

UNIVERSITÉ DE METZ

THÈSE

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L' UNIVERSITÉ DE METZ
Spécialité "TOXICOLOGIE DE L'ENVIRONNEMENT"

Présentée et soutenue publiquement
Le 26 Octobre 2000

Par

Géraldine AMBLARD-GROSS

**Bryophytes et Biomonitoring des Retombées
Atmosphériques en Métaux et Éléments Traces**

Caractérisation de la Variabilité à Différentes Échelles d'Utilisation

Directeurs de Thèse :
Professeur J.F. FERARD
Professeur A. MAUL

Composition du Jury:

M. P.M. Badot, Professeur,	Université de Franche-Comté	rapporteur
Mme C. Van Haluwyn, Professeur,	Université de Lille II	rapporteur
M. J.F. Férard, Professeur,	Université de Metz	
M. A. Maul, Professeur,	Université de Metz	
Mme S. Ayrault, Ingénieur CEA,	CEA de Saclay	invitée
Mme M. Bonnin-Mosbah, Ingénieur CEA,	CEA de Saclay	invitée
Mme L. Galsomiès, Ingénieur ADEME,	ADEME, Paris	invitée

UNIVERSITÉ DE METZ

THÈSE

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L' UNIVERSITÉ DE METZ

Spécialité **"TOXICOLOGIE DE L'ENVIRONNEMENT"**

Présentée et soutenue publiquement

Le 26 Octobre 2000

Par

Géraldine AMBLARD-GROSS

**Bryophytes et Biomonitoring des Retombées
Atmosphériques en Métaux et Éléments Traces**

Caractérisation de la Variabilité à Différentes Échelles d'Utilisation

Directeurs de Thèse :
Professeur J.F. FERARD
Professeur A. MAUL

Composition du Jury:

M. P.M. Badot, Professeur,	Université de Franche-Comté	rapporteur
Mme C. Van Haluwyn, Professeur,	Université de Lille II	rapporteur
M. J.F. Férard, Professeur,	Université de Metz	
M. A. Maul, Professeur,	Université de Metz	
Mme S. Ayrault, Ingénieur CEA,	CEA de Saclay	invitée
Mme M. Bonnin-Mosbah, Ingénieur CEA,	CEA de Saclay	invitée
Mme L. Galsomiès, Ingénieur ADEME,	ADEME, Paris	invitée

BIBLIOTHEQUE UNIVERSITAIRE - METZ	
N° inv.	2000 0235
Cote	S/M3 00/29
Loc	Magasin

Enfin une réponse à la question trop souvent posée par le "Curieux en forêt" :
"Est-il vrai que la mousse des arbres indique le Nord ???"

Réponse :

"C'est plus souvent le Nord que le Sud, mais l'orientation peut varier de l'Est à l'Ouest !"

Remerciements -

Après ces trois années passées au Laboratoire Pierre Süe, je dois dire que ce travail n'aurait pu aboutir sans la collaboration, l'amitié précieuse et le soutien moral de nombreuses personnes. Plus que des collaborateurs, j'y ai trouvé des amis (jeunes ...et moins jeunes !) avec le soutien et les encouragements nécessaires à cet exercice de fond qu'est la thèse !

Je tiens donc particulièrement à remercier M. J.F. Féraud pour avoir accepté la direction et l'encadrement de cette thèse, mais surtout pour avoir su être présent et disponible à chaque fois que nécessaire. Je ne peux qu'être reconnaissante pour toutes tes remarques et corrections toujours très constructives montrant le réel intérêt porté à ce sujet de recherche. Je suis également très redevable envers M. A. Maul pour avoir accepté de co-diriger cette thèse. Je ne peux que te remercier pour m'avoir guidée dans le domaine de la biostatistique avec des explications toujours très limpides et didactiques. Merci également à Mme S. Ayrault pour l'accueil et la confiance qu'elle a su donner à l'ensemble des initiatives prises pour la réalisation de ce travail. Je tiens aussi à remercier Mme M.A. Letrouit pour avoir co-encadré ce travail la première année, M. D. Savanne pour l'encadrement ADEME régulier et efficace, et Mme L. Galsomiès pour l'intérêt qu'elle a porté au sujet et à l'avancement des travaux. Je suis également reconnaissante envers M. S. Lequien pour avoir mis à ma disposition l'ensemble des outils du laboratoire Pierre Süe. Enfin, je ne peux que remercier M. P.M. Badot et Mme C. Van Haluwyn d'être les rapporteurs de ce travail de recherche.

Entre les idées et la réalisation effective du travail, il est un pas essentiel que je n'aurais pu franchir sans la collaboration et l'encadrement concret de nombreuses personnes et notamment de Mme F. Carrot et M. G. Meyer qui ont assuré les analyses ICP-MS très nombreuses et parfois difficiles à mettre en œuvre (de la minéralisation des poussières...à la réservation du calendrier pendant les périodes de "rush" !). L'utilisation du rayonnement synchrotron, sur l'impulsion de M. J.P. Duraud, a été encadré et suivi par Mme M. Bonnin-Mosbah et M. P. Chevallier qui ont su rendre accessible la physique des particules à une biologiste (ce n'était pas gagné !). Je n'oublie pas M. L. Daudin et M. J.P. Gallien pour la réalisation des mesures PIXE à la microsonde du laboratoire Pierre Süe et pour l'exploitation conjointe des résultats. La réalisation des cartes d'isoconcentrations a été rendue possible avec l'aide de M. E. Berthoumieux pour la manipulation de logiciels pas toujours conviviaux !

Il me faut également remercier le centre vital du laboratoire, l'Atelier, avec M. F. Saillant, M. S. Doublet, M. S. Boiziaux pour leur participation et efficacité dans la réalisation des transplants (supports et plateformes) et surtout pour leur humeur joyeuse et leurs plaisanteries très souvent grivoises !

Pour les collaborations externes avec les différents réseaux (SRSE, CEA de Saclay) et agences de surveillance de la qualité de l'air ASPA et ARSQA (coordonnées par le réseau MERA-Mesure des Retombées Atmosphériques), je me dois de remercier très vivement M. P. Coddeville (Ecole des Mines de Douai), M. B. Elsass (ASPA) et M. P. Béguinél (SRSE) pour la mise à disposition des sites et la participation effective à ce projet de recherche. Je tiens également à remercier M. J.M. Ducruet (laboratoire de Bioénergétique, CEA de Saclay) pour m'avoir encadrée dans la réalisation des mesures d'induction de fluorescence de la chlorophylle.

Enfin, les amis et proches... ah ! avec eux, le temps a passé trop vite ! Alors, dans le désordre et forcément gagnant :

MERCI à Elisa, Zerguy le p'tit homme vert, Marica la bella, Patricia, Xou, Francine, Agnès, la petite Nicole, Elie-Songe, Stéphane, Zcris, Mélanie, Hervé, Chantal, Anne, Séverine, Delphine...et encore et toujours GéoM.

Je dédicace l'intégralité de ce travail à mon quatuor familial David, André, Yvette et Cléo.

SOMMAIRE

Sommaire	1
Introduction générale	5
Publications et Communications	7

1 - CHAPITRE I - Comparaison statistique de deux techniques d'analyse multiélémentaires (AAN et ICP-MS) dans une étude de biomonitoring passif des retombées atmosphériques en métaux et éléments traces

1.1. Introduction	11
1.2. Matériel et Méthode	11
1.3. Résultats et Discussion	12
1.3.1. Comparaison entre ICP-MS et AAN pour différents matériaux de référence	13
1.3.2. Comparaison de ICP-MS et AAN pour les mousses françaises	14
1.3.3. Régressions entre les résultats ICP-MS et AAN pour les mousses françaises	16
1.4. Conclusion	17
1.5. Bibliographie	19

2 - CHAPITRE II - Variabilité Spatiale d'Echantillonnage : impact du maillage sur la quantification des retombées atmosphériques

2.1. Introduction	23
2.2. Matériel et Méthode	24
2.2.1. Plan d'expérience	24
2.2.2. Campagne d'échantillonnage et Bilan	25
2.2.3. Préparation des échantillons et analyse par ICP-MS	27
2.2.4. Traitement Statistique	27
2.2.4.1. Analyse des Composantes de Variance	27
2.2.4.2. Optimisation du protocole d'échantillonnage, étude de Variance Totale et Coût	28
2.3. Résultats et Discussion	30
2.3.1. Bilan de la campagne d'échantillonnage	30
2.3.2. Bilan des analyses ICP-MS, choix des éléments	32
2.3.3. Variabilité spatiale des éléments	33
2.3.3.1. Interprétation sans la variance résiduelle	33
2.3.3.2. Interprétation avec la variance résiduelle	35
2.3.4. Etude Coût-Bénéfice	37
2.3.5. Validité des cartes d'isoconcentration	38
2.4. Conclusion	45
2.5. Bibliographie	46

3 - CHAPITRE III - Conversion Stock-Flux : Calibration d'un outil de Biomonitoring Actif et des Retombées Atmosphériques Réelles _____ **49**

3.1. Introduction	51
3.2. Material and Method	52
3.2.1. "Moss Plate" construction and exposition design	52
3.2.2. Chlorophyll Fluorescence Induction	53
3.2.3. Parallel exposition of transplanted mosses and total deposition gauges	53
3.2.3.1. Stock-Flux conversion experiment	53
3.2.3.2. Biological Material for SXRF experiment	53
3.2.3.3. Preparation and analysis	54
3.2.4. Statistics	55
3.3. Results and Discussion	55
3.3.1. Chlorophyll Fluorescence Induction : viability of the "Moss Plate"	55
3.3.2. Stock-Flux conversion experiment (ICP-MS)	56
3.3.2.1. Moss results	56
3.3.2.2. Bulk collector results	57
3.3.2.3. Stock-Flux conversion for Ba, Pb, Sb, Ti	60
3.3.3. In vivo distribution of element enrichment (SXRF)	61
3.4. Conclusion	63
3.5. Literature Cited	64

4 - CHAPITRE IV - Localisation des métaux et éléments traces : Analyse in vivo de Bryophytes par les techniques SXRF et PIXE _____ **67**

4.1. Introduction	69
4.2. Material and Method	70
4.2.1. Protocol	70
4.2.2. SXRF experimental arrangement	71
4.2.3. ICP-MS preparation	71
4.2.4. Micro PIXE experimental arrangement	71
4.2.5. Statistics	72
4.3. Results and Discussion	73
4.3.1. Passive Biomonitoring	73
4.3.2. PIXE observations	75
4.3.3. Active Biomonitoring	75
4.4. Literature Cited	76
4.5. FIGURES 1 à 5; TABLEAUX I à IV, Supporting Informations, TABLEAUX I à IV	78

Conclusion générale _____ **95**

Données Bibliographiques	99
1.1. Aspects Généraux relatifs au Biomonitoring, aux mousses et aux métaux	99
1.1.1. Introduction	99
1.1.2. Bioindication, Biomonitoring et termes reliés	99
1.2. Généralités sur les Mousses	101
1.2.1. Biologie des mousses	101
1.2.2. Ecologie des mousses	102
1.2.3. Réponses des mousses à la pollution de l'air	103
1.2.4. Effets biochimiques et physiologiques du stress	103
1.2.5. Procédés de capture et d'accumulation des métaux et éléments traces	104
1.2.6. Les métaux et éléments traces dans la mousse	106
1.2.6.1. Localisation cellulaire	106
1.2.6.2. Analyse de la localisation des cations	107
1.2.6.3. Effet de l'âge sur la localisation	109
1.3. Généralités sur les Métaux	111
1.3.1. Le terme "Métaux Lourds"	111
1.3.2. La classification de Nieboer et Richardson, 1980	111
1.3.3. Les métaux et éléments traces dans l'environnement	112
1.3.3.1. Apports atmosphériques, sources et comportements	112
1.3.3.2. Retombées atmosphériques réelles, mesures et surveillances des particules	113
1.3.3.3. Classification basée sur les effets sur la santé	114
1.4. Généralités sur le Biomonitoring des métaux et éléments traces par les mousses	115
1.4.1. Faisabilité d'utilisation des mousses pour les études à grande échelle	115
1.4.1.1. Corrélations entre les retombées atmosphériques réelles et le contenu des mousses	116
1.4.1.2. Contribution d'autres facteurs (pluiolessivats, sol)	117
1.4.1.3. Etape de la calibration interespèces	118
1.4.1.4. Analyse et contrôle de la qualité	119
1.4.2. Biomonitoring Actif, la technique des "moss bags"	120
1.5. Etudes Statistiques	121
1.5.1. Concepts statistiques des plans d'échantillonnage	121
1.5.2. Plan d'échantillonnage	121
 Références	 123

Annexes Générales	131
Annexe I : Eléments de Biologie et d'Ecologie des Bryophytes	133
Annexes du Chapitre I	139
Annexes du Chapitre II	149
Principaux sites émetteurs recensés par la DRIRE Ile-de-France	150
Homogénéité des broyats	151
<i>Tests</i>	151
<i>Résultats</i>	152
Analyse des composantes de Variance, détail des calculs	155
Test de Fisher sur les variances	157
Principe de l'interpolation par krigeage	158
Annexes du Chapitre III	159
Principe de l'induction de la fluorescence de la chlorophylle	160
Protocole de préparation des échantillons (mousses, jauges "Owen") du terrain à l'analyse	162
Tests de représentativité du "moss plate", limites de détection et de quantification (ICP-MS)	164
<i>Tests d'homogénéité des broyats</i>	164
<i>Limites de détection et de quantification</i>	166
Figures 4, 5, 6, 7	168
Conversion Stock-Flux	171
Modélisation de la relation stock-flux par régression multiple, codage des variables	171
Exemples d'application pour Ba, Pb, Sb, Ti : Tableaux VI, VII, VIII et IX et Figures 8, 9 et 10	172
Annexes du Chapitre IV	175
Principe de la méthode d'analyse par SXRF	176
Principe de la méthode d'analyse par PIXE	180
Schémas des protocoles expérimentaux appliqués au biomonitoring passif	181
<i>Protocole général</i>	182
<i>Protocole pour estimer l'effet d'un pré-traitement par lavage des brins</i>	184
<i>Protocole pour estimer l'effet d'un pré-traitement par lavage des brins avec ou sans ajout initial de Zn (50µg/l)</i>	185
Schéma du protocole expérimental appliqué au Biomonitoring Actif	186
Schéma du protocole expérimental pour l'analyse en micro faisceau PIXE	187
Détails des résultats	188
<i>Analyses ICP-MS des mousses échantillonnées dans les 7 sites</i>	189
<i>Analyses de régressions sur As, Ba, Cu, Ni, Pb, Ti et Zn pour la conversion entre les données SXRF in vivo et ICP-MS</i>	192
<i>Effets du lavage des brins</i>	195

Publications et Communications

Cette thèse de publications est composée de 4 chapitres dont 2 ont fait l'objet de publications et 2 sont soumis à des revues internationales.

Articles acceptés

CHAPITRE I :

- **“Comparaison statistique de 2 techniques d’analyse multiélémentaires (AAN et ICP-MS) dans une étude de biomonitoring de la pollution atmosphérique en métaux lourds”**

Proceeding of Journées techniques de la CETAMA, “mesures et analyses dans les matrices environnementales et biologiques”, 14-15/09/99, Cadarache, France

AMBLARD G., SCIARRETTA M.D., CARROT F., AYRAULT S., BONHOMME P., GALSOMIES L., DESCHAMPS C.

CHAPITRE III :

- **“Biological Fluxes Conversion : a new biomonitoring tool for atmospheric metals and trace elements deposition”**

Proceeding of BioMAP, 2nd International Workshop on Biomonitoring of Atmospheric Pollution, 29/08 to 01/09/2000, Terceira Island, under publication IAEA Tecdoc Series,

AMBLARD-GROSS G., FERARD J.F., CARROT F., MAUL A., DUCRUET J.M., BEGUINEL P., CODDEVILLE P., AYRAULT S. and GALSOMIES L.

Articles soumis

CHAPITRE II :

- **“Sampling Spatial Variability : Grid Size Impact on Atmospheric metals and trace elements depositions mapping with mosses”, *Environmental and Ecological Statistics,***

AMBLARD-GROSS G., MAUL A., FERARD J.F. and CARROT F.

CHAPITRE IV :

- **“SXRF, PIXE and ICP-MS techniques for *in vivo* study of Metals and Trace Elements Distribution in Bryophytes”, *Environmental Science and Technology,***

AMBLARD-GROSS G., FERARD J.F., BONNIN-MOSBAH M., CHEVALLIER P., MAUL A., DAUDIN L., CARROT F., AYRAULT S.

Autre Article Acceptés et Communications

- **"Multi-analysis of trace elements in mosses with inductively coupled plasma mass spectrometry"** *Biological Trace Elements Research*, **Accepted**
AYRAULT S., BONHOMME P., CARROT F., AMBLARD G., SCJARRETTA M., GALSOMIES L.
- Journées de la Radiochimie, 02-04/09/98, Nantes, France
"Combinaison de 2 techniques d'analyse multiélémentaires, AAN et ICP-MS, pour l'étude des retombées atmosphériques"
AMBLARD G., AYRAULT S.
- 9th Annual Meeting of SETAC-Europe, 25-29 May 99, Leipzig, Germany
"Biological Fluxes conversion : a new biomonitoring tool for atmospheric heavy metals deposition, first results"
AMBLARD G., CARROT F., DUCRUET J.M., CODDEVILLE P., FERARD J.F.
- Journées scientifiques du DRECAM, 17-19/01/2000, CEA de Saclay, Gif-sur-Yvette, France
"Localisation de métaux lourds dans des plantes bioaccumulatrices, les mousses, par sonde photonique et sonde nucléaire"
AMBLARD G., BONNIN-MOSBAH M., CHEVALLIER P., POPULUS P., DAUDIN L., GALLIEN J.P., FERARD J.F., AYRAULT S., DURAUD J.P.

Introduction générale

La qualité de l'air et son suivi à court et long termes sont des sujets d'actualité qu'il convient d'aborder en diversifiant les approches expérimentales.

Le biomonitoring, ou biosurveillance, a pour objectif principal d'évaluer les quantités et la distribution de certains polluants dans des individus d'espèces choisies. L'utilisation des Bryophytes, et plus précisément des mousses, dans les études de biomonitoring des retombées atmosphériques en métaux et éléments traces a débuté en 1980 par un projet commun danois et suédois (GYDESEN *et al.*, 1983) pour être amplifiée et poursuivie dès 1985 par des campagnes européennes quinquennales de surveillance (RÜHLING et STEINNES, 1998). Les objectifs de ces études à grande échelle sont la caractérisation et la cartographie qualitative et quantitative de ces retombées atmosphériques.

Cependant, l'utilisation des mousses pour de tels objectifs fait intervenir différentes étapes depuis l'idée scientifique de départ jusqu'à l'interprétation finale des résultats. Toutes ces étapes intermédiaires (échantillonnage de terrain, préparation et analyse des échantillons, interprétation des données, etc.) contribuent à augmenter le risque d'erreurs d'estimation et donc la variabilité totale (FIGURE 1). Classiquement, certaines étapes sont connues pour contribuer plus ou moins à l'erreur d'estimation comme l'échantillonnage de terrain (>1000 %), la préparation des échantillons avant analyse (100-300%), les analyses elles-mêmes (2-20%) et l'interprétation des résultats (>50%) (MARKERT, 1996).

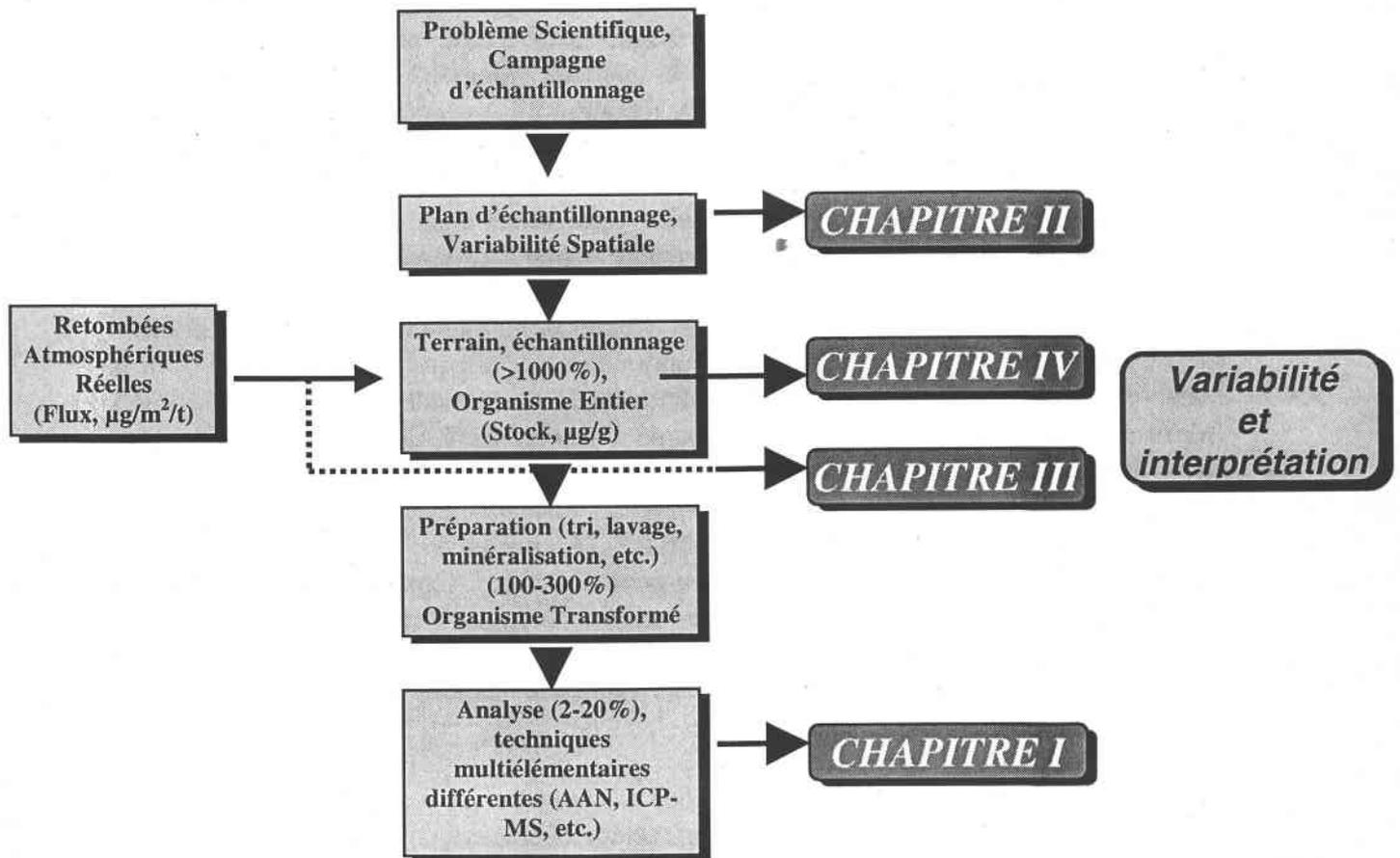


FIGURE 1 : Schéma des principales étapes et des erreurs d'estimation associées (exprimées en %, MARKERT, 1996) à un protocole de prélèvement et d'analyse d'échantillons environnementaux. Le plan de contribution à l'explication de la variabilité globale est indiqué pour chaque Chapitre (I à IV).

Mais, certains aspects fondamentaux concernant la validité d'utilisation des mousses restent encore trop peu explorés. Par exemple, dans un objectif de comparaison à l'échelle européenne, quel est le poids de la technique d'analyse utilisée par chaque pays participant dans l'interprétation des cartes ? Quel crédit peut-on donner à un échantillonnage unique supposé représentatif d'une maille de 1000 km² ? Quelle peut être la variabilité d'échantillonnage au niveau spatial ? Les variations spatiales des teneurs sont-elles réelles ou imputables à la méthode biologique ? Comment interpréter le contenu de la mousse par rapport aux retombées réelles ? Est-il possible de le convertir en retombées atmosphériques sèches réelles ? Où se localisent les métaux dans la mousse ? Sont-ils distribués de façon homogène ?

Ce travail de thèse, débuté en Novembre 1997, a exploré l'ensemble de ces questions par la mise en place et la réalisation de différentes orientations de recherche complémentaires et de complexité croissante. Il présente sous la forme de 4 articles¹ (avec des annexes complémentaires détaillées pour chacun)² les différentes thématiques abordées traitant toutes d'un aspect de la variabilité dans l'utilisation de cet outil biologique (**FIGURE I**) :

1. **CHAPITRE I : La comparaison statistique de 2 techniques d'analyse multiélémentaires (AAN et ICP-MS) dans une étude de biomonitoring passif des retombées atmosphériques en métaux et éléments traces.** Cette étude de comparaison à l'échelle nationale (campagne française de 1996) a pour objectif de mettre en évidence les probables influences du choix des méthodes analytiques dans l'homogénéisation des cartes d'isoconcentrations européennes et leur interprétation ;
2. **CHAPITRE II : La variabilité spatiale d'échantillonnage : impact du maillage sur la quantification des retombées atmosphériques.** Cette étude effectuée à une échelle régionale estime et valide la faisabilité de la méthode "mousse" quant à la cartographie des retombées atmosphériques. Elle tente de répondre à la question de représentativité de l'échantillonnage et d'optimisation des futures campagnes, compte tenu d'un aspect coût-bénéfice ;
3. **CHAPITRE III : La conversion stock-flux : calibration d'un outil de biomonitoring actif et des retombées atmosphériques réelles.** Cette troisième étude qui se situe à l'échelle d'une population de mousses rend compte de la mise au point d'un nouvel outil de biomonitoring actif utilisant des mousses vivantes et permettant d'expliquer le contenu des mousses avec différentes variables (quantitatives et qualitatives). Ce chapitre a vu la collaboration du laboratoire de Bioénergétique (CEA de Saclay), du réseau MERA (Mesure des Retombées Atmosphériques), de l'ASPA, de l'ARSQA et du réseau de surveillance du site CEA de Saclay (SRSE) ;
4. **CHAPITRE IV : La localisation des métaux et éléments traces dans les mousses : analyse in vivo par les techniques de SXRF (Fluorescence X sous Rayonnement Synchrotron) et PIXE (Emission X induite par Particules).** Ce dernier chapitre observe la variabilité de distribution et la localisation *in vivo* des métaux et éléments traces le long des brins de mousses et donc à l'échelle de l'individu. Elle montre aussi les potentialités de ces méthodes d'analyse dans la compréhension de la capture et des mouvements des éléments dans ces plantes.

L'ensemble de ces points précise un certain mode d'emploi de ces plantes dans les études de biomonitoring des retombées atmosphériques en métaux et éléments traces.

¹ voir § Publications et Communications

² voir Annexes Générales, Annexes des Chapitres I, II, III et IV.

CHAPITRE I - Comparaison statistique de deux techniques d'analyse multiélémentaires (AAN et ICP-MS) dans une étude de biomonitoring de la pollution atmosphérique en métaux lourds¹

Résumé

Depuis 1995, la France participe au Programme Européen de Recherche sur « l'estimation des retombées atmosphériques en métaux lourds en Europe par dosage dans les mousses » qui étudie les variations spatio-temporelles de dix éléments (As, Cd, Cr, Cu, Fe, Hg, Pb, Ni, V, Zn). La contribution française s'étend sur 36 éléments dosés par deux techniques différentes : ICP-MS (spectrométrie de masse couplée à une torche à plasma) et AAN (analyse par activation neutronique). Ce travail a porté sur la comparaison statistique de ces deux techniques d'analyse (563 échantillons analysés sur l'ensemble de la campagne) au travers de 12 éléments considérés (As, Ba, Ce, Co, Cr, Cs, Cu, Fe, La, Rb, Th, V).

L'influence du choix de la technique analytique est testée sur des matériaux de référence à teneurs recommandées (mousses M1, M2) (STEINNES et al., 1997) et certifiées (lichen IAEA 336, rye grass BCR CRM 281) puis sur les couples de mousses analysés par les deux techniques.

Pour les matériaux de références, certains éléments sont en limite de détection (As, Co, Th en ICP-MS pour M1 ; As en ICP-MS et AAN pour rye grass ; Cu en AAN pour M1, lichen et rye grass), d'autres ont des concentrations significativement différentes des références (Fe en ICP-MS pour M1 ; Co, Fe, Rb et V en ICP-MS pour M2 ; Rb en ICP-MS pour lichen ; Cr en ICP-MS pour rye grass ; Co, Cr, Fe, V en AAN pour M1 ; As, CR, Rb, Th, V en AAN pour M2 ; As, Cr, Cs, Fe, La, V en AAN pour lichen).

Pour les couples de mousses françaises, les dosages de Ba, Ce et Rb donnent des résultats équivalents en AAN et en ICP-MS. Par contre, l'ICP-MS surestime As, Co, Cs, Fe et V alors que l'AAN surestime Cr, Cu, La et Th.

Pour les éléments qui sont cartographiés (As, Cr, Fe, Cu et V), le choix de la technique (As, Cr et V avec dosages AAN ; Cu avec dosages ICP-MS) influence l'interprétation des cartes d'isodéposition de As et Cr. Le choix de l'AAN augmente la classe de contamination en Cr pour la France alors que, pour As, il sous-estime la teneur moyenne française. Des modèles de régression ont été établis entre AAN et ICP-MS pour Ba, Ce, Cs, Fe, La, Rb, Th ($r^2 > 91.1\%$) et V ($r^2 = 63.7\%$). Cependant aucun modèle satisfaisant n'a été trouvé pour As, Co, Cr et Cu. Ceci pose le problème d'une nécessaire homogénéisation des techniques d'analyse au niveau européen pour une interprétation correcte des cartes établies.

¹ Ce Chapitre est publié dans les actes du colloque « Journées techniques de la CETAMA, mesures et analyses dans les matrices environnementales et biologiques », 14-15/09/1999, Cadarache, France.

Abstract

Since 1995, France is involved in the Research European Program « atmospheric heavy metals deposition in Europe based on moss analysis » assessing the spatial and temporal variations of ten elements (As, Cd, Cr, Cu, Fe, Hg, Pb, Ni, V, Zn). France extends its contribution to 36 elements analysed by the ICP-MS (inductively coupled plasma mass spectrometry) and NAA (neutronic activation analysis) methods. This work deals with the statistical comparison of these two analytical technics (563 samples of mosses analysed in the all campaign) for 12 elements (As, Ba, Ce, Co, Cr, Cs, Cu, Fe, La, Rb, Th, V).

The influence of the analytical technic choice is tested through reference material with recommended (M1 and M2 mosses) (STEINNES et al., 1997) and certified values (lichen IAEA 336, rye grass BCR CRM 281) and moss pairs analysed by both methods.

For the reference materials, some elements are in detection limit (As, Co, Th, in ICP-MS for M1 ; As in ICP-MS and NAA for rye grass ; Cu in NAA for M1, lichen and rye grass), others have significant different concentrations from references (Fe in ICP-MS for M1 ; Co, Fe, Rb, V in ICP-MS for M2 ; Rb in ICP-MS for lichen ; Cr in ICP-MS for rye grass ; Co, Cr, Fe, V in AAN for M1 ; As, CR, Rb, Th, V in AAN for M2 ; As, Cr, Cs, Fe, La, V in AAN for lichen).

For the french moss pairs, analysis of Ba, Ce and Rb give equivalent results in NAA and ICP-MS. On the other hand, ICP-MS over-estimates As, Co, Cs, Fe, V whereas NAA over-estimates Cr, Cu, La and Th.

Par the mapped elements (As, Cr, Cu, Fe, V), the technic choice (As, Cr, V with NAA ; Cu with ICP-MS) influences the isodeposition map interpretation of As and Cr. The NAA choice for Cr increases the contamination class for France whereas, for As there is an under-estimation of the french mean concentration. Some regression models have been tested successfully for the ICP-MS/NAA conversion for Ba, Ce, Cs, Fe, La, Rb, Th ($r^2 > 91.1\%$) and V ($r^2 = 63.7\%$). However, no model has been found for the As, Co, Cr and Cu elements leading to a necessary homogenisation of the analytical technics at the european level for a correct map interpretation.

Comparaison statistique de deux techniques d'analyse multiélémentaires (AAN et ICP-MS) dans une étude de biomonitoring de la pollution atmosphérique en métaux lourds

AMBLARD G.*, SCIARRETTA M.D.*, AYRAULT S.*, CARROT F.*, BONHOMME P.**, GALSOMIES L.*** et DESCHAMPS C.*

* Laboratoire Pierre Süe, CEA-CNRS

** Centre des Faibles Radioactivités, CEA-CNRS

*** ADEME, Département Air, Direction Air et Transports, Centre de Paris

1.1 Introduction

Depuis 1995, le programme européen de recherche intitulé "Estimation des retombées atmosphériques de métaux lourds en Europe par dosage dans les mousses" (RÜHLING et STEINNES, 1998) étudie les variations spatio-temporelles de 10 éléments d'intérêt écotoxicologique (As, Cd, Cr, Cu, Fe, Hg, Pb, Ni, V, Zn). Les végétaux utilisés sont des mousses (Bryophytes), couramment utilisées pour les études de biomonitoring des métaux et éléments traces, ayant une large répartition géographique et présentes en grandes quantités.

La contribution française à ce programme s'étend sur 36 éléments qui ont été analysés par deux techniques, l'Analyse par Activation Neutronique (AAN) et l'ICP-MS. Dans le cadre de ce programme européen, différentes techniques d'analyse sont utilisées (AAN, ICP-MS, ICP-AES, XRF, AAS) par les pays participants.

Aussi, dans un objectif de comparaison à l'échelle européenne, il apparaît nécessaire d'estimer l'influence de la méthode d'analyse choisie dans l'interprétation et l'exploitation des résultats. De plus, la difficulté d'effectuer des analyses multiélémentaires pour un grand nombre d'échantillons biologiques (faisabilité, limites de détection, variabilité analytique...) voit la nécessité d'utiliser des méthodes complémentaires.

Les résultats présentés illustrent, dans le cadre des mousses françaises, la faisabilité d'utilisation de l'AAN et l'ICP-MS par rapport à des matériaux de référence (mousses, lichen, rye grass) pour 12 éléments considérés (V, Cr, Fe, Co, Cu, As, Rb, Cs, Ba, La, Ce, Th). La comparaison est ensuite étendue, pour les mêmes éléments, aux mousses échantillonnées sur l'ensemble du territoire et l'influence du choix de la méthode d'analyse dans l'interprétation des cartes d'isodéposition européennes est mise en évidence.

1.2 Matériel et Méthode

563 mousses ont été échantillonnées sur l'ensemble du territoire français (GALSOMIES et al., 1999). Chaque échantillon a été trié, séché 24 heures à 40°C puis broyé selon le protocole européen (RÜHLING et STEINNES, 1998).

Pour les analyses par activation neutronique, 2 échantillons de 70 mg mélangés à de la cellulose ultra pure ont été pastillés pour être soumis à une irradiation courte (conditionnement polyéthylène) et une irradiation longue (enveloppé dans une feuille d'aluminium ultra pur).

Les irradiations ont été faites au réacteur Orphée avec 1 minute d'irradiation sous un flux de neutrons thermiques de $1,3 \cdot 10^{13} \text{ n.cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ pour les isotopes de période courte (^{28}Al au ^{24}Na) et 2 temps de comptage (2 et 15 minutes après irradiation). Les isotopes de période longue (^{24}Na au ^{60}Co) ont été mesurés, après 17 heures d'irradiation sous un flux de $2,3 \cdot 10^{13} \text{ n.cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$,

pendant 2 et 5 heures après 4 et 15 jours de décroissance. Les dépouillements des spectres ont été réalisés avec le logiciel KOLabsue (PICCOT et al., 1997).

Pour les analyses par ICP-MS, une même quantité de mousse, 70 mg environ, a été minéralisée (matras PTFE, micro ondes avec 5 ml HNO₃, 5 ml H₂O₂, 5 ml HF, 3 ml HNO₃ et 10 ml H₂O). Les solutions ont ensuite été acidifiées (0,5 ml HNO₃) et les standards internes (Be, In, Re) ajoutés pour l'obtention d'une concentration finale de 10 ng.ml⁻¹ dans 20 ml de solution. Les analyses ont été effectuées au moyen d'un ICP-MS VG Plasmaquad II.

Dans le cadre du programme européen, des comparaisons interlaboratoires (STEINNES et al., 1997) ont permis la mise au point de mousses certifiées (M1 et M2, *Pleurozium schreberi*) pour un nombre important d'éléments.

Ces mousses M1 (moins chargée) et M2 (plus chargée) ont été utilisées comme matériaux de référence, de même que le lichen IAEA 336 (*Evernai prunasti*, L., Ach.) et le Rye Grass CRM 281 (BCR, Reference Materials) pour les 2 techniques d'analyses AAN et ICP-MS.

1.3 Résultats et Discussion

Les éléments étudiés sont V, Cr, Fe, Co, Cu, As, Rb, Cs, Ba, La, Ce et Th, dosés par AAN et ICP-MS. Les irradiations longues ont permis la détermination de As, Ba, Ce, Co, Cr, Cs, Fe, La, Rb et Th et les irradiations courtes celle de Cu et V.

technique utilisée	ICP-MS	AAN
V*	0,1	0,4
Cr*	0,5	0,1
Co	1,1	0,04
Cu*	0,3	1
As*	0,4	0,04
Rb	0,4	5
Cs	0,02	0,04
Ba	1	2
La	0,1	0,003
Ce	0,1	0,1
Th	0,04	0,004
Fe*	50	20

TABLEAU I : Limites de détection obtenues par ICP-MS et AAN ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) dans les mousses échantillonnées en France.

L'ICP-MS couvre l'ensemble des éléments cités précédemment mais, en pratique, certaines interférences isobariques gênent l'analyse de certains éléments comme Fe, par exemple. Les limites de détection ont été calculées sur les blancs de réactifs (3 fois l'écart-type) pour l'ICP-MS. En AAN, les limites de détection sont évaluées en fonction de l'activité gamma de fond. Dans les mousses, elles sont dues au Mn pour les irradiations courtes de Cu et V, au Na pour As et La et au Sc pour Ba, Ce, Co, Cr, Cs, Fe, Rb, Th (TABLEAU I).

Pour les éléments tels que Co, Cu, As, Rb, Th et La, les limites de détection entre les deux méthodes varient d'un « ordre de grandeur ». L'AAN est plus sensible pour As, Co, La et Th et l'ICP-MS pour Cu, Rb. Les éléments V, Cr, Cs, Ba et Ce ont des limites de détection comparables pour les deux techniques. Fe a une limite de détection très élevée en ICP-MS, mais qui reste également forte en AAN.

* indique les éléments appartenant au Programme Européen de Recherche (RÜHLING et STEINNES, 1998).

1.3.1 Comparaison entre ICP-MS et AAN pour différents matériaux de référence

Les matériaux de référence (**TABLEAU II**) ont été régulièrement analysés avec les échantillons du Programme Européen par les deux méthodes. Les résultats obtenus par chaque méthode ont été ensuite comparés statistiquement avec les valeurs certifiées (*Lichen 336 IAEA, Rye Grass BCR CRM 281*) et recommandées (*M1, M2, STEINNES et al., 1997*)*. Les comparaisons entre les distributions théoriques et expérimentales ont été effectuées par des tests de Kolmogorov-Smirnov ($\alpha=0.05$) qui possèdent l'avantage d'être plus puissants que le test du khi carré et qui s'appliquent pour des effectifs faibles ($n=10$ à 20 échantillons).

Pour l'ICP-MS, les résultats montrent que les éléments As, Co et Th sont en limite de détection pour la mousse M1 (la moins chargée). L'As est correctement mesuré dans la mousse M2 (la plus chargée) mais, Co et V sont surestimés dans les mesures observées par rapport aux recommandées. Cette surestimation est sans doute due pour Co et V à des interférences isobariques (interférences Ar-Cl sur l'isotope V 51). Fe est surestimé pour M1 et M2, en raison d'interférences importantes (Ar-O pour l'isotope 56). C'est l'isotope 57 du fer qui est utilisé car moins interféré mais aussi moins sensible.

Pour l'AAN, les teneurs As et Rb sont sous-estimées pour les fortes concentrations (M2) peut-être en raison d'interférences dans le comptage, notamment par Sc. Co est sous-estimé dans M1 bien qu'ayant une bonne limite de détection par cette méthode. La est lui aussi sous-estimé mais pour les fortes concentrations (Lichen 336). V et Cr n'ont pas de mesures correctes par AAN pour les deux mousses et le lichen. V est sous-estimé (hypothèse d'interférence par le Mn : à vérifier) Il est probable qu'une interférence de V par Mn vienne sous-estimer la valeur réelle (hypothèse d'interférences à vérifier) et Cr sur-estimé pour les deux mousses et le lichen (de 33 à 91%), mais en accord pour le Rye Grass. Seule la mousse M2 a une valeur de Cr qui n'a pas bénéficié de l'AAN pour la teneur recommandée (STEINNES et al., 1997).

Dans le cas de Cr, plusieurs hypothèses ont été formulées pour expliquer cette différence (*désaccords entre les deux méthodes d'analyse : sur-estimation de Cr par AAN et/ou sous-estimation par ICP-MS**). Notamment, il pourrait s'agir d'une contamination systématique par la pastilleuse (*pastilles de mousses*) (pression de 5 tonnes.cm⁻² dans une matrice en alliage) ou par la cellulose employée dans les analyses AAN (stabilité de la poudre en pastille pendant l'irradiation). Enfin, une dernière hypothèse concerne la mise en solution incomplète ou une volatilisation des composés de Cr lors de la minéralisation préalable à l'analyse des mousses par ICP-MS.

Afin de vérifier ces hypothèses, de la cellulose vierge non pastillée et pastillée a été analysée par AAN. Les concentrations rencontrées dans la cellulose non pastillée sont de 0.08 ± 0.03 µg/g et celles de la cellulose pastillée sont de 0.19 ± 0.01 µg/g. Ces résultats ne permettent pas d'expliquer ces variations.

Des étalons primaires de chrome (fil d'aluminium dopé à 0.105%) ont été analysés par AAN. La teneur mesurée est de $0.107 \pm 0.002\%$ de Cr. Cela montre que l'AAN doublée de la méthode K0 produit des résultats justes pour Cr.

Pour Cr en ICP-MS, une intercomparaison ICP-MS/AAS avec un autre laboratoire (Ispra, Italie) montre que les résultats (*dosages de minéralisats identiques**) sont très proches par les deux méthodes. De plus, les résultats sur les lichens AIEA, ou sur d'autres matrices (roches, eaux...) sont corrects par ICP-MS. La méthode n'est donc pas en cause.

* Le texte indiqué en *italique* correspond à des ajouts effectués dans l'article après publication pour une meilleure compréhension dans le manuscrit de thèse.

Ce qui est intéressant de remarquer, c'est la surestimation systématique de l'AAN par rapport aux méthodes ICP-MS/AAS dans ce travail d'inter-comparaison (AAN/ICP-MS ; AAN/AAS) montre que c'est la minéralisation qui est en cause.

1.3.2 Comparaison de ICP-MS et AAN pour les mousses françaises pour As, Ba, Ce, Co, Cu, Cr, Cs, Fe, La, Th, Rb et V

Dans un objectif de comparaison européenne des variations spatio-temporelles des retombées atmosphériques, il est nécessaire d'estimer le biais amené par la méthode analytique choisie dans l'exploitation et l'interprétation des résultats.

Au cours de cette première campagne impliquant la France, les résultats rendus et cartographiés ont été effectués par AAN pour les éléments As, Cr, Fe et V et par ICP-MS pour Cu en fonction de critères de faisabilité bien qu'ils aient été tous analysés par les deux méthodes. Les éléments analysés en plus de ceux du programme européen, c'est-à-dire Ba, Ce, Co, Cs, La, Th et Rb, ont été dosés par les deux méthodes mais seuls les résultats AAN ont été enregistrés dans la base de données ADEME (ANADEME^{*}). Plusieurs centaines de couples de données ont pu être comparés par des tests T sur données appariées.

Les résultats (TABLEAU III) montrent que Ba, Ce et Rb donnent des résultats équivalents en ICP-MS et en AAN. L'ICP-MS surestime As, Co, Fe, V et dans une moindre mesure Cs. L'AAN surestime Cr, Cu, La et Th.

La surestimation de l'ICP-MS par rapport à l'AAN concerne les éléments atomiques de masse inférieure à 80 et donc classiquement gênés par des interférences isobariques.

Ces différences entre AAN et ICP-MS ont déjà été constatées dans de précédentes études (STEINNES et al., 1993). Dans cette étude, la mousse utilisée est Hylocomium splendens et des différences analytiques sont montrées pour Fe, Cr, Co et V entre autres. Pour les éléments Fe et Co, la comparaison des techniques donnent des résultats inverses aux mousses françaises et, dans leur cas, c'est l'AAN qui surestime par rapport à l'ICP-MS. Il se pourrait donc que les valeurs ICP-MS françaises pour ces éléments soient influencées essentiellement par des interférences isobariques. Par contre, les différences constatées pour Cr et V vont dans le même sens que les dosages français avec une surestimation de l'AAN par rapport à l'ICP-MS. Il est d'ailleurs surprenant de constater dans cette étude (STEINNES et al., 1993) que la concentration de Cr double aussi lorsque cet élément est analysé par l'AAN par rapport à l'ICP-MS, ce qui est exactement similaire aux résultats français. Il semblerait donc que la minéralisation soit une explication justifiée quant à la perte de Cr dans les mousses.*

La surestimation de Cu par l'AAN est due à un problème de limite de détection très élevée. En effet, en AAN, la raie principale de Cu à 511 keV est interférée par Na, il faut donc beaucoup de Cu pour voir une autre raie d'intensité plus faible à 1345 keV.

La surestimation de Cr par l'AAN est très importante et donne des résultats doubles de la valeur ICP-MS.

Nous avons vu que les explications viennent des deux méthodes : d'une part une contamination lors du pastillage pour AAN, d'autre part une mise en solution incomplète pour l'ICP-MS.

* Le texte indiqué en italique correspond à des ajouts effectués dans l'article après publication pour une meilleure compréhension dans le manuscrit de thèse.

Eléments	AAN ($\mu\text{g/g}$)	Statistique (Tests t apparié)	ICP-MS ($\mu\text{g/g}$)	r, coefficient de corrélation linéaire	r^2 (%), coefficient de détermination
As (190)	0,63 \pm 0,18	< **	0,99 \pm 0,16	0,65	42
Ba (38)	26,28 \pm 5,88	=	25,67 \pm 5,15	0,95	91,1
Ce (97)	1,77 \pm 0,52	=	1,47 \pm 0,32	0,956	91,39
Co (44)	0,36 \pm 0,07	< **	1,29 \pm 0,22	0,34	11,84
Cr (347)	4,14 \pm 0,40	> **	2,23 \pm 0,21	0,46	21
Cs (40)	0,278 \pm 0,064	< *	0,315 \pm 0,076	0,98	96,9
Cu (70)	11,38 \pm 1,28	> **	8,28 \pm 1,01	0,41	19,5
Fe (100)	585,8 \pm 152,2	< **	646,7 \pm 149,9	0,969	93,89
La (42)	0,97 \pm 0,23	> *	0,83 \pm 0,19	0,97	93,3
Rb (99)	18,13 \pm 4,15	=	17,36 \pm 3,86	0,988	97,61
Th (97)	0,195 \pm 0,06	> *	0,163 \pm 0,044	0,96	92,38
V (290)	3,14 \pm 0,23	< **	3,94 \pm 0,28	0,8	63,69

TABLEAU III : Comparaisons statistiques entre résultats ICP-MS et AAN (tests t sur données appariées, $\alpha=0.05$, moyenne \pm intervalle de confiance) pour les mousses échantillonnées en France avec essais de régressions linéaires. * $p<0.01$ ** $p<0.001$.
(Le nombre de couples AAN/ICP-MS est indiqué entre parenthèses*)

La comparaison des résultats obtenus entre les techniques d'analyse est très importante car elle peut expliquer les différences de concentrations observées entre la France et les pays limitrophes pour certains éléments. *Les cartographies européennes ont été élaborées alors que environ la moitié des mousses françaises récoltées avait été dosée. Cependant, les conséquences du choix de l'une ou l'autre des deux méthodes sur l'interprétation des cartes d'isodéposition sont déjà visibles**. En effet, pour As les résultats obtenus par AAN ont été cartographiés en France alors que les pays voisins ont donné des valeurs ICP-MS. D'après les tests statistiques des données françaises, l'AAN sous-estime la valeur de cet élément par rapport à l'ICP-MS. En prenant les données ICP-MS françaises, la France devrait apparaître plus chargée en As qu'elle ne l'est par rapport à ses voisins européens (**Figure 1**)**. La charge globale française en As serait sous-estimée sur les cartes disponibles.

Pour Cr, c'est le cas inverse. En effet, Cr a été cartographié avec les valeurs AAN qui sont en moyenne le double des valeurs ICP-MS. Globalement, la France apparaît plus chargée que les pays voisins (**Figure 2**)** alors que, si les valeurs Cr ICP-MS étaient cartographiées, la classe de contamination serait deux fois plus faible. Autrement dit, avec les données AAN pour Cr, la France se "pénalise" par rapport aux pays voisins. Pour les 2 autres éléments appartenant au programme européen, Cu et V, même si ce sont les résultats ICP-MS et AAN qui ont été respectivement cartographiés, les classes de concentration ne sont pas modifiées, ou pas de façon significative, ne changeant pas l'interprétation des cartes (**Figures 3 et 4**)**.

* Le texte indiqué en *italique* correspond à des ajouts effectués dans l'article après publication pour une meilleure compréhension dans le manuscrit de thèse.

** Les figures signalées ne sont pas publiées mais ajoutées à l'Annexe du Chapitre I (voir dans Annexes Générales) pour une meilleure compréhension.

1.3.3 Régressions entre les résultats ICP-MS et AAN pour les mousses françaises

Dans un objectif de comparaison spatio-temporelle à l'échelle européenne, il apparaît donc essentiel d'uniformiser le choix des techniques d'analyses utilisées pour une interprétation comparable des cartes d'isodéposition.

Les résultats (**TABLEAU III**) montrent que de simples régressions linéaires et multiplicatives donnent des résultats satisfaisants ($r > 0.95$ et $r^2 > 91\%$) pour Ba, Ce, Cs, Fe, La, Rb et Th (**Figures 5 à 11**)**. Pour Ba, Ce et Rb, ces régressions ne sont pas nécessaires en raison d'absence de différence significative entre les AAN et ICP-MS*. Les deux méthodes analytiques seraient donc parfaitement utilisables et interchangeables pour ces éléments.

Dans le cas de V, le faible coefficient de détermination ($r^2 = 64\%$) devrait pouvoir être amélioré par d'autres modèles (en tenant compte de l'influence possible de certains éléments) (**Figure 12**)**.

Pour les éléments As, Cr (**Figures 13 et 14**)**, Co et Cu, les différents modèles de régressions linéaires et non linéaires ne donnent pas de résultats satisfaisants ($r^2 < 42\%$). Ils mettent ainsi en évidence des variations entre les deux méthodes qui ne sont pas forcément systématiques et donc difficilement contrôlables. D'autres modèles de régressions multiples pour ces éléments seraient à envisager.

Les modèles proposés pour Ba, Ce, Cs, Fe, La, Rb, Th et V sont donc exploitables pour des prévisions entre méthodes et une homogénéisation éventuelle des données pour établir des cartes européennes.*

* Le texte indiqué en *italique* correspond à des ajouts effectués dans l'article après publication pour une meilleure compréhension dans le manuscrit de thèse.

** Les figures signalées ne sont pas publiées mais ajoutées à l'Annexe du Chapitre I (voir dans Annexes Générales) pour une meilleure compréhension.

1.4 Conclusion

Le choix des méthodes d'analyse tel qu'il a été fait pour la campagne 1996, a tenu compte de la faisabilité (*participation à une campagne de comparaison inter laboratoires des techniques analytiques*) (STEINNES et al., 1997)* et d'un certain historique d'analyse du laboratoire.

D'après les résultats de cette étude statistique, il semble que le choix de la méthode a une influence non négligeable dans l'interprétation des cartes pour certains éléments (As, Cr). En effet, le choix de l'AAN pour la cartographie de Cr, augmente significativement la classe de contamination des mousses françaises par rapport aux pays voisins ayant utilisé l'ICP-MS. Le cas de As montre une situation inverse où, dans la perspective d'une homogénéisation des méthodes d'analyse, les teneurs françaises actuelles (avec AAN) seraient sous-estimées en moyenne par rapport aux pays frontaliers (utilisant l'ICP-MS).*

L'ICP-MS est la technique majoritairement utilisées par l'ensemble des pays européens impliqués dans cette cartographie. En France, il semble que l'ICP-MS convienne parfaitement au dosage des éléments Cu, Ba, Ce, Co, Cs, La, Th et Rb. Si on s'en tient aux résultats des mousses de référence, Cr est correctement analysé par ICP-MS. Cependant, le choix de la méthode de minéralisation est cruciale.

Pour As et V analysés en ICP-MS, seules les fortes teneurs sont dosables en raison de problèmes de limites de détection.

L'AAN conviendrait mieux pour les faibles concentrations en As et V, ainsi que pour les analyses de Fe et Co. *Elle permet aussi le dosage de Ba, Cs et La*.*

Ce travail reste à compléter pour mettre en évidence, par exemple, l'influence de certains éléments sur le dosage d'autres (analyses de régression multiples, par exemple). Il permet de préparer la prochaine campagne 2000 du Programme Européen et de poser également les problèmes de l'homogénéisation des techniques d'analyses utilisées (mise en solution comprise), mais aussi de la formulation des classes de concentrations qui tiendraient compte de ces différences entre méthodes.

* Le texte indiqué en *italique* correspond à des ajouts effectués dans l'article après publication pour une meilleure compréhension dans le manuscrit de thèse.

ICP-MS	M1 (STEINNES E. et al, 1997)			M2 (STEINNES E. et al, 1997)			Lichen 336 (IAEA 336)			Rye Grass (BCR, CRM 281)		
	mesures ICP	mesures recomm.	Statistique	mesures ICP	mesures recomm.	Statistique	mesures ICP	mesures certifiées	Statistique	mesures ICP	mesures certifiées	Statistique
As	<1	0,07 ± 0,005	LD	0,96± 0,18	0,98± 0,07	OK	0,65± 0,19	0,639± 0,077	OK	0,40± 0,2	0,057± 0,004	LD
Ba	10,6± 3,5	10,8± 0,5	OK	16,9± 0,8	17,6± 0,7	OK	nd	6,4± 1,1 (a)	nd	15,47± 2,62	nd	nd
Ce	0,13± 0,08	0,15± 0,03	OK	0,27± 0,06	0,35± 0,03 (a)	OK	nd	1,27± 0,17	nd	0,17± 0,02	nd	nd
Co	<0,2	0,124± 0,004	LD	1,43± 0,36	0,98± 0,06	*	0,30± 0,1	0,287± 0,039	OK	0,36± 0,12	nd	nd
Cr	0,56± 0,45	0,5± 0,13	OK	0,85± 0,34	0,97± 0,17 (a)	OK	1,22± 0,42	1,03± 0,14 (a)	OK	5,3± 3,4	2,14± 0,12	*
Cs	0,069± 0,019	0,068± 0,009	OK	0,52± 0,03	0,55± 0,04	OK	0,12± 0,02	0,110± 0,013	OK	0,08± 0,015	nd	nd
Cu	3,10± 0,86	3,18± 0,12	OK	65,1± 6,6	68,7± 2,5	OK	2,91± 0,85	3,55± 0,46	OK	8,81± 1,2	3,55± 0,46	OK
Fe	200± 50	90± 12	*	364± 35	262± 35	*	nd	426± 46	nd	236,12± 67	nd	nd
La	0,081± 0,032	0,071± 0,008	OK	0,17± 0,12	0,195± 0,018	OK	nd	0,66± 0,1	nd	0,09± 0,017	nd	nd
Rb	19,7± 5,9	17,6± 0,4	OK	45,3± 6,2	39,6± 0,4	*	1,51± 0,07	1,72± 0,2	*	34,95± 4,3	nd	nd
Th	<0,02	0,017± 0,001	LD	0,046± 0,018	0,042± 0,002	OK	0,14± 0,01	0,142± 0,019(a)	OK	9,88± 1,29	nd	nd
V	0,76± 0,24	0,60± 0,10	OK	1,76± 0,29	1,43± 0,17	*	1,38± 0,37	1,5± 0,19 (a)	OK	0,33± 0,16	nd	nd
AAN	mesures AAN	mesures recomm.	Statistique	mesures AAN	mesures recomm.	Statistique	mesures AAN	mesures certifiées	Statistique	mesures AAN	mesures certifiées	Statistique
As	0,062± 0,004	0,07 ± 0,005	OK	0,87± 0,04	0,98± 0,07	*	0,58± 0,07	0,639± 0,077	*	<0,11	0,057± 0,004	LD
Ba	10,8± 1,2	10,8± 0,5	OK	16,1± 1,9	17,6± 0,7	OK	7± 1,0	6,4± 1,1 (a)	OK	20,4± 5,14	nd	nd
Ce	0,11± 0,03	0,15± 0,03	OK	0,31± 0,09	0,35± 0,03 (a)	OK	1,2± 0,1	1,27± 0,17	OK	0,85± 0,63	nd	nd
Co	0,107± 0,008	0,124± 0,004	*	0,95± 0,07	0,98± 0,06	OK	0,31± 0,03	0,287± 0,039	OK	0,36± 0,12	nd	nd
Cr	0,71± 0,07	0,5± 0,13	*	1,85± 0,38	0,97± 0,17 (a)	*	1,33± 0,16	1,03± 0,14 (a)	*	2,17± 0,15	2,14± 0,12	OK
Cs	0,064± 0,006	0,068± 0,009	OK	0,54± 0,07	0,55± 0,04	OK	0,09± 0,02	0,110± 0,013	*	0,088± 0,018	nd	nd
Cu	<11	3,18± 0,12	LD	63,8± 14,0	68,7± 2,5	OK	<10	3,55± 0,46	LD	<15	3,55± 0,46	LD
Fe	106± 14	90± 12	*	280± 12	262± 35	OK	457± 37	426± 46	*	180,6± 16,95	nd	nd
La	0,072± 0,006	0,071± 0,008	OK	0,181± 0,021	0,195± 0,018	OK	0,59± 0,05	0,66± 0,1	*	0,156± 0,13	nd	nd
Rb	17,9± 0,2	17,6± 0,4	OK	38,2± 1,3	39,6± 0,4	*	1,6± 0,3	1,72± 0,2	OK	38,3± 2,11	nd	nd
Th	0,016± 0,003	0,017± 0,001	OK	0,036± 0,006	0,042± 0,002	*	0,13± 0,22	0,142± 0,019(a)	OK	0,158± 0,11	nd	nd
V	0,47± 0,09	0,60± 0,10	*	1,17± 0,2	1,43± 0,17	*	1,3± 0,1	1,5± 0,19 (a)	*	0,374± 0,095	nd	nd

TABLEAU II : Comparaison statistique (Kolmogorov-Smirnov, risque à 5%) entre les valeurs expérimentales et certifiées/recommandées (recomm.) pour les 2 méthodes analytiques (ICP-MS et AAN) pour les 4 matériaux de référence M1, M2, Lichen 336 et Rye Grass (n=30 à 40 échantillons).

* : différence significative ; OK : distribution identique entre les mesures et les références ; LD : mesure en limite de détection ; nd : valeurs non déterminées ; (a) : valeurs certifiées obtenues sans AAN.

1.5 Bibliographie

- GALSOMIES L., LETROUIT M.A., DESCHAMPS C., SAVANNE D. and AVNAIM M., 1999, Atmospheric metal deposition in France : initial results on moss calibration from the 1996 biomonitring, *The Science of the Total Environment* 232, 39-47.
- PICCOT D., DESCHAMPS C., DELMAS R. and REVEL G., 1997, Ko-Labsue : a quasi non-dependent data format package for Ko-quantification, *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, Vol. 215, No 2, 263-269.
- RÜHLING A. and STEINNES E. 1998, Atmospheric heavy metal deposition in Europe 1995-1996, *Nordic Council of Ministers, Copenhagen, Denmark, Nord 1998 : 15, 66 p.*
- STEINNES E., JOHANSEN O., ROYSET O., ODEGARD M., 1993, Comparison of Different Multielement Techniques for Analysis of Mosses Used as Biomonitors, *Environmental Monitoring and Assessment*, 25:87-97.
- STEINNES E., RÜHLING A., LIPPO H. and MÄKINEN A., 1997, Reference materials for large-scale metal deposition surveys, *Accred. Qual. Assur.*, 2, 243-249.

CHAPITRE II. Variabilité Spatiale d'Echantillonnage : impact du maillage sur la quantification des retombées atmosphériques¹

Résumé

L'étude de la structure de l'hétérogénéité spatiale des données "mousses" permet d'estimer la validité d'un protocole d'échantillonnage et son influence sur l'interprétation des résultats. Dans ce cadre, différentes tailles de mailles d'échantillonnage (30/30 km, 10/10 km et 3/3 km) ont été utilisées sur une aire de 90/90 km pour estimer la variabilité associée à chacune d'elle par la méthode d'analyse des composantes de variance.

Le plan d'expérience appliqué a consisté en un plan pyramidal, ou plan emboîté ("nested design"), à trois niveaux avec tirage aléatoire de 3/9 Mailles I (unité primaire, 30/30 km), 3/9 Mailles II (unité secondaire, 10/10 km) et de 3/9 Mailles III (unité tertiaire, 3/3 km). Chaque maille III comporte 2 sous unités à 2 répétitions (2 espèces de mousses échantillonnées) pour un nombre total N=108 analyses. L'objectif d'une telle étude est de pouvoir ensuite choisir les tailles de mailles et le protocole d'échantillonnage optimal pour les campagnes d'échantillonnage ultérieures afin d'identifier des gradients de contamination éventuels mesurés par l' "outil mousse", pour un coût et une précision donnés. Les espèces retenues pour cette étude ont été *Pseudoscleropodium purum* (Sp), *Pleurozium schreberi* (Ps) et *Eurynchium praelongum* (Ep)

Cette étude de variabilité spatiale permet de faire le point sur une partie importante de l'utilisation des mousses : la validité des données cartographiées et la structure de l'hétérogénéité des éléments.

Les résultats mettent en évidence tout d'abord la faible reproductibilité de l'outil pour des objectifs de cartographie à faible échelle (mailles III). De plus, la forte variance résiduelle de l'outil "mousse" pour certains éléments (Cu, Ga, Ti, V, As, Cs, Ba, La, Cd, Co et U) masque les variations spatiales associées aux mailles et pouvant révéler des sources d'émissions. Cependant, il apparaît raisonnable d'utiliser des mailles de 30/30 km, ou même plus grandes, pour établir des cartographies de la variation spatiale de Sb, Pb, Zn, Rb, et Sr, tout en prenant des précautions d'interprétation pour les éléments Rb, Zn et Sr.

L'étude coût-bénéfice montre que, pour optimiser les futures campagnes, l'effort d'échantillonnage des mousses doit porter sur les mailles I de 30/30 km, avec un effort particulier de répétitions par maille pour les éléments Cu, Pb et Sb. Plus la précision désirée est élevée, plus les mailles I doivent être multipliées. De même, plus le budget temps-argent alloué à une campagne d'échantillonnage est faible, plus les mailles I devront être favorisées par rapport aux autres, pour conserver une certaine précision à l'ensemble des données. Par contre, plus le montant alloué à une campagne augmente, plus le nombre de grandes mailles devra être favorisé.

L'estimation des retombées atmosphériques par les mousses avec des mailles de 30/30 km apparaît raisonnable pour Cu, Pb, Sb et Zn. Cependant, pour les autres éléments comme V, As, ou Cd, qui font partie du programme européen de recherche (1), la variabilité résiduelle de l' "outil mousse" est telle qu'elle ne garantit absolument pas l'origine spatiale des variations des teneurs constatées.

¹ Ce chapitre a été soumis à *Environmental and Ecological Statistics*, « *Spatial variability : grid size impact on atmospheric metals and trace elements deposition mapping with mosses* », AMBLARD-GROSS G., MAUL A., FERARD J.F. and CARROT F.

Abstract

The study of the spatial heterogeneity of moss data allows to assess the sampling protocol validity and its influence on result interpretation. In this context, different size of map mesh net (30/30 km, 10/10 km, 3/3 km) have divided an initial area of 90/90 km to estimate the associated variability for each mesh size using the statistical method of variance component analysis.

The design used was a nested design with three levels and with a random draw of 3/9 primary meshes (unit I, 30/30 km), 3/9 secondary meshes (unit II, 10/10 km) and 3/9 tertiary meshes (unit III, 3/3 km). Each unit III is composed of two sub-units with two replicates (2 moss species sampled) for a total number of samples $N=108$ analysis. The aim of such study is to be able to choose the mesh size and the optimal sampling protocol for future sampling campaign and identify possible spatial variation of contamination using mosses (for a defined cost and accuracy). Species chosen for this study were *Pseudoscleropodium purum* (Sp), *Pleurozium schreberi* (Ps) and *Eurhynchium praelongum* (Ep).

The spatial variability study allows to focus on an important point with the common use of mosses in biomonitoring experiment: data reliability of isodeposition maps and elements heterogeneity and structure.

Results put in evidence the poor accuracy of this biological tool for map purpose on a little scale (unit III). Furthermore, the strong residual variance of mosses for some elements (Cu, Ga, Ti, As, Cs, Ba, La, Cd, Co and U) hides the spatial variations associated with meshes.

Nevertheless, it appears reasonable to use 30/30 km mesh size, or even more, to build spatial variation maps of Sb, Pb, Zn, Rb and Sr, with more caution for Rb, Zn and Sr elements.

The cost-benefit study shows that the sampling effort has to be made on unit I of 30/30 km to optimize the future campaigns, and with a particular stress on the sampling repetitions for Cu, Pb and Sb elements. The higher desired precision is, the more numerous unit I should be. Likewise for a given accuracy and time-money budget, the weaker the campaign budget is, the more unit I should be favoured to the others.

On the other hand, the more expensive a campaign is, the more numerous unit I should be.

The atmospheric deposition assessment using mosses seems reasonable for Cu, Pb, Sb and Zn taken 30/30 km mesh size for mapping. For other elements V, As and Cd (analysed in the European research program (1)), the residual variability of mosses is too high to guarantee a spatial origin to the mapped variations.

Variabilité Spatiale d'Echantillonnage : impact du maillage sur la quantification des retombées atmosphériques

G. Amblard-Gross^{*,†}, J.F. Férard[‡], A. Maul[§], F. Carrot[†]

[†]Laboratoire Pierre Süe, CEA-CNRS, CEA de Saclay, Bât 637, 91191 Gif-sur-Yvette, France

[‡]EBSE, Campus Bridoux, rue du Général Délestraint, 57070 Metz, France

[§]STID, IUT Metz, 57045 Metz, France

2.1 Introduction

Les objectifs principaux des études de biomonitoring passif utilisant les mousses sont de suivre les variations spatiales et temporelles des métaux et éléments traces capturés par différentes espèces (1 à 6). Ce suivi s'effectue le plus souvent en élaborant des cartes d'isoconcentrations à la suite de campagnes d'échantillonnage locales, régionales, nationales ou même européennes (1, 4, 7). Le choix de la taille de maille d'échantillonnage et des espèces de mousses prélevées ne suit pas de protocole précis exception faite des études à grandes échelles comme le Programme Européen de Recherche sur l'études des retombées atmosphériques par dosage dans les mousses (1 à 3). Au niveau de ce P.E.R., le protocole standard préconise des mailles de 33/33 km et plus fines de 10/10 km pour des zones dites de proximité (forte densité de populations, zones industrialisées). Ce choix des mailles d'échantillonnage, notamment pour le Programme Européen, fait plutôt l'objet d'un compromis entre faisabilité et budget sans avoir été réellement testé au préalable. L'impact de ce maillage sur la variabilité spatiale d'échantillonnage n'a jamais été établi dans le cas de la France.

Or, le choix des mailles d'échantillonnage et des aires représentatives constitue la problématique la plus importante dans l'étude d'un écosystème donné. La variabilité spatiale et la mise au point de protocoles d'échantillonnage représentatifs sur des grandes surfaces ont surtout été étudiées pour des techniques de sondage notamment en écologie (8, 9) ou pour l'échantillonnage de sols (6).

L'étude de la structure de l'hétérogénéité spatiale des données "mousses" permet d'estimer la validité d'un protocole d'échantillonnage et son influence sur l'interprétation des résultats. Dans ce cadre, différentes tailles de mailles d'échantillonnage (30/30 km, 10/10 km et 3/3 km) ont été utilisées pour estimer la variabilité associée à chacune d'elle par la méthode d'analyse des composantes de variance. Cette mesure de la variabilité spatiale permet d'étudier la structure de l'hétérogénéité des éléments, pour une taille de maille donnée. L'objectif d'une telle étude est de pouvoir ensuite choisir les tailles de mailles et le protocole d'échantillonnage optimal pour les campagnes d'échantillonnage ultérieures afin d'identifier des gradients de contamination éventuels mesurés par l' "outil mousse", pour un coût et une précision donnés. Enfin, des cartes d'isoconcentration ont été élaborées pour différents éléments (interpolation par la méthode dite de "krigeage" (10, 11, 12)).

2.2 Matériel et Méthode

2.2.1 Plan d'expérience

La définition du plan d'expérience commence par le choix des facteurs contrôlés¹. Il faut sélectionner les facteurs contrôlés et fixer leurs modalités¹ afin que les résultats de l'expérimentation soient fixés en nombre. Toutefois, il faut signaler que le plan d'expérience doit aussi tenir compte des facteurs non contrôlés qui peuvent influencer les résultats. Il faut donc soit prévoir un blocage² de ces facteurs soit un agencement des mesures, tels qu'ils varient au hasard.

Dans cette étude de variabilité spatiale, l'étude régionale a porté sur une aire de 90/90 km au sud de Paris (région de Fontainebleau, département 77). Les facteurs contrôlés correspondent aux tailles différentes des mailles d'échantillonnage découpant cette zone initiale en :

- mailles primaires (=mailles I) de 30/30 km ;
- mailles secondaires (=mailles II) de 10/10 km ;
- mailles tertiaires (=mailles III) de 3/3 km (environ).

ce qui permet de définir :

- 9 mailles I ;
- 81 mailles II ;
- 729 mailles III.

Il n'était évidemment pas question d'échantillonner les 729 unités ou mailles III : des tirages aléatoires (effectués avec des tables de nombres au hasard) de 3 mailles/taille ont donc été faits en tenant compte du fait que le choix des mailles II était conditionné par celui des mailles I (de même celui des mailles III par le choix des mailles II). De ce fait, le plan d'échantillonnage utilisé dans cette étude est un échantillonnage par degrés, ou plan emboîté³ (**FIGURE 1**). En outre, chaque maille tertiaire comporte 2 sous unités d'échantillonnage avec elle-même 2 répétitions de mesures (2 espèces de mousses échantillonnées).

Les espèces retenues pour cette étude ont été *Pseudoscleropodium purum* (*Sp*), *Pleurozium schreberi* (*Ps*) et *Eurynchium praelongum* (*Ep*)⁴. Ce choix s'est effectué d'une part afin de suivre les recommandations européennes (pour *Ps* et *Sp*) (1, 2, 4, 7) et d'autre part en raison de leur abondance sur le terrain et la zone étudiée (ajout de *Ep*).

Au final, le nombre total d'analyses correspond à :

$$N = 3(\text{mailles I}) \times 3(\text{mailles II}) \times 3(\text{mailles III}) \times 2 \text{ sous unités} \times 2 \text{ espèces de mousses}$$

soit $N = 108$ analyses.

¹ Les facteurs dont on veut vérifier l'influence sur les résultats sont appelés "Facteurs Contrôlés". L'étude de leur action se fait à partir d'une expérience composée d'un ensemble de mesures caractérisées par des valeurs définies, appelées "Modalités", de ces facteurs.

² On parle de "blocage" ou de "facteurs bloqués" lorsque les facteurs bloqués ne varient pas, ou varient au hasard. On dit alors que les facteurs ne sont pas contrôlés. Pour cela, le plan d'expérience définit des conditions de prélèvements et de conservation identique pour tous les échantillons.

³ Le terme anglo-saxon approprié est "nested design".

⁴ voir Annexe Biologie et Ecologie des Bryophytes pour plus de détails sur ces trois espèces de mousses.

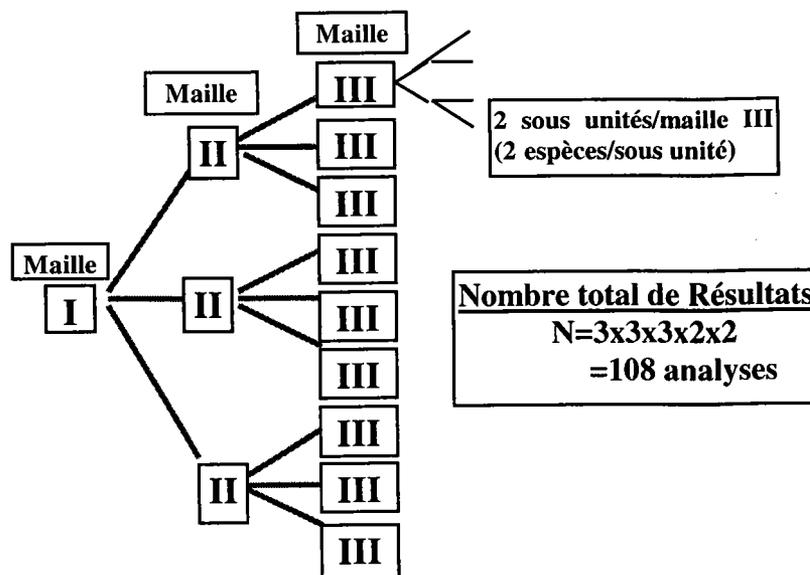


FIGURE 1 : Schéma du plan d'expérience appliqué à l'étude de la variabilité spatiale. Il s'agit d'un plan pyramidal, ou plan emboîté ("nested design"), à trois niveaux avec tirage aléatoire de 3/9 Mailles I (unité primaire, 30/30 km), 3/9 Mailles II (unité secondaire, 10/10 km) et de 3/9 Mailles III (unité tertiaire, 3/3 km). Chaque maille III comporte 2 sous unités à 2 répétitions (2 espèces de mousses échantillonnées) pour un nombre total $N=108$ analyses.

Les modalités des facteurs contrôlés "tailles de mailles" sont dites "aléatoires" car chaque unité a été sélectionnée au hasard. Si les mailles de chaque niveau avaient été choisies délibérément, les modalités auraient été qualifiées de "fixes". Les conséquences de tels choix dans les modalités sont importantes car dans le premier cas, les conclusions de l'analyse de variance peuvent être étendues à l'ensemble des modalités possibles (autrement dit généralisées à d'autres mailles) alors que dans le second cas, les conclusions des analyses ne peuvent être étendues à d'autres mailles et a fortiori à d'autres lieux.

2.2.2 Campagne d'échantillonnage et Bilan

Le choix d'une aire de 90/90 km en région de Fontainebleau (département de la Seine et Marne, 77) répondait à la nécessité de disposer d'une part d'une région suffisamment boisée (collecte aisée des espèces pleurocarpes) et d'autre part de zones d'activités industrielles et anthropiques non négligeables (**FIGURE 2**). Les sites émetteurs de métaux recensés sur cette région ont été identifiés et localisés grâce aux données de la DRIRE Ile de France¹. Afin de disposer de conditions d'échantillonnage identiques à la première campagne française (13), l'échantillonnage *in situ* des mousses a suivi les recommandations du programme européen de recherche (1, 2) (sites ouverts, dits de "fond" car éloignés de 300 m de toute route principale ou zone habitée, et de 100 m de toute route secondaire ou habitation, non directement exposés aux pluvio-lessivats des végétaux supérieurs). Compte tenu de ces critères, certaines sous unités des mailles III n'ont pas pu être prélevées ce qui explique que le nombre total théorique $N=108$ analyses a été réduit à 93 échantillons. Cette différence n'a pas d'incidence

¹ Voir Annexes Générales, Annexes du Chapitre II, "Principaux sites émetteurs référencés par la DRIRE Ile-de-France.

N=108 analyses a été réduit à 93 échantillons . Cette différence n'a pas d'incidence sur le traitement statistique des données tant que toutes les mailles III sont échantillonnées et que les différences ne portent que sur les répétitions. De même, il n'y a pas d'influence sur le traitement des données si les mailles III contiennent un nombre différent de répétitions¹.

L'échantillonnage des récoltes brutes correspond au prélèvement uniforme de 3 sous échantillons de chaque espèce sur une surface d'environ 50 m² (sachets de polyéthylène, gants non talqués). Les récoltes sont ensuite préparées pour les analyses ICP-MS.

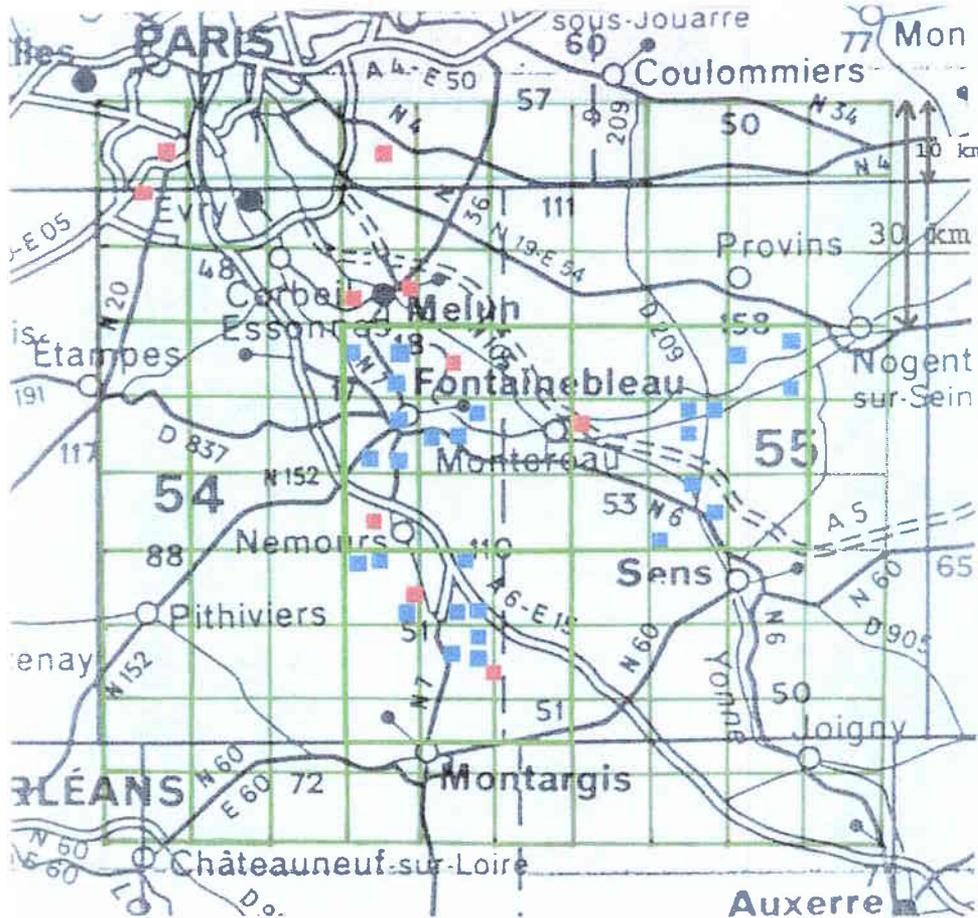


FIGURE 2 : Carte de la zone de 90/90 km choisie (Région de Fontainebleau, département 77) pour l'étude de la variabilité spatiale. Le maillage vert correspond aux mailles II (10/10 km). Après tirage aléatoire, 27 mailles III (carrés bleus, non mis à l'échelle) ont été échantillonnées. Les principaux sites émetteurs de métaux recensés par la DRIRE Ile de France sont indiqués (carrés rouges).

¹ Il faut au moins 1 répétition, sinon l'unité statistique correspondante à cette Maille III est perdue.

2.2.3 Préparation des échantillons et analyse par ICP-MS

Les récoltes brutes ont été nettoyées de leurs débris végétaux et triées afin d'obtenir des brins de mousses avec des segments annuels de croissance identifiés au mieux. Les populations prélevées sur l'ensemble des sites correspondent à des populations jeunes avec, pour *Sp* et *Ps*, deux segments annuels de croissance identifiables¹. Pour *Ep*, l'âge de la plante a été établi en se basant sur la couleur et l'aspect plus ou moins décomposé des parties vieilles.

Les mousses ont ensuite été séchées (24 heures à 40°C), broyées avec un mortier automatique et 200 mg de poudre ont été minéralisés (matras PTFE, micro ondes) avec ajouts successifs d'agents réactifs ultra purs (5 ml HNO₃, 5 ml H₂O₂, 5 ml HF, 3 ml HNO₃ et 10 ml H₂O) pour une solution finale ajustée à 50 ml. L'homogénéité des broyats et la représentativité des 200 mg de poudre ont été estimées par des calculs de coefficients de variations². Les analyses ICP-MS ont été effectuées sur un appareil VG Plasmaquad II Plus. Le contrôle de la qualité et de la répétabilité des analyses est assuré par comparaison avec des matériaux de référence certifiés (lichen IAEA 336 (*Evernai prunasti*, L., Ach.) ; Rye Grass CRM 281 (BCR, Reference Materials)) et des mousses à teneurs recommandées (M1, M2, *Pleurozium schreberi*) (14) et élaborées dans le cadre du programme européen de recherches. Les concentrations finales des éléments sont exprimées en µg.g⁻¹ de matière sèche.

2.2.4 Traitement Statistique

Les résultats des dosages par ICP-MS sont traités par la méthode d'Analyse des Composantes de Variance afin de déterminer la variance associée à chaque taille de maille. Les objectifs d'une telle analyse sont :

- d'évaluer l'efficacité de la résolution spatiale du biomonitoring par les mousses (hétérogénéité spatiale des éléments à la taille de maille considérée) ;
- d'optimiser les futures campagnes d'échantillonnage dans une étude de coût-bénéfice en tenant compte des paramètres de précision et de budget.

Des cartographies sont ensuite effectuées par la technique dite de "krigeage"³.

2.2.4.1 Analyse des Composantes de Variance

La variance associée à chaque taille de maille est déterminée par une analyse de la variance selon un plan pyramidal (TABLEAU I). Cette analyse de variance, réalisée par StatGraphic Plus®, donne des sommes de carrés (Q_T, Q_A, Q_B, Q_C et Q_R) associées aux différents facteurs. Ces sommes de carrés permettent ensuite l'estimation des composantes de variance (σ^2_A , σ^2_B , σ^2_C et σ^2_R) caractérisant chaque niveau de l'échantillonnage⁴.

Comme $Q_T = Q_A + Q_B + Q_C + Q_R$

- avec :
- Q_T représente la somme des carrés totale ;
 - Q_A correspond à la somme des carrés caractérisant la variabilité au niveau de la maille I ;
 - Q_B correspond à la somme des carrés caractérisant la variabilité au niveau de la maille II ;
 - Q_C correspond à la somme des carrés caractérisant la variabilité au niveau de la maille III ;

¹ voir Annexe sur la Biologie et Ecologie des Bryophytes dans les Annexes Générales pour plus de détails.

² voir Annexes Générales, Annexes du Chapitre II, Homogénéité des broyats.

³ voir Annexes Générales, Annexes du Chapitre II, Principe de l'interpolation par krigeage.

⁴ Voir Annexes Générales, annexes du Chapitre II, Analyse des composantes de variance, détail des calculs.

- Q_R représente la somme des carrés correspondant à la variance résiduelle. Elle englobe la variabilité induite par l'ensemble des facteurs non contrôlés (tout sauf les tailles de mailles) et notamment la variabilité propre à la méthode analytique (ICP-MS) et la méthode biologique ("outil mousse").

Les composantes de variance correspondantes (σ^2_A , σ^2_B , σ^2_C et σ^2_R) sont ensuite déduites pour chaque niveau de l'échantillonnage. Afin de vérifier que les valeurs trouvées sont significativement différentes de zéro, des tests de Fisher-Snedecor sont appliqués sur chaque composante de variance¹.

Source de Variation	Somme de carrés Q	d.l. v	Quantité estimée par Q/v ABC aléatoires
Facteur A	Q_A	$p-1$	$nrq\sigma^2_A + nr\sigma^2_B + n\sigma^2_C + \sigma^2_R$
Facteur B	Q_B	$p(q-1)$	$nr\sigma^2_B + n\sigma^2_C + \sigma^2_R$
Facteur C	Q_C	$pq(r-1)$	$n\sigma^2_C + \sigma^2_R$
Résiduelle	Q_R	$pqr(n-1)$	σ^2_R
Totale	Q_T	$npqr-1$	

TABLEAU I : Tableau général d'une analyse de variance selon un plan pyramidal avec 3 facteurs contrôlés et n répétitions. Q_A , Q_B , Q_C et Q_R correspondent aux sommes de carrés utilisées pour estimer σ^2_A , σ^2_B , σ^2_C et σ^2_R , composantes de variance relatives aux facteurs A, B et C (compte tenu des degrés de liberté v). σ^2_R représente la variance résiduelle. d.l. : degrés de liberté ; p , q et r représentent les modalités des facteurs contrôlés A, B et C ; n correspond au nombre de répétitions.

2.2.4.2 Optimisation du protocole d'échantillonnage, étude de la variance totale et du coût

C'est à partir des valeurs estimées σ^2_A , σ^2_B , σ^2_C et σ^2_R que l'estimation de la Variance Totale σ^2_X , correspondant à tout autre plan fictif, est possible.

Afin d'optimiser les campagnes d'échantillonnage ultérieures, il convient donc d'estimer la variance globale, σ^2_X , ainsi que le coût, C , afin de choisir la meilleure combinaison p , q , r , n , nombres de mailles et de sous mailles à échantillonner. Un objectif raisonnable consiste à définir le plan expérimental qui minimise le produit $[(\sigma^2_X) \times (C)]$.

La valeur approximative du coût peut être calculée par la formule suivante :

$$C = C_1 p + C_2 pq + C_3 pqr + C_4 pqrn \quad (1)$$

¹ Pour plus de détails, voir Annexes Générales, Annexes du Chapitre II, Tests de Fisher sur les variances.

Les coefficients $-C_i$ qui représentent le coût d'une unité supplémentaire au niveau correspondant de l'échantillonnage ($i=1$ à 4 pour mailles I, II, III et répétitions) et cela indépendamment des autres niveaux de mailles. Chaque C_i peut être estimé de façon très grossière en tenant compte des paramètres importants à chaque niveau. Le coût d'une analyse multiélémentaire est identique pour toutes les tailles de mailles. Le seul paramètre important, et qui change avec la taille des mailles, est la probabilité de trouver les espèces de mousses en quantité et qualité suffisante. En supposant que ce paramètre est proportionnel à la taille des mailles (plus la maille est grande plus la probabilité de trouver les espèces en quantité et qualité suffisante augmente), alors l'évolution relative des coûts est la suivante :

$$C_1 < C_2 < C_3 < C_4$$

Cette relation entre les coûts est également renforcée par l'aspect budgétaire d'une campagne d'échantillonnage qui va nécessiter plus d'argent si les mailles sont plus nombreuses et plus petites.

La variance globale est calculée de la façon suivante

$$\sigma^2_X = \sigma^2_A/p + \sigma^2_B/pq + \sigma^2_C/pqr + \sigma^2_R/pqrm \quad (2)$$

Pour la diminuer, il faudrait surtout agir sur le paramètre p car, en l'augmentant, chaque composante de variance diminue en même temps. L'effet de diminution de la variance globale est plus prononcé si l'effort d'échantillonnage se porte au niveau des mailles de taille I.

Le produit variance globale et du coût s'écrit, d'après les formules (1) et (2) :

$$[(\sigma^2_X) \times (C)] = (\sigma^2_A/p + \sigma^2_B/pq + \sigma^2_C/pqr + \sigma^2_R/pqrm) (C_1 p + C_2 pq + C_3 pqr + C_4 pqrm) \quad (3)$$

Les solutions de q , r et n sont données par les formules suivantes

$$n = a\sqrt{[C_3/C_4]} \text{ avec } a = \sigma_R/\sigma_C$$

$$r = b\sqrt{[C_2/C_3]} \text{ avec } b = \sigma_C/\sigma_B$$

$$q = c\sqrt{[C_1/C_2]} \text{ avec } c = \sigma_B/\sigma_A$$

En introduisant les valeurs des composantes de variance obtenues précédemment, le choix de n , r , q peut être fait. Quant à p , le choix dépend de la précision souhaitée pour les résultats mais aussi du budget alloué à une campagne d'échantillonnage précise. p est obtenu en résolvant l'équation (3) soit en fonction du coût soit en fonction de la variance selon que l'un ou l'autre est imposé (16). Les estimations des p , q , r , n sont faites en arrondissant les valeurs trouvées à l'entier inférieur (rapport des $C_i < 1$).

2.3 Résultats et Discussion

2.3.1 Bilan de la campagne d'échantillonnage

Toutes les mailles III sélectionnées aléatoirement ont été échantillonnées mais elles ne contiennent pas toutes le même nombre de répétitions (**TABLEAU II, FIGURE 3**). Ceci n'a pas d'influence sur le traitement statistique des données, l'important étant que toutes les mailles III soient échantillonnées au moins une fois pour obtenir un plan d'expérience respectant une certaine symétrie. Pour une majorité de mailles III, deux espèces de mousses, parmi *Sp*, *Ps* et *Ep*, ont été échantillonnées. Seules les mailles III n° 9, 18 et 25 (**TABLEAU II**) ne contiennent qu'une seule espèce de mousse. En ne considérant que l'espèce *Sp*, le plan reste quasi complet puisqu'une seule maille III (n°9) ne contient pas cette espèce. L'espèce *Ep* est absente de 8 mailles III et l'espèce *Ps* est échantillonnée plus rarement. Il faut donc avoir une certaine réserve quant aux conclusions n'impliquant que les espèces *Ep* et *Ps* en raison d'un plan d'échantillonnage incomplet. Avec ces échantillonnages, des conversions entre espèces pourraient être essayées (analyses de régression impliquant 24 couples *Sp-Ep* et 12 couples *Sp-Ps*). Cependant, ces conversions entre espèces sont sujet à débat et semblent ne pas pouvoir être généralisées à d'autres études en dehors de celles où elles ont été établies (1, 2, 7, 16). C'est pourquoi, cet aspect n'a pas été développé dans la présente étude.

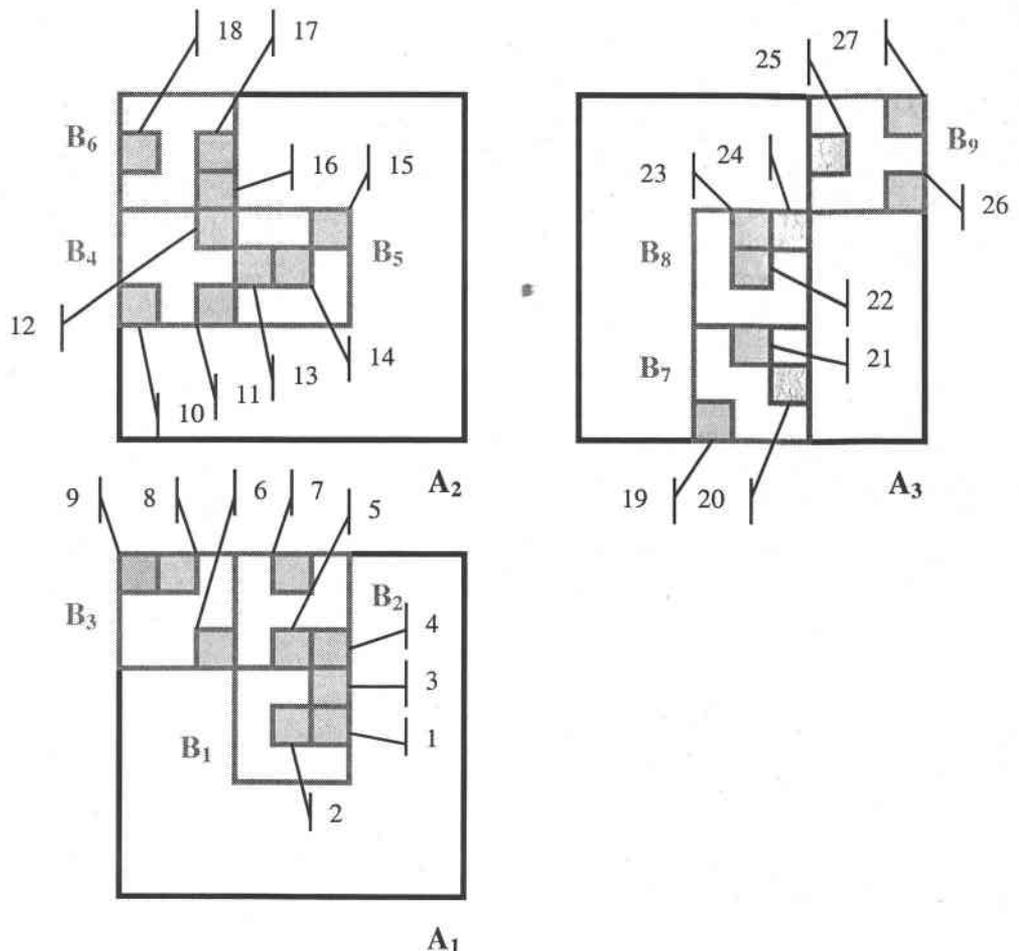


FIGURE 3 : Identification et nomination des différentes mailles I (mailles A), II (mailles B) et III (mailles 1 à 27) après tirage aléatoire sur la zone initiale de 90/90 km (**FIGURE 2**) pour l'étude de la variabilité spatiale d'échantillonnage. La composition de chaque maille III du point de vue des espèces de mousses et des répétitions effectuées est détaillée dans le **TABLEAU II**.

Maille I	Maille II	Maille III	Nombre de sous unités	espèces /ss-u 1	espèces /ss-u 2
A1 n=33	B1 n=13	1 (n=6)	2	2Sp 2Ps	2Sp
		2 (n=4)	2	Sp Ep	Sp Ep
		3 (n=3)	1	Sp 2Ps	Ne
	B2 n= 11	4 (n=4)	2	Sp Ep	Sp Ep
		5 (n=4)	2	Sp Ep	Sp Ep
		6 (n=3)	2	Sp Ep	Ep
	B3 n=9	7 (n=4)	2	Sp Ep	Sp Ep
		8 (n=4)	2	Sp Ep	Sp Ep
		9 (n=1)	1	Ep	Ne
A2 n=34	B4 n=12	10 (n=3)	2	Ep	Sp Ep
		11 (n=5)	2	Sp Ep	2Sp Ep
		12 (n=4)	2	Sp Ep	Sp Ps
	B5 n=17	13 (n=7)	2	Sp Ps	2Sp Ps 2Ep
		14 (n=4)	2	Sp Ps	Sp Ps
		15 (n=6)	2	2Ep Sp	Sp Ep Ps
	B6 n=5	16 (n=1)	1	Sp 2Ps	Ne
		17 (n=3)	2	Sp	Sp Ps
		18 (n=1)	1	Sp	Ne
A3 n=25	B7 n=11	19 (n=5)	2	2Sp Ep	Sp Ep
		20 (n=4)	2	Sp 2Ep	Ep
		21 (n=2)	1	Sp Ep	Ne
	B8 n=8	22 (n=3)	2	Sp Ep	Ep
		23 (n=3)	2	Ep	Sp Ep
		24 (n=2)	2	2Ep	Ep
	B9 n=6	25 (n=1)	1	Sp	Ne
		26 (n=3)	2	Sp	Sp Ps
		27 (n=2)	2	Sp	Ps

TABLEAU II : Bilan de la campagne d'échantillonnage pour l'étude de la variabilité spatiale pour chaque niveau de mailles I (A1 à A3), II (B1 à B9) et III (1 à 27) (**FIGURE 3**) avec n, le nombre d'échantillons analysés en ICP-MS. Les récoltes brutes des mailles III sont détaillées en fonction du nombre de sous unités échantillonnées et des espèces de mousses trouvées (Sp, *Pseudoscleropodium purum*; Ps, *Pleurozium schreberi*; Ep, *Eurhynchium praelongum*). Par exemple, pour la maille III n°1 (n=6 récoltes brutes); 2 ; 2Sp 2Ps ; 2Sp signifie que cette maille III a été échantillonnée dans 2 sous unités avec dans la première 2 récoltes de Sp et 2 récoltes de Ps, et dans la seconde 2 récoltes de Sp. Ne : sous-unité non échantillonnée.

2.3.2 Bilan des analyses ICP-MS, choix des éléments

Les limites de détection et de quantification des éléments dosés sont déterminées sur les blancs d'analyse (TABLEAU III). Parmi l'ensemble des éléments analysés, seuls Mo et Th ont une concentration moyenne inférieure à leur limite de quantification (TABLEAU III). Ces éléments ne sont donc pas quantifiables de façon certaine et ils ne seront pas considérés dans la suite des traitements statistiques en raison de mesures trop incertaines. Pour les autres éléments, c'est-à-dire **Ti, V, Co, Cu, Zn, Ga, As, Rb, Sr, Cd, Sb, Cs, Ba, La, Pb et U**, les analyses peuvent être considérées comme quantifiables (TABLEAU III) et exploitables (dosage des matériaux de références¹).

Éléments ($\mu\text{g/g}$)	Moyenne (n=93)	écart-type	Médiane	Min	Max	LD (3*etb)	LQ (10*etb)
Ti48	114,85	79,59	84,86	20,79	367,77	10,18	33,94
V51	2,81	1,96	2,08	0,39	9,80	0,07	0,23
Co59	0,67	0,51	0,45	0,11	2,17	0,08	0,27
Cu63	5,58	2,06	5,51	1,86	17,16	0,43	1,43
Zn64	34,59	13,28	30,81	14,64	87,31	1,82	6,05
Cu65	5,84	2,03	5,70	2,19	17,10	0,40	1,33
Zn66	34,62	13,73	31,78	13,67	89,01	0,61	2,02
Ga69	1,29	0,96	1,14	ld	4,35	0,02	0,06
As75	0,51	0,35	0,37	0,09	1,83	0,06	0,18
Rb85	14,82	8,19	13,37	1,32	36,52	0,07	0,24
Sr88	11,94	10,29	8,64	4,46	79,52	0,06	0,19
Mo95	0,18	0,13	0,18	ld	0,67	0,20	0,66
Cd111	0,22	0,07	0,22	0,09	0,42	0,03	0,09
Cd114	0,18	0,08	0,17	0,03	0,39	0,02	0,07
Sb121	0,28	0,13	0,25	0,08	0,73	0,02	0,05
Cs133	0,44	0,29	0,34	0,05	1,73	0,01	0,02
Ba138	28,42	15,90	26,00	6,59	106,71	0,21	0,70
La139	1,58	1,52	1,10	0,39	11,83	0,02	0,07
Pb206	9,17	3,14	8,68	3,05	21,04	0,09	0,30
Pb207	9,57	3,40	8,71	3,21	22,00	0,12	0,38
Pb208	9,31	3,22	8,79	3,14	21,15	0,08	0,25
Th232	0,34	0,30	0,20	ld	1,30	0,13	0,42
U238	0,11	0,14	0,07	ld	1,18	0,01	0,04

TABLEAU III : Statistiques des analyses ICP-MS pour l'ensemble de la campagne d'échantillonnage (n=93 analyses, 200 mg) toutes espèces de mousses confondues. Les limites de détection (LD= 3×écart-type des blancs) et les limites de quantification (LQ=10×écart-type des blancs) sont présentées pour les différents isotopes mesurés. Les éléments grisés ont des moyennes inférieures aux limites de quantification et ne sont donc pas quantifiables. Les autres éléments (moyenne>LQ) peuvent être utilisés dans les traitements statistiques ultérieurs, car quantifiables.

¹ voir Chapitre I, Tableau II.

2.3.3 Variabilité Spatiale des Eléments

La structure de l'hétérogénéité n'est pas la même pour les différents éléments. L'analyse des composantes de variance permet d'appréhender l'échelle à laquelle l'hétérogénéité est la plus marquée.

La variance associée à chaque taille de maille et la variance résiduelle ont été calculées pour chaque élément (TABLEAU IV). Chaque composante de variance s'exprime en pourcentage de la variance totale. Les éléments ont été rassemblés en quatre groupes en fonction du pourcentage maximal de variance associé à chaque niveau de maille :

- 1) Cu, Sb, et Pb au niveau de la maille I (>30%) ;
- 2) Zn (>30%), Ga (>9%) au niveau de la maille II ;
- 3) Ti, V, As, Cs, Ba et La au niveau de la maille III ;
- 4) Rb, Sr, Cd, Co et U présentent des situations intermédiaires avec des maximums de variance aux mailles I et III. Les éléments Mo et Th sont indiqués mais non interprétés en raison de dosages trop proches des limites de quantification.

2.3.3.1 Interprétation sans la variance Résiduelle

Du point de vue de l'interprétation des résultats, il faut dans un premier temps ne pas tenir compte de la variabilité résiduelle (fort %) et ne considérer que la variabilité associée aux mailles I, II et III.

Les 4 groupes d'éléments ont une structure de l'hétérogénéité différente. Autrement dit, les éléments en question présentent une variabilité spatiale de distribution. La conséquence sur le terrain de l'existence d'une hétérogénéité spatiale de distribution est qu'un échantillonnage (et un dosage) unique effectué dans une telle maille n'est pas représentatif de sa teneur moyenne. A l'intérieur de cette maille, un échantillon peut être prélevé sur un endroit fortement, ou très peu concentré, avec une sur- ou une sous-estimation de la concentration moyenne.

Par exemple, l'élément du premier groupe Pb a une variabilité maximale à l'échelle de maille de taille I (30/30 km) (41.5% pour Pb206). Cela montre qu'à cette échelle de maille, Pb n'est pas réparti de façon homogène et, en conséquence, un échantillonnage de mousse dans une telle maille n'est pas représentatif de la teneur moyenne. Cela signifie donc que c'est à ce niveau qu'il convient d'augmenter l'effort d'échantillonnage pour une meilleure estimation de la concentration globale des éléments du premier groupe (Cu, Sb et Pb).

Pour les éléments du deuxième groupe, Zn et Ga, l'hétérogénéité étant la plus marquée à l'échelle de maille II (10/10 km), c'est à ce niveau qu'il faut porter l'effort d'échantillonnage. Cependant pour Zn, les composantes de variance associées aux mailles I (12%) et III (19%) semblent indiquer l'existence d'une hétérogénéité spatiale à ces échelles, mais plus faibles qu'à la maille II. En conséquence, si une hétérogénéité spatiale pour Zn est présente aux trois échelles de mailles, il pourrait être difficile d'associer ces variations à un paramètre géographique particulier.

Pour les éléments du troisième groupe, Ti, V, As, Cs, Ba et La, la composante de variance maximale est localisée en maille III (environ 3/3 km). La variance associée aux autres niveaux de mailles (I et II) est significativement moindre, sauf pour As et La qui gardent une composante de variance élevée pour les maille II et I (20,6% et 21,4%) respectivement. Cette forte variabilité à la maille III vient consolider l'hypothèse d'une influence locale et de petite échelle. Ti, V, As, Cs et Ba sont des éléments présents sur des particules de sols et donc généralement associés à une origine pédologique (17).

Éléments	Maille I (30/30 km) dl=2			Maille II (10/10 km) dl=6			Maille III (3/3 km) dl=18			Résiduelle dl=66		
	Q _A	s _A ²	%	Q _B	s _B ²	%	Q _C	s _C ²	%	Q _R	s _R ²	%
Cu63	3,039	0,043	31,27	1,111	0,0057	4,15	2,227	0,015	11	4,87	0,074	53,58
Cu65	3,072	0,046	36,34	0,738	0,002	1,72	1,776	0,009	7,1	4,566	0,069	54,84
Sb121	9,534	0,152	61,08	0,5	0*	0	1,91	0,004	1,62	6,122	0,093	37,3
Pb206	3,541	0,053	41,47	0,845	0,007	5,16	1,344	0,003	2,3	4,292	0,065	51,07
Pb207	4,253	0,066	48,42	0,591	0,002	1,49	1,387	0,004	2,84	4,246	0,064	47,25
Pb208	3,774	0,0568	43,67	0,817	0,006	4,87	1,307	0,003	1,92	4,25	0,064	49,54
Zn64	2,587	0,017	11,77	4,212	0,057	39,39	2,387	0,027	18,98	2,828	0,043	29,86
Zn66	2,893	0,019	12,44	4,62	0,062	39,76	2,599	0,03	19,45	2,923	0,044	28,36
Ga69	3,989	0,001	0,09	11	0,097	9,39	15,472	0*	0	56,336	0,939	90,52
Ti48	3,928	0,033	7,39	5,335	0,012	2,63	13,104	0,143	32,1	16,994	0,257	57,87
V51	4,5	0,047	9,67	2,687	0*	0	13,156	0,129	26,67	20,266	0,307	63,66
As75	3,482	0*	0	10,053	0,095	20,55	12,358	0,139	29,89	15,17	0,23	49,56
Cs133	1,81	0,0001	0,04	1,873	0*	0	14,397	0,147	31,89	20,756	0,314	68,07
Ba138	0,807	0*	0	2,959	0,008	2,69	7,192	0,051	17,7	15,222	0,231	79,61
La139	10,749	0,137	21,43	3,915	0*	0	18,1	0,219	34,08	18,833	0,285	44,49
Rb85	12,857	0,19	40,07	2,869	0*	0	9,347	0,104	22,22	11,572	0,175	37,31
Sr88	7,948	0,106	31,29	4,013	0,02	5,96	7,886	0,098	29,14	7,499	0,114	33,62
Cd111	1,144	0,014	15,04	0,831	0,003	3,71	1,821	0,011	12,47	4,18	0,063	68,78
Cd114	5,659	0,065	23,27	4,579	0,048	17,17	4,91	0,046	16,61	7,918	0,12	42,95
Co59	8,605	0,078	13,46	10,434	0,1	17,12	12,764	0,133	22,87	17,871	0,271	46,55
Mo95	0,589	0*	0	4,332	0,0268	5,36	6,727	0*	0	29,305	0,473	94,64
Th232	11,237	0,12	14,57	10,941	0,058	7,06	21,548	0,246	29,73	25,723	0,402	48,64
U238	6,222	0,068	12,34	5,947	0,0251	4,54	12,625	0,122	21,99	21,328	0,339	61,13

TABLEAU IV : Analyse des Composantes de Variance avec Q (somme des carrés), s_i² (composante de variance au niveau de maille i) et le % de contribution par rapport à la variance totale. Cette analyse divise la variance totale (log[élément]) en 3 composantes de variance (une pour chaque taille de maille I, II et III) et variance résiduelle. En ne considérant pas la variance résiduelle, les parties grisées réunissent les éléments et leur composante de variance maximale pour une taille de maille donnée. Les éléments hachurés ont des concentrations moyennes inférieures aux limites de quantification (TABLEAU III). * Variances non significativement différentes de zéro (test de Fisher, voir Annexes Générales, Annexes du Chapitre II).

Parmi les différents facteurs influençant le contenu des mousses¹, le facteur sol est souvent évoqué (1, 2, 18, 19). Les éléments Ba, Cs, Ti et V (et dans une moindre mesure As) sont plus concentrés dans les sols que dans les mousses (TABLEAU V) qui peuvent donc être contaminées par des poussières de sols remises en suspension. Ti est utilisé pour corriger les concentrations des mousses de l'influence de ce facteur sol, de même que les éléments Al ou Sr (20). D'autres méthodes basées sur des transformations graphiques des résultats permettent de distinguer la part de ce facteur sol dans les données (21).

[médiane] (µg/g)	As	Ba	Cs	Ti	V
Mousses (Norvège)	0.27	24	0.18	nd	2.4
Mousses (Allemagne)	0.25	19.5	0.22	21.8	1.71
Sols agricoles 0-25 cm ; <2 mm	1.55	43.2	2.1	402	25.4
Sols urbains 0-2 cm <2mm	0.5	72.2	nd	1110	55
Air (ng/m ³)	0.5	0.4-0.8	0.045	7-6.4	0.8-0.53

TABLEAU V : Exemples de concentrations médianes entre différentes matrices biologiques, les mousses (médianes des campagne norvégienne et allemande), les minéraux (sols agricoles et urbains) et l'air (concentrations sur filtres PM10). Données référencées et issues de (17).

Pour ces éléments, la variabilité spatiale à cette échelle peut être interprétée comme une hétérogénéité micro environnementale influencée par le sol, plus que par un réel apport atmosphérique.

Pour les éléments du quatrième groupe, Rb, Sr, Cd, Co et U, il n'apparaît pas de nette différence entre les composantes de variance associées à chaque taille de maille. Ces éléments semblent tout de même avoir une variance plus faible à la maille II, mais avec des variances mailles I et III du même ordre.

Pour ces éléments du troisième et du quatrième groupe, même s'il semble difficile de définir une taille de maille d'échantillonnage optimale, il ne faut pas perdre de vue que, de toute façon, il est toujours plus efficace de faire porter l'effort d'échantillonnage le plus haut possible, c'est-à-dire en amont, aux premiers degrés du plan d'échantillonnage.

2.3.3.2 Interprétation avec la Variabilité Résiduelle

Toutes les remarques précédentes ne tenaient pas compte de la variabilité résiduelle. Or, sa composante de variance est supérieure à toutes les autres composantes de variance relatives aux tailles de mailles.

A l'exception de Sb, Zn et Rb, les autres éléments (Cu, Pb, Ga, Ti, V, As, Cs, Ba, La, Sr, Cd, Co et U) ont une composante de variance résiduelle supérieure à leur composante de variance "taille de maille" maximale (TABLEAU IV). Pb et Sr ont une variabilité résiduelle du même ordre de grandeur que leur composante de variance maximale (maille I pour Pb avec s_A^2 de Pb = 43 % environ et $s_R^2 = 48%$; maille III pour Sr avec $s_C^2 = 29,1%$ et $s_R^2 = 33,6%$).

Il s'avère donc que la variabilité propre à l' "outil mousse", indépendamment des facteurs contrôlés tailles de mailles, est effectivement très importante. Cette variance résiduelle rassemble l'influence des paramètres non contrôlés, c'est-à-dire autres que géographiques, comme les différences entre espèces de mousses, la méthode d'analyse (ICP-MS) ou bien des

¹ voir Chapitre Bibliographie, §1.4.1.2. contribution d'autres facteurs.

efficacités de capture de l' "outil biologique" différentes en fonction des éléments ou des sites (qualités des retombées différentes).

Il existe donc pour certains éléments à la fois une variabilité spatiale de distribution et une variabilité résiduelle non négligeable. Pour d'autres encore, la variabilité résiduelle est quasiment la seule présente ($s^2_R = 90.5\%$ et 79.6% pour Ga et Ba).

Aussi, dans un objectif cartographique, il faut constater que l' "outil " mousse ne permet pas une très grande précision. En effet, du fait de cette forte variabilité résiduelle, il n'est pas possible d'identifier les variations spatiales de concentrations des mousses comme de véritables variations spatiales au sens géographique. Autrement dit, les variations spatiales des retombées atmosphériques mesurées par les mousses ne peuvent être visibles que si la variabilité résiduelle de l'outil de mesure est inférieure à l'une des composantes de variance des facteurs taille de maille (à moins d'augmenter considérablement le nombre de prélèvements).

Ainsi, compte tenu de la variabilité résiduelle, il reste raisonnable d'échantillonner à la maille de taille I pour les éléments du premier groupe Cu, Sb et Pb. D'ailleurs, comme la variabilité résiduelle est du même ordre de grandeur que la composante de variance maille I, il serait même envisageable d'échantillonner à des tailles de mailles supérieures à 30/30 km.

Pour les éléments du second groupe, Zn a une variance résiduelle du même ordre de grandeur que sa composante de variance maximale maille II. Il semble donc raisonnable pour cet élément de prendre des tailles de maille I afin de cartographier les contenus des mousses. Par contre, Ga semble difficilement cartographiable par la méthode mousse tant la variance résiduelle est importante (90,5 %). Pour cet élément, la méthode mousse apporte beaucoup trop d'incertitude pour distinguer les variations spatiales éventuelles.

Les éléments du troisième groupe, Ti, V, As, Cs, Ba comportent tous des variances résiduelles importantes (>50%). Ceci implique une réelle difficulté à distinguer des variations de concentrations spatiales très fines. Pour As et V qui sont dosés et cartographiés dans le programme européen de recherche, des mailles de 30/30 km ne semblent pas convenir à une interprétation fiable des retombées atmosphériques. Il faudrait donc envisager pour ces éléments, de n'employer la méthode "mousse" que dans des cas extrêmes où les retombées atmosphériques sont caricaturales et élevées. Une diminution de la variance résiduelle est sans doute possible pour ces éléments si elle est décomposée en d'autres paramètres (différences inter-spécifiques, autres facteurs contrôlés à envisager, etc.). Ainsi, en tenant compte de ces variabilités résiduelles fortes et supérieures à toutes les composantes de variances spatiales, il semble que des tailles de mailles plus grandes pourraient tout à fait être utilisées si les objectifs sont de cartographier à tout prix. L'interprétation de la variabilité spatiale ne serait pas, à l'évidence, plus forte qu'elle ne l'est déjà à la maille I. Cependant, il faut tout de même s'interroger sur l'emploi raisonnable, ou non, de cette méthode biologique pour la cartographie des éléments As, V (programme européen) ou de Cs, Ti et Ba.

Pour les éléments du quatrième groupe, Sr, Rb et Cd, les variances associées aux mailles et les variances résiduelles sont toutes du même ordre et rendent raisonnable un échantillonnage à la taille de maille I. Même si des tailles de mailles supérieures pourraient a priori être utilisées, les mêmes précautions que pour les éléments du groupe III sont à prendre pour les cartographies.

En conclusion, cette étude de variabilité spatiale permet de faire le point sur une partie importante de l'utilisation des mousses : la validité des données cartographiées et la structure de l'hétérogénéité des éléments.

Ces résultats mettent en évidence tout d'abord la faible reproductibilité de l'outil pour des objectifs de cartographie à faible échelle (mailles III). De plus, la forte variance résiduelle de l'outil "mousse" pour certains éléments (Cu, Ga, Ti, V, As, Cs, Ba, La, Cd, Co et U) masque les variations spatiales associées aux mailles et pouvant révéler des sources d'émissions. Cependant, il apparaît raisonnable d'utiliser des mailles de 30/30 km, ou même plus grandes, pour établir des cartographies de la variation spatiale de Sb, Pb, Zn, Rb, et Sr, tout en prenant des précautions d'interprétation pour les éléments Rb, Zn et Sr.

2.3.4 Etude Coût-Bénéfice

Pour optimiser le protocole d'échantillonnage, il faut tenter d'atteindre la meilleure précision possible pour un coût minimal.

A cet effet, un critère intéressant consiste à minimiser le produit : variance \times coût. Indépendamment des coûts, il apparaît clairement (**formule 3**) qu'en augmentant le paramètre "p", l'ensemble des composantes de variance diminuent. Il est donc recommandé de porter l'effort d'échantillonnage sur les grandes mailles pour gagner en précision globale.

Il est possible de déterminer le protocole d'échantillonnage idéal compte tenu d'une précision désirée ou d'un budget alloué à une campagne d'échantillonnage. En effet, à partir des composantes de variance calculées (**TABLEAU IV**), les n, r et q pour l'ensemble des éléments ont été calculés puis, les valeurs de "p" sont estimées en fonction de C ou de s_x^2 (c'est-à-dire pour un coût ou bien une variance totale fixés) (**TABLEAU VI**).

Les résultats montrent que pour diminuer la variabilité totale d'une campagne d'échantillonnage (s_x^2 faible), l'effort de prélèvement doit se porter sur les grandes mailles (p élevé).

Les valeurs de "p" calculées à la variabilité totale de 5% ($s_x^2=0.05$) sont très élevées et supérieures à la modalité utilisée dans le cadre de cette campagne (p=3 mailles I tirées aléatoirement). Cela signifie sans doute qu'il est probablement impossible d'obtenir une telle précision spatiale (variabilité faible) avec cet outil biologique. Par contre, il semble possible d'obtenir une variabilité globale de 20% avec un effort d'échantillonnage pour les éléments des troisième et quatrième groupes. Il est intéressant de constater que pour Cu, Pb et Sb, les estimations de $n>1$ montrent qu'il existe une variabilité au niveau des répétitions. Il ne faut donc pas négliger les répétitions ("n") et le nombre de maille I ("p"), si ces éléments doivent être cartographiés avec la méthode mousse.

En ce qui concerne les estimations du protocole d'échantillonnage pour un coût C fixé, plus la somme allouée à la campagne est faible (budget temps-argent minimal, C=1), moins il sera possible d'échantillonner de mailles I (p faible), si la variabilité doit être maintenue constante. Par contre, plus le budget augmente (C=5, 25, 100), plus cet effort au niveau des mailles I peut augmenter (p élevé). Les coûts relatifs s'échelonnent ici dans un ordre qui n'est pas l'ordre habituel. Dans le problème classique, il y a un compromis à trouver entre deux antagonismes (pas le cas ici).

Globalement, pour diminuer la variabilité totale de la méthode "mousse", l'effort d'échantillonnage doit porter sur les mailles I de 30/30 km, avec un effort de répétitions des mesures pour les éléments Cu, Sb et Pb. En plus, du point de vue du budget (temps, argent moyen), les mailles I sont moins coûteuses à échantillonner que les mailles plus petites. Autrement dit, plus le montant alloué à une campagne sera élevé, plus il sera possible et intéressant d'aller échantillonner dans les mailles les plus grandes (C élevé, p élevé), compte tenu de la variabilité interne de cet outil biologique.

2.3.5 Validité des cartes d'isoconcentration

Les cartes d'isoconcentration pour la zone échantillonnée (i.e. avec uniquement les 3 mailles I sélectionnées aléatoirement) (**FIGURE 3**) ont été tracées avec les éléments Ti, Pb, Zn, As et V (**FIGURES 4 à 8**) appartenant aux trois premiers groupes définis par l'analyse des composantes de variance (**TABLEAU IV**). Il est intéressant de remarquer que ces cartes d'isoconcentrations illustrent bien les résultats de la variabilité spatiale.

En effet, Ti (**FIGURE 4**) présente une distribution plutôt étalée avec une zone plus chargée dans la région Sud-Ouest de la carte. Ceci peut être mis en relation avec la faible composante de variance des mailles I et II pour cet élément qui semble malgré tout réparti et étalé sur une grande surface, plutôt que très localisé (notamment aux échelles de mailles I et II).

A l'inverse, Pb (**FIGURE 5**) montre une zone très concentrée au niveau des routes nationales menant à Fontainebleau. Le reste de la carte présente des concentrations basses. La zone fortement concentrée en Pb est assez localisée. Cette surface fait partie de la maille I A₂ (**FIGURE 3**) qui présente aussi des zones nettement moins chargées (zones vertes). Autrement dit, l'hétérogénéité de cette taille de maille est visible sur cette carte.

Pour Zn (**FIGURE 6**), une zone assez concentrée se distingue au niveau de Fontainebleau. Pour la zone très concentrée au Sud-Ouest (maille III n°2, **FIGURE 3**, commune de Ferrières), aucune explication n'a pour le moment été trouvée bien que cette zone soit recensée comme émettrice¹.

As (**FIGURE 7**) montre une zone localisée et très concentrée située sur la commune de Château-Landon. Sur ce site, une industrie de traitement du bois et une entreprise de traitement de surface seraient susceptibles d'émettre l'élément As, le bois pouvant être traité au pentoxyde d'arsenic.

De même, la carte de V (**FIGURE 8**) est très similaire à celle de As mais aucune explication n'a pu être trouvée quant à la zone de très forte concentration.

Pour ces deux derniers éléments, la variabilité spatiale aux tailles de maille I était assez faible et celle à la maille III forte. De fait, malgré une ou deux mesures très concentrées, le reste des dosages est plutôt homogène. Il faut cependant garder à l'esprit que de fortes concentrations locales sont possibles pour ces deux éléments. Ce même phénomène a été rapporté lors de la première campagne française pour As (**Chapitre I, FIGURE 1**) où un seul échantillon très concentré a suffi pour répertorier une zone de plusieurs centaines de km² dans la gamme de concentrations maximales. Il semble donc que de très fortes valeurs en As soient possibles dans les mousses et ceci de façon très locale. Des influences atmosphériques sont probables pour les très fortes concentrations en As mais, il faut garder à l'esprit que cet élément est proche des limites de quantification de la technique de dosage (ICP-MS) (**TABLEAU III**).

¹ voir Annexes générales, Annexes du Chapitre II, Principaux sites émetteurs recensés par la DRIRE Ile de France.

Éléments	Constantes			Estimations			Estimations de p pour s_x^2 fixée			Estimations de p pour C fixé			
	a	b	c	n	r	q	0,05	0,20	0,50	C=1	C=5	C=25	C=100
Cu63	2,221	1,622	0,364	2	1	1	2	1	1	1	1	2	7
Cu65	2,769	2,121	0,209	2	2	1	1	1	1	1	1	1	4
Sb121	4,822	0,100	0,100	4	1	1	4	1	1	1	1	1	5
Pb206	4,655	0,655	0,363	4	1	1	2	1	1	1	1	1	5
Pb207	4,000	1,414	0,174	4	1	1	2	1	1	1	1	1	5
Pb208	4,619	0,707	0,325	4	1	1	2	1	1	1	1	1	5
Zn64	1,262	0,688	1,831	1	1	1	3	1	1	1	1	3	10
Zn66	1,211	0,696	1,806	1	1	1	3	1	1	1	1	3	10
Ga69	0,100	0,100	9,849	1	1	9	2	1	1	1	1	1	1
Ti48	1,341	3,452	0,603	1	3	1	4	1	1	1	1	1	4
V51	1,543	0,100	0,100	1	1	1	10	2	1	1	1	3	10
As75	1,286	1,210	0,100	1	1	1	9	2	1	1	1	3	10
Cs133	1,462	0,100	0,100	1	1	1	9	2	1	1	1	3	10
Ba138	2,128	2,525	0,100	2	2	1	2	1	1	1	1	1	4
La139	1,141	0,100	0,100	1	1	1	13	3	1	1	1	3	10
Rb85	1,297	0,100	0,100	1	1	1	9	2	1	1	1	3	10
Sr88	1,079	2,214	0,434	1	2	1	5	1	1	1	1	1	6
Cd111	2,393	1,915	0,463	2	1	1	1	1	1	1	1	2	7
Cd114	1,615	0,979	0,859	1	1	1	6	1	1	1	1	3	10
Co59	1,427	1,153	1,132	1	1	1	12	3	1	1	1	3	10
Mo95	0,100	0,100	0,100	1	1	1	10	2	1	1	1	3	10
Th232	1,278	2,059	0,695	1	2	1	10	3	1	1	1	2	6
U238	1,667	2,205	0,608	1	2	1	6	2	1	1	1	2	6

TABLEAU VI : Calcul des constantes a, b et c et des estimations n, r, q et p à partir des composantes de variances (Tableau IV) et des valeurs relatives des coûts C_1 , C_2 , C_3 et C_4 . Les différents paramètres sont calculés de la façon suivante :

$n = a \times \sqrt{(C_3/C_4)}$ avec $a = s_r/s_c$; $r = b \times \sqrt{(C_2/C_3)}$ avec $b = s_c/s_b$; $q = c \times \sqrt{(C_1/C_2)}$ avec $c = s_b/s_a$; ($C_1 < C_2 < C_3 < C_4$) , les estimations de n, r et q sont arrondies à l'entier le plus proche. Les éléments hachurés ont une concentration moyenne dans les mousses proches des limites de quantification et demandent des réserves quant à leur interprétation.

Les calculs de p sont effectués en fixant soit s_x^2 (formule 2) ou le coût C (formule 1). Les coûts représentent des coûts relatifs (temps et probabilité d'échantillonnage, budget) entre différentes campagnes avec : C=1 (budget temps-argent minimal); C=5, 25 et 100 (budget temps-argent 5, 25 et 100 fois plus important).

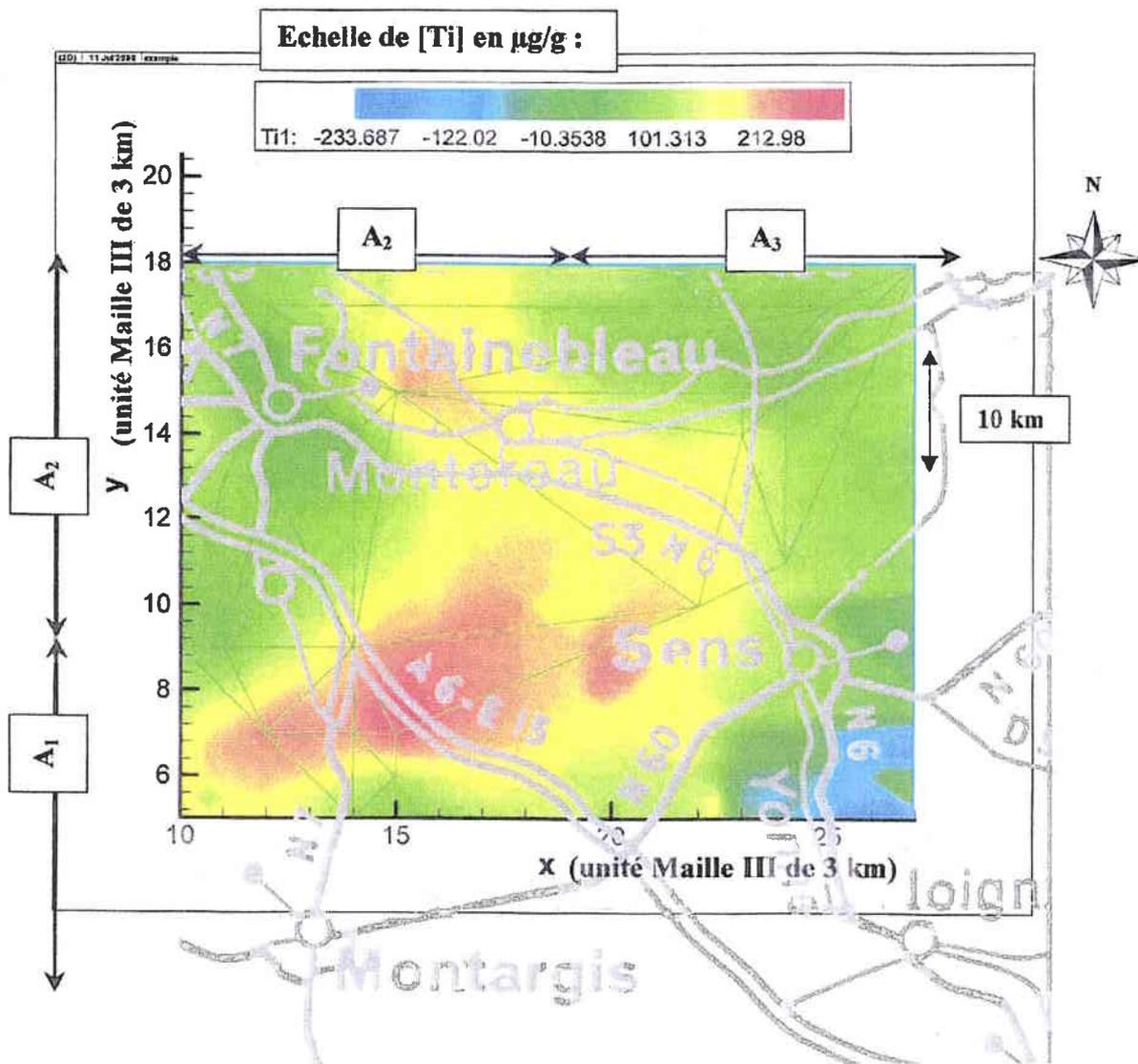


FIGURE 4 : Carte d'isoconcentration de Ti mesuré dans les mousses ($\mu\text{g/g}$) après interpolation par krigeage de la zone comprenant uniquement les 3 Mailles de taille I échantillonnées (A_1 , A_2 , A_3 , 30/30 km, **FIGURE 3**). Les agglomérations et routes principales sont indiquées ainsi que la triangulation des données (triangles verts). Les axes des abscisses et des ordonnées correspondent aux unités mailles III (unité=3 km). Les fortes concentrations sont étendues et localisées en région centrale de la carte, avec une zone plus concentrée à l'Ouest au niveau de la maille III n°4 (**FIGURE 3**). Les [Ti] négatives (échelle en $\mu\text{g/g}$) ne sont pas à considérer (zones bleues au sud-est de la carte) en raison d'une interpolation faite avec des points trop éloignés.

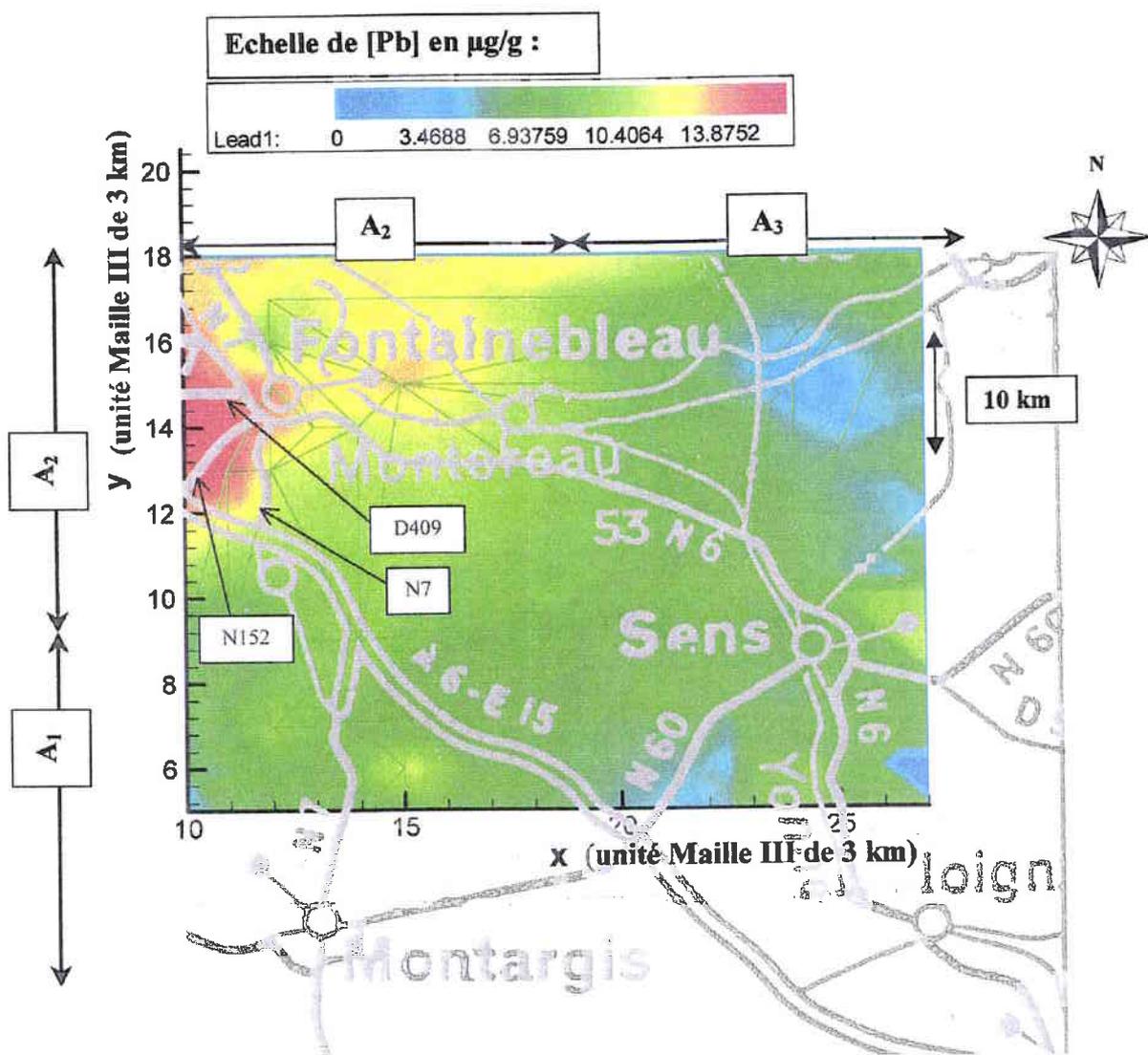


FIGURE 5 : Carte d'isoconcentration de Pb mesuré dans les mousses ($\mu\text{g/g}$) après interpolation par krigeage de la zone comprenant uniquement les 3 Mailles de taille I échantillonnées (A₁, A₂, A₃, 30/30 km, FIGURE 3). Les agglomérations et routes principales sont indiquées ainsi que la triangulation des données (triangles verts). Les axes des abscisses et des ordonnées correspondent aux unités mailles III (unité=3 km). La zone de Fontainebleau comporte des échangeurs routiers très fréquentés (nord-ouest) qui semblent influencer le contenu des mousses en Pb (D409, N152, N7).

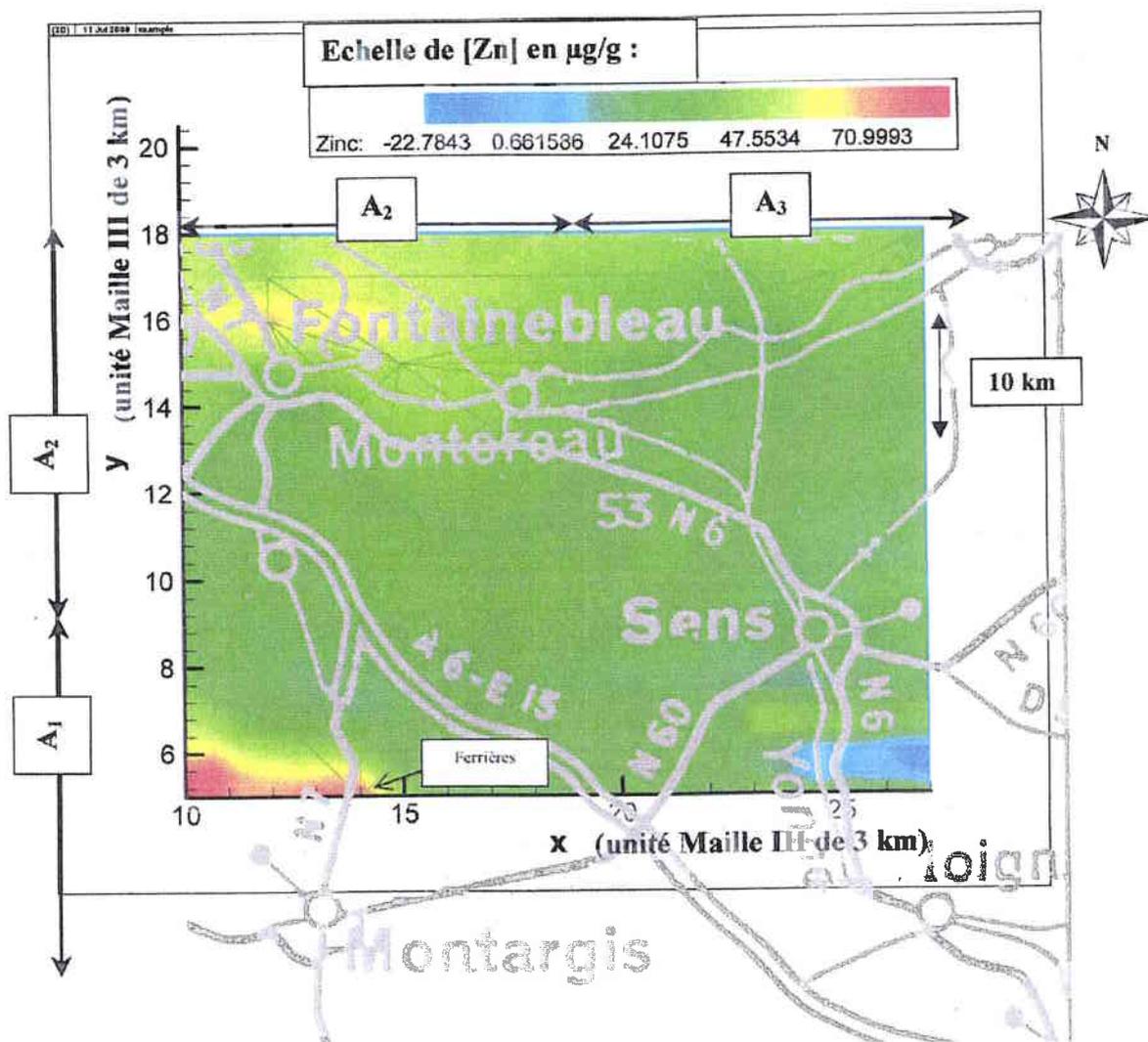


FIGURE 6 : Carte d'isoconcentration de Zn mesuré dans les mousses (µg/g) après interpolation par krigeage de la zone comprenant uniquement les 3 Mailles de taille I échantillonnées (A₁, A₂, A₃, 30/30 km, **FIGURE 3**). Les agglomérations et routes principales sont indiquées ainsi que la triangulation des données (triangles verts). Les axes des abscisses et des ordonnées correspondent aux unités mailles III (unité=3 km). Les zones assez concentrées en Zn sont localisées à l'emplacement de la ville de Fontainebleau (incinérateur) et à la région sud ouest (maille III n°2, **FIGURE 3**, zone proche de la commune de Ferrières, recensée comme émettrice, voir Annexes Chapitre II, Annexes Générales). Le reste de la carte indique une distribution homogène avec une faible concentration globale. Les [Zn] négatives (échelle en µg/g) ne sont pas à considérer (zones bleues au sud-est de la carte) en raison d'une interpolation faite avec des points trop éloignés.

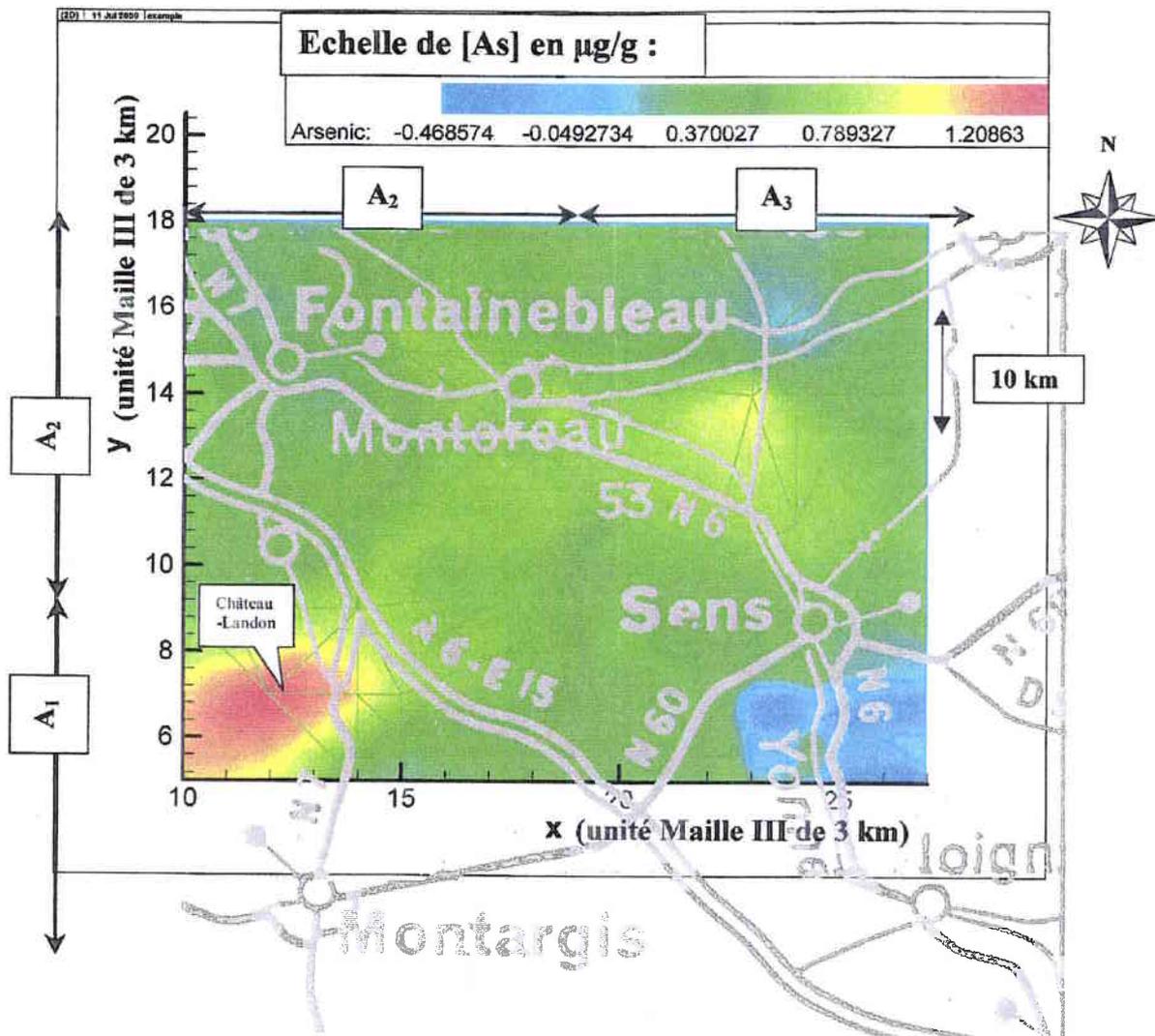


FIGURE 7 : Carte d'isoconcentration de As mesuré dans les mousses ($\mu\text{g/g}$) après interpolation par krigeage de la zone comprenant uniquement les 3 Mailles de taille I échantillonnées (A_1 , A_2 , A_3 , 30/30 km, **FIGURE 3**). Les agglomérations et routes principales sont indiquées ainsi que la triangulation des données (triangles verts). Les axes des abscisses et des ordonnées correspondent aux unités mailles III (unité=3 km). La zone fortement concentrée (maille III n°6, **FIGURE 3**) est proche de la commune de Château-Landon (recensée comme émettrice, voir *Annexes Chapitre II, Annexes générales*). Le reste de la carte indique une distribution homogène avec une faible concentration globale (sauf pour la maille III n°22 située au nord-est, **FIGURE 3**). Les [As] négatives (échelle en $\mu\text{g/g}$) ne sont pas à considérer (zones bleues au sud-est de la carte) en raison d'une interpolation faite avec des points trop éloignés.

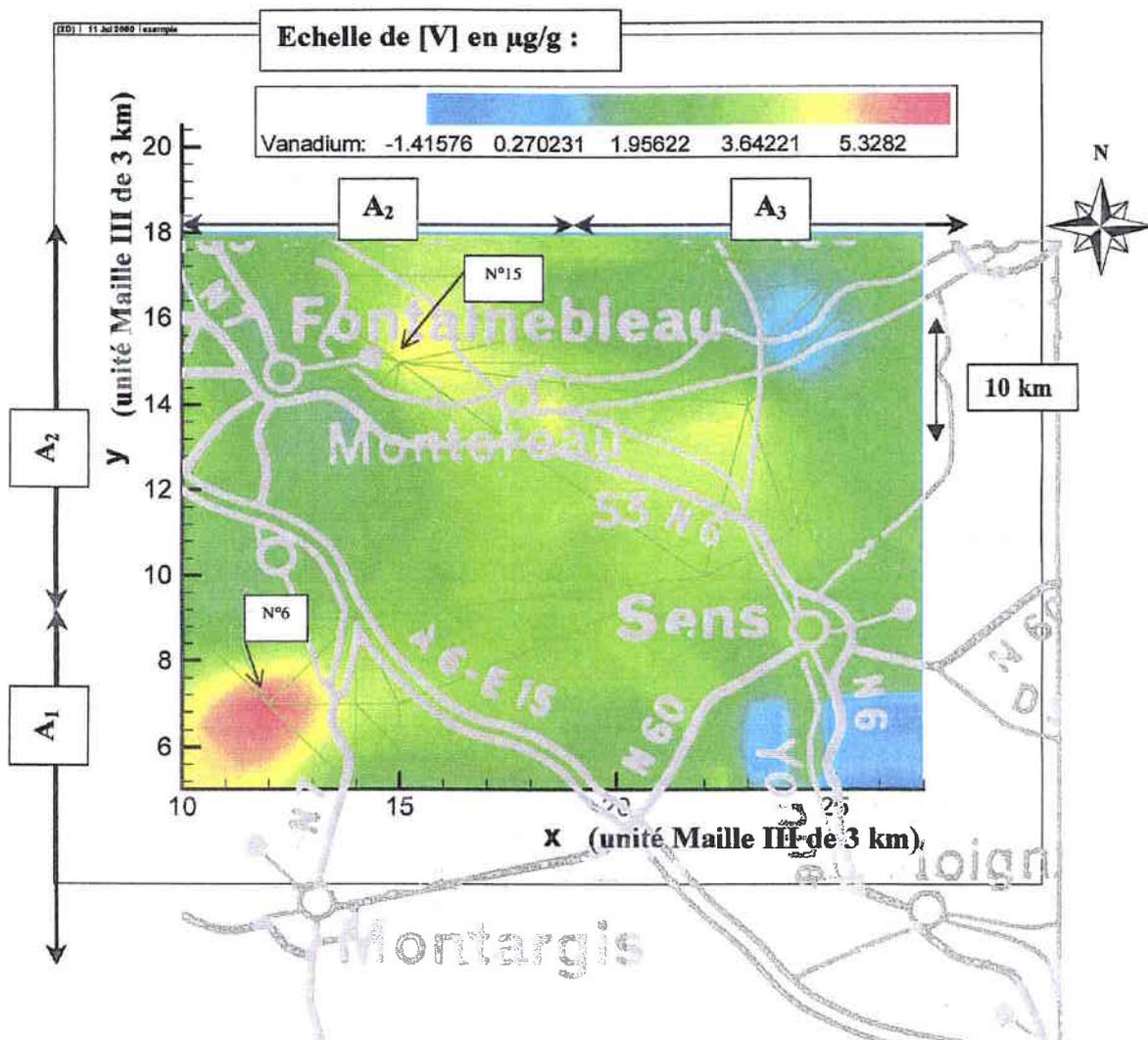


FIGURE 8 : Carte d'isoconcentration de V mesuré dans les mousses ($\mu\text{g/g}$) après interpolation par krigeage de la zone comprenant uniquement les 3 Mailles de taille I échantillonnées (A_1 , A_2 , A_3 , 30/30 km, **FIGURE 3**). Les agglomérations et routes principales sont indiquées ainsi que la triangulation des données (triangles verts). Les axes des abscisses et des ordonnées correspondent aux unités mailles III (unité=3 km). Les zones assez concentrées en V sont localisées aux mailles III n°6 et 15 (**FIGURE 3**) proches des communes de Château-Landon et Champagne-sur-Seine répertoriées comme zones émettrices (voir *Annexes du Chapitre II, Annexes Générales*). Le reste de la carte indique une distribution homogène avec une faible concentration globale. Les [V] négatives (échelle en $\mu\text{g/g}$) ne sont pas à considérer (zone sud-est de la carte) en raison d'une interpolation faite avec des points trop éloignés.

2.4 Conclusion

L'étude de variabilité spatiale a permis de préciser une partie importante de l'utilisation des mousses dans les études de biomonitoring passif : la validité des données cartographiées et la structure de l'hétérogénéité des éléments.

Les résultats montrent la faible reproductibilité de l'"outil mousse" pour des objectifs de cartographie à faible échelle (mailles II et III de 10/10 et 3/3 km). La variance résiduelle propre à cette méthode biologique est forte pour l'ensemble des éléments et masque ainsi les hétérogénéités spatiales éventuelles associées aux mailles pouvant révéler des sources d'émissions. Les éléments Cu, Sb, Pb (composante de variance Maille I élevée) et Zn (composante de variance Maille II élevée) ont une composante de variance résiduelle du même ordre de grandeur, voire inférieure, à leur composante de variance "taille de maille" maximale. Il est donc raisonnable pour ces éléments d'utiliser des mailles I de 30/30 km pour cartographier les variations spatiales des teneurs des mousses, tel que cela a été fait dans le programme européen (1, 2). Mais, compte tenu de la variabilité résiduelle non négligeable, des tailles de maille plus grandes (>30/30 km) pourraient tout-à-fait être utilisées. Pour les autres éléments (Ga, Ti, V, As, Cs, Ba, La, Rb, Sr, Cd, Co et U), les fortes variabilités résiduelles et la dispersion régulière de la variabilité totale à chaque niveau (maille I, II, III et résiduelle) rendent délicate toute interprétation de données par la méthode "mousse", dont les variations de teneurs seront essentiellement dues à la méthode biologique plus qu'à de réelles variations spatiales.

L'étude coût-bénéfice montre que, pour optimiser les futures campagnes, l'effort d'échantillonnage des mousses doit porter sur les mailles I de 30/30 km, avec un effort particulier de répétitions par maille pour les éléments Cu, Pb et Sb. Plus la précision désirée est élevée, plus les mailles I doivent être multipliées. De même, plus le budget temps-argent alloué à une campagne d'échantillonnage est faible, plus les mailles I devront être favorisées par rapport aux autres, pour conserver une certaine précision à l'ensemble des données. Par contre, plus le montant alloué à une campagne augmente, plus le nombre de grandes mailles devra être favorisé.

L'estimation des retombées atmosphériques par les mousses avec des mailles de 30/30 km apparaît *a posteriori* raisonnable pour Cu, Pb, Sb et Zn. Cependant, pour les autres éléments comme V, As, ou Cd, qui font partie du programme européen, la variabilité résiduelle de l'"outil mousse" est telle qu'elle ne garantit absolument pas l'origine spatiale des variations des teneurs constatées. Pour ces éléments, comme pour ceux du troisième et quatrième groupe, il faut s'interroger sur la validité même de cette méthode biologique pour les cartes d'isoconcentrations.

2.5 Bibliographie

- 1- Rühling, A.; Steinnes, E.; *Atmospheric Heavy Metal Deposition in Europe 1995-1996*, Nord 1998 : 15, Nordic Council of Ministers, Copenhagen **1998**, 66 p.
- 2- Rühling, A.; Nordisk Ministerrad Report, Nord **1994** : 9, 58 p.
- 3- Berg, T.; Steinnes, E.; *Recent trends in atmospheric deposition of trace elements in Norway as evident from the 1995 moss survey*, The Science of the Total Environment 208, **1997**, 197-206.
- 4- Berlekamp, J.; Herpin, U.; Lieth, H.; Markert, B.; Weckert, V.; Wolterbeck, B.; Verburg, T.; Zinner, H.J.; Siewers, U.; *Geographic classification of heavy metal concentrations in mosses and stream sediments in the Federal Republic of Germany*, Water, Air and Soil Pollution, Vol 101, No. ¼, **1998**, 177-195.
- 5- Reimann, C.; De Caritat, P.; Halleraker, J.H. et al., *Regional atmospheric deposition patterns of Ag, As, Bi, Cd, Hg, Mo, Sb and Tl in a 188,000 km² area in the european arctic as displayed by terrestrial moss samples- long-range transport vs local impact*; Atmospheric Environment, Vol. 31, No 23, **1997**, 3887-3901.
- 6- Markert B., Environmental sampling for trace analysis, Markert B. (ed); VCH Weinheim, **1994**, 522 p.
- 7- Halleraker, J.H.; Reimann, C.; de Caritat, P.; Finne, T.E.; Kashulina, G.; Niskaavaara, H.; Bogatyrev, I.; *Reliability of moss (*Hylocomium splendens* and *Pleurozium schreberi*) as a bioindicator of atmospheric chemistry in the Barents region : Interspecies and field duplicate variability*, The Science of the Total Environment 218, **1998**, 123-139.
- 8- Frontier S., Stratégies d'échantillonnage en Ecologie ;Edition Masson et les Presses de l'université Laval-Québec, **1982**, 494 p.
- 9- Maul A., **1982**, Définition d'une stratégie de prélèvement pour l'analyse microbiologique des eaux de surface, Thèse de 3^{ème} Cycle, Université de Metz, 124 p.
- 10- Matheron G., La théorie des variables régionalisées, et ses applications, Les cahiers du Centre de Morphologie Mathématique de Fontainebleau, Fascicule 5, ENSMP, Fontainebleau, France, **1970**, 212 p.
- 11- Chauvet P., Traitement des données à support spatial : la géostatistique et ses usages, rapport N-28/92/G, ENSMP, Fontainebleau, France, **1992**, 43 p.
- 12- De Fouquet C., Influence de la méthode d'estimation et de la maille de reconnaissance sur la quantification des pollutions, étude méthodologique à 2D, rapport N-8/96/G, ENSMP, Fontainebleau, France, **1996**, 18 p.
- 13- Galsomiès, L.; Letrouit-Galinou, M.A.; Deschamps, C.; Savanne, D.; Avnaim, M.; *Atmospheric metal deposition in France : initial results on moss calibration from the 1996 biomonitoring*, The Science of the Total Environment, **1999**, 232, 39-47.
- 14- Steinnes, E.; Rühling, A.; Lippo, H.; Mäkinen, A.; *reference materials for large scale metal deposition surveys*, Accred. Qual. Assur., **1997**, 2, 243-249.
- 15- Cochran W.G., Sampling Techniques, third edition ; John Wiley and Sons (eds), **1957**, 428 p.
- 16- Wolterbeek, H.T.; Kuik, P.; Verburg, T.G.; Herpin, U.; Markert, B.; Thöni, L.; *Moss interspecies comparisons in trace element concentrations* ; Environmental Monitoring and Assessment 35, **1995**, 263-286.
- 17- Reimann, C. and De Caritat P., **1998**, Chemical Elements in the Environment, Factsheets for the Geochemist and Environmental Scientist, Springer-Verlag, 398 p.

- 18-Steinnes E., A critical evaluation of the use of naturally growing moss to monitor the deposition of atmospheric metals; *The Science of the Total Environment*, **1995**, 160/161, 243-249.
- 19-Qinghong, L.; Brakenhielm, S.; *A statistical approach to decompose ecological variation*, *Water, Air and Soil Pollution*, 85, **1995**, 1587-1592.
- 20-Bargagli R., The elemental composition of vegetation and the possible incidence of soil contamination of samples; *The Science of the Total Environment*, **1995**, 176, 121-128.
- 21-Rahn K.A., A graphical technique for distinguishing plant material and soil from atmospheric deposition in biomonitors, *BioMAP*, 1st International Workshop on Biomonitoring of Atmospheric Pollution, 10/1997, Lisbonne, Portugal.

CHAPITRE III. Conversion Stock-Flux : Calibration d'un outil de Biomonitoring Actif et des Retombées Atmosphériques Réelles¹

Résumé

Un nouvel outil de biomonitoring actif, nommé « Moss Plate », a été élaboré avec des critères de standardisation et de qualité afin de maintenir vivants des transplants de mousses pleurocarpes sur une période de deux mois. La technique d'induction de la fluorescence de la chlorophylle (rapport Fv/Fm) a mis en évidence le rôle tampon de la présence d'eau sur le maintien de l'activité biologique des trois espèces de mousses testées (*Pleurozium schreberi*, *Ps* ; *Scleropodium purum*, *Sp* ; *Eurhynchium praelongum*, *Ep*).

Les deux espèces les plus résistantes (*Ps*, *Sp*) ont été transplantées dans ces « moss plates » avec une réserve d'eau, sur quatre stations différentes (2 témoins, 2 polluées), en parallèle de collecteurs totaux des retombées atmosphériques (« jauge Owen »). Trois expositions de deux mois ont permis de relier le contenu des transplants (exprimé en µg/g) en Ba, Pb, Sb et Ti avec les retombées atmosphériques sèches et sédimentables (> à 20 µm, exprimées en µg/m²/t) séparées en différentes classes de tailles (>1 mm ; 1000-200 µm ; 200-40 µm ; 40-20 µm). L'ensemble des dosages ont été réalisées en ICP-MS.

En parallèle, quelques brins de *Sp*, prélevés à t=0, 1, 2 mois d'exposition sur un site témoin et un site pollué, ont été analysés par la méthode non destructive de SXRF (Fluorescence X sous rayonnement synchrotron) pour localiser l'enrichissement *in vivo* des éléments le long du brin.

Les résultats des transplants montrent que les « moss plates » permettent de comparer relativement les stations entre elles (Ba, Cs, Sb, Sr, U) ainsi que les différences d'accumulation entre espèces de mousses (Pb, Sb, Ti, V). Deux mois d'exposition sont suffisants pour mesurer un enrichissement significatif des mousses (Ba, Cd, Pb, Sb, Ti, U, V) par rapport au contenu initial.

De bons modèles de conversion stock-flux sont élaborés pour Ba, Pb, Sb, Ti ($r^2=70\%$). Ces modèles utilisent des variables qualitatives (stations, espèces) et quantitatives (flux de poussières, temps d'exposition) pour expliquer le contenu des mousses. Ils mettent notamment en évidence l'influence significative des variables qualitatives « stations » montrant ainsi une biodisponibilité différente des mousses face à la qualité des retombées atmosphériques sèches sédimentables.

La capture des éléments après exposition est localisée par la méthode de SXRF qui met en évidence l'influence des retombées atmosphériques récentes (Pb, Ti, Se, Cl) sur les parties âgées des brins (base des brins). Cette accumulation semble essentiellement due à un phénomène passif de capture et de sédimentation des poussières à la base des brins de mousses.

¹ Ce chapitre a fait l'objet de publication : Actes du colloque *BioMAP 2nd International Workshop on Biomonitoring of Atmospheric Pollution*, 29/08 to 01/09/2000, Terceira Island, Azores, published in IAEA *Tecdoc* puis soumis à *Environmental Pollution*

Abstract

A new active biomonitoring tool named "moss plate" was elaborated with standardization and quality criteria in the aim of keeping alive mosses for a short term period of two months. The chlorophyll fluorescence induction method (Fv/Fm parameter) on three moss species (*Pleurozium schreberi*, *Pseudoscleropodium purum*, *Eurhynchium praelongum*) has demonstrated the buffering action of the water presence for the biological activity stability of mosses. The two more resistant species were selected and exposed on four different sites with parallel exposure of monthly total atmospheric deposition gauges ("Owen" gauges) for three successive periods of two months. The "moss plate" allows relative site (Ba, Cs, Sb, Sr, U) and species (Pb, Sb, Ti, V) comparisons and, two months are enough for a significant enrichment (Ba, Cd, Pb, Sb, Ti, U, V). The coarse and sedimentable particles were separated into different size classes (>1 mm; 1000-200 µm ; 200-40 µm ; 40-20 µm). Dry depositions and transplanted mosses were analysed by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS) for a stock (µg.g⁻¹) - fluxes (µg.m⁻².t⁻¹) conversion experiment. Good explicative models were elaborated for Ba, Pb, Sb and Ti (r²>70 %) including categorical (Stations, moss Species) and quantitative variables (particles size classes in fluxes term). Models put in evidence the qualitative in site local influence of sedimentable particles on the moss content. Entire and intact shoots of *Pseudoscleropodium purum* were analysed by detected Synchrotron Radiation Induced X-Ray Fluorescence (SXRF) to locate the *in vivo* distribution of the multielemental enrichment along the moss stem. The Pb, Ti, Cl, Se short term enrichment on the moss is mainly localized in the old plant parts.

Biological Fluxes Conversion, a New Active Biomonitoring Tool for Atmospheric Metals and Trace Element Deposition.

G. Amblard-Gross^{*,†}, J.F. Férard[‡], F. Carrot[†], A. Maul[§], J.M. Ducruet^{**}, P. Coddeville^{*}, P. Béguinel^{*}, S. Ayrault[†] and L. Galsomiès^{*}.

[†] Laboratoire Pierre Süe, CEA-CNRS, CEA de Saclay, Bât 637, 91191 Gif-sur-Yvette, France

[‡] EBSE, Campus Bridoux, rue du Général Delestraint, 57070 Metz, France

[§] STID, IUT Metz, 57045 Metz, France

^{**} Laboratoire de Bioénergétique, CEA de Saclay, 91191 Gif-sur-Yvette, France

^{*} Département de Chimie et Environnement, Ecole des Mines de Douai, Douai, France

[♦] SRSE, CEA de Saclay, 91191 Gif-sur-Yvette, France

^{*} ADEME, Département Air et transport, 27 rue Louis Vicat, 75737 Paris Cedex 15.

* Corresponding author phone: (33) 1 69 08 97 79; fax: (33) 1 69 08 69 23; e-mail: amblard@drecam.cea.fr or gamg@freesurf.fr

Abstract

A new active biomonitoring tool named “moss plate” was elaborated with standardization and quality criteria in the aim of keeping alive mosses for a short term period of two months. The chlorophyll fluorescence induction method (Fv/Fm parameter) on three moss species (*Pleurozium schreberi*, *Pseudoscleropodium purum*, *Eurhynchium praelongum*) has demonstrated the buffering action of the water presence for the biological activity stability of mosses. The two more resistant species were selected and exposed on four different sites with parallel exposure of monthly total atmospheric deposition gauges (“Owen” gauges) for three successive periods of two months. The “moss plate” allows relative site (Ba, Cs, Sb, Sr, U) and species (Pb, Sb, Ti, V) comparisons and, two months are enough for a significant enrichment (Ba, Cd, Pb, Sb, Ti, U, V). The coarse and sedimentable particles were separated into different size classes (>1 mm; 1000-200 µm ; 200-40 µm ; 40-20 µm). Dry depositions and transplanted mosses were analysed by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS) for a stock (µg.g⁻¹) - fluxes (µg.m⁻².t⁻¹) conversion experiment. Good explicative models were elaborated for Ba, Pb, Sb and Ti (r²>70 %) including categorical (Stations, moss Species) and quantitative variables (particles size classes in fluxes term). Models put in evidence the qualitative in site local influence of sedimentable particles on the moss content. Entire and intact shoots of *Pseudoscleropodium purum* were analysed by detected Synchrotron Radiation Induced X-Ray Fluorescence (SXRF) to locate the *in vivo* distribution of the multielemental enrichment along the moss stem. The Pb, Ti, Cl, Se short term enrichment on the moss is mainly localized in the old plant parts.

3.1 Introduction

Because of their large geographic repartition, mosses have been increasingly used for active and passive biomonitoring purposes with aims of spatial and/or temporal assessment of atmospheric depositions (1, 2). Their bioaccumulation properties make them very efficient indicators for atmospheric metals and trace element depositions (1, 3). Root and cuticule absence make them find their nutritive elements in wet and dry atmospheric deposition (4, 5). The capture is supposed to be mainly due to cation exchange capacity and surface structures with minimum diffusive resistance of elements (6, 7) but, poorly data concern the dry deposition and especially the coarse and sedimentable particles capture (8, 9). The exact relationship between the moss content and the dry deposition is still not known even with the standardized active biomonitoring method of “moss bags” (10, 11). Some authors agree with the efficiency of “moss bags” mainly for the dry deposition (10, 12, 13). This active biomonitoring method is also used for the high surface contact and high cation exchange capacity of the moss species. But, these transplanted mosses don't keep a biological activity during exposure. This paper reports on a new active biomonitoring tool named, “Moss Plate” in reference to the well-known “Moss Bags” method and presents the relationships between the moss content and the dry

atmospheric deposition, precisely the coarse and sedimentable fraction ($>20 \mu\text{m}$) (22, 23). This experiment is composed of three different parts with firstly, the active biomonitoring tool elaboration and tests, secondly the moss content data conversion into fluxes term and thirdly, the *in vivo* distribution of elemental enrichment along the moss shoot with the SXRF method.

3.2 Materials and Methods

3.2.1 "Moss Plate" construction and exposition design

The "Moss Plate" is a three sub-unit tool (defined area of $3 \times 95 \text{ cm}^2$) divided in two parts (FIG. 1). The upper part of 12 cm height contains the biological material coming from a natural and young population of mosses (with two annual segments) sampled on a background area. A fresh sub-sample of mosses of a 95 cm^2 surface is installed in each sub-unit. They keep their natural individual density and vertical position as moss cushion. The high edges allow only a vertical atmospheric deposition onto the moss, by the circular and open area, and prevent from lateral capture, wind influence or rapid air drying. The mean material of each sub-unit corresponds to 1 g dried weight (for all species tested). A fine nylon net separates the two parts preventing from direct contact between mosses and water. The controlled water is stored (350 ml of a known water) in the downpart reserve keeping a constant level controlled by an outside gauge and sustaining a constant humidity for mosses. To prevent from material losses, a large mesh size polyamide hairnet is placed above the triplicate. The transplants are then installed on platforms to prevent from soil dust contaminations and to expose mosses to a similar atmospheric contact height as bulk collectors (1.1 m high) (FIG. 1). All measurements and tests (induction fluorescence of chlorophyll, stock-flux experiment and *in vivo* element distribution study) were made with mosses exposed in this design.

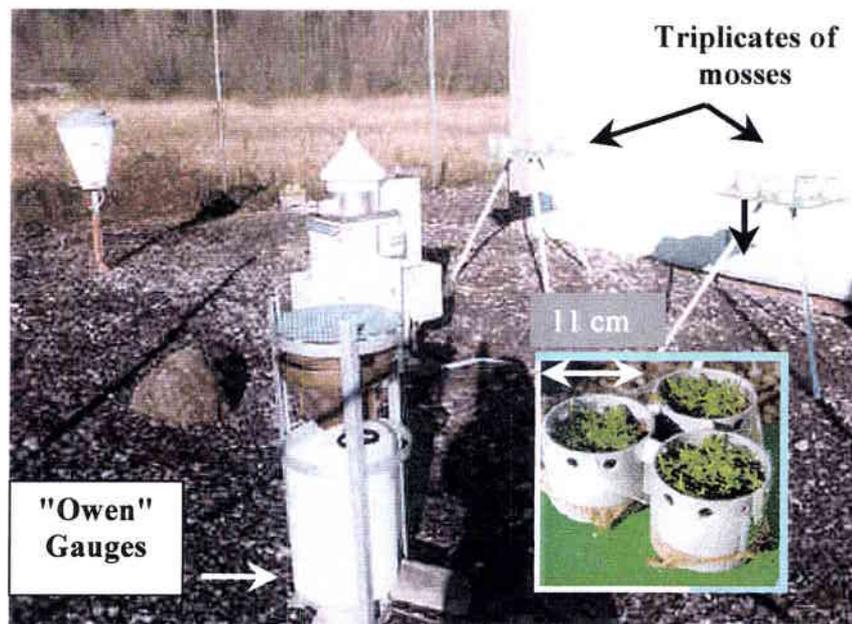


FIG. 1. : Picture and enlargement of the "Moss plates" construction and exposition design on continuous monitoring station (MERA network, France). The transplants with a defined area and water tank (350 ml water) are three sub-unit tools with natural population of mosses (enlargement picture of *Pseudoscleropodium purum*) installed on platforms (1.1 m high). This tool keeps mosses alive for two months in a natural and vertical position as moss cushion. Parallel exposure of total atmospheric deposition gauges ("Owen" gauges) (diameter 290 mm, 100 mm high) for the sedimentable and coarse dry atmospheric depositions ($>1 \text{ mm}$; $1000\text{-}200 \mu\text{m}$; $200\text{-}40 \mu\text{m}$; $40\text{-}20 \mu\text{m}$).

3.2.2 Chlorophyll Fluorescence Induction

Before transplantation on different sites, the viability of mosses during two months was tested in order to assess the watering necessity and to choose the two more appropriate and resistant moss species.

During summer 1998, *Pleurozium schreberi* (*Ps*), *Pseudoscleropodium purum* (*Sp*) and *Eurynchium praelongum* (*Ep*) were installed in transplants with and without water and exposed in an open area. At $t=0$, 2, 4 and 8 weeks, two chlorophyll fluorescence induction measurements were carried out on each transplant sub-unit. This method has proved to be a sensitive indicator of physiological stress in plants (14, 15, 19) qualifying the functional state of Photosystem II (PSII). Chlorophyll fluorescence was measured in the laboratory after a dark-adaptation period of two hours. Green upper parts of five mosses were cut into pieces and put in the analytical chamber with 0.5 ml of water. The whole induction kinetic was followed by a modulated PAM fluorimeter (Walz, Germany), under a continuous illumination (660 nm , $135\ \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) and $5000\ \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 1 s light pulses, with a 120 and 60 seconds period time at 20°C and 10°C . At the end, a saturating flash was given to reach the maximum fluorescence level F_m . The key parameter F_v/F_m ratio (variable and maximal fluorescences) was calculated. MANOVA data treatment determine the significant controlled factors and interactions.

3.2.3 Parallel exposition of transplanted mosses and total deposition gauges

3.2.3.1 Stock-Flux conversion experiment

The two moss species *Ps* and *Sp* have proved to be appropriate for such transplant tool. "Moss plates" and monthly total atmospheric deposition gauges ("Owen" Gauge) were both exposed on four continuous air quality monitoring stations, 2 background and 2 polluted stations. The "blank" and remote stations ("D" and "R") are part of the MERA (Atmospheric Deposition MEasurements) network. The two polluted stations ("CE" and "SV") are mainly influenced by dry particulate depositions and car exhausts. These stations are part of the environmental controlled network of the Atomic Energy Center (CEA, France). The bulk collector consisted of a polyethylene funnel (diameter 290 mm; vertical board 100 mm) and a polyethylene bottle (15 l). The funnel-bottle system was maintained by solid external framework. After $t=0$, 1 and 2 month of cumulative exposure, one triplicate of "moss plate" by specie and by station was removed from their platform and, mosses of each sub-unit were prepared for ICP-MS analysis. Total atmospheric deposition gauges were transported to the laboratory and prepared for ICP-MS analysis. During autumn 1998 to summer 1999, three exposure periods of two months (overall 6 month exposure) were conducted. Data statistical treatments were achieved through MANOVA procedure for the "Moss Plate" results and multiple regression analysis for the stock-flux conversion.

3.2.3.2 Biological Material for SXRF (Synchrotron Radiation Induced X-Ray Fluorescence) experiment

During the summer exposition, intact two year old shoots of *Sp* were removed from the transplants of stations "D" and "SV" for the *in vivo* analysis by SXRF. At $t=0$ and after $t=1$ and 2 months, three two years old's moss shoots were randomly sampled in each sub-unit of the transplant and prepared for *in vivo* analysis by SXRF.

SXRF data were analysed by MANOVA for the different controlled factors and regression analysis for a SXRF/ICP-MS semi-quantitative conversion.

* voir Annexes Générales, Annexes du Chapitre III pour plus de détails sur la méthode d'Induction de Fluorescence de la Chlorophylle.

3.2.3.3 Preparation and analysis

3.2.3.3.1 ICP-MS

3.2.3.3.1.1 *Transplanted Mosses*

After $t=0$, 1 and 2 month of cumulative exposure in the four stations, moss species of each sub-unit were separately prepared and analysed for ICP-MS analysis. Samples were dried (24 h at 40°C), milled and mineralised (200 mg portion in PTFE vessels by micro-wave with successive addition of ultra-pure reagents HNO₃, H₂O₂, HF, H₂O). A 200 mg dried moss aliquot over the 1 g total dried weight of one sub-unit has shown to be representative and homogeneous of the transplant material (coefficient of variation <20%). Solutions were diluted in 50 ml with high purity water (18.2 MΩ/cm), internal standards (In, Be, Re at 10 ng.ml⁻¹) were added and analysis were performed by ICP-MS with a VG Plasmaquad II Plus. Quality control and reproducibility of results were ensured by comparison with standard reference materials Lichen 336 IAEA, Rye Grass CRM 281 BCR, and mosses M1 and M2 inter laboratory elaborated reference material (16). Final elements concentrations are expressed in µg.g⁻¹ on a dry weight basis. Detection limits and results reproductibility have been published (17).

3.2.3.3.1.2 *Bulk Collectors*

After a monthly exposition ($t=1, 2$ months) in the four stations, total atmospheric deposition gauges were transported to the laboratory where their content was weighted and homogenized (shaking for 2 hours). The particle content was divided into four size classes by passing through nylon sieves with different mesh sizes (>1 mm ; 1000-200 µm ; 200-40 µm ; 40-20 µm). Samples were dried 24 hours at 60 °C and the all size class particle amount (<70 mg) was mineralised by a wet digestion method, with successive addition of ultra-pure reagents (HNO₃, HF, HClO₄) on sandy bath of 150 °C for 3 hours. During a cooling period (cold bath, 15 min), H₂O₂ was added and put at 90°C for 30 min. Then, teflon pots were open and two successive HNO₃ additions and evaporations allowed chlorine removing. Mineralised samples were diluted in 50 ml with high purity water (18.2 MΩ/cm), internal standards (In, Be, Re at 10 ng.ml⁻¹) were added and analysis were performed by ICP-MS with a VG Plasmaquad II Plus. Quality control and reproducibility of results were ensured by comparison with standard reference material (Coal Fly Ash 1633a SRM).

3.2.3.3.2 SXRFF Experimental arrangement

The moss gametophyte shoots with fully developed annual segments (two year old) were randomly chosen and kept in ultra-pure polyethylen plastic bags in a refrigerator (4°C) to avoid any dry out event. Just before SXRFF experiments, moss shoots were fixed on a plastic sample-holder structure for *in vivo* analysis. In parallel, the samples rests were analysed by ICP-MS for concentration analysis. Synchrotron induced X-Ray Fluorescence analysis* were performed on beam line D15 at LURE DCI (Laboratory for Electromagnetic Radiation Use), Orsay (France).

Relativistic positron, stored in a ring, radiate energy resulting in an intense white X-ray beam, highly collimated and polarized. In the experimental device, this beam is monochromated and cut to a 300 micron diameter spot by a platinum collimator. An energy of 14 keV was chosen to enhance sensitivity for Pb determination. A laser beam is used to simulate the X-ray beam path for proper positioning of sample which is set on a three axis (x, y, z) remote controlled stage and observed with a microscope equipped with a CCD camera. The fluorescence spectrum is detected with a Si(Li) detector of 150 eV energy resolution set at 90° from the incident beam in order to minimize scattering. Acquisition live time was typically of 600s. Three point acquisitions by annual segments were made on each two-years old individual to obtain a two-dimensional semiquantitative mapping of element repartition along identified annual segments. Data treatment was achieved through VIRESYME (18) which is a program used for the deconvolution of X-ray fluorescence spectrum.

* voir Annexes Générales, Annexes du Chapitre III pour plus de détail sur la méthode de SXRFF.

3.2.4 Statistics.

For the chlorophyll fluorescence induction data, the influence of controlled factors (water, species, time) on the Fv/Fm ratio was tested through MANOVA procedure.

For the “Moss Plates” data, the significant influence of controlled factors (species, stations, time) were tested through MANOVA and the stock-fluxes conversion models were assessed with multiple regression analysis (categorical variables as stations, species and quantitative variables as class size particles fluxes, time). Binary encoding allowed the models to take account the categorical variables. The “bulk collectors” data were tested by MANOVA for the controlled factors (stations, size classes). The SXRF data were analysed with MANOVA for the controlled factors (time, annual segment, Station). Possible semi-quantitative conversions between SXRF and ICP-MS were tested through different fitted models (linear, logarithmic). In these statistical analysis, variables were first transformed (logarithmic, square root functions) if necessary to satisfy the underlying conditions of variance and regression analysis. Multiple comparison procedures were applied to determine which means were significantly different from the others (Tukey’s honestly significant differences HSD procedure). All statistical analysis were performed using StatGraphics Plus[®] software.

3.3 Results and Discussion

3.3.1 Chlorophyll induction Fluorescence : Viability of the “Moss Plates”

MANOVA determines significant effects of the three controlled factors (Water, Species and Time) and interactions (Water×Time) (W×T) and (Species×Time) (S×T) (TAB. I, FIG. 2A and 2B). The “Water” effect indicates the necessity of the water presence in the transplant to sustain the PSII biological activity of the three moss species exposed. The PSII activity of the lichen *Cladonia convoluta* was shown to be dependant on the water presence for rapid restoration after an unfunctionnal state (19). In general, the activity of PSII is more susceptible to heavy metal ions induced damage compared to that of PSI (14, 19) and could be more influenced by atmospheric depositions.

The *Ps* specie has a higher biological activity than the two others. *Ps* is a more light resistant moss than *Sp* or *Ep* which are shade species (20). This significant difference can be explained by the ecology of *Ps* but could also reveal a probable difficult adaptation of two other species for a two months exposition in an open area.

Main Effects	W : Water (dl=1)		S : Species (dl=2)			T : Time (dl=3)
p-Value	***		***			***
	with (n=42)	without (n=42)	<i>Ep</i> (n=28)	<i>Ps</i> (n=28)	<i>Sp</i> (n=28)	
Fv/Fm Mean	0.53	0.59	0.53	0.63	0.52	
Std. error	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	

Interactions	(WxS) (dl=2)	(WxT) (dl=3)	(SxT)(dl=6)	(WxSxT) (dl=6)
p-Value	0.376	**	***	0.153

TAB. I : Summary of the Multifactor Analysis of Variance for Fv/Fm for the controlled factors W : “Water” (with watered or unwatered moss plates); S : “Species” (moss species tested with *Eurhynchium praelongum* (*Ep*), *Pleurozium schreberi* (*Ps*) and *Pseudoscleropodium purum* (*Sp*)); T : “Time” (t=0, 2, 4, 8 weeks, not detailed here) and the Interactions (WxS) (FIG. 2B); (WxT) (FIG. 2A); (SxT) and (WxSxT). Since 5 p-values are less than 0.05, these factors have a statistically significant effect on Fv/Fm at the 5% level (** p<0.001; *** p<0.0001). This table shows the mean and standard error (Std. Error) Fv/Fm for the water and species levels.

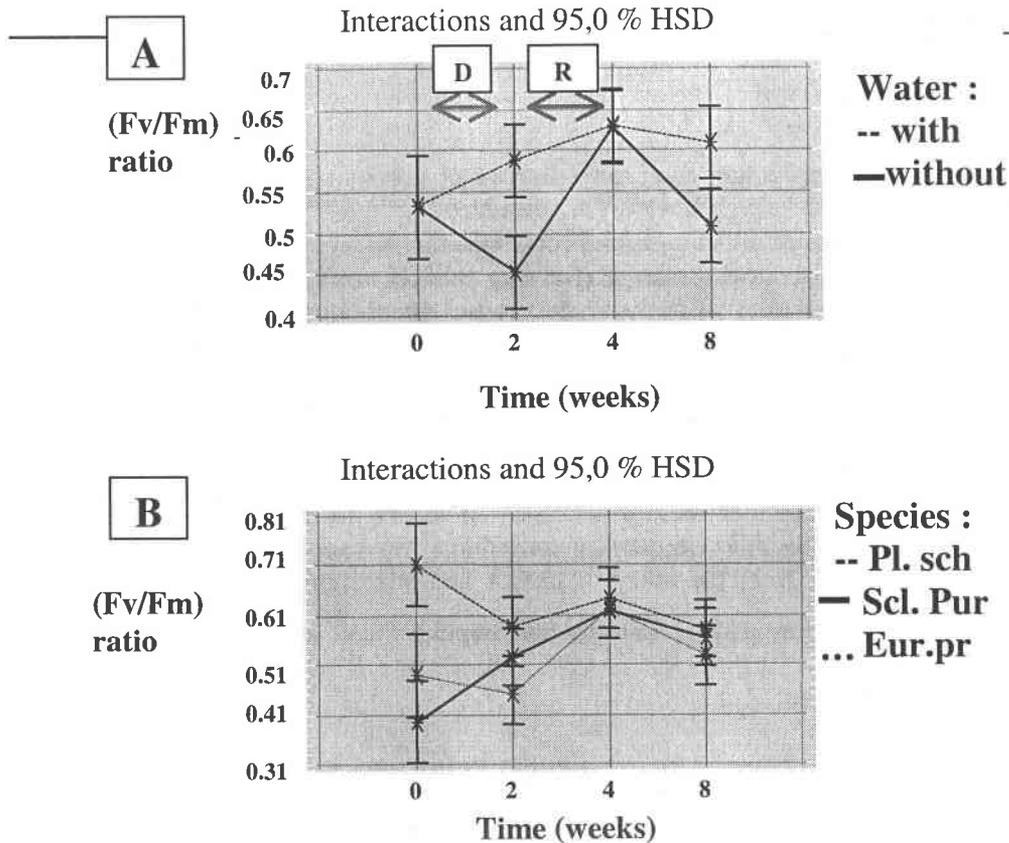


FIG. 2. : Controlled factor interactions after MANOVA for the Fv/Fm ratio (Chlorophyll Fluorescence Induction parameter) (with). The significant interactions are :
A- (Water×Time) with watered and unwatered "moss plates", "D" and "R" indicate the drought and rainy time periods ; time (t=0, 1, 2, 4 and 8 weeks);
B- (Species×Time) with the three moss species tested *Pleurozium schreberi* (Pl. schr.), *Pseudoscleropodium purum* (Scl. Pur.) and *Eurhynchium praelongum* (Eur. Pr.); time (t=0, 1, 2, 4 and 8 weeks).

The (W×T) interaction (**FIG. 2A**) shows the buffering role of water for the PSII activity of mosses exposed for two months. Indeed, the watered transplants have a relative constant activity whereas the unwatered's are more variable with time. At t=2 and 8 weeks, the Fv/Fm ratios are different between both transplants. A drought period has preceded the t=2 weeks measurements and a rainy period has overlapped the t=4 weeks measurements. The watered "moss plates" buffer the effect of external meteorological conditions on the chlorophyll fluorescence induction. With a rain event, the low PSII activity of mosses is restored rapidly to a normal level. For the (S×T) interaction (**FIG. 2B**), the *Ps* species has a higher and more stable activity than the two others. *Sp* and *Ep* show a parallel time evolution with a rapid recuperation after the drought period because of a rain event. For the stock-flux conversion, the selected moss species were *Ps* (stable biological activity) and *Sp* (fast biological recovery).

3.3.2 Stock-Flux conversion experiment (ICP-MS)

3.3.2.1 Moss results

The MANOVA analysis allows to clarify the "moss plates" efficiency as a biomonitoring tool (**TAB. II**).

The "Species" effect is significant for Pb, Sb, Ti ($p < 0.001$) and V ($p < 0.05$). These results show that *Ps* accumulate more all elements of concern than *Sp*, for all stations and periods of exposure. Some studies have shown a higher Pb, Fe, Ti and V content of *Ps* versus *Sp* after passive biomonitoring surveys (21). Environmental pathways for these elements often involve particulate matter emitted from natural (Ti, V soil dusts) or anthropogenic (Pb, Sb) sources like car exhausts (22, 23, 24). The better capture efficiency of *Ps* versus *Sp* could be explained by a wider surface contact area due to a more

open leaf shape, leading to an efficient dust trap. The specie content difference is of several $\mu\text{g.g}^{-1}$ for Pb, Ti and ng.g^{-1} for Sb and V, with a double concentration for Sb. *Ps* seems to be more efficient for these elements capture and could be preferred to *Sp*.

The "Time" effect shows that a cumulative two-month exposure is necessary for significant enrichment of mosses compared to $t=0$ for Ba, Cd, Pb, Sb, Ti, U and V (TAB. II). One month is sufficient for Sb and U. The time required for the "moss plate" is similar for "moss bags" with one to several month exposition required (10, 13). Some authors recommend more than one month exposure for Pb atmospheric deposition with "moss bag" (25) and agree with the efficiency of "moss bags" mainly for dry deposition (10, 12, 13). But, the exact relation between the "moss bag" content and real atmospheric deposition is still not known even if some studies put in evidence possible quantitative conversion with unsedimentable dry deposition ($<0.8 \mu\text{m}$) (26).

The relative comparisons of "Stations" are possible for Cs, Sb, Sr, U ($p<0.001$) and Ba ($p<0.05$) (TAB. II). The two-month exposure is not enough to see significant differences for Pb even if some trends are obvious. For other elements, the two polluted sites "CE" and "SV" are significantly higher than the background "D" and "R" for Cs, Sb, Sr, U. "SV" is significantly higher than "D" for Ba. The mean concentrations of "moss plates" are of the same order of previous passive biomonitoring surveys with same moss species (27). For Sb, stations "D" and "R" are closer to Norwegian and German median concentrations (0.09 and $0.171 \mu\text{g.g}^{-1}$ versus $0.29 \mu\text{g.g}^{-1}$) whereas "SV" and "CE" are closer to the maxima indexed for these mosses (0.64 and $0.62 \mu\text{g.g}^{-1}$). For U, the German and Norwegian median (0.04 and $0.029 \mu\text{g.g}^{-1}$) are similar to those of stations "D" and "R". Stations "CE" and "SV" are far from indexed maxima (0.45 and $0.89 \mu\text{g.g}^{-1}$) but, transplanted mosses have doubled their content in one month in these two stations. For Cs, the situation is similar to U with "SV" and "CE" stations higher to the "D" and "R" content and to classical median encountered (0.18 and $0.22 \mu\text{g.g}^{-1}$). For Sr, Ba the "moss plate" concentrations are similar to classical moss content (13 and $10.4 \mu\text{g.g}^{-1}$ for Sr ; 24 and $19.4 \mu\text{g.g}^{-1}$ for Ba).

3.3.2.2 Bulk collector results

MANOVA treatment reveals significant effect of controlled factors. The "Stations" effect is significant for Ba, Pb, Sb, Ti (TAB. III). For Ba, the station "CE" ($469.7 \mu\text{g.g}^{-1}$) is significantly higher than "D" ($349.9 \mu\text{g.g}^{-1}$). The mean concentration of these two stations are similar to concentration maxima found in urban soil (0-2 cm) with $385 \mu\text{g.g}^{-1}$ (median of $72.2 \mu\text{g.g}^{-1}$) (27). Probably, Ba is mostly present in windblown dusts with geogenic sources more important than anthropogenic ones. For Pb, "SV" ($1728.2 \mu\text{g.g}^{-1}$) is higher than "CE" ($761.1 \mu\text{g.g}^{-1}$) and "R" ($844.6 \mu\text{g.g}^{-1}$) which are not different but significantly more concentrated than "D" ($470.3 \mu\text{g.g}^{-1}$). For the "R" station firstly considered as a background one, there is a certain evidence of a traffic influence as important as "CE". For "CE", it is surprising that total atmospheric deposition for sedimentable particles is similar to "R" but this could be explained by a real local influence of Pb sedimentable dusts which can distinguish background from heavily polluted sites but less precisely from different medium polluted sites. The Pb particle concentration for all stations makes Pb a major element of the dusts captured by the bulk collectors (% contribution for "SV"). These concentrations are similar to maxima indexed in urban soil (0-2 cm) ($976 \mu\text{g.g}^{-1}$) (27). The car exhausts influence in these stations, especially in "SV" for Pb, is clearly put in evidence. Sb is present in Pb-Cu smelters, car exhaust, coal combustion and, for this element, "CE" and "SV" are more concentrated than the two background stations with similar concentrations than maxima in urban soil ($18 \mu\text{g.g}^{-1}$) (27). For Ti, "R" is statistically more concentrated than "D", "CE" and "SV". Ti is one of the major component of sedimentable particles recovered in these passive gauges. Its environmental pathways are mainly soil dusts and median concentrations for urban soils are $1110 \mu\text{g.g}^{-1}$ and $402 \mu\text{g.g}^{-1}$ for agricultural soils (27) with maxima of 3170 and $3010 \mu\text{g.g}^{-1}$. Station Ti concentrations are closer to maxima and could put in evidence a main source of dusts captured with these gauges coming from soil after possible atmospheric resuspension. Comparing "Stations" effect between "moss plates" and "bulk collectors", similar relative station classification are possible for Sb and Ba. For Pb, station classification with bulk collectors and mosses can be considered as relatively similar if the non significant mosses data trends are taken into account.

The "Size class" effect is significant for Ba, Pb, Sb and Ti, showing differential element repartition with the four sizes $>1 \text{ mm}$ (class 1); $1000-200 \mu\text{m}$ (class 2); $200-40 \mu\text{m}$ (class 3) and $40-20 \mu\text{m}$

(class4) (TAB. III). Ti is more concentrated in class 3 than class 1, 2 and 4 (lowest concentration in the >1 mm). Ba, Sb and Pb have a more ubiquitous presence in all the size classes 2, 3, 4 with an higher trend for class 3 (lowest concentration for class 1). These total atmospheric deposition gauges seem to be mainly influenced by resuspended particles with natural and anthropogenic origins. Dust size classes show different elemental concentrations (*Figures 4 à 7*)* and are probably of importance for the stock-flux models as independant explicative variables of moss content.

Main Effects	Elements	Ba138	Pb206	Sb121	Ti48
A : Time	S. of sq.	3.45	10.3	6.17	1.16
dl=1	p-value	ns	**	ns	ns
t=1 (n=96)	m +- st.e.	419.7+-21.4	1093.9+-41.3	10.2+-3.5	2968.4+-117.4
t=2 (n=96)	m +- st.e.	395.4+-43.4	808.2+-83.8	9.8+-4.1	2736.1+-237.9
B : Size Classes	S. of sq.	93.45	49.46	152.9	199.4
dl=3	p-value	***	***	**	***
>1mm (n=48)	m +- st.e.	153.9+-36.6	803.8+-70.8	5.7+-3.3	1003.2+-200.9
1000-200µm (n=48)	m +- st.e.	538.2+-36.6	862.8+-70.9	8.8+-2.5	3193.3+-200.9
200-40µm (n=48)	m +- st.e.	394.9+-36.4	1117.6+-70.9	12.5+-3.6	3976.5+-200.9
40-20µm (n=48)	m +- st.e.	543.2+-49.9	1020.1+-96.4	5.1+-3.2	3235.8+-273.6
C : Stations	S. of sq.	11.75	120.7	210	24.42
dl=3	p-value	***	***	***	***
D (n=48)	m +- st.e.	349.9+-36.6	470.3+-70.6	4.3+-4.1	2712.4+-202.1
R (n=48)	m +- st.e.	409.2+-49.9	844.6+-96.4	4.2+-4.1	3816.1+-273.6
CE (n=48)	m +- st.e.	469.7+-36.5	761.1+-70.6	13.9+-5.1	2927.2+-200.9
SV (n=48)	m +- st.e.	401.3+-36.6	1728.2+-70.9	19.8+-5.9	1953.3+-200.9

TAB. III : Summary of the MANOVA for “Owen” gauges sedimentable atmospheric particles ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) with the controlled factors A : “Time” (t=1, first month; t=2, second month); B : “Size classes” (four size classes of sedimentable particles); C : “Stations” (D, R : blank stations; CE, SV : polluted stations mainly influenced by traffic and car exhausts). Since 10 p-values are less than 0.05, these factors have a statistically significant effect on these multielemental concentrations at the 5% level (** p<0.001; *** p<0.0001; ns : no significant; S. of sq. : Sum of squares). This table shows the mean and standard error (m +- st. e.) element concentrations ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) for the time, size classes and stations levels. The number of ICP-MS analysis are indicated in brackets.

* Les Figures signalées ne sont pas publiées mais ajoutées à l'Annexe du Chapitre III (Annexes Générales) pour une meilleure compréhension.

Main Effects	Elements	Ba138	Cd114	Cs133	La139	Pb206	Sb121	Sr88	Ti49	U238	V51
A : Species dl=1	S. of sq.	0.252	0.584	0.003	0.7483	2.5831	20.72	0.038	6.08	0.06	2.02
	p-value	ns	ns	ns	ns	***	***	ns	***	ns	*
Ps (n=120)	m +- st.e.	12.88+-0.71	0.23+-0.01	0.67+-0.04	0.46+-0.04	10.95+-0.51	0.29+-0.01	12.95+-0.87	21.01+-1.11	0.093+-0.005	1.35+-0.05
Sp (n=120)	m +- st.e.	13.42+-0.71	0.26+-0.01	0.64+-0.04	0.42+-0.04	8.65+-0.51	0.16+-0.01	13.42+-0.87	13.87+-1.07	0.081+-0.005	0.98+-0.05
B : Time dl=3	S. of sq.	5.204	10.63	1.652	6.761	10.462	12.96	8.807	9.38	16.4	10.9
	p-value	**	***	*	**	***	***	***	***	***	***
t=0 (n=22)	m +- st.e.	11.89+-1.43	0.20+-0.02	0.72+-0.08	0.42+-0.09	7.18+-1.03	0.15+-0.02	9.72+-1.74	13.95+-2.45	0.057+-0.010	0.97+-0.09
t=1c (n=108)	m +- st.e.	10.45+-0.65	0.21+-0.01	0.49+-0.03	0.39+-0.04	8.34+-0.47	0.23+-0.01	12.39+-0.79	15.75+-0.97	0.089+-0.005	1.02+-0.04
t=(2c-1c) (n=22)	m +- st.e.	14.59+-1.43	0.25+-0.02	0.75+-0.08	0.44+-0.09	10.52+-1.03	0.20+-0.02	12.94+-1.74	15.75+-2.01	0.078+-0.010	1.21+-0.09
t=2c (n=88)	m +- st.e.	15.68+-0.72	0.30+-0.01	0.68+-0.04	0.51+-0.04	13.18+-0.52	0.31+-0.01	17.7+-0.89	24.31+-1.03	0.123+-0.005	1.46+-0.05
C : Stations dl=3	S. of sq.	3.024	0.158	5.888	2.736	1.012	27.79	5.365	2.39	5.7	2.19
	p-value	*	ns	***	ns	ns	***	***	ns	**	ns
D (n=66)	m +- st.e.	11.65+-0.9	0.24+-0.01	0.58+-0.05	0.44+-0.06	8.91+-0.64	0.16+-0.01	11.34+-1.09	14.74+-1.33	0.066+-0.006	1.05+-0.06
R (n=44)	m +- st.e.	11.98+-1.12	0.25+-0.02	0.49+-0.06	0.40+-0.07	9.55+-0.80	0.16+-0.02	10.04+-1.36	14.17+-1.66	0.068+-0.008	1.03+-0.08
CE (n=66)	m +- st.e.	14.09+-0.9	0.25+-0.01	0.85+-0.05	0.44+-0.06	10.56+-0.64	0.24+-0.01	16.81+-1.1	19.95+-1.36	0.105+-0.006	1.23+-0.06
SV (n=64)	m +- st.e.	14.88+-0.9	0.22+-0.01	0.71+-0.05	0.47+-0.06	10.19+-0.65	0.35+-0.01	14.56+-1.1	20.9+-1.4	0.108+-0.006	1.34+-0.06

TAB. II : Summary of the MANOVA for “Moss Plates” multielementary concentrations ($\mu\text{g.g}^{-1}$) with the controlled factors A : “Species” (moss species tested with *Pleurozium schreberi* (Ps) and *Pseudoscleropodium purum* (Sp)); B : “Time” (time of transplant exposure with t=0, 1c (one cumulative month), 2c (two cumulative months) and (2c-1c) (second month); C : “Stations” (D, R : blank stations; CE, SV : polluted stations mainly influenced by traffic and car exhausts). Since 19 p-values are less than 0.05, these factors have a statistically effect on these multielemental concentrations at the 5% level (* p<0.05; ** p<0.001; *** p<0.0001; ns : no significant; S. of sq. : Sum of squares). This table shows the mean and standard error (m +- st. e.) element concentrations ($\mu\text{g.g}^{-1}$) for the species, time and stations levels. The number of ICP-MS analysis are indicated in brackets.

3.3.2.3 Stock-Flux conversion for Ba, Pb, Sb, Ti

After a stepwise method for selecting the significant variables ($p < 0.05$) and fitting the best models, stock-flux models were built for Ba, Pb, Sb, Ti with quantitative variables (different size class fluxes; time) and categorical variables (stations, moss species) (TAB. IV). These models have a relatively strong r^2 (>70% for Ba, Pb, Ti) and very strong $r^2=94\%$ for Sb. For Ba, 8 significant variables are involved in the moss stock content explication ($r^2=70\%$) (species; size classes particles 1, 2, 4 for dust fluxes; stations ST1 to ST4; time). There is a significant contribution of the categorical variable "stations" in this model, leading to a local and qualitative influence of the transplantation site on the moss content for Ba. There is no "specie" variable in the model and this could be related to the no "specie" effect for Ba in "moss plate" data (TAB. IV). The "time" variable is significant for the model as it was for the "time" effect in the moss plates accumulation. For Pb, r^2 (72%) shows a strong relationship between the dependant variable of moss content and the other 7 variables. The quantitative variables, size class particles 1 and 2 are the only significant leading to a more important contribution of coarse fraction (1000-200 μm) to the moss content for Pb than the smaller ones. The "time" and "species" variables are significant too, reinforcing previous "moss plate" data analysis (TAB. IV). The "stations" categorical variable (ST2, ST3, ST4) is included in the model showing the importance of Pb local atmospheric deposition to the moss content. The "D" station doesn't appear for Pb and only the "R", "CE" and "SV" (deduced from the two other) stations are significant. This could be interpreted as a necessary enough contaminated level deposition for a significant contribution to the moss content. Perhaps for Pb, two months of exposure are not enough for the less polluted site.

Sb presents the best fitted model with $r^2=94.1\%$ and with 8 significant variables. All categorical variables "species" and "stations" (ST2, ST3, ST4) are involved confirming previous significant effects with "moss plate" (TAB. IV). As for Pb, the local qualitative influence of atmospheric coarse deposition on the moss content is shown (size class 2, 3, 4 with particles from 1000 to 20 μm).

For Ti, the model shows 8 significant variables ($r^2=82.5\%$) with the categorical variables "species" and "stations" (ST1 to ST4). For Ti, the dust size class involved in the model are class 1, 4 (>1 mm; 40-20 μm).

Studies on atmospheric capture of dusts by mosses (28, 29) have demonstrated their better efficiency for coarse particles (20-175 μm) and, that the standardised active biomonitoring method of "moss bags" had better capture efficiency on particles over a 20 μm diameter less influenced by abiotic conditions like wind speed. The stock-flux conversion is possible between the "moss plates" content and coarse sedimentable particles for Ba, Pb, Sb and Ti. But, the models built (*Tableaux VI to IX et Figures 8 à 10*) * are dependant on categorical variables such as "Species" and "Stations" leading to a preliminary moss specie choice before exposure and a necessary site calibration of the biological tool before any stock-flux conversion.

* Les Tableaux et Figures signalés ne sont pas publiés mais ajoutés à l'Annexe du Chapitre III (Annexes Générales) pour une meilleure compréhension.

Multiple regression analysis

Dependant Variables (Moss Plates)	log(Ba138) r ² =70%			log(Pb206) r ² =72%			log(Sb121) r ² =94.1%			log(Ti48) r ² =82.4%		
	Parameter	Estimate	Std. er.	p	Estimate	Std. er.	p	Estimate	Std. er.	p	Estimate	Std. er.
Constant	3.698	0.4322	***	1.2572	0.1124	***	-1.3274	0.0749	***	3.5896	0.3809	***
species			ns	0.0628	0.0117	***	0.2425	0.0127	***	0.0499	0.0144	**
log(flux s.c.p. 1)	0.1622	0.0555	*	0.0491	0.018	*			ns	0.1037	0.0218	***
log(flux s.c.p. 2)	-0.1557	0.0724	*	0.1555	0.045	**	-0.2718	0.1328	*			ns
log(flux s.c.p. 3)			ns			ns	0.6826	0.1532	***			ns
log(flux s.c.p. 4)	-0.2696	0.0985	*			ns	0.1479	0.0428	**	-0.1288	0.0766	*
ST1	-0.3132	0.072	**			ns			ns	-0.4023	0.1195	*
ST2	-0.23	0.0732	*	-0.1075	0.0252	***	-0.4813	0.1709	*	-0.3062	0.0713	***
ST3	0.2845	0.1153	*	0.2008	0.0418	***	0.2248	0.1186	*	0.4489	0.0648	***
ST4	0.2587		*	-0.0933		***	0.2565		*	0.2596		***
Time	0.5186	0.1423	**	-0.09	0.0309	*	-0.4738	0.1049	***	0.1706	0.0799	*

TAB. IV : Fitted multiple linear regression models to describe the relationships between the "Moss Plates" content (expressed as logarithmic $\mu\text{g.g}^{-1}$) and independant variables. Quantitative variables are "time" (month) and the four size classes of sedimentable particles (s.c.p.) (expressed as logarithm of fluxes term, $\mu\text{g.m}^{-2}.\text{t}^{-1}$). The categorical variables are "species" (-1 for *Pseudoscleropodium purum* and +1 for *Pleurozium schreberi*), "stations" (ST1 for "D", ST2 for R, ST3 for CE; the estimate of ST4 for "SV" station is deduced from the others with \sum estimates=0). Since p-value are less than 0.05, there is a statistically significant relationship between the variables at the 5% level (* p<0.05; ** p<0.001; *** p<0.0001; ns : no significant). The r² statistic indicates the % variability explained by the model as fitted.

3.3.3 In Vivo distribution of element enrichment (SXRF)

The sensitivity of SXRF analysis allows to identify 15 elements with a 14 keV photon beam energy (S, K, Cl, Ca, Cr, Mn, Fe, Cu, Zn, Ni, Se, Ti, As, Ba and Pb). All MANOVA results are detailed in another work (30) and, this paper focuses on the (Segment×Time) (Se×T) interaction factor in order to locate the moss annual segment enrichment with this short time exposure.

This significant interaction (Se×T) effect for Cl, Se, Ti and Pb (TAB. V, FIG. 3) shows different time behaviour between elements. Cl increases with time in all shoots, but after one month it is more concentrated in the basal part (SII, two year old segment vs SI, one year old segment). For Ti, one month of exposure reverses the segment repartition compared to t=0 with the basal part enriched versus the upper one. This enrichment continues a bit during the second month. At t=0 for Se, the upper part is richer in Se, after one month the increase of the SII leads to a homogeneous repartition along the shoot and finally, a SII enriched to SI after two months. For Pb, the t=0 homogeneous situation is followed by a significant enrichment of SII versus SI which also captured Pb but not as much as basal part. These results are in accordance with a simple particular capture of dust from a geogenic (Ti) or anthropogenic (Pb) source. Aerial dispersion of heavy metals often involves particular matter as industrial emissions or carbonaceous material released by vehicular exhaust like in the Station "SV" exposition. Previous studies have found an homogeneous repartition of Cl between a wide range of coarse particle diameters (0, 08 to 16 μm) (31) leading to a possible Cl particular enrichment of mosses. For Se, a small fraction may exist in the gaseous state in the atmosphere but, the majority of Se is expected to be present in particular form mainly emitted from coal and oil combustion (32). Mosses have demonstrated their better efficiency for coarse particle (20-175 μm) (28, 29) and previous results with the stock-flux model have shown the significant contribution of the coarse atmospheric dry deposition on the moss content. So, atmospheric particles containing these elements could fall on moss and be more or less retained with gravity for coarse particles or static phenomenons for smaller ones (1). All these *in vivo* observations reflect integrated input and output of elements falling on a moss shoot (FIG. 3). For active biomonitoring, these results show that old parts are the preferentially sites of recent capture for short-time exposure with mainly dry depositions. Moreover, poorly water soluble elements (Pb, Ti) seem to be under a saturation effect of capture after one month of exposure for Sp specie (TAB. V).

Regression analysis (FIG 3) allows a quantitative conversion of *in vivo* SXRF Pb data to concentration results ($\mu\text{g.g}^{-1}$). So, SXRF *in vivo* quantification of metals and trace elements in mosses are possible on a very small amount of material (1 mm² biological surface), without any pre-treatment (dry out, mineralisation), and with consecutive analysis possible (non destructive method). These results illustrate the hypothesis that particle trapping by bryophytes may be a major source of poorly water-soluble elements and, that moss content can reflect recent environmental conditions for dry and coarse depositions. The use of such biomonitors should be precise in purpose, protocole of pre-treatment, choice of plant's parts (which annual segments involved) and analysed elements.

		Cl [§]			Ti [£]		
Segment x Time	Time (month)	0 (n=18)	1 (n=40)	2 (n=33)	0 (n=18)	1 (n=40)	2 (n=33)
M ⁺ Std.Er	I (n=55)	1.94+0.08	2.03+0.06	1.95+0.06	1.21+0.24	1.63+0.17	1.59+0.2
	II (n=36)	1.85+0.11	2.21+0.07	2.3+0.08	0.49+0.34	2.0+0.2	2.14+0.23
Level : Segment 95.0% conf. level	I	X	X	X	X	X	X
	II	X	X	X	X	X	X

		Se [§]			Pb [§]		
Segment x Time	Time (month)	0 (n=18)	1 (n=40)	2 (n=33)	0 (n=18)	1 (n=40)	2 (n=33)
M ⁺ Std.Er	I (n=55)	0.8+0.05	0.96+0.04	0.94+0.04	1.85+0.07	2.14+0.05	2.23+0.06
	II (n=36)	0.55+0.07	0.99+0.04	1.05+0.05	1.67+0.2	2.27+0.06	2.43+0.07
Level : Segment 95.0% conf. level	I	X	X	X	X	X	X
	II	X	X	X	X	X	X

TAB. V : Summary of the MANOVA for SXRF data with the (SegmentxTime) interaction significant for Cl, Ti, S and Pb analysed on first annual segment (I) and second annual segment (II) of *Pseudoscleropodium purum* after t=0, and 2 month of exposure in "Moss Plates". Mean and standard error values (M +Std.Er.) are expressed after (§) logarithmic and (£) square root transformations of variables (element counting/diffusive counting for 600 seconds time acquisition, photon macrobeam of 14 keV). Homogeneous groups are identified by a column of X's. Within each column, the levels containing X's have groups of means with or without statistically significant differences at the 5% level.

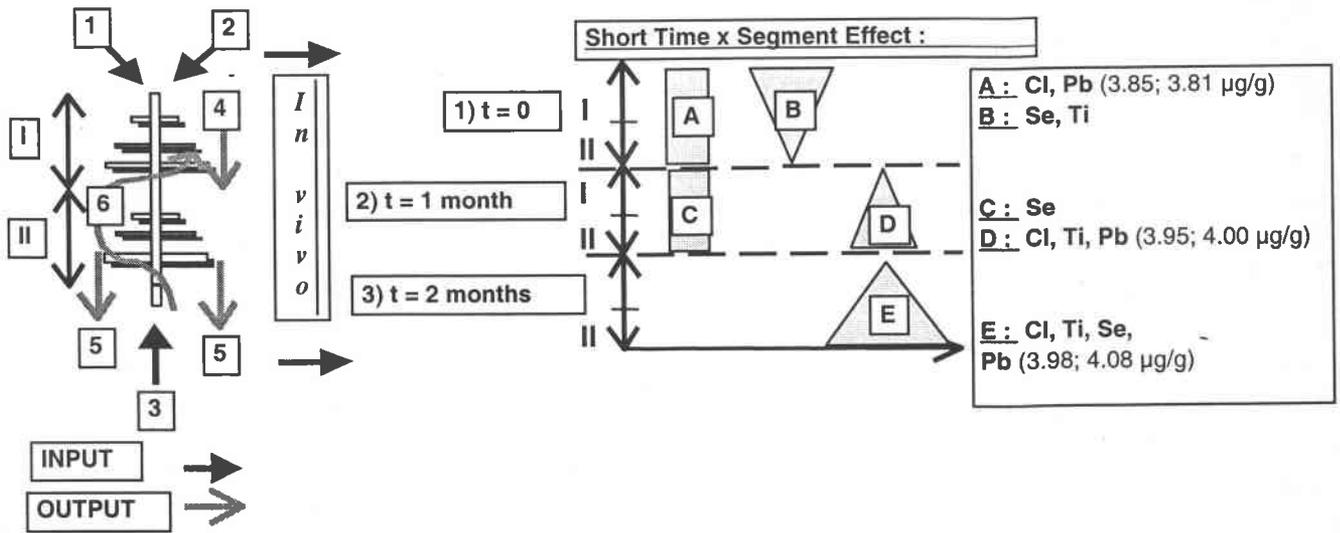


FIG. 3 : Scheme of principal factors influencing trace elements Input and Output on a pluriannual shoot of moss, 1) wet, dry atmospheric depositions, 2) leachate from upper vegetation, 3) soil contamination, 4) young to older parts movements, 5) material losses (decomposition), 6) elements remobilization from old to younger parts. In vivo elements distribution by SXRF technique gives integrated observation of all these factors. The *in vivo* short time enrichment (TAB. V) effects through the elements distribution shows homogeneous, pyramidal or reversed pyramidal segments repartitions on I (first annual segment) and II (second annual segment). SXRF to ICP-MS conversion for Pb in brackets ([Pb] in SI; [Pb] in SII, with $R^2=98.1\%$ and $Pb_{icp}=3.565+0.046Pb_{sxf}$).

3.4 Conclusion

The chlorophyll fluorescence induction has demonstrated the biological activity stability of *Pleurozium schreberi* (Ps), *Pseudoscleropodium purum* (Sp) in this active biomonitoring tool. The necessary water presence has been shown to buffer the dry period effects on the Fv/Fm measurement as well as the rapid moss biological activity recovering with rainy period. The “moss plate” allows significant Sb, U and Ba, Cd, Pb, Ti, V accumulation in one and two months exposure from initial moss content. With this time and conditions exposure, relative sites comparisons are possible for Ba, Cs, Sb, Sr and U as species effect with a systematic more concentrated Ps specie versus Sp for Pb, Sb, Ti and V. The Stock-Flux conversion is possible for Ba, Pb, Sb and Ti ($R^2>70\%$) demonstrated the significant influence of coarse particles (1000-20 µm) in the moss content. But this also put in evidence the significant influence of categorical variables such as the moss specie and the site of exposure itself leading to the evidence of a local qualitative influence of atmospheric coarse deposition on the moss content. In parallel, the SXRF experiment illustrate the ability to locate the *in vivo* enrichment along the moss shoot exposed to dry deposition in their natural and vertical position. The *in vivo* microanalysis and multielemental SXRF technique allow to study and quantify very small amount of intact biological and, as a few work has been done on the process of particles entrapment by bryophyte surface, perspectives of future SXRF macro- or microbeam analysis are very encourageous for such environmental studies.

This “Moss Plate” has to be improved (time of exposure, water dependancy) but, as it allows a better understanding of moss-dry deposition relationships with a moss biological activity stability, the next step could be to assess some bioavailability aspects.

Acknowledgement

We are grateful to P. Chevallier and M. Bonnin-Mosbah for providing important assistant for the SXRF analysis, to S. Boiziau and S. Doublet for the concrete realisation of the "Moss Plate" support material and, to C. Elichegaray from the ADEME Agency for financial support. We are indebted to G. Meyer for active discussions and support. This work was carried out with the financial support of ADEME (French Agency for the Environment and Energy Management).

3.5 Literature Cited

- (1) Markert, B. In *Plants as Biomonitors: indicators for heavy metals in the terrestrial environment*; Markert, B., Ed.; Weinheim; VCH, **1993**, 643 p.
- (2) Ceburnis, D.; Valiulis, D., *Science of the Total Environment*, **1999**, 226, 247-253.
- (3) Rühling, A.; Tyler, G., *Bot. Notiser*, **1968**, 121, 321-342.
- (4) Brüning, F.; Kreeb, K. H., In *Plants as Biomonitors: indicators for heavy metals in the terrestrial environment*; Markert, B., Ed.; Weinheim; VCH, **1993**, 382-395.
- (5) Brown, D. H., In *Bioindicators of Environmental Health*; Munawar, M.; Hänninen, O.; Roy, S.; Munawar, L.; Kärenlampi, L.; Brown, D.H., Eds; Ecovision World Monograph Series, SPB Academic Publishing, Amsterdam, The Netherlands, **1995**, 203-206.
- (6) Puckett, K. J., In *Lichens, Bryophytes and Air Quality*; Nash, T. H.; Wirth, V., Eds; Cramer, J.; Berlin, Stuttgart, **1988**, Band 30, 231-267.
- (7) Herrmann, R. In *Bryophytes their chemistry and chemical taxonomy*; Zinsmeister, H. D.; Mues, R., Eds, Oxford Science Publications, **1990**, 319-335.
- (8) Clough, W.S.; *Atmospheric Environment*, Pergamon Press, **1975**, Vol.9, 1113-1119.
- (9) Taylor, F.G.; Witherspoon, J.P.; *Health Physics Pergamon Press*, **1972**, Vol. 23, 867-869.
- (10) Lodenius, M. and Tulisalo, E., *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **1984**, 32, 439-444.
- (11) Martin, M.H. and Coughtrey, P.J., *Biological Monitoring of Heavy Metal Pollution*, London, Applied Science Publishers, **1982**, 475 p.
- (12) Hynninen, V., *Ann. Bot. Fennici*, **1986**, 23:83-90.
- (13) Cameron, A.J., and Nickless, G., *Water, Air and Soil Pollution*, **1977**, 7, 117-125.
- (14) Ducruet, J.M., Chapitre III in *Les Herbicides, mode d'action et principes d'utilisation*, sous la direction de René Scalla ; INRA, Paris, **1991**, 450 p.
- (15) Bolhàr-Nordenkamp, H.R. and Öquist, G., Chapter 12, In *Photosynthesis and production in a changing environment, a field and laboratory manual*, Hall, D.O., Scurlock, H.R., Bolhàr-Nordenkamp, H.R., Leegood, R.C. and Long, S.P. (Eds); Chapman & Hall, **1993**, 464 p.
- (16) Steinnes, E., Rühling, A., Lippo, H. and Mäkinen, A., 1997, Reference materials for large-scale metal deposition surveys, *Accred. Qual. Assur.*, **1997**, 2, 243-249.
- (17) Ayrault, S.; Bonhomme, P.; Carrot, F.; Amblard, G.; Sciarreta, M.D.; Galsomiès, L.; *Biological Research Elements*, **2000**, accepted.
- (18) Wang, J. X.; Piccot, D.; Chevallier, P.; Legrand, F.; Abbas, K.; VIRESYME: Logiciel d'exploitation des spectres de fluorescence; Note CEA-N-2756, **1993**, 231-235.
- (19) Sass, L., Csintalan, Z., Tuba, Z. and Vass, I., *Photosynthesis Research*, **1996**, 205-212.
- (20) Schofield, W.B., *Introduction to Bryology*, Macmillan Publishing Company, New York; **1985**, 431p.
- (21) Wolterbeek, H.T., Kuik, P., Verburg, T.G., Herpin, U., Markert, B. and Thöni, L.; *Environmental Monitoring and Assessment*, **1995**, 35: 263-286.
- (22) Jaenicke, R., Chapter 1 in *Atmospheric Particles*, Harrison, R.M. and Van Grieken, R.E. (eds), IUPAC series on analytical and physical chemistry of environmental systems, Volume 5, John Wiley and Sons, **1998**, 610 p.

- (23) Zufall, M.J. and Davidson, C.I., Chapter 13 in *Atmospheric Particles*, Harrison, R.M. and Van Grieken, R.E. (eds), IUPAC series on analytical and physical chemistry of environmental systems, Volume 5, John Wiley and Sons, **1998**, 610 p.
- (24) Coe, J.M. and Lindberg, S.E., The morphology and size distribution of atmospheric particles deposited on foliage of inert surfaces, *J. APCA*, **1987**, 37, 237.
- (25) Ratcliffe, J.M., *Atmospheric Environment*, **1975**, Vol. 9, 623-629.
- (26) Vasconcelos, M.T.S.D. and Tavares, H.M.F., *The Science of the Total Environment*, **1998**, 212, 11-20.
- (27) Reimann, C. and De Caritat, P.(eds), *Chemicals Elements in the Environment, Factsheets for the Geochemist and Environmental Scientist*; Springer-Verlag, **1998**, 398 p.
- (28) Taylor, F.G.; Witherspoon, J.P.; *Health Physics Pergamon Press*, **1972**, Vol. 23, 867-869.
- (29) Clough, W.S.; *Atmospheric Environment*, Pergamon Press, **1975**, Vol.9, 1113-1119.
- (30) Amblard-Gross G., Férard J.F., Bonnin-Mosbah M., Chevallier P., Maul A., Daudin L., Carrot F. and Ayrault S., *SXRF and PIXE Techniques for in vivo Study of Heavy Metals and Trace elements Distribution in Bryophytes*, *Environmental Science and Technology*, submitted.
- (31) Krivácsy, Z.; Molnár, A.; *Atmospheric Research*, **1998**, 46, 279-291.
- (32) Merian, E. (ed.), *Metals and their compounds in the environment, occurrence, analysis and biological relevance*; VCH, **1991**, 1438 p.

CHAPITRE IV. Localisation des métaux et éléments traces : Analyse *in vivo* de Bryophytes par les techniques SXRF et PIXE¹

Résumé

Les techniques de fluorescence X sous rayonnement synchrotron (SXRF), d'émission X induite par particules chargées (PIXE) et de spectrométrie de masse couplée à une torche à plasma (ICP-MS) ont été utilisées pour étudier la distribution *in vivo* des métaux et éléments traces capturés par des végétaux bioindicateurs, les mousses. Ces mousses proviennent de 7 sites d'exposition avec un gradient croissant de concentration en plomb, ou ont été transplantées sur des sites pour une courte période.

Les mousses naturelles, contenant un gradient de concentration en Pb (*Pleurozium schreberi*, *Ps* ; *Scleropodium purum*, *Sp*), présentent 3 segments annuels. Des analyses multiélémentaires ont été effectuées par SXRF sur des brins entiers, et en ICP-MS après broyage, pastillage et minéralisation des mousses.

Certains brins issus du site le moins pollué ont été lavés avec un ajout de Zn (50 ppb).

Les mousses qui ont été transplantées sur 2 sites ont été analysées par SXRF et ICP-MS à t=0, 1, 2 mois d'exposition.

Les analyses PIXE ont été effectuées sur des échantillons (*Eurhynchium praelongum*, *Ep* ; *Scleropodium purum*, *Sp*) issus du site le plus chargé en Pb, présentant une source d'émission connue en Pb et Ba (verrière industrielle). Les résultats SXRF montrent des hétérogénéités de distributions le long des segments annuels de croissance des mousses ainsi que des effets significatifs de certains facteurs contrôlés (lavage des brins, espèces, sites) sur cette distribution. Cette étude révèle notamment que les éléments non essentiels sont plus concentrés dans les parties âgées de la mousse. Les éléments essentiels à la plante présentent des distributions différentes allant d'une répartition homogène à hétérogène le long du brin. Des analyses de régression entre les résultats SXRF et ICP-MS montrent qu'il est possible de convertir les résultats de la fluorescence X (taux de comptage/taux de diffusion) en concentration *in vivo* ($\mu\text{g/g}$) et ce, pour très peu de matériel biologique (1 mm^2).

Le lavage des brins intacts montrent des mouvements d'éléments : perte de K (par les parties âgées de la mousse), gains de Zn (capture des parties jeunes après ajout dans la solution de lavage) et de Cl (contamination de l'eau de lavage et capture sur l'ensemble du brin).

L'analyse par SXRF effectuée sur des brins de *Sp* transplantés sur deux stations (1 témoin, 1 polluée) pendant deux mois montre une influence des retombées récentes sur les parties âgées de la mousse. Ces captures concernent des éléments peu solubles comme Pb, Ti qui semblent subir un phénomène passif de capture par sédimentation et lessivage des particules à la base de la plante. Cette hypothèse de simple capture passive est renforcée par les résultats PIXE.

¹ Ce chapitre a été soumis à *Environmental Science and technology*

COVER LETTER

for the Submitted Research Article

SXRF, PIXE and ICP-MS Techniques for *in vivo* Study of Metals and Trace Elements Distribution in Bryophytes.GÉRALDINE AMBLARD-GROSS,^{†,*} JEAN-FRANÇOIS FERARD,[‡] MICHELLE BONNIN-MOSBAH,[†] PIERRE CHEVALLIER,[†] ARMAND MAUL,[§] LAURENT DAUDIN,[†] FRANCINE CARROT,[†] SOPHIE AYRAULT,[†][†] Laboratoire Pierre Süe, CEA-CNRS, CEA de Saclay, Bât 637, 91191 Gif-sur-Yvette Cedex 1, France[‡] Université de Metz, EBSE, Campus Bridoux, rue du Général Delestraint, 57070 Metz, France[§]Département de Statistiques et Traitement Informatique des Données, IUT Metz University, 57045 Metz, France*Corresponding author phone: (33) 1 69 08 97 79; fax: (33) 1 69 08 69 23; e-mail: amblard@drecam.cea.fr or gamg@freesurf.fr

Mosses have been increasingly used for biomonitoring purposes to study spatial and temporal atmospheric deposition of metals and trace elements.

Usual multielemental techniques like ICP-MS have been used to assess their bioaccumulation properties. But all these studies were based on transformed material (dried, milled, mineralized) or resultant bathing solutions. None of these experiments have investigated direct *in vivo* measurements. Here, for the first time, we report on the coupled use of the detected X-ray emission by photon (SXRF) and protons (PIXE). The possibility to focus photon and protons enables us to investigate metals and trace elements distribution along shoots' mosses at different scales of *in vivo* observation (μm^2 to mm^2).

SXRF and PIXE techniques have close performances related to biological material. Sensitive multielemental analysis ($Z > 11$) is possible for a wide range of analytical investigation.

In this experiment, an X ray $300 \times 300 \mu\text{m}^2$ beam spot size was firstly used to analyse element distribution and movements on the whole plant. Then, micro PIXE with a beam proton of $15 \times 15 \mu\text{m}^2$ was focused to detail the elemental composition of dusts captured by mosses.

Another main advantage of these techniques is the "almost" non destructive method depending on analytical conditions. However, with the X-ray macro beam, the opportunity is given to re-analysed the same sample after additional treatments, such as a washing treatment for biological material.

This study confirms previous litterature results with K losses after an hydric stress and Zn capture from diluted solution to the moss.

Moreover, the original results are the possibilities to locate which parts of the plant are involved in these element movements, and to follow their long or short time capture on the moss.

Qualitative maps of dust element composition are recorded with PIXE. In spite of biological matrice unhomogeneity, the calibration of SXRF data into concentrations terms is possible for several elements using parallel ICP-MS analysis.

The submission of this research article is suitable because it fits with the objectives of Environmental Science and Technology. The subject highlights the perspectives in the coupled use of classical biomonitoring plants with original techniques such as SXRF and PIXE in this field study.

SXRF, PIXE and ICP-MS Techniques for *in vivo* Study of Metals and Trace Elements Distribution in Bryophytes.

GÉRALDINE AMBLARD-GROSS,* † JEAN-FRANÇOIS FERARD, ‡ MICHELLE BONNIN-MOSBAH, † PIERRE CHEVALLIER, † ARMAND MAUL, § LAURENT DAUDIN, † FRANCINE CARROT, † SOPHIE AYRAULT, †

† Laboratoire Pierre Süe, CEA-CNRS, CEA de Saclay, Bât 637, 91191 Gif-sur-Yvette Cedex 1, France

‡ Université de Metz, EBSE, Campus Bridoux, rue du Général Delestraint, 57070 Metz, France

§ Département de Statistiques et Traitement Informatique des Données, IUT Metz University, 57045 Metz, France

* Corresponding author phone: (33) 1 69 08 97 79; fax: (33) 1 69 08 69 23; e-mail: amblard@drecam.cea.fr or gamg@freesurf.fr

Abstract

Synchrotron Radiation Induced X-Ray Fluorescence (SXRF), Particle Induced X-Ray Emission (PIXE) and Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS) have been used to study *in vivo* distribution of metals and trace elements along annual segments of mosses. 15 elements were analysed and multivariate statistic analysis have determined significant interactions among various controlled factors.

This study reveals an heterogeneity of element distribution with non essential elements mainly accumulated in the plant's old parts. Essential elements present various distribution patterns. After regressions analysis between SXRF and ICP-MS data, *in vivo* quantification is possible with only 1 mm² of biological material. Pre-treatment by washing of several individuals, with or without initial Zn addition in water, evidences elements movements in annual segments with uptakes (Zn, Cl), losses (K) and possible internal movements (Cr).

Active biomonitoring with transplanted mosses on background and traffic influenced emission sites demonstrates the short-time capture of poorly water-soluble elements (Pb, Ti) mainly in older plant's parts. The hypothesis of a simple particular trapping is reinforced by PIXE-bidimensionnal element maps.

4.1 Introduction

Because of their large geographic repartition, mosses have been increasingly used for active and passive biomonitoring purposes with aims of spatial and temporal assessment of atmospheric depositions (1, 2).

Their bioaccumulation properties make them very efficient indicators for atmospheric metals and trace element depositions (1, 3). Root and cuticle absence make them find their nutritive elements in wet and dry atmospheric deposition (4, 5). This capture is supposed to be mainly due to cation exchange capacity and surface structures with minimum diffusive resistance of elements (6, 7).

Nevertheless, the use of mosses as biomonitors supposes some underlying conditions as the pluriannual integration of atmospheric pollutants depositions on the moss shoot divided in several annual segments (8). Some experiments keep only young green parts and others the three integrate annual segments for quantitative analysis. Different protocoles can lead to problems with the results representativity for relative comparisons and with the exact identification of annual segments for different species.

The metals and trace elements repartition has been found to be greatly influenced by the age of the plant (9, 10), by the species sampled and by environmental parameters such as hydric stress (11).

Some experiments evidence possible movements of elements between annual segments and possible losses by passive excretion according to meteorological or growth conditions (12, 13). These elements movements have been identified from young to old segments (14), from old to young segments (14) and from soil to the moss (11, 12) via the bottom turf in drought periods (upwards movements).

But all these studies were based on transformed material (dried, milled, mineralized) or resultant bathing solutions. None of these have investigated direct *in vivo* measurements.

Synchrotron radiation induced X-Ray Emission (SXRF) and Particle Induced X-ray Emission (PIXE) are methods known and recognized as good tool for multielemental determination of trace elements (for $Z > 11$) for both wide range of problems and materials (16, 17). Monochromatic X-ray of 14 keV with SXRF method is well adapted for a wide *in vivo* determination of element from $Z > 16$ to $Z = 82$ (Pb's detection) and a 3 MeV protons beam with the PIXE technic leads to the same range determination of elements. With these experimental conditions, SXRF and PIXE methods have virtually the same capabilities (detection limits, material depth analysis) with less damages induced to biological material by SXRF and less sample preparation problems for PIXE (less sensible to thickness and heterogeneity depth of the material).

This study investigates the *in vivo* distribution of metals and trace elements along shoots' mosses according to different parameters with the SXRF, PIXE and ICP-MS techniques. Repartitions, movements (washing treatment, Zn addition) and capture (short time transplantation effect) behaviours are observed with the non destructive multielementary SXRF analysis on mosses with passive (indigenous mosses) and active (transplanted mosses) biomonitoring experiments. *In vivo* quantitative conversions of SXRF data into concentrations with ICP-MS results are tested for several elements (As, Ba, Cr, Cu, Pb, Ti, Zn) with few biological material. The influence of controlled factors and their interactions are assessed through multifactorial analysis. Qualitative maps of dusts element composition are performed by PIXE.

4.2 Materials and Methods

4.2.1 Protocol

The metals and trace elements distribution along moss shoots were described through a passive (indigenous mosses, pluriannual presence on sites) and active (transplanted mosses, short time presence on sites) biomonitoring experiments.

With the passive biomonitoring, three moss species, *Pseudoscleropodium purum* (Sp), *Pleurozium schreberi* (Ps) and *Eurhynchium praelongum* (Ep) were sampled from seven sites located all over France with a range of Pb concentrations from 10 to 100 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (TABLE 1) (Figure 1, Tableau 2)*. Five sites, as part of the French survey of atmospheric heavy metal deposition monitored by moss analysis (18), and two additional sites (site 1 considered as unpolluted blank site; site 7 with a (Pb, Ba)S smelter glass industry) were chosen (FIGURE 1). The three moss species were collected with at least three fully developed annual growth segments.

* Les Figures et Tableaux mentionnés ne sont pas présents dans la publication mais ajoutés en Annexe du Chapitre IV (Annexes Générales) pour plus de détails.

The *in situ* sampling and sample handling of mosses were based on the Scandinavian recommendations (8). Small gaps areas of young plantations not directly exposed to throughfall precipitations from forest canopy were selected. Plastic gloves and bags were used for the moss collecting with 5-10 subsamples within a 50 x 50 m² area.

Samples were then prepared for SXRF, PIXE and ICP-MS analysis.

Elements distribution were assessed through three different experiments.

The first experiment involved moss sampled on the seven sites (general situation of element distribution), the second experiments the pre-treatment influence by washing moss shoots (samples of sites 1 and 7) (**Figure 2**)* and the third, the Zn addition in bathing medium for a capture efficiency test (**Figure 3**)*. For each experiment and controlled factors, three moss gametophyte shoots with fully developed annual segments (three years old for passive biomonitoring, two years old for active biomonitoring) were randomly chosen and kept in ultra-pure polyethylen plastic bags in a refrigerator (4°C) to avoid any dry out event. Just before SXRF experiments, moss shoots were fixed on a plastic sample-holder structure for *in vivo* analysis (**FIGURE 2**). In parallel, the samples were analysed by ICP-MS for concentration analysis.

For the first experiment, significant influence of controlled factors "Segments", "Species" and "Sites" on SXRF data are tested through MANOVA 1 (**TABLE 2**; **TABLE 1 SI**).

For the second experiment, the two species, *Ep* and *Sp* sampled on sites 1 and 7, were separated in two sets. Unwashed and washed individuals were prepared to assess the pre-treatment influence on metals and trace elements repartition. For the washed treatment, 10 shoots of each specie sampled on both sites were put in demineralised water (18°C, pH=6.9) under magnetic agitation for 15 minutes. Results of (Segments x Pre-treatment) interaction (**TABLE 3**) and controlled factors influence on SXRF data are tested through Manova 2 (**TABLE 2, 3 SI**).

After the microscopic location of dust particles on mosses, a two years old segment of *Ep* sampled from the site 1 and the site 7 (Pb, Ba)S smelter site) were isolated and put on sticky Kapton. Annual segment II of *Ep* specie from the two sites were analysed with the Micro PIXE method to map the elemental composition of dusts retained and kept by mosses (**Figure 5**)*.

In parallel, a third experiment studied possible uptake mechanisms of Zn from biological active parts of the plant. 10 two years old shoots of *Sp* specie coming from Site 1 were washed in 200 ml of demineralised water, under magnetic agitation, with or without initial Zn addition ($[Zn]_{t0} = 0$ ppb ; $[Zn]_{t0} = 50$ ppb). At $t = 15$ minutes, three moss shoots were removed from water and prepared for SXRF analysis. 50 ml of the bathing medium was filtered (0.22 µm), to keep the dissolved part of elements, and acidified for ICP-MS analysis. The (Segment x pre-treatment) interaction with Zn addition was assessed through a third MANOVA procedure and reported with previous interactions of the second experiment in **TABLE 3** to localise the Zn uptake between annual segments.

With the active biomonitoring (**Figure 4**)*, samples of *Sp* with two fully developed annual growth segments were collected from an area with a low trace element pollution level (site 1) and transplanted on sites A and B (**FIGURE 1**). During summer 1999, standardised moss transplants elaborated to keep plants in its natural vertical position of moss cushion (19) were transplanted on two continuous atmospheric monitoring stations, a background (site A) and a traffic influenced ones (site B), for a two months period (**Tableau 3**)*.

* Les Figures et Tableaux mentionnés ne sont pas présents dans la publication mais ajoutés en Annexe du Chapitre IV (voir Annexes Générales) pour plus de détails.

At time $t=0$, 1 and 2 months, three two years old's moss shoots were randomly sampled for each factor (segment, site, time) and analysed by SXRF, the remains of biological material was analysed by ICP-MS. Results of the interaction Segment x Time of transplantation (**TABLE 4**) and controlled factors influence on SXRF data are tested through Manova 4 (**TABLE 4 SI**).

4.2.2 SXRF Experimental arrangement

Synchrotron induced X-ray fluorescence analysis were performed on beam line D15 at LURE DCI (Laboratory for Electromagnetic Radiation Use), Orsay (France).

Relativistic positron produced in an injector (Linac) are stored in a ring equipped with bending magnets and a wiggler. In these devices the positron radiate energy, resulting in an intense white X-ray beam, highly collimated and polarized. In the experimental hutch, this beam enters a double crystal focusing monochromator made of two highly oriented mosaic graphite crystal. The monochromatic beam is then cut to a 300 micron diameter spot by a platinum collimator. An energy of 14 keV was chosen to enhance sensitivity for lead determination.

A laser beam is used to simulate the X-ray beam path for proper positioning of the sample which is set on a three axis (x, y, z) remote controlled stage and observed with a microscope equipped with a CCD camera.

The fluorescence spectrum is detected with a Si(Li) detector of 150 eV energy resolution set at 90° from the incident beam in order to minimize scattering. Pulses from the detector were processed through a Tennelec 714 amplifier and stored in a Nucleus PCA3 card. Acquisition live time was typically of 600s.

Three point acquisitions by annual segments were made on each three- or two-years old individual to obtain a two-dimensional semiquantitative mapping of element repartition along identified annual segments. Data treatment was achieved through VIRESYME (20) which is a program used for the deconvolution of X-ray fluorescence spectrum, especially written for the study of spectra obtained under monochromatic photon irradiation of the sample (synchrotron radiation). For final element content, each spectrum was normalised with its total diffusive radiation which is a proportional representation of the biological material under the photon-beam (**FIGURE 2**).

4.2.3 ICP-MS preparation

After determination of moss age, samples were dried 24 hours at 40°C , milled in an automatic mortar and a 200 mg portion was mineralised in PTFE vessels by micro-wave with successive addition of ultra-pure reagents (HNO_3 , H_2O_2 , HF, HNO_3 , H_2O). Solutions were diluted in 50 ml with high purity water ($18.2 \text{ M}\Omega/\text{cm}$), internal standards (In, Be, Re at $10 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$) were added and analysis were performed by ICP-MS with a VG Plasmaquad II Plus. Quality control and reproducibility of results were ensured by comparison with standard reference materials (Lichen 336 IAEA, Rye Grass CRM 281 BCR). Final elements concentrations are expressed in $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ on a dry weight basis. Detection limits and results reproducibility have been published (21). For water analysis, a 50 ml volume was filtered under $0,22 \mu\text{m}$ sieve to keep dissolved part of elements, acidified (HNO_3) and internal standards (In, Be, Re $10 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$) were added.

4.2.4 Micro PIXE Experimental arrangement

Micro PIXE measurements were performed with the Pierre Süe laboratory nuclear microprobe running now since December 1993.

After an acceleration up to 3 MeV by a single stage Van de Graaff accelerator, the proton beam is directed towards one of the two microbeam lines by the analyzing and switching magnet. Under vacuum conditions necessary for ions bombardment techniques, the charged particles are focussed on the sample to a beam spot of $15 \times 15 \mu\text{m}^2$ and a current intensity of 1 nA. The incident beam direction is normal to the sample surface. A Si(Li) crystal, with a detection angle of 45° , provides the detection of X-ray spectrum. A Mylar absorber of $90 \mu\text{m}$ thickness was added in front of the $16 \mu\text{m}$ Be intrance window to stop all backscattered particles (up to 3 MeV protons) and decrease the background and low energy. A PC-Based multiparameter data acquisition system coupled with a beam scanning device were used to analyze the sample and an enlargement of the central dust part (**FIGURE 6**). Two scans were defined with a scanning step of $20 \mu\text{m}$ (distance between two analyzed points) and a scanning speed of 10 ms per point. The first scan was a 100×100 pixels picture (analyzed area of 4mm^2) during 108 minutes. The second one (enlargement of the central dust) was a 23×26 pixels picture (analyzed area of about $0,2 \text{mm}^2$) during 70 minutes (total analyzed time of 7 seconds/pixel). After an event by event acquisition, it was possible to generate bidimensionnal elemental maps and local spectra using a laboratory-made software RISMIN[®] (22) based on Labview[®] package.

4.2.5 Statistics

For SXRF experiments, multifactor analysis of variance (MANOVA) was performed with StatGraphics Plus[®] software to determine which factors have a statistically significant effect on each variable represented by the normalised and transformed elements. It also tests for significant interactions among the factors.

In the analytical procedure, variables were first transformed (logarithmic, square root functions) to satisfy the underlying conditions of variance's analysis. The variability of transformed variables was decomposed into contributions due to various factors and their interactions. All F-Ratio were based on the residual mean square error.

Multiple comparison procedures were applied to determine which means were significantly different from the others. Homogeneous groups were identified and the method used to discriminate among the means was Tukey's honestly significant differences (HSD) procedure. Such procedure was applied for the passive and active biomonitoring experiments.

In the passive biomonitoring, three MANOVA procedures were performed: Manova 1 with 3 factors (Segment, Specie and Site) for the sampling all over France (**TABLE 2**), Manova 2 with 4 factors (Segment, Specie, Site and shoot Treatment) for the sites 1 and 7 with the washed-unwashed shoots (**TABLES 2, 3 SI**) and manova 3 with two controlled factors (Segment, Zn concentration) for the parallel study on Sp from Site 1 with different initial water concentration ($[\text{Zn}]_{t_0}=0$ or $50 \mu\text{g/l}$). Several interactions factors were performed, especially the Segment x Pre-Treatment by washing (**TABLE 3**).

A regression analysis was performed in the first procedure between transformed SXRF data as independent variables and ICP-MS concentrations as dependant variables. Possible semi-quantitative conversions between SXRF and ICP-MS were tested through different fitted models (linear, logarithmic) after verifications of the underlying conditions of regression analysis application (**FIGURE 3**).

In the active biomonitoring experiment, the MANOVA 4 procedure was performed with 3 factors (Segment, Time and Site) (**TABLE 4 SI**). Several interactions factors were performed especially the Segment x Time Transplantation interaction (**TABLE 4**).

4.3 Results and Discussion

4.3.1 Passive Biomonitoring

The sensitivity of SXRF analysis allows to identify 15 elements with a 14 keV photon beam energy. These elements can be classified according physiological functions for plants (structural and electrolytic elements as S, K, Cl and Ca ; enzymatic elements as Cr, Mn, Fe, Cu and Zn ; no biological function known for mosses as Ni, Se, Ti, As Ba and Pb). The Cr, Ni and Se classification are made according to literature data (1, 23).

In the first experiment, the Manova procedure (**TABLE 2; TABLE 1 SI**) shows significant effects of controlled factors Segments, Species and Sites for elements analysed. Regression analysis performed between SXRF and ICP-MS data indicate that *in vivo* conversion is possible for several elements (**FIGURE 3**).

For the Segments effect, two repartitions are shown : homogeneous along the shoot and accumulation content with segment age. This first repartition occurs in structural, electrolytic and enzymatic elements (S, K, Cu, Zn) but does not represent the majority with the no biological function elements (except for Se). The second repartition concerns elements of the two-first categories (Cl, Ca, Cr, Mn, Fe) but represents the main behaviour in the non-essential elements (Ni, Ti, As, Ba and Pb). These results are in accordance with previous works as reported for Zn, Cr and Fe in Ps specie (24) and for Ca, Cr, Fe, Mn, Ni, Ti and Pb in *Hylocomium splendens* specie (10), interpreting this increasing segment element concentrations as cation exchange capacity or particular trapping. Furthermore, other studies showed that elements generally encountered to extra-cellular exchange sites and/or on particules tend to accumulate in more basal segments (25).

In the Specie effect, homogeneous groups of elements show all possible classifications between species (**TABLE 1 SI**). These results are illustrative of previous observations in the variety of parameters influencing behaviour and capture efficiency in moss species in front of elements (26, 27). The Sites effect is significant for all elements analysed by SXRF confirming data given in **TABLE 1** for Pb gradient and showing differences between all sampling sites in front of elemental composition (**TABLE 1 SI**).

Regression analysis performed indicate that quantitative conversion is possible between *in vivo* measurements and ICP-MS concentrations for all elements (**Figures 6 à 12**)* analysed with both techniques (As, Ba, Cr, Cu, Ni, Ti) especially for Pb and Zn (**FIGURE 3**). Good explicative linear or logarithmic models are found for As, Ba, Cu, Ni, Pb, Ti and for Cr, Zn respectively. R-squared statistic explain from 56.9 to 99.9 % of the total variability (Ti, As). Plots of models presented (**FIGURE 3**) include the equation of the model (white inner solid line), confidence limits for the means (inner pink lines) and prediction limits (outer dotted white lines).

The R-squared statistic for Pb indicates an explanation of the variability with 98.07% and a very strong linear relationship between the variables SXRF and ICP-MS. In this model, one point is removed from the model (site 7, Ep specie) because of its position outside of prediction limits. Zn gives good explicative models too (R-squared with 77.19%).

So, *in vivo* quantification of metals and trace elements in mosses is possible with the SXRF analysis without any pre-treatment of biological material (dry out, mineralisation), on a very small amount of material (1 mm² biological surface) and with consecutive analysis possible due to non destructive method.

This first experiment shows possible quantification of elements concentrations in very small amount of biological material and possible relative comparison between sampling sites as well. It is obvious that species effect is very different between considered elements and that the element repartition along the moss shoot is heterogeneous. This points out the delicate and important choice of the biomonitor's parts to be considered for analysis to avoid any over- or under-estimation of contamination.

In the second experiment with the *Ep* and *Sp* species sampled on sites 1 and 7 and washed or unwashed, the SXRF elements data showed clear controlled factor influence (**TABLES 2, 3 SI**). For the washing treatment, significant increase (Cl, Ca) and losses (K) occur after the washing treatment. All other non-essential elements Ni, Se, Ti, As, Ba and Pb are not influenced by the washing treatment as well as S, Mn, Cu, Zn and Fe. Ba, Fe, Ti, Pb are known to be present in dust fraction and probably this experimental washing pre-treatment wasn't strong enough to remove them from the moss.

The interaction factors Segment x Pre-Treatment (S x T) (**TABLE 3**) locates which segments are involved in the losses of K, the uptake of Cl and Zn (in the case of initial water addition of 50 µg/l of Zn) and the possible internal movements of Cr.

For K, the upper segment (annual segment I) still contains the same quantity after washing. Losses occurs in the older segments leading to an apex (annual segment I) richer in K than the basal part (annual segment III). K is mainly an intracellular element in young segment of mosses and its leakage can be used as a measure of membrane damage (28). Levels of intracellular K in the new growth remained constant at the expense of the pool of exchangeable ions (29), but some of the soluble ions, as K, either leak to the rehydrating solution or become bound on the cell-wall exchange sites after an hydric stress period. This exchangeable K concentration of *Sp* specie was found higher in the apex (0-2 cm) than in the sub-apex (2-4 cm) (12). This experiment can be interpreted as the leakage of the intra-extracellular K of old segments with more damaged membranes and a constant level of intra- and exchangeable K levels in younger part by a possible active mechanism (29, 30, 31). It is possible that, in spite of precautions avoiding any dry out, the washed samples have lost K after an hydric stressed period.

Because of an unvoluntary enrichment of the bathing medium in Cl in the second experiment (purification of demineralised water with Chlorine pellets), Cl increases in mosses after the 15 minutes washing. The Cl increase concerns all three segments (**TABLE 3**) but Segment I captures more Cl than the two others leading to an homogeneous repartition along the shoot.

In the third experiment with the initial addition of Zn, the (S x T) interaction after 15 minutes of contact shows an increase in all the shoot leading to a more concentrated young segment I (**TABLE 3**). With a parallel decrease of [Zn] in the bathing medium, the Zn uptake in moss shoots is significantly higher at t=15 minutes with initial [Zn]_{t0}=50 µg/l (**Figures 13 et 14**)*. The fast capture of Zn is confirmed by other metal uptake experiments where it was found that 90% of Zn captured in the moss occurred during the first 5 minutes (30). This means that Zn seems to be rapidly captured by moss and sufficiently retained to be held at least for 45 minutes in plants.

For Cr, there is no significant losses after washing (**TABLES 2, 3 SI**). But, a significant (S x T) interaction effect shows an internal re-distribution after washing treatment but an accentuated differences between the two older parts (segments II and III). Soluble and/or exchangeable Cr seems to move from young to older parts. For Cr, the older segments may capture mobile Cr perhaps because of more accessible exchange sites (old segment with more cations exchange capacities) (25). Nevertheless, these Cr movements have to be interpreted

with caution in front of poor data in this experiment and in literature results with no concrete evidences on possible uptakes or movements of this element in plants (23).

There is no significant (S x T) effect on Pb, Ba, As, Ti, Fe, these elements should be retained very efficiently by mosses and would probably not be removed after a natural rain, which goes with the hypothesis of fine to coarse particles effectively retained or adsorbed by moss surface.

This experiment evidences the washing pre-treatments influence on plans of repartitions along the moss shoot leading to new distribution (pyramidal or basal versus upper parts, reverse pyramidal or basal versus upper parts and homogeneous repartitions) (**FIGURE 5**).

This experiment could be interpreted as an efficient capture of some elements after short term contact with water which is in favor of the well-known capture efficiency of mosses. But, there is a new redistribution of elements along the shoot and, for some elements (Zn, Cl), with behaviour differences young and old parts with integrating recent input.

4.3.2 PIXE observations

This hypothesis of an efficient particular capture of mosses is reinforced by the PIXE observations of *Ep* specie sampled on Site 7 (**FIGURE 4**). The elements Ca, K, Ba, Pb and Fe were identified and mapped. The physiological structure of the moss (stem, leave insertion) is very well described by K and Ca spectra. The central dust agglomeration captured at the stem-leave insertion is characterised by an heterogeneous elemental composition. The central part of dusts is Fe-enriched (area 2) and Ba, Pb dusts are localised on both sides (area 1). This moss sampled on the Ba, Pb's smelter site presents clear dust composition with Ba, Pb and Fe elements, all with a significant site effect (Site 7 > Site 1) (**TABLE 2 SI**). These elements are not uniformly distributed on the plant as K and Ca but concentrated on this central dust accumulation. These results on heterogeneous composition of dusts captured by mosses are illustrative of the necessary strong acidic conditions for moss digestion prior to ICP-MS analysis.

4.3.3 Active Biomonitoring

For the active biomonitoring experiment, the MANOVA 4 shows significant effects for all the three factors (Segment, Time and Site) (**TABLE 4 SI**) as for the interaction (S x Ti) (**TABLE 4**). There is no significant effect for the interaction (Segment x Site) reflecting a likely homogeneous behaviour of elements deposition along the segment of the shoot between the two sites (sites A and B) (**TABLE 4 SI**).

The (S x Ti) interaction factor is very interesting in order to know which segments capture which elements during this short time exposition of two months.

This effect is significant for Cl, Se, Ti and Pb (**TABLE 4**) (**FIGURE 5**).

Cl increases with time in all the shoot, but after one month it is more concentrated in the basal part. For Ti, after one month of exposure, the segment repartition is completely inversed with the basal part enriched versus the upper one, and this enrichment continues a bit during the second month. The situation is the same for Se with an intermediate situation after one month exposition. At t=0, the upper part is richer in Se, after one month the increase of the segment II leads to an homogeneous repartition along the shoot and finally, after a two-months exposure, the basal part is enriched versus the upper part. For Pb, the homogeneous situation at the beginning is followed by a significant enrichment of basal part versus upper part which also captured Pb but not as much as basal part. This results are in accordance with a simple particular capture of dust from a pedologic (Ti) or anthropogenic (Pb) source origin. These particles containing these elements fall on moss and are more or less retained with gravity for coarse particles or static phenomenons for smaller ones (1). Aerial dispersion of heavy metals

often involves particular matter as industrial emissions or carbonaceous material released by vehicular exhaust like in the Site B exposition. Previous studies have found a homogeneous repartition of Cl between a wide range of particle diameters (0,08 to 16 μm) (32) leading to a possible particular enrichment of mosses. Studies on atmospheric capture of dusts by mosses (33, 34) have demonstrated their better efficiency for coarse particles (20-175 μm) and, that the standardised active biomonitoring method of moss bags had better capture efficiency on particles over a 20 μm diameter less influenced by abiotic conditions like wind speed.

All these *in vivo* observations reflect integrated input and output of elements falling on a moss shoot (FIGURE 5).

For passive biomonitoring experiments, observations of element repartition are made, by theory, after several years of exposure. This time integration reveals trends of location and accumulation of elements according to their biological functions. Essential ones present all possible repartition along the shoot and non-essential elements are more concentrated in old parts of the plants.

Washing procedures, with or without initial addition in water, induce changes in the repartition of K, Cl, Cr and Zn depending on the age part of the moss.

For active biomonitoring, these results show that old parts seem to be the preferentially sites of recent capture for short-time exposure with mainly dry depositions. Moreover, for active biomonitoring, poorly water soluble elements (Pb, Ti) seem to be under a saturation effect of capture after one month of exposure for *Sp* specie (TABLE 4).

This illustrate the hypothesis that particle trapping by bryophytes may represent a major source of poorly water-soluble elements and that mosses content, for the observed species, reflects recent environmental conditions (wet and dry depositions). The use of such biomonitors should be precise in purpose, protocole of pre-treatment, choice of plant's parts and analysed elements.

As a few work has been done on the process of particles entrapment by bryophyte surface, perspectives of future SXRF and PIXE use are very encourageous for such environmental studies. Microanalysis and multielemental techniques allow to study very small amount of biological material and to understand *in vivo* bioaccumulation behaviours on biomonitors commonly used.

Acknowledgements

We are grateful to L. Galsomiès for providing the french biological material, to J. P. Gallien for the microprobe analysis, D. Savanne, J.P. Duraud and M. A. Letrouit for providing important assistance. We are indebted to G. Meyer for active discussions and support. This work was carried out with the financial support of ADEME (Energy and Environmental Mastery Agency) and CEA (Atomic Energy Center).

4.4 Literature Cited

- (1) Markert, B. In *Plants as Biomonitors: indicators for heavy metals in the terrestrial environment*; Markert, B.,Ed.; Weinheim; VCH, **1993**, 643 p.
- (2) Ceburnis, D.; Valiulis, D., *Science of the Total Environment*, **1999**, 226, 247-253.
- (3) Rühling, A.; Tyler, G., *Bot. Notiser*, **1968**, 121, 321-342.
- (4) Brüning, F.; Kreeb, K. H., In *Plants as Biomonitors: indicators for heavy metals in the terrestrial environment*; Markert, B.,Ed.; Weinheim; VCH, **1993**, 382-395.
- (5) Brown, D. H., In *Bioindicators of Environmental Health*; Munawar, M.; Hänninen, O.; Roy, S.; Munawar, L.; Kärenlampi, L.; Brown, D.H., Eds; Ecovision World Monograph Series, SPB Academic Publishing, Amsterdam, The Netherlands, **1995**, 203-206.

- (6) Puckett, K. J., In *Lichens, Bryophytes and Air Quality*; Nash, T. H.; Wirth, V., Eds; Cramer, J.; Berlin, Stuttgart, **1988**, Band 30, 231-267.
- (7) Herrmann, R. In *Bryophytes their chemistry and chemical taxonomy*; Zinsmeister, H. D.; Mues, R., Eds, Oxford Science Publications, **1990**, 319-335.
- (8) Rühling, A.; Nordisk Ministerrad Report, Nord **1994** : 9, 58 p.
- (9) Rühling, A.; Tyler, G.; Oikos, **1970**, 21, 92-97.
- (10) Mäkinen, A.; Report 4 **1994**, Ministry of the Environment, Environmental Policy Department, Helsinki, Finland, 83 p.
- (11) Brown, D. H.; Brumelis, G.; The Science of the Total Environment, **1993**, 187, 153-161.
- (12) Bates, J. W.; Farmer, A. M., Annals of Botany, **1990**, 65, 87-96.
- (13) Zechmeister, H. G.; Environmental Monitoring and Assessment, **1998**, 52, 441-451.
- (14) Brown, D. H.; Brown, R. M., In *Element concentration cadaster in ecosystem, Methods of assessment and evaluation*; Lieth, H.; Markert, B., Eds, Weinheim, VCH, **1990**, 55-62.
- (15) Wells, J.M.; Brown, D.H.; Journal of Bryology, **1996**, 19, 1-17.
- (16) Bos, A.J.J.; Vis, H.; Verheul, H.; Prins, M.; Davies, S.T.; Bowen, D. K.; Makjanic, J.; Valkovic, V.; Nucl. Instr. And Meth., **1984**, B 3, 232.
- (17) Mosbah, M.; Clocchiati, R.; Michaud, V.; Piccot, D.; Chevallier, P.; Legrand, F.; Als Nilsen, G.; Grübel, G., Nuclear Instruments and Methods in Physics Research, B 104, **1995**, 481-488.
- (18) Rühling, A.; Steinnes, E.; **1998**, Atmospheric heavy metals deposition in Europe 1995-1996, Nordic Council of Ministers, Copenhagen, Denmark, Nord 1998: 15, 66p.
- (19) Amblard, G.; Carrot, F.; Ferard, J.F., 9th Annual Meeting of SETAC-Europe, 25-29 May **1999**, Leipzig, Germany.
- (20) Wang, J. X.; Piccot, D.; Chevallier, P.; Legrand, F.; Abbas, K.; VIRESYME: Logiciel d'exploitation des spectres de fluorescence; Note CEA-N-2756, **1993**, 231-235.
- (21) Ayrault, S.; Bonhomme, P.; Carrot, F.; Amblard, G.; Sciarreta, M.D.; Galsomiès, L.; Biological Research Elements, **2000**, accepted.
- (22) Daudin, L.; RISMIN: Laboratory-made software for pictures and spectra reconstitution for nuclear microprobe technique, Pierre Süe laboratory, CEA de Saclay, France.
- (23) Kimbrough, D.E.; Cohen, Y.; Winer, A.M.; Creelman, L.; Mabuni, C.; Critical Reviews in Environmental Science and Technology, **1999**, 29(1), 1-46.
- (24) Grodzinska, K.; water, Air and Soil Pollution, **1978**, 9, 83-87.
- (25) Brown, D.H.; Wells, J. M.; In *Bryophytes their chemistry and chemical taxonomy*; Zinsmeister, H. D.; Mues, R., Eds, Oxford Science Publications, **1990**, 299-318.
- (26) Ross, H.B.; Water, Air and Soil Pollution; **1990**, 50,63-76.
- (27) Berg, T.; Royset, O.; Steinnes, E.; Atmospheric Environment, **1995**,29(3), 353-360.
- (28) Brown, D.H.; Buck, G. W.; New. Phytol., **1979**, 82, 115-125.
- (29) Bates, J. W.; Annals of Botany, **1997**, 79,299-309.
- (30) Gjengedal, E.; Steinnes, E.; Environmental Monitoring and Assessment, **1990**, 14, 77-87.
- (31) Bates, J.W.; Journal of Bryology, **1992**, 17, 223-240.
- (32) Krivácsy, Z.; Molnár, A.; Atmospheric Research, **1998**, 46, 279-291.
- (33) Taylor, F.G.; Witherspoon, J.P.; Health Physics Pergamon Press, **1972**, Vol. 23, 867-869.
- (34) Clough, W.S.; Atmospheric Environment, Pergamon Press, **1975**, Vol.9, 1113-1119.

4.5 FIGURES 1 à 5 ; TABLEAUX I à IV ; Supporting Informations¹ TABLEAUX I à IV

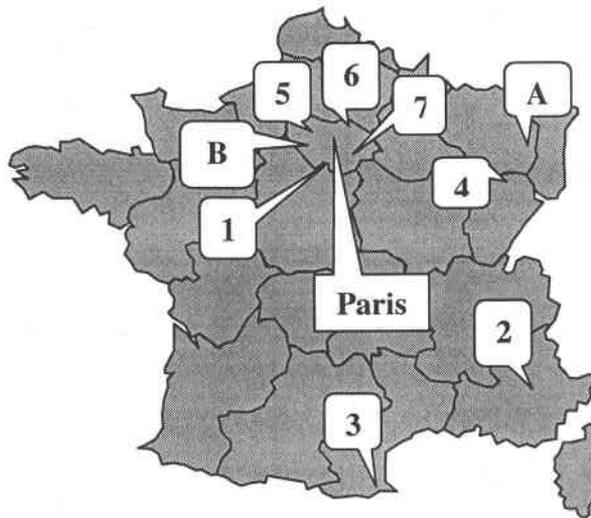


FIGURE 1. Sampling sites location 1 to 7 for passive biomonitoring and A to B for active biomonitoring. Site 1 (blank site for passive biomonitoring) is reference area from which moss transplants were collected for site A and B. Site A is the background station for active biomonitoring and site B is the polluted site. The (Pb, Ba)S smelter is located on site 7. Sites 2 to 6 are considered as almost background sites with Pb's gradient exposition as seen in TABLE 1.

Sites	[Pb]*	Species
1	5.1	Sp, Ps, Ep
2	7.4	Sp, Ps
3	21	Ps
4	27.8	Ps
5	29.2	Sp
6	56.5	Sp
7	100.1	Sp, Ep

TABLE 1 :Passive Biomonitoring Sites description for Pb ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) in mosses measured by ICP-MS. Three species were sampled *Pleurozium schreberi* (Ps), *Pseudoscleropodium purum* (Sp) and *Eurhynchium praelongum* (Ep). * indicates [Pb] for Sp moss specie for sites with more than one specie.

¹ Les "Supporting Informations" sont des tableaux destinés à n'être publiés que sur la version web de l'article. La revue *Environmental Science and Technology* offre cette possibilité à des documents trop gros (tableaux, bases de données, etc.) ne pouvant paraître dans la version papier. Ces "Supporting Informations" dans cet article sont signalées en référence comme TAB. I, S.I.

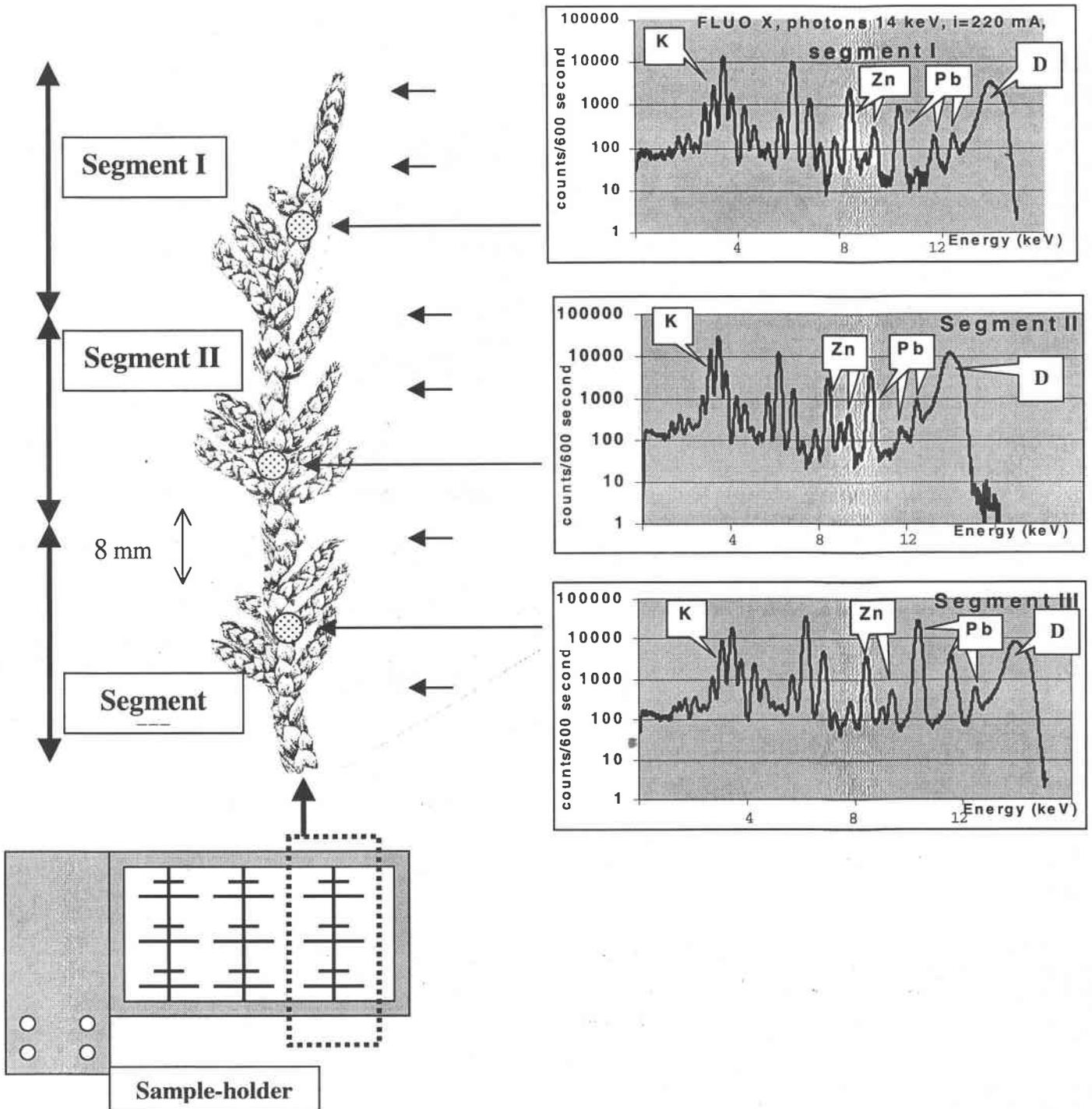
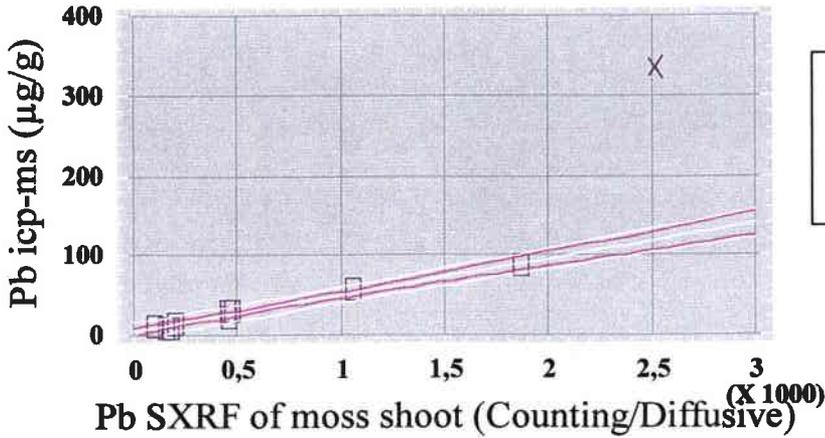


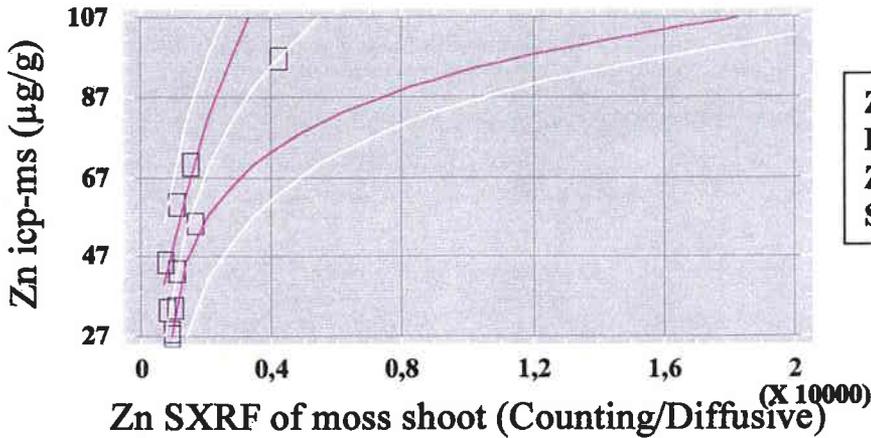
FIGURE 2. Scheme of the SXRF analysis location along a pluriannual gametophyte shoot of *Pseudoscleropodium purum* divided into three annual segments (I, II, III) and of the experimental sample-holder. Examples of X-ray fluorescence spectra with acquisition evolution of K, Zn, Pb and "D" (Diffusive radiation) along the moss stem for segment I, segment II and segment III. The incident X-ray beam was a 14 keV energy, 600 seconds live time acquisitions, with three point acquisitions by annual segment (black arrows).

Linear Regression Fit for Pb



Pb :
 $R^2=98,07\%$
 $Pb\ icp-ms=3,5635+0,0456*PbSXRF$
 $S_r=3,94$

Logarithmic Regression Fit for Zn



Zn :
 $R^2=77,19\%$
 $Zn\ icp-ms=-226,5+38,79*\ln(ZnSXRF)$
 $S_r=11,12$

FIGURE 3 : Examples of linear and logarithmic regression models between ICP-MS (µg/g) (dependant variables) and *in vivo* SXRF (counting/diffusive ratio) (independant variables) data for Pb and Zn. R^2 indicates the % of the variability explained by the model and S_r is the standard error of estimation. The equation of the model is shown as the white inner solid line. The plots include both confidence limits for the means (inner pink lines) and prediction limits (outer dotted white lines).

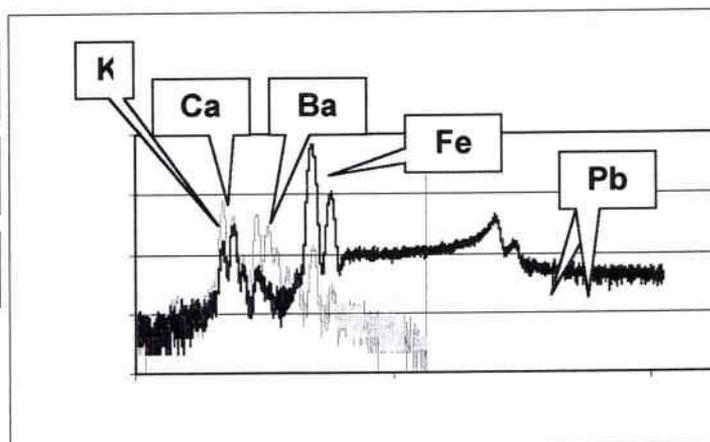
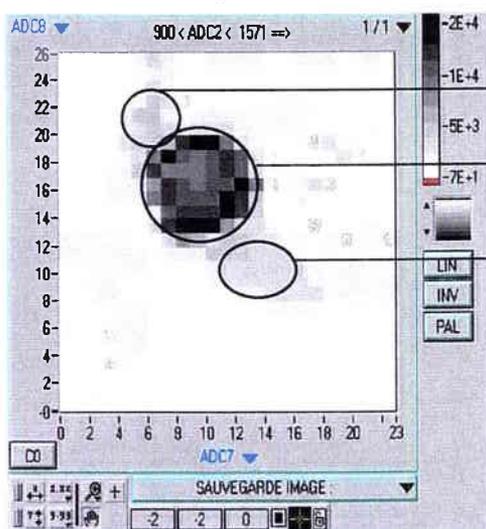
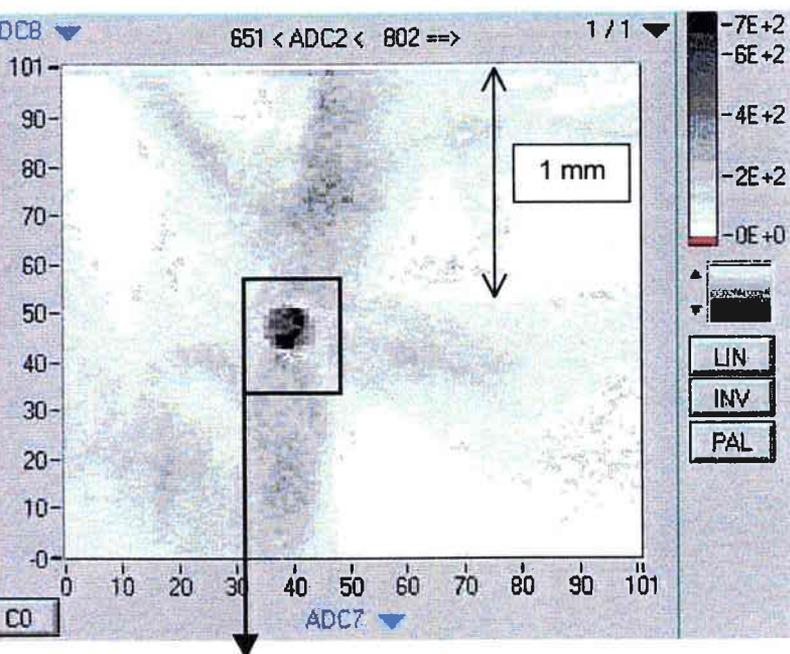


FIGURE 4 : PIXE maps with RISMIN[®] software of a 2 mm² moss fragment sampled on a (Ba, Pb)S smelter site and of the enlargement of dusts captured in a stem-leave insertion. Scans are defined with a scanning step of 20 μm and a scanning speed of 10 ms per. The first scan is a 100 x 100 pixels picture (analyzed area of 4 mm²) obtained after 108 minutes analyzing. The enlargement of the central dust is a 23 x 26 pixels picture (analyzed area of about 0,2 mm²) during 70 minutes (7 seconds/pixel). Example of PIXE spectra illustrating the heterogeneous composition of dusts with area 1 composed of K, Ca, Ba and Pb and area 2 composed of K, Ca and Fe.

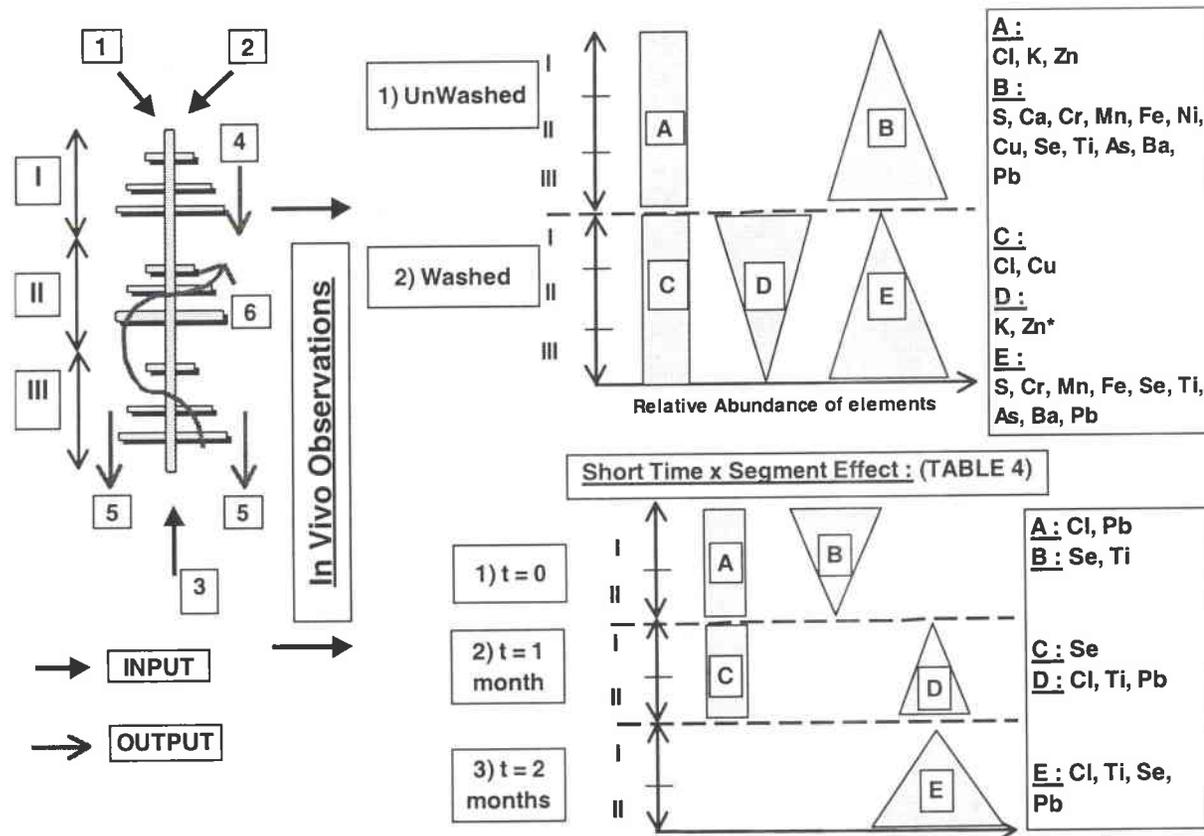


FIGURE 5 : Scheme of principal factors influencing heavy metals and trace elements Input and Output along a pluriannual shoot of moss, 1) wet and dry atmospheric depositions, 2) leachate from upper vegetation, 3) soil contamination, 4) young to older parts movements, 5) material losses by decomposition processes, 6) elements remobilization from old to younger parts. In vivo elements distribution by SXRF technique gives integrated observation of all these factors. It allows to see washing treatment (TABLE 3) and short time transplanted (TABLE 4) effects through the elements distribution along with homogeneous, pyramidal or reverse pyramidal segments repartitions. * indicates Zn repartition in the special case of Zn addition of 50 µg/l in the bathing medium.

MANOVA 1		Structural and Electrolytic[§]				Enzymatic[§]					No Biological Function Known[§]					
Main Effects		S16	K19	Cl17	Ca20	Cr24	Mn25	Fe26	Cu29	Zn30	Se34	Ni28	Ti22	As33	Ba56	Pb82
A: Segments	p-value	ns		***	**	***			ns		ns	***		**	***	
Homogeneous Groups	I (n=66)	2,4	3,8	2,1	3,9	0,8	2,9	3,7	2,3	3,3	0,6	1,6	1,8	-0,7	1,6	2,5
	II (n=64)	2,4	3,8	2,3	4,0	1,3	3,1	4,1	2,3	3,3	0,7	1,8	2,5	-0,1	2,1	2,8
	III (n=40)	2,5	3,8	2,5	4,1	1,6	3,1	4,2	2,3	3,3	0,7	1,9	2,6	0,0	2,2	2,9
LS Mean for segment	I	X		X		X			X		X	X				X
	II	X		X		X			X		X	X		X		X
	III	X		X		X			X		X	X		X		X
95% Tukey HSD																
by segment																

TABLE 2 : Summary of Multifactor Analysis of Variance 1 after logarithmic transformation (§) of elements variables in the Passive Biomonitoring experiment with national sampling sites. Elements means are expressed as log(element counts/diffusive counts) results. (A) Segments effect examines the overall repartition elements in different annual segments I, II and III (for 1, 2 and 3 years old). Levels of significance : ns: not significant; * p<0,05 ** p<0,01 *** p<0,001; dF: degrees of freedom Homogeneous groups are identified by a column of X's. Within each column, the levels containing X's form a group of means with or without statistically significant differences (Tukey's honestly significant differences, HSD, procedure).

<i>interaction Manova 2 Segment x Treatment (AxD) effect</i>		K18 [£]		Cl17 [£]		Cr24 [§]		Zn30 ^{§***}	
		Unwashed (n=128)	Washed (n=158)	Unwashed (n=128)	Washed (n=158)	Unwashed (n=128)	Washed (n=158)	Unwashed (n=128)	Washed (n=158)
Mean +- Stnd Error	I (n=106)	57.3+-2.0	56.5+-1.8	10.3+-0.9	17.4+-0.8	-0,4+-0,2	-0,6+-0,1	3.2+-0.1	4.1+-0.1
	II (n=94)	61.7+- 2.1	54.2+-1.9	12.6+-0.9	16.1+-0.8	-0,1+-0,2	0.4+-0.1	3.2+-0.1	3.7+-0.1
	III (n=86)	65.3+- 2.1	44.1+-2.3	14.9+-0.9	16.6+-1.0	0.7+-0.2	0.9+-0.2	nd	nd
Level : Segment	I	X	X	X	X	X	X	X	X
95,00%	II	X X	X	X	X	X	X	X	X
confidence level	III	X X X		X	X	X	X	nd	nd

TABLE 3: Summary of the significant interaction (Segment x Treatment) factor for the MANOVA 2 with *Eurhynchium praelongum* (Ep) and *Pseudoscleropodium purum* (Sp) species sampled on sites 1 and 7 with the washed/unwashed treatment (TABLE 1 and 2, supporting information). *** indicates that Zn data are those extracted from the experiment with the initial Zn addition of 50 µg/l in the bathing medium ([Zn]_{t0}=50 ppb) with *Pseudoscleropodium purum* (2 years old) sampled on Site 1 after 15 minutes of washing. nd : no Zn determination in segment III for the two years old shoot of Sp.

Means values are transformed data (£, square root and §, logarithmic functions) of SXRF results (element counting/diffusive counting) for 600 seconds time acquisition. Homogeneous groups are identified by a column of X's. Within each column, the levels containing X's form a group of means with or without statistically significant differences (95% confidence intervals for each mean).

<i>Interaction Manova 4 Segment xTime transplant (AxB) effect</i>		Cl17 [§]			Ti22 [£]		
		0 (n=18)	1 (n=40)	2 (n=33)	0 (n=18)	1 (n=40)	2 (n=33)
Mean [±] Std.Error	I (n=55)	1.94+-0.08	2.03+-0.06	1.95+-0.06	1.21+-0.24	1.63+-0.17	1.59+-0.20
	II (n=36)	1.85+-0.11	2.21+-0.07	2.3+-0.08	0.49+-0.34	2.0+-0.20	2.14+-0.23
Level : Segment 95.0% confidence level	I	X	X	X	X	X	X
	II	X	X	X	X	X	X
		Se34 [§]			Pb82 [§]		
		0 (n=18)	1 (n=40)	2 (n=33)	0 (n=18)	1 (n=40)	2 (n=33)
Mean [±] Std.Error	I (n=55)	0.80+-0.05	0.96+-0.04	0.94+-0.04	1.85+-0.07	2.14+-0.05	2.23+-0.06
	II (n=36)	0.55+-0.07	0.99+-0.04	1.05+-0.05	1.67+-0.20	2.27+-0.06	2.43+-0.07
Level : Segment 95.0% confidence level	I	X	X	X	X	X	X
	II	X	X	X	X	X	X

TABLE 4: Summary of the significant (Segment x Time) interaction factor of the Manova 4 (table 3, supporting information) for the Active Biomonitoring experiment with Pseudoscleropodium transplants on site A (blank site) and site B (traffic-influenced site).

(£) square root and (§) logarithmic transformations of variables, means values are transformed normalized (element counting/diffusive counting) for 600 seconds.

Homogeneous groups are identified by a column of X's. Within each column, the levels containing X's form a group of means with or without statistically significant differences (95% confidence intervals for each mean).

MANOVA 1		Structural and Electrolytic [§]				Enzymatic [§]					No Biological Function Known [§]					
Main Effects		S16	K19	Cl17	Ca20	Cr24	Mn25	Fe26	Cu29	Zn30	Se34	Ni28	Ti22	As33	Ba56	Pb82
A: Segments dF=2	p-value	ns		***	**	***			ns		ns	***		**	***	
Homogeneous Groups LS Mean for segment	I (n=66)	2,4	3,8	2,1	3,9	0,8	2,9	3,7	2,3	3,3	0,6	1,6	1,8	-0,7	1,6	2,5
	II (n=64)	2,4	3,8	2,3	4,0	1,3	3,1	4,1	2,3	3,3	0,7	1,8	2,5	-0,1	2,1	2,8
	III (n=40)	2,5	3,8	2,5	4,1	1,6	3,1	4,2	2,3	3,3	0,7	1,9	2,6	0,0	2,2	2,9
95% Tukey HSD by segment	I	X		X		X			X		X	X				X
	II	X			X		X		X		X		X			X
	III	X				X	X		X		X		X			X
B: Species dF=2	p-value	***	*	***	ns	**		ns	***		ns	***	ns		***	
Homogeneous Groups LS Mean for Specie	Sp (n=77)	2,3	3,7	2,1	4,0	0,9	3,1	3,9	2,1	3,1	0,7	1,6	2,3	-0,5	1,7	2,6
	Ps (n=54)	2,4	3,9	2,2	3,9	1,5	3,2	4,0	2,2	3,1	0,8	1,7	2,5	-0,2	1,9	2,7
	Ep (n=37)	2,6	3,9	2,7	4,1	1,3	2,9	4,0	2,5	3,8	0,4	2,0	2,0	-0,1	2,3	2,9
95% Tukey HSD by specie	Sp	X		X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X
	Ps	X		X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X
	Ep	X		X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X
C: Sites dF=6 95% Tukey HSD	p-value	***				***					***					

TABLE 1, supporting information : Summary of Multifactor Analysis of Variance 1 after logarithmic transformation (§) of elements variables in the Passive Biomonitoring experiment with national sampling sites. Elements means are expressed as log(element counts/diffusive counts) results. (A) Segments effect examines the overall repartition elements in different annual segments I, II and III (for 1, 2 and 3 years old); (B) Species effect tests the different elements contents between three moss species (Sp, Pseudoscleropodium purum; Ps, Pleurozium schreberi; Ep, Eurhynchium praelongum); (C) Sites effect compares significant differences between sampling sites. Levels of significance : ns: not significant; * p<0,05 ** p<0,01 *** p<0,001; dF: degrees of freedom Homogeneous groups are identified by a column of X's. Within each column, the levels containing X's form a group of means with or without statistically significant differences (Tukey's honestly significant differences, HSD, procedure).

MANOVA 2		Structural and Electrolytic^E				Enzymatic^S					No Biological Function Known for Plants^S					
Main Effects		S16	K19	Cl17	Ca20	Cr24	Mn25	Fe26	Cu29	Zn30	Ni28	Se34	Ti22^E	As33	Ba56	Pb82
A : Segment df =2	F-Ratio	8,0	1,24	2,22	29,9	38	21	69,9	5,44	7,37	8,69	6,56	40,0	11,7	43,5	39,2
	p-Value	***	ns		***	***			**	***	***	**	***			***
Homogeneous Groups 95% Tukey HSD	I (n=106)	x		x	x				x	x	x	x	x			x
	II (n=94)		x		x		x			x		x	x			x
	III (n=86)		x			x		x		x		x		x		x
B : Specie df =1	F-Ratio	44,4	13,7	114	42,7	1,1	51,8	0,12	227	166	57	0,28	34,4	0,72	31,5	59,2
	p-Value	***				ns	***	ns	***		***	ns	***	ns	***	
Homogeneous Groups 95% Tukey HSD	Ep(n=129)			x		x	x	x		x	x	x	x	x		x
	Sp(n=149)		x			x	x	x	x		x	x	x	x	x	
C : Site df = 1	F-Ratio	6,4	0,89	8,28	33,2	33	219	26,4	73,3	38,7	0,68	0,01	25,9	337	557	594
	p-Value	*	ns	**	***	***	***	***	***		ns		***			
Homogeneous Groups 95% Tukey HSD	S1(n=122)	x	x		x	x	x		x		x		x			
	S7(n=164)		x	x		x	x	x		x		x			x	
D : Shoot treatment df =1	F-Ratio	2,19	34,9	30,4	78,7	1,6	0,5	0,2	17,6	250	26,3	2,31	0,01	0,7	0,0	0,32
	p-Value	ns	***	***		ns					ns					
Homogeneous Groups 95% Tukey HSD	Washed	x	x		x			x					x			
	Unwashed		x		x			x					x			

TABLE 2, supporting information : Multifactor Analysis of Variance 2 procedure with 4 factors (A), Segment effect; (B) Specie effect; (C) Site effect; (D) treatment effect after logarithmic (§) and square root (£) transformations of SXRF results expressed as (elements counts/diffusive counts) in the passive biomonitoring experiment. Controlled factors are (A) Segment effect (segments I, II and III for 1, 2 and 3 years old); (B) species effect (Ep, Eurhynchium praelongum ; Sp, Pseudoscleropodium purum) ; (C) Site effect (sites 1 and 7) and (D) Shoot Treatment effect (pre-treatment of moss with washed and unwashed individuals). F-ratio is based on the residual mean square error, significance levels : ns, not significant; * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$. Homogeneous groups are identified by a column of X's. Within each column, the levels containing X's form a group of means with or without statistically significant differences (Tukey's honestly significant differences, HSD, procedure).

Interactions MANOVA 2		Structural and Electrolytic[£]				Enzymatic[§]					No Biological Function Known for Plants[§]					
		S16	K19	Cl17	Ca20	Cr24	Mn25	Fe26	Cu29	Zn30	Ni28	Se34	Ti22[£]	As33	Ba56	Pb82
AB df =2	F-Ratio	1,66	0,22	2,03	0,84	3,50	5,07	0,04	13,3	0,20	0,08	1,25	0,42	0,21	4,27	1,49
	p-Value	ns				*	**	ns	***	ns	ns			*	ns	
AC df =2	F-Ratio	0,23	5,48	0,58	1,88	0,82	2,92	0,16	1,29	3,00	0,91	0,23	4,44	1,31	12,1	1,41
	p-Value	ns	**	ns		ns					ns	*	ns	***	ns	
AD df =2	F-Ratio	0,12	12,3	4,69	2,18	3,47	2,98	2,64	1,72	7,26	0,55	2,24	1,07	0,26	0,71	1,94
	p-Value	ns	***	**	ns	*	ns				ns					
BC df =1	F-Ratio	1,15	85,1	27,2	59,9	12,9	7,04	0,34	39,4	100	3,37	8,63	5,10	3,17	8,85	2,70
	p-Value	ns	***			***	**	ns	***	ns		ns	**	*	ns	**
BD df =1	F-Ratio	0,06	0,03	8,33	9,82	0,17	15,7	0,12	0,15	10,9	2,84	2,67	0,59	0,14	6,97	1,93
	p-Value	ns		**		ns	***	ns		**	ns			**		ns
CD df =1	F-Ratio	1,94	0,57	31,9	0,19	0,18	14,8	0,11	1,61	123	1,29	0,08	1,77	0,37	0,09	0,18
	p-Value	ns		***	ns	ns	***	ns			ns					
ABC df =2	F-Ratio	1,42	5,57	3,73	0,09	2,39	1,22	5,72	3,22	0,19	0,11	1,14	2,02	0,94	1,78	0,94
	p-Value	ns	**	*	ns	ns		**	*	ns	ns					
ABD df =2	F-Ratio	1,54	0,76	2,92	2,27	0,45	0,20	0,02	0,28	1,16	0,34	0,98	0,09	0,64	2,30	3,04
	p-Value	ns				ns					ns					
ACD df =2	F-Ratio	0,35	0,80	0,21	5,06	0,33	4,18	5,98	5,04	4,15	6,71	0,24	1,45	0,35	1,68	4,30
	p-Value	ns			**	ns	*	**		*	**	ns			*	
BCD df =1	F-Ratio	0,48	6,83	6,61	9,74	1,63	2,91	1,23	3,59	52,8	2,32	3,52	3,27	2,07	14,7	3,31
	p-Value	ns	**	*	**	ns					ns			***		
ABCD df =2	F-Ratio	0,07	0,23	2,37	1,32	0,81	1,25	1,09	2,11	4,11	0,53	0,73	0,96	0,57	0,79	2,11
	p-Value	ns				ns					ns					

TABLE 3, supporting information : Significance results of interaction factors of Multifactor Analysis of variance 2 (TABLE 1, supporting information) with (A) Segment effect, (B) Specie effect, (C) Site effect and (D) Treatment effect. (£) square root and (§) logarithmic transformations of variables, means of elements are expressed as transformed (element counting/diffusive counting). F-ratio is based on the residual mean square error, significance levels: ns, not significant; * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$; df: degrees of freedom
Homogeneous groups are identified by a column of X's. Within each column, the levels containing X's form a group of means with or without statistically significant differences (Tukey's honestly significant differences, HSD, procedure).

MANOVA 4		Structural and Electrolytic^s				Enzymatic^s					No Biological Function Known for Plants^s						
Main Effects		S16	K19^z	Cl17	Ca20	Cr24	Mn25	Fe26	Cu29	Zn30	Ni28	Se34	Ti22^z	As33	Ba56	Pb82	
A : Segment df =1	F-Ratio	1,37	1,16	5,28	9,73	3,81	17,5	15,1	1,82	1,55	12,2	0,83	0,12	1,12	23,2	1,07	
	p-Value	ns	ns	*	**	*	***	***	ns	ns	***	ns	ns	ns	***	ns	
	Homogeneous Groups 95 % Tukey HSD	I (n=106)	X		X		X			X		X			X		X
	II (n=94)	X			X		X		X		X		X		X	X	
B : Time df =2 (months)	F-Ratio	5,36	1,51	4,42	27,71	3,40	4,01	14,5	0,87	6,96	6,43	20,8	9,28	0,49	31,3	28,53	
	p-Value	**	ns	*	***	*	*	***	ns	**	**	***	***	ns	***	***	
	Homogeneous Groups 95 % Tukey HSD	t= 0 (n=18)	X	X	X		X	X X X	X	X	X	X		X	X	X	
		t=1 (n=40)	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X
		t=2 (n=33)	X	X		X	X X X	X	X	X	X	X	X	X	X		X
C : Site df = 1	F-Ratio	0,01	1,93	0,96	3,95	4,86	9,29	6,54	5,15	0,10	0,37	0,87	1,06	0,24	17,9	2,62	
	p-Value	ns	ns	ns	*	*	**	*	*	ns	ns	ns	ns	ns	***	ns	
	Homogeneous Groups 95 % Tukey HSD	A (n=48)		X		X		X		X			X		X		X
	B (n=43)		X		X		X		X			X		X		X	
Interactions		S16	K19^z	Cl17	Ca20	Cr24	Mn25	Fe26	Cu29	Zn30	Ni28	Se34	Ti22^z	As33	Ba56	Pb82	
AB 95 % confidence level	F-Ratio	1,44	2,08	3,47	0,95	0,75	2,26	1,25	0,53	2,01	0,12	6,23	3,26	0,46	0,18	3,15	
	p-Value	ns	ns	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	**	*	ns	ns	*	
AC 95 % confidence level	F-Ratio	1,68	1,59	1,99	0,09	0,20	0,06	0,06	0,15	0,01	0,01	0,83	0,19	1,42	0,26	0,01	
	p-Value	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	
BC 95 % confidence level	F-Ratio	0,68	0,40	0,69	1,23	3,99	11,9	1,72	1,02	0,22	5,08	0,27	0,29	1,24	5,92	1,70	
	p-Value	ns	ns	ns	ns	*	***	ns	ns	ns	**	ns	ns	ns	**	ns	
ABC 95 % confidence level	F-Ratio	0,41	0,33	0,63	0,07	0,37	1,86	0,60	0,89	0,73	1,48	0,24	0,04	0,49	0,17	3,56	
	p-Value	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	*	

TABLE 4, supporting information: Multifactor Analysis of Variance 4 after (§) logarithmic and (£) square root transformations of variables in the Active Biomonitoring Experiment of (Sp) *Pseudoscleropodium purum* with three factors and interaction factors, (A), Segment effect examines the elements repartition in the two annual segments, (B) Time effect represents time exposition of moss transplants (t =0, 1 and 2 months), (C) Site effect allows to compare Site A (blank site for the active biomonitoring experiment) to Site B (traffic-influenced site). Means of elements are expressed as transformed (element counting/diffusive counting). F-ratio is based on the residual mean square error. Levels of significance: ns, not significant, * p<0,05 ** p<0,01 *** p<0,001 ; dF: degrees of freedom. Homogeneous groups are identified by a column of X's. Within each column, the levels containing X's form a group of means with or without statistically significant differences (Tukey's honestly significant differences, HSD, procedure).

Conclusion Générale

Les différentes échelles de variabilité abordées dans cette thèse montrent que les réponses observées avec les mousses sont sous l'influence de différents facteurs biotiques et abiotiques. La connaissance d'une partie de ces facteurs permet de proposer un "mode d'emploi" d'utilisation des mousses compte tenu de divers objectifs d'étude.

Objectifs cartographiques

Faisabilité

L'élaboration de cartes d'isoconcentrations avec la méthode-mousse est très certainement l'objectif principal justifiant les campagnes de grande échelle comme le programme européen de recherche. Cet objectif cartographique ne trouve pas d'équivalent avec les techniques classiques de monitoring en continu comme les stations de surveillance de la qualité de l'air, par exemple. En effet, ces stations sont coûteuses en entretien et maintenance et elles forment un réseau moins dense comparé aux possibilités d'échantillonnage offertes par les méthodes de bioindications. Cependant, même si ces organismes sont caractérisés par deux avantages importants (facilité d'échantillonnage et possibilité de couvrir de grandes surfaces), il ne faut pas pour autant négliger la validité et l'interprétation des résultats.

Ainsi, nous avons montré que des mailles de 30/30 km peuvent être raisonnablement utilisées pour estimer les variations de concentrations spatiales de Cu, Pb, Sb et Zn mesurés dans les mousses. Les cartes françaises de la dernière campagne européenne de 1995 ont utilisé des mailles de 33/33 km ce qui rend possible l'interprétation des variations spatiales des concentrations de Pb, Cu et Zn appartenant aux éléments du programme européen de recherche. Cependant, des mailles de 10/10 km effectuées sur l'Ile de France n'étaient pas nécessaires compte tenu de la précision de l'outil.

Cependant, nous avons montré que l' "outil-mousse" conserve une trop grande variabilité résiduelle qui ne permet pas de faire confiance aux variations géographiques constatées pour les éléments Ga, Ti, As, Cs, Ba, La, Rb, Sr, Cd, Co, U et V. Il faut donc éviter toute interprétation hasardeuse concernant les cartes établies pour ces éléments et par cette méthode biologique.

Il en ressort que l'interprétation des cartes de As, Cd et V, est délicate. Pour ces derniers éléments, il est extrêmement difficile de garantir l'origine spatiale des variations constatées, celles-ci pouvant être dues uniquement à la variabilité de la méthode biologique.

Au vu de ces conclusions, il est donc intéressant de proposer pour les futures campagnes, un élément comme Sb (toxique et potentiellement dangereux pour la santé) qui pourrait s'ajouter valablement à la liste déjà établie.

Par ailleurs, les autres éléments du programme européen Hg, Ni et Cr n'ont pas été pris en compte dans ce travail et il serait utile de connaître leur variabilité spatiale associée aux mesures dans les mousses. De plus, des perspectives intéressantes pourraient être envisagées avec l'étude de la décomposition de la variabilité résiduelle de l' "outil-mousse" qui pourrait éclaircir l'influence de nouveaux facteurs.

Influence des techniques analytiques

L'analyse est généralement considérée comme l'étape engendrant les erreurs d'estimation les plus faibles. Cependant, après la première campagne française, il est maintenant *a posteriori* évident que la technique d'analyse utilisée pour le dosage des mousses peut influencer l'interprétation des cartes européennes établies. En effet, les analyses effectuées en AAN (analyse par activation neutronique) et en ICP-MS (spectrométrie de masse couplée à une torche à plasma) fournissent des résultats significativement différents pour As, Co, Cr, Cs, Cu, Fe, La et Th. Aucune différence n'est constatée pour Ba, Ce et Rb. Ces derniers éléments peuvent donc être analysés indifféremment par les deux méthodes. Des équations de régression ont été établies pour Cs, Fe, La et Th ($r^2 > 70\%$) rendant possible l'homogénéisation des analyses françaises vis à vis des pays limitrophes et de leurs techniques d'analyse (exception faite de Co). Cependant, mis à part Fe, ces éléments n'appartiennent pas à la liste des éléments d'intérêt du programme, ce qui n'est pas le cas de As, Cr, Cu et V pour lesquels aucun modèle satisfaisant n'a été trouvé. Pour ces éléments, le choix de la technique d'analyse dépend des objectifs de qualité (As et Cr en AAN) ou d'homogénéisation européenne (ICP-MS pour As, Cr, Cu et V).

Localisation et intégration des retombées

L'un des aspects d'utilisation pratique des mousses pleurocarpes pour le biomonitoring passif concerne la présence des segments annuels de croissance permettant de dater l'exposition des organismes. Ces segments annuels sont plus ou moins facilement identifiables selon les espèces mais, ils sont censés intégrer et représenter les retombées atmosphériques de plusieurs années. Les études de distribution *in vivo* des métaux et éléments traces le long des brins par les méthodes de SXRF et PIXE montrent des différences significative entre les segments annuels. La majorité des éléments étudiés sont plus concentrés dans les segments les plus âgés. Il serait donc plus aisé, pour une simple identification qualitative du contenu des mousses, d'analyser les parties âgées de la plante. Il faut également déconseiller tout pré-traitement par lavage des échantillons qui, sans influencer le contenu des vieux segments, provoque des pertes d'éléments favorisant les échanges ioniques.

L'expérimentation de biomonitoring actif et les mesures *in vivo* réalisées en SXRF ont montré que l'*influence des retombées récentes* (exposition de un à deux mois) se localisait essentiellement *dans les vieux segments annuels de croissance des mousses*. Une version plus dynamique de la capture des retombées est ainsi mise en évidence, illustrant des comportements de simple capture passive par gravité et sédimentation ainsi que de possibles phénomènes de saturation. Les perspectives d'études complémentaires sont nombreuses pour ces outils analytiques non destructifs, notamment pour des aspects de micro analyse *in vivo* couplée à des traitements simultanés des échantillons.

Conversion stock-flux

Le contenu des mousses peut être expliqué par le flux des retombées en poussières sédimentables ($> 20 \mu\text{m}$, dans le cas de cette étude) pour Pb, Sb, Ti et Ba. Mais, le

contenu des mousses transplantées est aussi influencé par des facteurs qualitatifs comme le site d'exposition et les espèces de mousses utilisées. Il n'est donc pas possible de généraliser les modèles à d'autres endroits, ni avec d'autres organismes. Le temps d'exposition est aussi un facteur important et, pour la majorité des éléments, il faut deux mois d'exposition pour obtenir une augmentation significative du contenu. Les transplants élaborés maintiennent l'activité biologique (test de fluorescence du photosystème II) des mousses pendant deux mois, ce qui laisse entrevoir certaines perspectives d'études notamment pour des aspects de biodisponibilité des polluants. Il serait tout à fait intéressant d'effectuer des études similaires mais en utilisant des systèmes de collecte différents pour les retombées réelles (tailles de poussières différentes, récupération sur filtres, etc.). De même, l'influence qualitative des retombées atmosphériques sèches sur le contenu des mousses est trop sous-estimée et mériterait de plus amples études.

Objectifs d'étude	Eléments	Espèces
Relative <i>Cartes d'isoconcentration</i> (mailles de 30/30 km) <i>Techniques</i> AAN	Cu, Pb, Sb, Zn	<i>S. p.</i> , <i>P. s.</i> , <i>E. p.</i>
ICP-MS	As, Cr, Co, Fe	
AAN et/ou ICP-MS	(As), (Cr), Cu, Ni, Pb, V Ba, Ce, Cs, Fe, La, Rb, Th	
Quantitative <i>Conversion stock-flux</i> (>20 µm ; 2 mois d'exposition)	Ba, Pb, Sb, Ti	<i>S. p.</i> , <i>P. s.</i> * <i>Ps>Sp</i> pour Pb, Sb, Ti, V <i>Ps=Sp</i> pour Ba, Cd, Cs, La, Sr, U

Tableau récapitulatif du "mode d'emploi" proposé pour l'utilisation des mousses en fonction d'objectifs d'études en approche Relative (élaboration de cartes d'isoconcentration, choix des techniques d'analyse) ou en approche Quantitative (relation avec poussières >20 µm). * choix des espèces : *P. s.*, *Pleurozium schreberi* ; *S. p.*, *Pseudoscleropodium purum* ; *E.p.*, *Eurhynchium praelongum*. Les éléments entre parenthèses renvoient à des problèmes de limite de détection par la technique d'analyse considérée.

L'objectif de cette thèse était d'étudier la variabilité à différentes échelles d'observation. En définitive cette étude nous a permis de mieux estimer et comprendre les limites d'utilisation de ces organismes bioindicateurs. Le mode d'emploi (cf. ci-dessus) peut paraître à l'issue de cette étude une conclusion relativement succincte pour autant, ce travail exploratoire laisse entrevoir de nombreuses perspectives d'amélioration ainsi que des compléments d'étude dans des domaines variés allant de l'écotoxicologie analytique, au biomonitoring et à la biostatistique.

Données Bibliographiques

1.1 Aspects Généraux relatifs au Biomonitoring, aux mousses et aux métaux

1.1.1 Introduction

Depuis les travaux pionniers des pays nordiques pour l'utilisation des mousses dans le monitoring environnemental¹ des pollutions atmosphériques (RÜHLING et TYLER, 1968, 1969, 1970), les études utilisant ces organismes comme organismes sentinelles de la pollution se sont développées. Les mousses qui sont des organismes cryptogames² ont pour elles un certain nombre de caractéristiques intéressantes (§ 1.2.2), parmi lesquelles il convient de citer tout particulièrement :

1. Leur large distribution géographique et leur capacité d'accumulation, en particulier des métaux, en font des candidats de premier choix pour les études de biomonitoring. En effet, les métaux et éléments traces qui, selon leur(s) source(s) sont déposés ou transportés à l'échelle locale, régionale, nationale ou continentale (RAMADE, 1992 ; RÜHLING, 1994), se retrouvent à des concentrations très élevées dans les mousses par rapport aux plantes supérieures (RÜHLING et TYLER, 1968 ; HUCKABEE, 1973 ; MARKERT, 1993).
2. Parmi les cryptogames, les mousses et les lichens sont les plus utilisés en raison de propriétés biologiques et fonctionnelles qui en font de bons outils d'estimation de la qualité atmosphérique (PUCKETT, 1988 ; WINNER, 1988 ; HERRMANN, 1990).

Les mousses tiennent ainsi une place privilégiée dans le biomonitoring actif (organismes transplantés) et passif (organismes *in situ*) des pollutions atmosphériques, principalement en ce qui concerne le suivi spatial et/ou temporel des retombées atmosphériques (*i.e.* déposition sèche et humide, sédimentation) (LODENIUS et TULISALO, 1984 ; HYNNINEN, 1986 ; MARKERT, 1993). D'une manière générale, les cryptogames sont plus sensibles à la pollution atmosphérique que les plantes vasculaires en raison de contrôles des flux de gaz impossibles (absence de cuticule et de stomates) (ROLAND et VIAN, 1992) et de l'absorption rapide et directe de l'eau de pluie chargée en polluants (PICKERING et PUJA, 1969).

1.1.2 Bioindication, Biomonitoring et termes reliés

Le monitoring environnemental a pour objectif de déterminer les variations spatiales et/ou temporelles des niveaux et/ou des effets de polluants (PUCKETT, 1988 ; MARKERT, 1993). D'une manière générale, la sensibilité (effets et niveaux) des réactions de tout ou partie d'un organisme, voire d'un écosystème, à la qualité de son environnement peut être utilisée. Cela peut concerner des réactions biochimiques, physiologiques, morphologiques ou phytosociologiques. L'ensemble de ces réactions dépend non seulement du polluant en

¹ Le *monitoring*, terme anglais équivalent au terme français de *surveillance*, a pour objectif d'évaluer l'impact à un instant t ou en fonction du temps de la pollution de l'environnement à l'aide de paramètres physico-chimiques (e.g. pH) ou d'outils biologiques. Dans ce dernier cas, il s'agit de biomonitoring environnemental (cf. définitions § 212) (FERARD, comm. pers.).

² Les *Cryptogames* (de *kruptos*=caché et *gamos*=union), ou plantes sans fleurs, constituent un vaste ensemble comportant les Algues, les Champignons, les Bryophytes et les Ptéridophytes (ROLAND et VIAN, 1992).

question mais aussi de facteurs abiotiques et biotiques propres à l'espèce considérée (âge, sexe, besoins nutritionnels, humidité, compétition inter- ou intraspécifique).

De nombreux auteurs européens (MARKERT, 1993) ont suggéré les définitions suivantes concernant les termes de *bioindication* et *biomonitoring* :

- *Bioindication* s'emploie dans le cas où tout ou partie d'un organisme (ou d'une communauté) est utilisé pour obtenir des informations sur la qualité de tout ou partie de son environnement. Ces organismes qui peuvent fournir des informations sur la qualité de leur environnement sont alors appelés *Bioindicateurs*.

- *Biomonitoring* s'emploie pour une observation en continu d'une surface donnée grâce à des *Bioindicateurs* qui, dans ce cas d'étude, peuvent aussi être qualifiés de *Biomoniteurs* (e.g. mousses, lichens, aiguilles de pins). Normalement, toute observation continue permettra une évaluation semi-quantitative des résultats (WITTIG, 1993).

- Le *Biomonitoring* peut être qualifié de *passif* ou *actif* selon que les organismes bioindicateurs sont échantillonnés *in situ* (sur les lieux étudiés) ou qu'ils y sont implantés volontairement. Ces organismes sont alors désignés sous le terme de *Transplants* (MÄKINEN et LODENIUS, 1984 ; HYNINEN, 1986 ; TUBA et CSINTALAN, 1993).

Les caractéristiques idéales d'un bon "Biomoniteur d'accumulation" ont été présentées par WITTIG (1993) :

a) Le biomonitoring actif et passif

- taux d'accumulation suffisant ;
- toxicotolérance générale et suffisante ;
- pas de différence saisonnière dans la disponibilité et l'utilisation de l'organisme ;
- méthodologies d'échantillonnage et d'analyse standardisées ;
- existence de corrélation entre l'accumulation et l'apport des polluants dans l'écosystème ;
- pas de pertes majeures de polluants surveillés par l'organisme ;
- organisme très étudié du point de vue écologique, biologique, anatomique, etc.

b) Le biomonitoring passif

- organisme présent en grande quantité sur la région étudiée ;
- organisme ayant une grande amplitude géographique de dispersion ;
- différenciation possible entre les retombées atmosphériques et les contaminations par les sols ;
- facilité d'échantillonnage ;
- absence de problèmes liés à la détermination.

c) Le biomonitoring actif

- culture et entretien faciles ;
- multiplication végétative aisée ;
- pas de problème de parasitisme ou de maladie ;
- méthodes de culture et d'exposition standardisées ;
- uniformité génétique (existence de clones).

Comme cet organisme idéal n'existe pas, le choix des espèces bioindicatrices dans de nombreuses études répond avant tout à des critères d'efficacité et de convenance pratique.

1.2 Généralités sur les Mousses

1.2.1 Biologie des Mousses

Les mousses appartiennent au groupe des Bryophytes regroupant environ 22000 espèces divisées en 3 classes : les mousses, les hépatiques et les anthocérotes (*Bryopsida*, *Hepaticopsida* et *Anthocerotopsida* selon les règles de nomenclature internationale de botanique). Les mousses représentent 64% des Bryophytes et se répartissent elles-mêmes en 6 classes dont les bryidae qui regroupent 90% des taxons (NASH et EGAN, 1988).

En raison du faible développement des tissus conducteurs et de l'absence de véritables racines, les mousses sont très dépendantes de l'eau. Son absorption s'effectue par les rhizoïdes (systèmes racinaires rudimentaires) et surtout par capillarité sur toute la surface des feuilles, de la tige ou de la lame thalloïde. En absorbant l'eau par toute leur surface, les mousses incorporent les nutriments et éléments traces présents à l'interface plante/eau. Selon certains auteurs, c'est l'absorption aérienne qui est privilégiée et non pas l'assimilation substratique (RÜHLING et TYLER, 1970 ; BRÜNING et KREEB, 1993). Cette supposition reste vraie pour les espèces épiphytes¹ mais doit être relativisée pour les espèces vivant sur les sols ou les rochers pour lesquelles la solubilisation du substrat a lieu (SYERS et ISKANDAR, 1973).

La présence de ces organismes dans des stations sèches (murs, rochers) est possible grâce à des adaptations biologiques (vie ralentie, reviviscence). En effet, ces organismes poïkilohydriques² subissent plusieurs fois dans leur vie un état de vie ralentie, ou anhydrobiose, suivi d'un état de vie active après réhydratation (RICHARDSON, 1981).

Au cours de leur cycle de développement³, les mousses ne sont représentées que par des organismes haploïdes, ou gamétophytes, toujours nettement différenciés en tiges et feuilles. Le sporophyte (ou sporogone), réduit à l'organe élaborant les spores haploïdes, est diploïde et vit en parasite sur le gamétophyte femelle. Il porte une capsule sporifère qui s'ouvre à son sommet par des sacs sporifères. La sexualité est liée à l'eau (libération des gamètes à la faveur d'une pluie) et très fréquemment ces organismes se multiplient par voie végétative (simple bouturage) (NASH et EGAN, 1988 ; ROLAND et VIAN, 1992).

Les caractéristiques générales des mousses sont les suivantes :

- présence de chlorophylles A et B, d'amidon, de parois cellulosiques et parfois d'une cuticule
- sporophyte annuel, non ramifié produisant un sporangium terminal ;
- sporophyte attaché et dépendant du gamétophyte (la base, ou pied, pénètre les tissus du gamétophyte) ;
- pas de tissus conducteurs pour le sporophyte et le gamétophyte ;
- gamétophyte pérenne, provenant d'un protonéma (phase filamenteuse) et d'un gamétophyte à l'origine des organes sexuels ;
- gamètes mâles biflagellés rejoignant l'oosphère via un film d'eau ;
- organe femelle ou archégone ;
- croissance du gamétophyte grâce à une cellule apicale.

Les éléments majeurs pour les besoins minéraux des bryophytes sont le C, H, O, N, P, S et en éléments secondaires B, Ca, Cu, Fe, Mn, Mg et Zn. Les mousses, dont l'activité

¹Chez les végétaux, les organismes "épiphytes" représentent un cas de commensalisme (interactions positives entre espèces) impliquant un contact permanent de l'hôte et de son commensal (RAMADE, 1984).

²Le terme "poïkilohydrique" désigne des organismes dont la teneur en eau est identique (ou voisine) à celle du milieu extérieur et suit ses fluctuations (RAMADE, 1984).

³Pour plus de détails sur le cycle de reproduction des mousses, voir Annexes Générales, Eléments de Biologie et d'Ecologie des Bryophytes.

physiologique est dépendante de la contenance en eau, sont physiologiquement inactives à moins de 20% de leur poids sec (NASH et EGAN, 1988). La déshydratation peut inhiber des synthèses protéiques et provoquer des perturbations physiologiques comme la perméabilité des membranes (DHINDSA et BEWLEY, 1977).

1.2.2 Ecologie des mousses

Les mousses se retrouvent dans de nombreux écosystèmes. Leur présence et abondance à différents stades pionniers sont largement reconnues. Les représentants du groupe sont souvent considérés comme de bons indicateurs de conditions microclimatiques et de la nature du sol (ROLAND et VIAN, 1992). Ils constituent l'essentiel de la strate basse ou muscinale et d'une façon générale, l'écologie des bryophytes est très dépendante de l'eau et des mécanismes biologiques ou des dispositifs particuliers permettant son économie. Les mousses ont un rôle important dans les écosystèmes (pollués et non pollués) du point de vue de la productivité, de la fixation de l'azote (présence de cyanobactéries), du cycle des éléments minéraux, de la chaîne alimentaire, de la colonisation des successions primaires et enfin dans la stabilité des sols (SLACK, 1988). Elles sont un élément essentiel dans le cycle des minéraux de certaines forêts (90% du Ca, Mg, K et Na dans la végétation du sol) (RIELEY, 1979). Même si les mousses sont des plantes pérennes, leur présence est limitée à quelques années ou décades en raison de l'évolution des conditions d'habitat (NASH et EGAN, 1988). Parmi les espèces utilisées et recommandées pour le biomonitoring des retombées atmosphériques des métaux et éléments traces (FOLKESON, 1979 ; RÜHLING, 1992), les mousses pleurocarpes¹ sont les plus intéressantes :

- *Hylocomium splendens* est très commune en France jusqu'à l'étage alpin mais elle est rare en région méditerranéenne. C'est une espèce photophile, se trouvant sur des humus de type mull-acide ou moder. Elle peut être confondue avec *Thuidium tamariscinum*. Sa productivité annuelle est de 450-600 kg/ha en forêt d'épicéas (Suède) ;

- *Pleurozium schreberi* est commune jusqu'à l'étage alpin mais elle est absente de la région méditerranéenne. C'est une espèce héliophile qui se trouve sur des sols très pauvres en bases et en azote, plutôt sur des humus moder à mor, sur substrat exclusivement siliceux. Elle est indifférente à l'humidité du sol. Elle peut être confondue avec *Pseudoscleropodium purum*. Sa productivité annuelle est de 435-655 kg/ha en forêt d'épicéas (Suède). Lors de l'étape de reviviscence, cette mousse passe de 12% à 70-80% de masse de matière fraîche en 1 minute. En 3-4 heures, les cellules retrouvent un aspect "normal" de vie active (RICHARDSON, 1981) ;

- *Hypnum cupressiforme* est très commune jusqu'à l'étage alpin et un peu plus rare en région méditerranéenne. C'est une espèce photophile à sciaphile², indifférente à l'acidité du substrat. Elle se trouve surtout sur le bois pourrissant et la litière. C'est un taxon confus en l'état actuel des connaissances et de son utilisation par les bryologues.

- *Pseudoscleropodium purum* est très commune jusqu'à l'étage subalpin. C'est une espèce photophile qui se trouve sur des humus mull eutrophe à mor. Elle est indifférente à l'acidité du substrat.

- *Thuidium tamariscinum* est répandue depuis la plaine jusqu'au-delà de 2000 m. Elle se trouve à même le sol dans les forêts humides et ombragées. Elle peut être confondue avec *Hylocomium splendens*.

¹ Le terme "pleurocarpes" désigne les mousses dont l'organe où s'élabore les spores pousse de façon latérale par rapport à la tige feuillée (terme opposé à "acrocarpes") (voir Annexes Générales, Eléments de Biologie et d'Ecologie des Bryophytes).

² Le terme "sciaphile" désigne des espèces végétales ayant un faible besoin lumineux (espèces dites "d'ombre").

Pour les études de biomonitoring, ces espèces pleurocarpes sont utilisées en raison de différentes caractéristiques physiologiques et écologiques :

- une large répartition géographique (on les retrouve par exemple jusque dans les régions circumboréales). Elles permettent ainsi de comparer les concentrations en métaux pour diverses régions (urbaines, industrielles, rurales) et pays (TUBA, 1987 ; WINNER, 1988 ; JAHNS, 1989) ;
- une morphologie qui ne varie pas avec les saisons. De plus, ces plantes ayant une certaine longévité, elles permettent de dater et d'intégrer des variations de dépositions atmosphériques sur le long terme (RÜHLING et TYLER, 1968, 1969, 1970) ;
- présence de segments annuels de croissance, censés représenter, contenir et intégrer l'ensemble des variations annuelles des retombées atmosphériques ;
- une accumulation des métaux à des niveaux très supérieurs à leur réels besoins physiologiques, avec des mécanismes de capture principalement expliqués par les échanges ioniques et la structure de surface (PUCKETT, 1988 ; NASH et EGAN, 1988) ;
- une absence de cuticule qui facilite l'interception et la rétention des particules et minimise toute résistance physique à la diffusion de minéraux solubles à l'intérieur de la plante ;
- végétaux poïkilohydriques (tolérant une déshydratation très poussée) ;
- une absence de structure racinaire développée qui les oblige à prélever les nutriments essentiels à partir des dépôts secs et humides atmosphériques (NASH et WIRTH, 1988 ; HERRMAN, 1990 ; BRÜNING et KREEB, 1993 ; BROWN, 1995).

1.2.3 Réponses des mousses à la pollution de l'air

Les mousses ont été décrites pour la première fois comme sensibles à la pollution de l'air il y a 100 ans (ARNOLD, 1892). Elles présentent des réponses écologiques et physiologiques aux polluants atmosphériques. Par exemple, la disparition des mousses de certaines régions implique les polluants atmosphériques comme des agents délétères (BARKMAN, 1969). Il est cependant difficile de déterminer quelles sont les mousses sensibles à la pollution de l'air en utilisant les données d'études de terrain (présence/absence) puisque l'absence d'espèces peut être due à d'autres facteurs (NASH, 1972). En effet, la température, l'humidité, les pluies, la géochimie du substrat et les antécédents historiques peuvent, en particulier, participer à la répartition spatiale des espèces de mousses. La réponse de celles-ci aux polluants atmosphériques varie avec ces facteurs environnementaux. Beaucoup d'espèces croissent dans des zones polluées (espèces pollutolérantes) y compris dans des zones désertées par les lichens les plus résistants (HUCKABEE, 1973 ; WELLS et BROWN, 1995).

D'après des expériences de terrain, il apparaît clairement que la croissance des mousses est retardée au voisinage de sources d'émissions. En laboratoire, la croissance de *Sphagnum nemoreum* est inhibée par des solutions de métaux (SIMOLA, 1977). La relation entre la charge en métaux et la croissance de différentes espèces est un problème complexe demandant des études spécifiques à chaque cas.

1.2.4 Effets biochimiques et physiologiques du stress

Sous certaines conditions de stress, comme le SO₂, les métaux ou même la déshydratation, les mousses répondent par des modifications biochimiques et/ou physiologiques. Ces réponses peuvent être évaluées soit dans des conditions de laboratoire contrôlées, soit sur du matériel croissant dans des conditions de gradient de stress (biomonitoring passif), ou encore sur du matériel transplanté directement dans de telles conditions de gradient (biomonitoring actif). Cependant, les réponses physiologiques des mousses face aux polluants atmosphériques ont été peu étudiées.

Quelques études font mention de l'effet négatif du SO₂ sur la quantité et la fluorescence de la chlorophylle ainsi que sur la photosynthèse (WINNER et BEWLEY, 1983). La fumigation par du SO₂ de trois mousses (*H. splendens*, *P. schreberi*, *Ptilium crista-castrensis*) provoque une diminution immédiate de leur taux de photosynthèse, mais n'a aucun effet sur leur respiration. *P. schreberi* est l'espèce la plus sensible, même si toutes les trois absorbent la même quantité de SO₂. L'absorption du SO₂ étant liée au degré d'hydratation de la plante, les mousses humides absorbent évidemment plus que les mousses sèches. Lorsqu'une cellule est desséchée, et en plasmolyse, un espace d'air entre le cytoplasme (limité par le plasmalemme) et la paroi pectocellulosique forme une barrière à la diffusion du gaz dans la cellule. Ceci expliquerait que les plantes sèches sont moins affectées par ce gaz (cas de *Hypnum cupressiforme*) (WINNER et KOCH, 1982 ; WINNER et BEWLEY, 1983).

L'induction de la fluorescence de la chlorophylle mesure l'activité du photosystème II et est un indicateur sensible du stress des plantes (BOHLAR-NORDENKAMPF et ÖQUIST, 1993). Ce paramètre a été utilisé dans des expérimentations de fumigation à court terme afin de détecter les effets de SO₂, O₃ et NO₂ sur les réactions lumineuses de la photosynthèse (SCREIBER et al., 1978 ; SHIMAZAKI 1987 ; SCHMIDT et al., 1988). Cette méthode a permis de mettre en évidence l'effet de la déshydratation sur le photosystème II du lichen normalement tolérant à la sécheresse *Cladonia convoluta* (SASS et al., 1996). Ce paramètre rend compte de l'état global de stress de la plante.

Récemment, les effets des radicaux libres ont été suivis au travers des enzymes et métabolites impliqués dans la protection contre le stress oxydant (RICHARDSON et NIEBOER, 1983 ; KÖCK et al., 1985). Des activités enzymatiques, telles que la SOD (Superoxyde Dismutase), la catalase ou l'augmentation des produits de lipoperoxydation sont autant de critères d'effet face au stress (BROWN D.H., 1995).

En ce qui concerne les effets des métaux, une étude utilisant des transplants a permis de mettre en parallèle l'augmentation du contenu en métaux avec la diminution des chlorophylles, des caroténoïdes et de la photosynthèse nette (MEENKS et al, 1991). Des expériences de laboratoire ont permis de mettre en relation le contenu intracellulaire du Cd et la diminution de l'activité photosynthétique (BROWN et WELLS, 1990). L'induction intracellulaire de polypeptides chélateurs de métal (phytochélatines) dans les mousses suggère que ces protéines ont un rôle de protection contre les dommages induits par les métaux (JACKSON et al, 1991).

1.2.5 Procédés de capture et d'accumulation des métaux et éléments traces

A l'interface plante/air-eau, différents mécanismes peuvent intervenir (**FIGURE 1**).

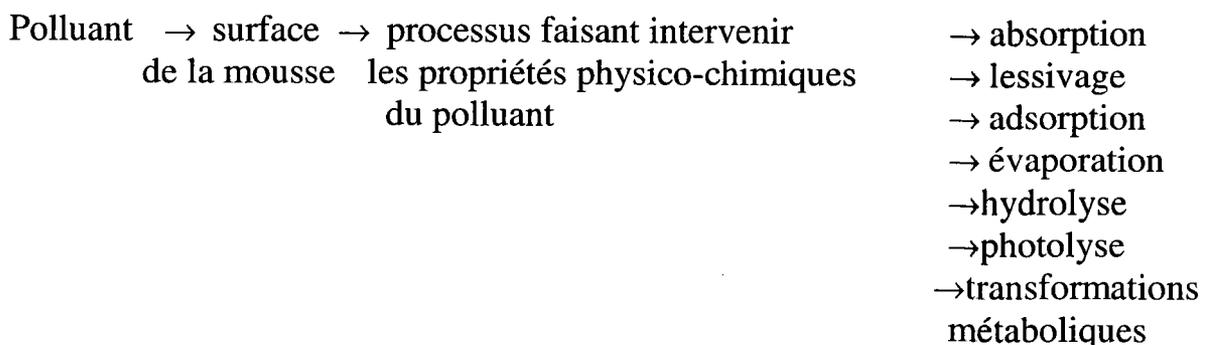


FIGURE 1:Processus de capture et devenirs possibles des polluants à l'interface plante/air-eau

Pour les mousses, la connaissance de ces processus est limitée à la capacité d'échange ionique des éléments traces (HERRMANN, 1990). La capacité d'échanges cationiques des mousses (CEC¹) a été mesurée entre 40-120 meq./100 mg de poids sec (KNIGHT et al., 1961). Pour la capture des éléments dissous, elles emploient les classiques trois phases de prélèvement des éléments en fonction du temps. Un prélèvement rapide dû à la diffusion dans les interstices du tissu, suivi d'un équilibre avec les sites d'échanges de la paroi cellulaire et finalement d'une lente augmentation linéaire due au prélèvement intracellulaire. Seules les deux premières phases ont lieu dans les matériaux morts (PICKERING et PUJA, 1969).

Il est présumé que la source principale de nutriments des mousses sont les dépôts atmosphériques sèches et humides. Cette supposition est sans doute vraie pour les espèces épiphytiques (*Hypnum cupressiforme*) mais, pour les espèces vivant sur les sols ou les rochers, la solubilisation du substrat est prouvée (pour les lichens, SYERS et ISKANDAR, 1973) et l'absorption de la solution par les organismes doit se produire, même si le phénomène de capillarité est le mécanisme principal. De plus, la spécificité bien connue entre substrat et espèces n'est valable que si le substrat participe comme source de nutriments. Cependant, les mécanismes d'absorption des solutions du sol ne sont pas bien définis. Certaines espèces sont capables de prélever des éléments du sol, comme le cadmium par exemple (WELLS et BROWN, 1995), montrant ainsi que l'accumulation des polluants peut s'effectuer selon un processus normal c'est-à-dire par la voie aérienne et substratique. Ces espèces de mousses (e.g. *Rhytidiadelphus squarrosus*) sont donc à proscrire de toute étude de biomonitoring des retombées atmosphériques.

Les concentrations normales de métaux dans les mousses sont très difficiles à définir. Certaines concentrations dites de fond ont pu être établies pour *Pleurozium schreberi* (RINNE et BARCLAY-ESTRUP, 1980) en analysant des échantillons provenant de sites reculés (Ontario, Canada). La capacité de tolérance en métaux et éléments traces des cellules végétales type et de cellules de mousses reste aujourd'hui inconnue. Certaines espèces peuvent survivre à des concentrations bien supérieures aux limites habituelles. Par exemple, *Hylocomium splendens* et *Pleurozium schreberi* ont été dosées avec des concentrations en Pb de 17 320 et 1160 µg/g respectivement (la concentration de fond pour ces espèces étant comprise entre 10 et 30 µg/g) (WINNER, 1988).

La concentration des métaux et éléments traces dans les mousses de zones polluées dépend du support d'émission ou de transport des métaux, c'est-à-dire des particules, ainsi que des propriétés physico-chimiques de ces particules (taille, acidité). En effet, la solubilité des métaux sera d'autant plus grande que le pH sera bas. Les métaux les plus solubles en solution acide, donc avec un fort potentiel d'oxydation², (Mn > Zn > Fe > Cd > Co > Ni > Pb > Cu > Hg) sont moins efficacement retenus dans les tissus de mousses. Ils sont plus susceptibles d'être déplacés par des métaux moins solubles, ou par des ions H⁺ (RINNE et BARCLAY-ESTRUP, 1980). Cette séquence peut être mise en parallèle avec l'ordre des éléments préférentiellement absorbés par :

Hylocomium splendens : Cu, Pb > Ni > Co > Zn, Mn ;

Pleurozium schreberi : Pb > Cu > Ni > Zn > Cd > Fe > Mn (RÜHLING et TYLER, 1973).

¹ La Capacité d'Echanges Cationiques (CEC) désigne le nombre total de charges négatives que porte une masse donnée, en l'occurrence de mousse, à la surface des sites susceptibles de fixer des cations (groupements -CO²⁻ ; -S⁻ ; etc.).

² Le potentiel d'oxydation désigne le potentiel d'un système S d'être soumis à une oxydation par perte d'électrons. Ce terme est à relier à celui de potentiel d'oxydoréduction (ou potentiel rédox) d'un système qui est d'autant plus réducteur qu'il est bas.

Cet ordre est indépendant du mélange ou non des éléments tel qu'effectué dans le cadre de cette expérimentation (des effets de compétition sont néanmoins constatés) (RÜHLING et TYLER, 1973). Cette capacité de capture reste valable, surtout pour Cu, Pb et Ni, malgré la présence de grande quantité de Ca, K, Mg et Na, éléments fréquents dans les eaux de pluies.

1.2.6 Les métaux et éléments traces dans les mousses

Les bryophytes peuvent accumuler de larges quantités d'éléments prélevés dans l'atmosphère (ROBERTS et al, 1979). La majorité des nutriments et des éléments sont acquis par la déposition de particules (simple sédimentation) et les gaz (retombées sèches) et par les précipitations (retombées humides) (TAMM, 1953 ; HUCKABEE, 1973 ; HUCKABEE et JANZEN, 1975). Mais, dans les études de biomonitoring, les concentrations mesurées dans les mousses sont le plus souvent des concentrations totales. Ces analyses ne distinguent pas le contenu extra- et intracellulaire (RÜHLING, 1994 ; MARKERT et al, 1996).

1.2.6.1 Localisation cellulaire

1.2.6.1.1 Les Particules

Le piégeage des particules par les mousses représente une source importante pour les éléments peu solubles (BROWN et WELLS, 1990c) mais a été très peu étudiée. La dispersion des métaux dans l'atmosphère se fait en très grande partie via les particules existantes et/ou émises par l'industrie ou les transports et qui vont se déposer soit par simple sédimentation (particules $>10 \mu\text{m}$), par dépositions sèches ou humides. Certaines particules associées aux mousses peuvent être des dépôts secondaires et peuvent être plus ou moins intimement associées aux cellules. La disponibilité des métaux internes ou en surface des mousses est très peu étudiée et demanderait plus d'investigations. Une étude a montré que pratiquement 100% des dépositions initiales des particules de diamètre aérodynamique moyen compris entre 88-175 μm sont interceptées par la mousse *Dicranum scoparium* mais que 20% de ce matériel était lessivé à la première pluie (TAYLOR et WITHERSPOON, 1972).

1.2.6.1.2 Sites de capture des parois cellulaires

Après des études de laboratoire, la nature physico-chimique des liaisons extracellulaires des métaux traces a été expliquée (BROWN et WELLS, 1990c). Les éléments extracellulaires échangeables sont liés à des groupements chargés (ligands) présents sur les polymères insolubles qui constituent les parois. Pour les cations, il y a de nombreux sites de liaison chargés négativement dans la fraction des parois. Par contre, il y a beaucoup moins de sites pour les anions. Pour *Sphagnum*, ces sites de liaisons à cations sont des polymères carbohydratés (CLYMO, 1963) ou encore des groupements acide carboxylique associés à des protéines présentes aussi à l'intérieur de la cellule et sur les lipoprotéines des membranes plasmiques. En plus, ces protéines sont riches en S et groupements thiols, en N et ligands hydroxyyles (BROWN et WELLS, 1990c).

Les processus d'équilibre physico-chimiques sont très rapides avec des demi-temps de capture calculés à 4.45 ± 1.03 min avec $100 \mu\text{mol/l}$ de Cd (BROWN et BECKETT, 1985). Cependant, ces temps d'équilibre sont concentration-dépendants comme mis en évidence par MOUVET (1987) avec plusieurs jours nécessaires avant équilibre pour Cd à $0.13 \mu\text{mol/l}$.

Ainsi, la quantité d'éléments liés dépendra de la concentration de l'élément dans le milieu, de son affinité pour les sites de liaisons ainsi que du nombre total de sites de fixation et d'échanges accessibles. Avec des mousses mortes, la quantité totale d'éléments fixés doit augmenter en raison d'une plus grande exposition de sites qui étaient avant intracellulaires. Cependant, il a été mis en évidence (WELLS, 1988) que de forts traitements acides utilisés pour tuer les mousses diminuaient la capacité d'échange à cause de la perte du cytoplasme.

1.2.6.1.3 Sites intracellulaires

La capture intracellulaire des éléments suppose leur passage à travers la barrière hydrophobe des membranes plasmiques entourant le cytoplasme. D'autres mouvements transmembranaires peuvent se produire à l'intérieur de la cellule par des passages dans la vacuole (par le tonoplaste¹) ou dans les organelles (chloroplastes, mitochondries). Cependant, en ce qui concerne les mousses, aucune différence n'est faite dans la localisation intracellulaire de ces différents compartiments. De même, aucune différence n'est faite entre le matériel soluble, précipité ou incorporé à des molécules se trouvant à l'intérieur de la cellule (cas de N présent dans les acides aminés, de Mg présent dans les chlorophylles, etc.). Aussi, l'existence de transfert intracellulaire grâce à des transporteurs a été explorée et, en ce qui concerne les possibilités de transferts intracellulaires, des pompes à protons ainsi que des systèmes de co-transport avec symport proton/acide aminé (glycine) ont été mis en évidence (CAUSSIN et al., 1982).

1.2.6.2 Analyse de la localisation des cations

1.2.6.2.1 Techniques utilisables

Différentes méthodes impliquant des agents chélatants peuvent être utilisées pour séparer les éléments en fonction de leur localisation cellulaire. Parmi ces différents agents, l'efficacité de KNO_3 , $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, de l'acide acétique et de l'EDTA a été comparée sur différents éléments (RÜHLING et TYLER, 1970). Aucun n'est apparu satisfaisant et aucune mesure de pertes de K n'a été effectuée au cours de ces expérimentations pour vérifier l'intégrité des membranes plasmiques. Certains de ces agents, comme l'EDTA à 10^{-4} M restent efficaces sur des algues unicellulaires (FERARD, 1986) pour la désorption d'élément, comme le Cd par exemple.

1.2.6.2.2 Elution séquentielle

En ce qui concerne les mousses, la quantification de la concentration des ions et leur localisation cellulaire ont été recherchés sur des échantillons prélevés autour d'une source de pollution connue, grâce à une méthode d'éluion séquentielle (fraction particulaire, extracellulaire échangeable, inter- et intracellulaire) (BROWN, 1995 ; BROWN et BRUMELIS, 1996).

Cette technique est utile lorsque les particules sont censées ne pas représenter une contribution majeure du contenu minéral (BROWN et WELLS, 1990). En effet, la présence de particules trop nombreuses et variées imposerait des traitements par lavages différents en qualité, durée, et intensité pouvant ainsi perturber la localisation initiale des éléments dans la mousse (pertes d'éléments, passage du milieu intra au milieu extracellulaire par liaison secondaire sur les sites extracellulaires présents sur les parois cellulaires).

Par l'éluion séquentielle, les éléments métalliques peuvent être localisés à différents endroits cellulaires :

- De simples lavages (40 et 30 min) à l'eau déminéralisée permettent d'accéder aux éléments retenus sous forme particulaire à la surface (du thalle) ou entre les cellules. Ce piégeage des particules (ou "particle trapping") constitue une source majeure pour les éléments faiblement solubles dans l'eau, comme les particules de sol (Ti, Al, Fe) . Cela concerne le matériel des dépôts secs ou les résidus de précédents événements pluvieux. Cette fraction peut également contenir des éléments comme K^+ provenant de l'intérieur de la cellule (extrusion délibérée ou dommages membranaires). La disponibilité des métaux venant de particules internes (dépôts cristallins) ou de surface est rarement étudiée ;

¹ Le *tonoplaste* désigne la membrane limitant le cytoplasme du côté interne. Le côté externe du cytoplasme est limité par le plasmalemme.

- L'utilisation d'agents déplaçants (Sr^{2+} pour les éléments de la classe A, Ni^{2+} pour les éléments de la classe B) permet d'accéder aux éléments liés à des groupes externes de la paroi cellulaire ou à des polymères membranaires de la fraction apoplastique¹. Cette fraction représente la capacité d'échanges cationiques de la cellule. Elle concerne les éléments extracellulaires échangeables liés à des groupes chargés (ou ligands) présents sur le matériel polymérique insoluble de la paroi.
- La libération des éléments intracellulaires est effectuée par un traitement HNO_3 à 1 mol/l. Les sites intracellulaires (symplasma², vacuole), sous forme soluble à l'intérieur de la cellule ou non soluble, sont alors accessibles. Dans les conditions normales, ces éléments doivent alors passer au travers de la membrane plasmique hydrophobe qui entoure le cytoplasme, ce qui laisse supposer un processus faisant appel à un transporteur membranaire, ou "carrier". Des pertes d'éléments de cette fraction peuvent survenir à la suite de dommages de la membrane plasmique (par des facteurs abiotiques par exemple).
- La partie résiduelle est minéralisée entièrement. Elle constitue le matériel insoluble qui peut être piégé (plus ou moins chargé) sur des particules extracellulaires ou biologiquement formées sous forme de dépôts cristallins (extracellulaire ou dans le protoplasme) (BROWN et WELLS, 1990; BROWN et BRUMELIS, 1993; BROWN, 1995).

Grâce à cette technique d'éluion séquentielle, la localisation de différents éléments a pu être mise en évidence (TABLEAU I).

Extracellulaire	Intermédiaire	Intracellulaire	Références
Ca	(stress hydrique)		Brown et Buck, 1979
	←	K	Brown et Buck, 1979
	Mg, Zn		Brown et Buck, 1988
Cd	→	baisse de la photosynthèse	Wells et Brown, 1987 Wells, 1988
Cations métalliques			Brown et Wells, 1990c

TABLEAU I : Récapitulatif bibliographique de la localisation d'éléments au niveau d'une cellule de mousse déterminée par la méthode de l'éluion séquentielle (BROWN, 1995b).

La dessiccation et la période de stockage des échantillons (24h à 0% d'humidité relative) modifient aussi la localisation cellulaire notamment des éléments cationiques intracellulaires qui peuvent se retrouver sur des sites échangeables extracellulaires (BROWN et BUCK, 1979;

¹ L'*apoplasme* désigne l'ensemble des parois (très perméables à l'eau), des lacunes et des méats; il peut être assimilé à l'espace libre, où les ions pénètrent par simple diffusion.

² Le *symplasma* est constitué de l'ensemble des cytoplasmes qui sont en continuité par les plasmodesmes.

BATES, 1997). Une réhydratation peut inverser en partie ce phénomène (importante perte de K^+ intracellulaire et de Mg, augmentation de Ca intracellulaire). Cette perte de K^+ et d'ions intracellulaires peut être utilisée comme une mesure des dommages membranaires. Le stockage des échantillons diminue également le taux de photosynthèse (BROWN et BRUMELIS, 1996).

1.2.6.3 Effet de l'âge sur la localisation

La localisation cellulaire des métaux et éléments traces dans les mousses peut être considérablement affectée par l'âge du tissu (entre les différents segments annuels de croissance) (TABLEAU II). En effet, la mousse *Hylocomium splendens* prélevée en forêt montre une répartition uniforme des éléments Mg et Pb des tissus jeunes (haut du brin) aux tissus âgés (bas du brin). Les éléments Mn, Fe et Ca ont tendance à s'accumuler dans les segments annuels de croissance les plus âgés. Seul K montre une concentration élevée dans les segments les plus jeunes (premier segment annuel). La concentration en métaux dans l'humus situé sous la mousse est inférieure à celle du dernier segment, exception faite de Fe (et peut-être Co) pouvant être d'origine substratique (RÜHLING et TYLER, 1970). Cependant, cette expérience révèle simplement que le prélèvement des éléments se fait par capillarité (sauf pour K et peut être Zn et Cu sous forme chélatée).

Avec la méthode d'éluion séquentielle, Mg, K, Cd, N et P sont retrouvés principalement en intracellulaires dans le segment le plus jeune (BROWN et WELLS, 1990c). Dans les autres segments, Mg, Ca, Ni, Zn et Mn sont principalement sous forme échangeable (BROWN et WELLS, 1990c) et tous augmentent dans les parties âgées. Les concentrations élevées dans les parties jeunes pourraient être en partie dues à une maturation incomplète de la cellule, contribuant à une plus faible masse par unité de longueur. Le calcium et le zinc augmentent dans les segments les plus âgés (parties échangeables). Les effets de gradients de distance d'une source polluante sont visibles dans les trois segments suivants celui de l'année en cours (pour Zn et Ca).

De fortes concentrations en Cd intracellulaire ont été retrouvées dans les segments de base et associées à la possible présence de micro organismes (BROWN et BECKETT, 1985), d'autant plus probable que ces segments sont plus proches du sol et en partie en décomposition. La forme échangeable en Cd augmente vers les parties âgées de la plante (BROWN et WELLS, 1990c).

Globalement, les éléments généralement liés à des sites extracellulaires échangeables ont tendance à s'accumuler dans les segments les plus bas (les plus vieux) (BROWN et WELLS, 1990) et d'autres auteurs ont mis en évidence des comportements similaires :

- chez *Hylocomium splendens* et *Pleurozium schreberi*, Cu, Fe, Mn, Pb et Zn augmentent des tissus jeunes vers les tissus âgés (PAKARINEN et RINNE, 1979).
- chez *Pleurozium schreberi*, Cu, Fe, Pb, Cr et Ni augmentent des tissus jeunes vers les tissus âgés (GRODZINSKA, 1978). Par contre, aucune différence de répartition n'a été observée pour Cd, Zn, Mn et Co.

Il est donc important de bien savoir :

- i) si la mousse entière a été utilisée
- ii) si les vieux segments ou seulement les "verts" ont été analysés.

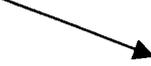
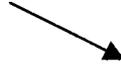
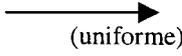
<i>Elution séquentielle</i>	<u>Segments Annuels</u> <u>Jeunes</u>	<u>Segments Annuels</u> <u>Vieux</u>	Références
	K^i, P^i, Cd^i, Mg^i		Brown et Wells, 1990c Brown et Bates, 1990
	Ni^e, Ca^e, Mg^e, Zn^e Cd^e		Brown et Wells, 1990c Brown et Beckett, 1985 Wells, 1988
	Eléments situés sur les sites extracellulaires échangeables		Brown et Wells, 1990c
<hr/>			
<i>Concentration Totale</i>			
	K		Rühling et Tyler, 1970
	Mg, Pb Cd, Zn, Mn, Co	 (uniforme)	Rühling et Tyler, 1970 Grodzinska, 1978
	Ca, Fe, Mn Mn Cu, Fe, Mn, Pb, Zn Cu, Fe, Pb, Cr, Ni		Rühling et Tyler, 1970 Malmer, 1988 Pakarinen et Rinne, 1979 Grodzinska, 1978

TABLEAU II : Récapitulatif bibliographique de l'effet de l'âge sur la localisation (méthode de l'*élution séquentielle*) et la distribution (méthode de la *concentration totale*) des éléments en parcourant les brins des segments annuels jeunes vers les segments annuels vieux (diminution, augmentation ou répartition uniforme). Pour la méthode d'élution séquentielle, les éléments intra et extracellulaires concernés sont indiqués par des exposants *i* et *e*.

1.3 Généralités sur les Métaux

1.3.1 Le terme “ Métaux Lourds ”

Le terme “ métaux lourds ” se réfère à la densité de l'élément et regroupe l'ensemble des éléments ayant une densité $> 4,5 \text{ g/cm}^3$ (LESACA, 1977). Cette définition ne convient cependant pas à tous les éléments avec par exemple Cr dont la densité est voisine de $4,5 \text{ g/cm}^3$ mais qui ne précipite pas sous forme de sulfure, de même que U avec une densité plus forte de 19 g/cm^3 . Par contre, VOUK (1979) préfère utiliser la réaction de précipitation des éléments avec l'anhydride sulfureux pour définir ce terme.

1.3.2 La classification de Nieboer et Richardson, 1980

Une autre classification (NIEBOER et RICHARDSON, 1980) tient compte du comportement des cations, en particulier leur facilité à former des complexes chimiques. Il y a ainsi trois catégories d'éléments (**FIGURE 2**) :

- la classe A : éléments montrant une nette tendance à former des liaisons ioniques et à s'associer préférentiellement à des ligands riches en éléments donneurs d'électrons selon la séquence suivante $O > N > S$ (K, Mg, Ca) ;

- la classe B : éléments montrant une nette tendance à former des liaisons covalentes et à s'associer préférentiellement à des ligands riches en éléments donneurs d'électrons selon la séquence suivante $S > N > O$ (Pb, Hg, Au) ;

- la classe des éléments intermédiaires¹, située entre la classe A et B, qui peuvent former des liaisons ioniques ou covalentes avec un caractère plus ou moins marqué selon leur position sur le graphe (**FIGURE 2**).

¹ Le terme “classe des éléments intermédiaires” est désigné en anglais par “borderline elements”.

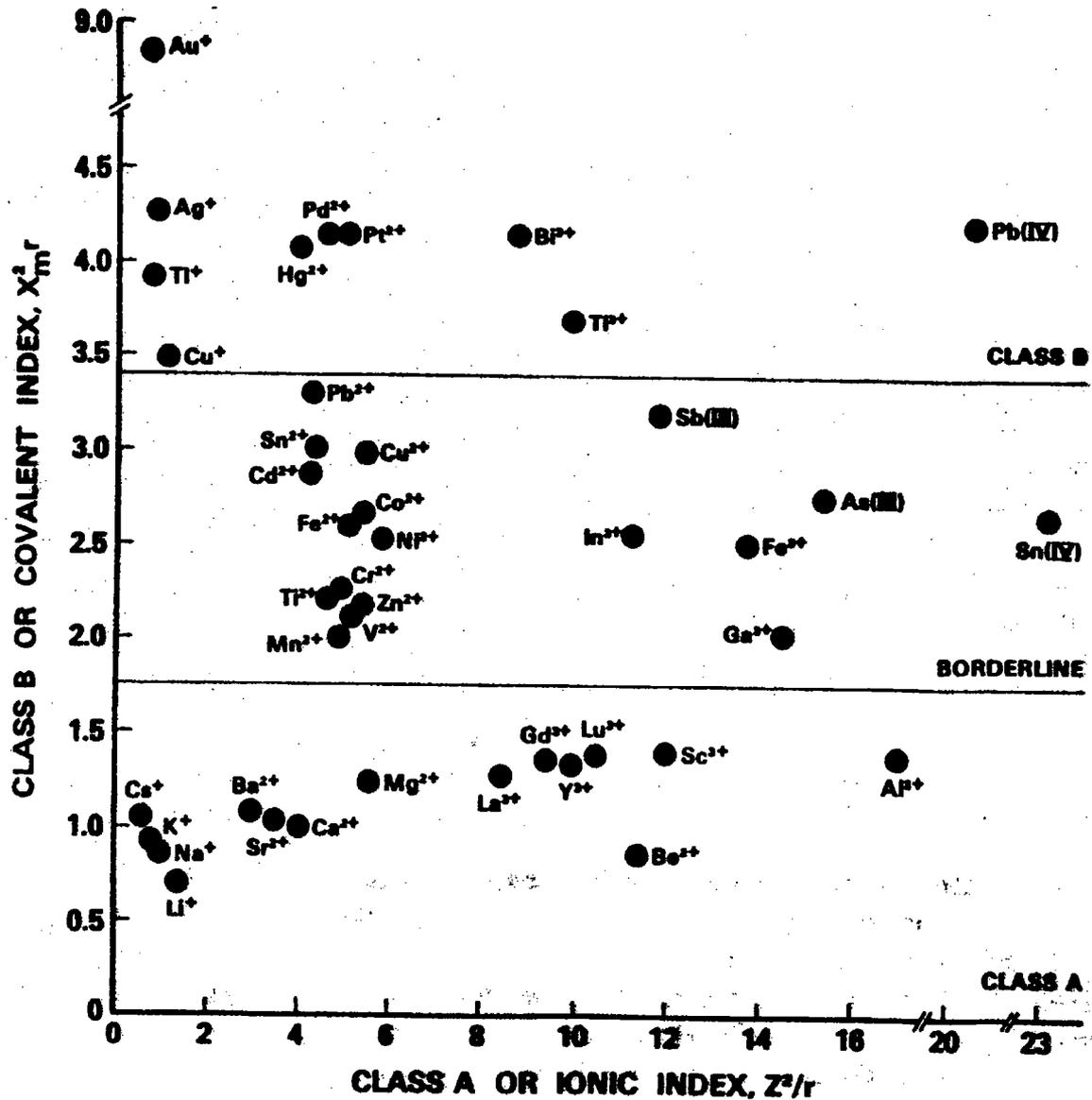


FIGURE 2 : Classification de NIEBOER et RICHARDSON, 1980.

1.3.3 Les métaux et éléments traces dans l'environnement

1.3.3.1 Apports atmosphériques, sources et comportement

En plus de ses constituants principaux (78% N₂, 21% O₂, 0.95% d'Argon), l'air est composé de constituants gazeux en concentrations relativement importantes (vapeur d'eau, gaz carbonique) et d'autres à des concentrations très faibles (oxydes d'azote, composés organiques volatils, etc.) (MOUVIER, 1994). Ces derniers jouent un rôle très important dans la chimie de l'atmosphère.

L'air contient aussi des particules solides ou liquides dont la suspension constitue un aérosol. Les fines particules (diamètre compris entre 10⁻² et 5 μm) sont très légères, restent longtemps en suspension et sont transportées sur de grandes distances.

Les particules plus lourdes se déposent plus rapidement par sédimentation ($>10 \mu\text{m}$). La composition des particules est très variée : composés organiques et divers. Cette variété reflète leurs différentes origines : naturelles (soulèvements de poussières, feux de forêts, embruns marins, volcanisme...) ou anthropiques (RAMADE, 1992 ; SAWIDIS et al, 1993). Les distances de transport des polluants introduits dans l'atmosphère varient en fonction de l'intensité et de la hauteur de l'émission, de la taille des particules et de la stabilité chimique des substances considérées (RAMADE, 1992). Les précipitations et les mécanismes de dépôt sec des particules ramènent les polluants à la surface du sol et (ou) dans l'hydrosphère. Les particules solides sont entraînées mécaniquement ou par dissolution, les substances gazeuses sont dissoutes dans les eaux de pluie. La contamination des divers milieux par les agents polluants va ensuite contaminer les êtres vivants.

1.3.3.2 Retombées atmosphériques réelles, mesures et surveillance des particules

1.3.3.2.1 Comportement des particules à l'interface atmosphère-surface

Les particules atmosphériques sont transportées par des mouvements turbulents et des forces gravitationnelles (ZUFALL et DAVIDSON, 1998). Elles atteignent ensuite la surface par les dépositions sèches et humides. Selon les conditions atmosphériques et les caractéristiques de la surface et de la particule, cette dernière peut soit y être collée soit rebondir¹ (WU et al., 1992). Plus tard, elle peut être de nouveau remise en suspension dans l'atmosphère. Au niveau des particules elles-mêmes, les paramètres comme la taille, la forme, la densité, la réactivité, l'hygroscopie et la solubilité vont influencer la déposition des poussières. Les caractéristiques telles que la vélocité de l'air, l'humidité relative, les caractéristiques de surface des particules influencent la quantité de poussières remises en suspension à partir d'une surface. Cette remise en suspension est plus grande pour les particules larges en raison des plus faibles forces d'adhésion et d'une plus grande rugosité de surface. L'humidité relative diminue la remise en suspension (augmentation des forces d'adhésion) (NICHOLSON, 1993). La vitesse du vent accroît cette remise en suspension suggérant ainsi que la remise en suspension des grandes particules est surtout le fait de brusques coups de vent.

1.3.3.2.2 Mesures et échantillonnage des poussières sédimentables

Au cours de leur temps de vie dans l'atmosphère, les aérosols subissent des transformations comme des coagulations², des chocs et des sédimentations (JAENICKE, 1998). En raison de toutes ces différences, les aérosols montrent des distributions de tailles qui couvrent cinq ordres de grandeur en allant du nanomètre à plusieurs centaines de micromètres. Cet énorme intervalle de taille rend la mesure de la distribution de taille des aérosols difficile, onéreuse et parfois entachée d'erreurs.

Les méthodes et stratégies d'échantillonnage des aérosols sont très nombreuses et variées (MARK, 1998). Selon que l'intérêt d'échantillonnage porte sur des particules fines ($< 20 \mu\text{m}$) ou grossières ($> 20 \mu\text{m}$), les appareils de capture employés seront différents. Les fractions fines intéressent plus particulièrement la santé humaine avec les normes ISO PM10 et PM2.5 qui définissent respectivement les fractions thoracique et respirable (donc à haut risque). Ces fractions sont mesurées par des appareils à filtres et pompage actif. Pour les fractions grossières et donc sédimentables (diamètre aérodynamique $> 10 \mu\text{m}$), les appareils de collecte sont des jauges de collecte³ qui ont des formes et des efficacités très variées. Ces jauges ont une surface et une période d'exposition définies permettant de définir des flux de retombées. Les jauges de déposition de particules (type jauge "Owen") sont dérivées des

¹ C'est le phénomène de "Bounce off".

² Le terme de *coagulation* ici pour désigner les formations d'amas entre les particules plus fines.

³ Le terme anglo-saxon correspondant est "particle deposit gauges".

jauges utilisées pour l'eau de pluie. Il s'agit d'un dispositif passif de collecte des retombées de diamètre aérodynamique de tailles supérieures à 20 μm dont l'efficacité est dépendante de la vitesse du vent et de la taille des poussières. L'importance des particules dites "grossières" (ou "coarse particles") a sans doute été négligée dans les études des retombées atmosphériques. Certaines études montrent qu'il existe une proportion importante des poussières $>10 \mu\text{m}$ dans les dépositions allant jusqu'à 60% de la masse de particules déposées (COE et LINDBERG, 1987 ; HOLSEN et al., 1993).

1.3.3.3 Classification basée sur les effets de la santé

En ce qui concerne la santé humaine, de récentes études ont montré que des particules inférieures à 100 μm peuvent pénétrer dans le corps au cours de la respiration et se déposer dans diverses régions du tractus respiratoire. La taille des particules conditionne l'endroit du dépôt et du devenir depuis les voies nasales jusqu'à la fraction alvéolaire. Ce n'est que récemment que les gestionnaires de l'environnement ont réalisé le risque représenté par les classes de particules dites PM10 et 2,5¹ qui sont inhalées et peuvent induire des effets au niveau des alvéoles pulmonaires.

La classification basée sur les effets sur la santé (TABLEAU III):

- la fraction inhalable ;
- la fraction thoracique ;
- la fraction alvéolaire.

	Diamètre de coupure	Phénomènes d'arrêt	Elimination
<u>Fraction inhalable</u>	<u>50 μm</u>	Filtration (poils) et/ou Adsorption (muqueuse)	Voie nasale, buccale ou par déglutition
<u>Fraction thoracique</u>	<u>10 μm</u>	Filtration (cils) et/ou adsorption	Toux,escalier mucociliaire
<u>Fraction alvéolaire</u>	<u>4 μm</u>		Phagocytose

TABLEAU III : Classification des différentes fractions de particules basées sur les effets sur la santé. Le diamètre de coupure correspond au diamètre pour lequel le taux de captage est de 50%.

¹ Les fractions PM10 et PM2,5 correspondent aux particules dont le diamètre aérodynamique est respectivement inférieur ou égal à 10 et 2,5 μm .

1.4 Généralités sur le Biomonitoring des métaux et éléments traces par les mousses

1.4.1 Faisabilité d'utilisation des mousses pour les études de Biomonitoring à grande échelle

La technique du biomonitoring utilisant les mousses a permis de distinguer des comportements différents de dispersion géographique et de préciser la provenance des éléments (STEINNES, 1992, 1993) :

- les transports atmosphériques à longues distances (V, As, Se, Mo, Ag, Cd, Sb, Pb, Co, Zn) ;
- les éléments de sources locales d'émissions (Cr, Ni, Cu) ;
- les éléments provenant de l'environnement marin (Cl, Sc, Br, I, Na) ;
- les transferts sol plantes supérieures via les pluviocessivats (Mn, Zn, Rb, Cs) ;
- les particules minérales principalement amenées par les vents et le sol (Al, Fe, Ti).

La faisabilité d'utilisation des mousses pour le biomonitoring de la déposition atmosphérique dépend tout d'abord de la concentration environnementale des éléments. En outre, les facteurs environnementaux influencent la sensibilité des mousses aux pollutions : la capture des métaux par les mousses est influencée par le climat, spécialement par l'humidité et la vitesse des vents (CLOUGH, 1975 ; FOLKESON, 1979 ; HYNINEN, 1986). Dans les vitesses de vents classiquement rencontrées, des études faites en tunnels montrent que les particules larges (32 μm) sont plus facilement collectées par des transplants ("moss bags"¹ d'*Hypnum cupressiforme*) que les plus petites (0.08 à 5 μm) (CLOUGH, 1975). De plus, la capture de "moss bags" avec mousses fraîches est plus efficace qu'avec des mousses rincées au bain acidifié et séchées. D'après cette étude les "moss bag" ne sont pas satisfaisants pour surveiller le contenu particulaire de l'air (0.08 à 5 μm) car trop dépendant de la taille des particules et de la vitesse du vent.

D'autre part, les éléments essentiels présents naturellement en quantité importante dans la mousse, comme Zn et Cu (20-30 $\mu\text{g/g}$ et 3-5 $\mu\text{g/g}$), ne peuvent pas être uniquement expliqués par l'apport atmosphérique (ROSS, 1990 ; BERG et al., 1995).

Il est cependant possible de relier le contenu des mousses avec les retombées atmosphériques réelles, comme les retombées humides (eaux de pluie). Cependant des facteurs autres qu'atmosphériques peuvent influencer le contenu des mousses (facteurs sol et influence de la végétation supérieure). Une autre source de variation dans les campagnes européennes de biomonitoring provient des :

- différentes espèces de mousses pleurocarpes échantillonnées,
- des techniques de d'analyse différentes entre pays voisins (ICP-MS, AAS, AAN, etc.) (RÜHLING, 1994 ; RÜHLING et STEINNES, 1998).

Il faut donc tenir compte de l'ensemble de ces paramètres qui augmentent la variabilité des données et influencent l'interprétation des résultats présentés sous forme de cartes d'isoconcentration.

¹ Pour plus de détail sur le "moss bag", voir §142 sur le biomonitoring actif.

1.4.1.1 Corrélations entre les retombées atmosphériques réelles et le contenu des mousses

Le biomonitoring utilisant des mousses pour estimer les retombées atmosphériques ne donne pas de résultats en termes de déposition atmosphérique absolue mais relative (GALSOMIES et al., 1999b).

En ce qui concerne l'estimation des retombées atmosphériques réelles, les dépositions humides peuvent être simplement estimées par la collecte de pluies dans des jauges passives¹. Cependant, ces estimations des retombées humides nécessitent des analyses de qualité (problèmes de contamination, de limites de détection). L'estimation de la déposition sèche est plus difficile car elle dépend de nombreux facteurs (taille des particules, vitesse du vent, topologie de la surface d'étude ...) et la relation avec le contenu des mousses a été très peu étudiée (TAYLOR et WITHERSPOON, 1972 ; CLOUGH, 1975).

Pour les métaux traces qui sont transportés à longue distance, il est supposé que la déposition humide est le facteur principal de déposition.

Lorsque le contenu des mousses est corrélé aux dépositions humides de 13 stations différentes (BERG et STEINNES, 1997), des corrélations significatives sont trouvées pour *Hylocomium splendens* (Al, V, Fe, Co, Ni, Cu, Y, Mo, Cd, Sb, Ce, Sm, Er, Tl, Pb et Bi) et pour *Pleurozium schreberi* (Mg, Al, V, Fe, Co, Ni, Cu, As, Se, Y, Mo, Cd, Sb, Tl, Pb et Bi).

Si de bonnes corrélations ont été trouvées entre les pluies et les mousses *Hylocomium splendens*, *Pleurozium schreberi* respectivement pour Cu, Cd, Fe, Pb, Zn, V (ROSS, 1990) par contre, aucune corrélation n'a été trouvée avec le Mn, Cr et Ni remettant ainsi en question leur participation à la liste des éléments étudiés à l'aide des mousses. De même, aucune corrélation n'a été trouvée pour les éléments Na, Mg, Cr, Mn, Fe, Ni, Rb, Sr, Ba et La. Cette absence de corrélation pourrait être le résultat de facteurs dominants autres que la déposition atmosphérique (BERG et al, 1995). Cependant, l'absence de corrélation pour ces quelques éléments ne signifie pas que la technique mousse est inutilisable pour le biomonitoring en général.

De façon idéale, la corrélation entre les mousses et les retombées atmosphériques réelles serait possible en établissant des facteurs d'efficacité afin de convertir des données dites de stock (mg/g) en données dites de flux (mg/m²/an). Mais, il faut remarquer que les estimations de dépositions atmosphériques en terme de flux reposent sur l'hypothèse que les mousses conservent un taux de croissance similaire et régulier sur l'ensemble des sites sélectionnés et dans l'ensemble des conditions environnementales étudiées (ou leur degré de pollution).

Pour le monitoring des métaux dans les mousses, les flux de déposition peuvent être estimés de la façon suivante :

$$D = (C \times A) / E$$

D : dépôt atmosphérique (mg/m²/an) ;

C : concentration de l'élément dans la mousse (mg/kg poids sec) ;

A : facteur biologique de croissance (kg/m²/an) ;

E : facteur d'efficacité de l'espèce pour l'élément.

L'établissement des facteurs A et E demande une très bonne connaissance de la biologie, de la physiologie des espèces utilisées. Les pays nordiques ont depuis longtemps évalué ces facteurs qui ne sont malheureusement pas réutilisables dans d'autres pays en raison des facteurs environnementaux et climatiques différents. Par exemple, des études suédoises ont établi le taux de croissance de *Hylocomium splendens* à $0,116 \pm 0,014$ kg/m²/an (RÜHLING et al, 1987). Les études norvégiennes indiquent que pour Hs le facteur E varie selon les

¹ Le terme anglo-saxon est "bulk collectors".

métaux : Pb, 100%, Cr, 84%, Cd, 65%, V, 54%, Zn, 41%, As, 32% (RÜHLING et al 1987 ; STEINNES, 1985).

Une autre méthode pour estimer l'efficacité de rétention "E" consiste à comparer les données des mousses avec celles des précipitations de stations munies de jauges passives de collecte des eaux de pluie (BERG et al, 1995 ; ROSS, 1990). Cette méthode est basée sur l'hypothèse que la majorité des métaux retrouvés dans les mousses proviennent de la déposition humide. Dans ce cas, le "E" établi précédemment (RÜHLING et al., 1987) pour Hs et pour Pb ($E_{ss-Pb}=100\%$), permet d'établir des "E", ou efficacité relative à Pb sans calculer le paramètre A.-

1.4.1.2 Contribution d'autres facteurs (pluiolessivats, sol)

Les mousses "plumeuses"¹ (*Hylocomium splendens*, *Pleurozium schreberi*, *Pseudoscleropodium purum*) sont principalement utilisées dans l'évaluation des retombées atmosphériques en raison du faible contact direct avec le sol et de leur capacité de sorption des métaux de solutions diluées (RÜHLING et TYLER, 1969, 1970).

Cependant, ces concentrations dans les mousses sont influencées par d'autres facteurs que l'adsorption des précipitations, comme la végétation supérieure et les particules de sols.

1.4.1.2.1 Influence des pluiolessivats

Des études montrent un effet significatif de l'augmentation de la couverture de la canopée (RINNE et BARCLAY-ESTRUP, 1980) sur l'augmentation de la concentration de Cd, Cu, Fe, Hg, Ni, Pb, Zn dans les mousses, à l'exception de Mn qui est faiblement retenu dans les mousses (ROSS, 1990). De même, la concentration de Cd, Cu et Zn augmente également dans l'humus avec la couverture des arbres. Les forêts de conifères sont connues pour être des pièges efficaces vis-à-vis des aérosols et, les mousses terrestres qui grandissent sous la canopée des arbres ne sont pas directement exposées aux polluants ambiants efficacement filtrés avant d'atteindre le sol (BELOT et al., 1994). Le contenu des mousses peut être aussi influencé par les métaux et éléments traces des pluiolessivats comme certaines études l'ont montré (KILINGBECK et WALI, 1978). Certaines espèces épiphytes peuvent capturer des éléments venant de la circulation automobile et du lessivage du tronc d'arbre : 27% du Cs¹³⁷ introduit dans le tronc de *Tulip poplar* (Liriodendron) retrouvé dans les mousses (HOFFMAN, 1972). C'est pourquoi la méthode d'échantillonnage standardisée des mousses *in situ* impose des prélèvements en clairières ouvertes (RÜHLING et STEINNES, 1998).

1.4.1.2.2 Influence d'un facteur Sol

Une étude portant sur la variabilité des données entre des mousses et des relevés mensuels de précipitations a montré que la variabilité des résultats-mousses était plus importante que celle des eaux de pluie. Ceci montre que des facteurs autres que l'adsorption des précipitations influencent la teneur des mousses (ROSS, 1990).

Le sol peut influencer le contenu des mousses avec la remise en suspension des poussières (BARGAGLI, 1995). Il est possible d'avoir une mesure de cette contamination et de normaliser les dosages des mousses obtenus avec les éléments Al, Sc, Ti, Fe (STEINNES, 1992 ; BARGAGLI, 1995).

La concentration des métaux et éléments traces dans *Pleurozium schreberi* a été trouvée généralement inférieure à l'humus "de position" ou minéral (situé juste en dessous) de la mousse (RINNE et BARCLAY-ESTRUP, 1980). Des précautions doivent être prises pour éviter toute contamination par des niveaux élevés de la partie minérale du sol en Cu, Ni et Fe, ceci pouvant intervenir si la mousse est directement en contact avec le sol (ce qui est rarement le cas avec les "feather mosses" (RINNE et BARCLAY-ESTRUP, 1980).

¹ Le terme anglo-saxon convenant est "feather mosses".

1.4.1.3 Etape de la calibration interespèces

L'estimation des retombées atmosphériques en métaux et éléments traces sur de grandes surfaces et à l'échelle européenne (RÜHLING et al., 1987 ; RÜHLING, 1994 ; RÜHLING et STEINNES, 1998) ne peut pas se faire sans utiliser différentes espèces de mousses pleurocarpes. En effet, l'échantillonnage de terrain se heurte parfois à l'absence de l'espèce recherchée, et c'est pourquoi il est préconisé dans les études de biomonitoring d'échantillonner plusieurs espèces (RÜHLING, 1992 ; MARKERT, 1993). Ce choix d'espèces doit être basé sur des études précédentes qui évaluent leur efficacité de bioindicateurs et fournissent une calibration interespèces possible pour les éléments analysés (RÜHLING, 1992 ; FOLKESON, 1979).

Ces campagnes de grande échelle ont un objectif de comparaison des retombées atmosphériques et il faut donc homogénéiser les cartes d'isoconcentrations obtenues à une échelle régionale voire nationale. Aussi, certains auteurs se sont interrogés sur la faisabilité de calibrer les différentes espèces de mousses entre elles. Cette calibration interespèces permet de prendre en compte des lieux d'échantillonnage qui ne seraient pas inclus dans les études par absence du matériel biologique recherché (FOLKESON L., 1979). Alors que certains recommandent d'effectuer cette calibration interspécifique préalablement à toute étude de biomonitoring de grande surface (FOLKESON L, 1978 ; RÜHLING, 1994 ; RÜHLING et STEINNES, 1998), d'autres n'y voient que l'introduction d'une nouvelle incertitude dans les données et les interprétations des résultats (HALLERAKER et al., 1998). Il est vrai que, même lorsque ces calibrations entre espèces sont possibles, les facteurs de conversion ne sont pas applicables entre pays voisins (WOLTERBEEK et al., 1995). En plus, ces facteurs de calibrations interspécifiques dépendent très certainement des gammes de concentrations élémentaires ainsi que des conditions micro climatiques et géographiques.

Il apparaît clairement que chaque espèce se comporte plus ou moins différemment dans la capture des éléments atmosphériques et cette efficacité varie également élément par élément (ROSS, 1990 ; SAWIDIS et al., 1993 ; BERG et al., 1995) en raison de facteurs biologiques et environnementaux.

Certaines études tentent tout de même de déterminer ces facteurs de calibration qui sont en général établis sur des espèces trouvées au même endroit et dans des lieux supposés indemnes de toute pollution. Des régressions linéaires sont réalisées entre couples de mousses et pour chaque élément (WOLTERBEEK et al., 1995 ; GALSOMIES et al., 1996 ; HALLERAKER et al., 1998).

Mais, le fait d'avoir déterminé ces facteurs dans des zones peu polluées pose un problème quant aux zones très polluées du fait des possibles effets de saturation qui peuvent aggraver les erreurs de comparaison. En effet, l'apparition d'un effet de saturation signifie que les données ne devraient pas être utilisées pour une quelconque extrapolation.

Parmi les différents travaux sur le sujet, les premiers travaux sur le biomonitoring (RÜHLING et TYLER, 1968, 1969, 1970) ont montré l'efficacité des mousses *Hylocomium splendens* et *Pleurozium schreberi* dans la rétention de métaux ainsi qu'un comportement similaire en tant que bioindicateurs.

Cependant, des travaux plus récents (ROSS, 1990) montrent que ces mêmes espèces ont un comportement différents selon les pays. En Scandinavie, les facteurs de calibration élaborés en Suède ne conviendraient pas. En effet, pour le Cu, Fe, Pb, Ni et V *Hylocomium splendens* retient d'avantage que *Pleurozium schreberi* (pas de différence pour Cd, Mn, Zn, Cr).

D'autres expériences de calibration interespèces ont montré que *Pleurozium schreberi* avait des concentrations en Pb, Ni, Cd plus faibles que *Hylocomium splendens* et *Hypnum cupressiforme* (FOLKESON L., 1979). Ces résultats vont à l'encontre d'autres travaux qui ne trouvaient pas de différence entre *Pleurozium schreberi*, *Hylocomium splendens* et *Hypnum cupressiforme* pour le Pb (RÜHLING et TYLER, 1968).

Il apparaît parfois impossible de calibrer des espèces pour certains éléments, notamment dans des études à grande échelle ou lors de mise en commun de résultats entre pays. Par exemple, à cause d'une trop grande variabilité des données, la Suisse et l'Allemagne n'ont pu calibrer Co, V et Zn entre *Hylocomium splendens* et *Pleurozium schreberi* (WOLTERBEEK et al., 1995). Les raisons portent aussi bien sur le matériel biologique lui-même que sur les méthodes d'analyses ou le traitement des données.

Autrement dit, la calibration interespèces, lorsqu'elle est possible, ne reste valable que dans les conditions géographiques et environnementales dans lesquelles elle a été établie et ne peut être extrapolée.

De toute manière, l'évidence de transports transfrontaliers des polluants montre la nécessité d'une coopération entre les différents pays (MARKERT et al, 1996 ; RÜHLING, 1992).

1.4.1.4 Analyse et Contrôle de la qualité

1.4.1.4.1 Les différentes techniques d'analyses multiélémentaires

Les études de biomonitoring effectuées à grande échelle utilisent différentes techniques d'analyse de traces pour doser les éléments V, Cr, Fe, Ni, Cu, Zn, As, Cd, Hg, Mn et Pb (RÜHLING and STEINNES, 1998). Les techniques les plus fréquentes sont l'AAN (Analyse par Activation Neutronique), AAS (Spectrométrie d'Absorption Atomique), ICP-AES (Spectrométrie d'Emission Atomique Induite par une torche à Plasma), ICP-MS (Spectrométrie de Masse Induite par une torche à Plasma). L'incertitude sur le résultat doit être faible, la répétabilité et la reproductibilité (dans le temps) grandes afin de permettre un grand nombre d'analyses en routine.

- a) L'ICP-AES est une technique d'étude multiélémentaire bien établie depuis plusieurs années et qui a été appliquée à des matrices très différentes (LOBERSLI et al, 1990) ;
- b) L'ICP-MS est d'une utilisation plus récente mais se révèle être sensible et applicable aussi bien à des échantillons géologiques que biologiques (NÖLTNER et al, 1990). L'ICP-MS est donc une bonne technique pour les analyses multiélémentaires notamment pour les faibles concentrations et, elle est toute désignée pour les études de biomonitoring (STEINNES et al, 1993) ;
- c) L'AAN est utilisée pour certains éléments et par quelques pays impliqués dans des campagnes à grandes échelles comme les Pays Bas (As, Cd, Cr, Cu, Fe, Hg, Ni, V et Zn), la Slovénie (As, Cd, Cr, Fe, V et Zn) et la France (As, Cr, Fe, Hg, V et Zn) (RÜHLING et STEINNES, 1998). Elle ne demande pas de minéralisation préalable et permet une analyse globale des éléments (moins de risque de contaminations et de pertes par minéralisation).

Les incertitudes concernant l'analyse peuvent être évaluées sur des échantillons analysés plusieurs fois (HALLERT, 1967). Les incertitudes typiques sur les concentrations dans les mousses sont de l'ordre de 3 à 6% (ROSS, 1990).

Cependant, des différences entre méthodes d'analyse existent. Ces différences ont été constatées entre l'ICP-MS et l'AAN pour certains éléments comme Cr et peut-être Sc, Co et V (STEINNES, 1993b). Il faut donc s'attacher à bien choisir la méthode d'analyse appropriée pour le dosage et surtout utiliser la même technique pour le suivi spatio-temporel des retombées atmosphériques.

1.4.1.4.2 Echantillonnage et variabilité locale

L'accumulation des métaux et éléments traces dans les mousses varie non seulement en fonction des conditions environnementales locales mais également d'une espèce à l'autre et d'un élément à l'autre dans un même biotope. Par exemple, des espèces comme *Grimmia pulvinata* et *Hypnum cupressiforme* échantillonnées dans les mêmes zones polluées et non polluées accumulent différemment.

Aussi, l'échantillonnage des mousses sur le terrain doit être le plus représentatif possible et intégrer, ou tout au moins minimiser, l'ensemble des variations.

L'évaluation de cette variation locale¹ est également un pré-requis essentiel (de même que la calibration interspèces) à toute étude de biomonitoring (RÜHLING, 1992 ; WOLTERBEEK et al, 1995). Ces variations locales englobent la variabilité résultant de l'échantillonnage des espèces (variabilité biologique), de la méthode d'échantillonnage et de l'analyse des éléments (variabilité de la technique de dosage) (MARKERT, 1993 ; WOLTERBEEK et al, 1995).

1.4.2 Biomonitoring Actif, la technique des " moss bags "

Une distinction est faite entre le biomonitoring passif et actif. Le premier prélève les mousses trouvées sur le terrain alors que le second utilise des transplants. La méthode de transplants consiste à placer directement les organismes biomoniteurs aux endroits choisis pour surveiller surtout l'évolution spatiale et plus rarement temporelle des retombées atmosphériques.

Les bryophytes peuvent être utilisés pour du biomonitoring actif en raison d'une mise en culture facile et d'une bonne connaissance de la physiologie et des effets de stress (BRÜNING et KREEB, 1993 ; HERRMANN, 1990 ; NASH et WIRTH, 1988 ; BROWN, 1995).

La technique standardisée des " Moss Bags " (SFS 5794, 1994) est depuis plusieurs années employée avec succès dans le monitoring des retombées atmosphériques et a été comparée avec le biomonitoring passif (MÄKINEN, 1977 ; HYNNINEN, 1986 ; MÄKINEN et LODENIUS, 1984 ; LODENIUS et TULISALO, 1984). Ainsi, l'utilisation des "moss bags", des lichens et de *Pleurozium schreberi*, dans l'accumulation du mercure émis par une industrie, a révélé une efficacité similaire des trois méthodes et organismes avec une capture plus importante pour les "moss bags" (LODENIUS et TULISALO, 1984). Les espèces utilisées pour ces "moss bags" sont en général des sphaignes (*Sphagnum girgensohnii*, *S. fuscum*, *S. riparium*, *S. balticum*) mais d'autres espèces peuvent aussi être utilisées (*Hypnum cupressiforme*, *Hylocomium splendens*) (GOODMAN et ROBERTS, 1971). La quantité de matière utilisée par "Moss Bag" est de 15 g de matière fraîche en moyenne et de 3,2 g de matière sèche (LODENIUS et TULISALO, 1984 ; MÄKINEN et LODENIUS, 1984). Avant toute pose, les mousses sont lavées dans des bains acidifiant et exposées en pelotes dans des filets en nylon à larges mailles. Même si les mousses se maintiennent en vie durant les premiers jours d'exposition, ce sont des mousses mortes qui sont exposées et récupérées pour les dosages.

Sur la base du poids de mousse utilisé pour les "moss bags", une estimation empirique de la déposition du mercure près de l'industrie a pu être faite (1 g de matière sèche représente environ 1dm²) (LODENIUS et TULISALO, 1984).

Cette technique standardisée est spécialement utile pour le monitoring de la déposition sèche (CLOUGH, 1975) et, de plus, elle est rapide, économique et permet un monitoring sur de nombreux sites et à une échelle étendue. Certaines variations saisonnières ont pu être constatées par "moss bags" (plus grande variabilité en Été qu'en Hiver) (HYNNINEN, 1986) mais, d'autres études ne font pas mention de variations saisonnières, en particulier pour le mercure (LODENIUS et TULISALO, 1984).

¹ Le terme anglo-saxon employé dans ce cas est "within sample site".

La distribution spatiale des éléments traces est aisément mise en évidence. Ainsi, l'accumulation des métaux augmente avec la proximité de sources d'émissions (HYNNINEN, 1986 ; LODENIUS et TULISALO, 1984). Il est également possible d'étudier la variabilité temporelle d'un site ou d'une région (HYNNINEN, 1986). La distribution spatiale des éléments se superpose en général avec la direction principale des vents (HYNNINEN, 1986). Il a d'ailleurs été montré que l'accumulation des particules atmosphériques dans les moss-bags dépendait de la vitesse du vent (CLOUGH W.S., 1975). Cependant, la relation entre la déposition réelle et la valeur donnée par le "moss bag" est inconnue.

1.5 Etudes Statistiques

1.5.1 Concepts statistiques des plans d'échantillonnage

Il existe un grand nombre de plans d'échantillonnage dont la plupart résultent de la combinaison de quelques plans élémentaires dont les échantillonnages :

aléatoire simple, systématique, à probabilités inégales de sélection des unités, stratifié, par régression, par degrés et à différentes occasions (FRONTIER S., 1983).

Chaque plan repose sur les mêmes concepts statistiques avec (SCHERRER B., 1984):

- l'*élément* (ou unité d'échantillonnage) sur lequel la variable mesurée est étudiée ou observée ;
- un *échantillon* qui est une collection d'éléments prélevés dans la population statistique , selon un processus aléatoire ;
- un *plan d'échantillonnage* qui est un protocole de sélection des éléments de la population statistique en vue d'obtenir un échantillonnage aléatoire (ou représentatif) ;
- la *population statistique* est une collection d'éléments, possédant au moins une caractéristique commune, et sur laquelle porte les inférences ou conclusions statistiques ;
- un *paramètre* est une caractéristique quantitative qui représente de façon condensée l'information contenue dans un ou plusieurs ensembles de données (la variance, la médiane, le mode, le coefficient de corrélation, etc.) ;
- un *estimateur* est une expression mathématique qui mesure, à partir des données de l'échantillon, un paramètre de la population statistique ;
- une *estimation* correspond à la valeur prise par un estimateur pour un échantillon particulier.

Comme une estimation varie d'un échantillon à l'autre, un estimateur est une variable aléatoire dont la distribution s'appelle *distribution d'échantillonnage*. La *variance de l'estimateur* correspond à la variance de la distribution d'échantillonnage et sa racine carrée s'appelle *l'écart type*.

1.5.2 Plan d'échantillonnage

L'objectif d'une théorie du plan d'échantillonnage est défini par COCHRAN (1977) de la façon suivante : "*The purpose of sampling theory is to make sampling more efficient. It attempts to develop methods of sample selection and of estimation that provide, at the lowest possible cost, estimates that are precise enough for our purpose*". Les problèmes rencontrés dans l'échantillonnage sont très nombreux et, l'optimisation de l'échantillonnage implique, en plus du coût (argent, temps, moyens), la définition d'un critère numérique de la valeur de l'information. Les critères peuvent être statistiques comme l'absence de biais, les variances intra et inter-classes, les coûts faibles, la variance totale minimale, etc.

Mais en fait, l'échantillon n'est pas simplement un objet rigide mais un système :

- qui fonctionne et qui va évoluer ;
- qui est structuré (espace, temps), mouvant et hétérogène ;
- dans lequel les parties ne sont pas toujours distinctes ;
- dont certaines connaissances et hypothèses de fonctionnement sont déjà acquises.

Dans le cas d'une région peu étudiée, certaines données préalables sont nécessaires à toute étude de biomonitoring (inventaires floristiques, étendue et présence des organismes, etc.) mais, le choix d'un plan d'échantillonnage doit toujours être considéré comme la première et essentielle étape de toute étude, y compris celle du choix de la technique d'analyse (en toute rigueur) car il va décider des futurs traitements statistiques possibles.

Les aléas de l'échantillonnage de terrain font qu'un échantillonnage complet d'une zone est impossible. Aussi, afin de contourner ce biais, des répliqués de sites doivent couvrir largement la zone étudiée et les unités d'échantillonnage doivent être identiques. Les études de la qualité de l'air au niveau régional présentent des difficultés particulières pour les plans d'échantillonnages, puisque les différences constatées peuvent être corrélées à des différences géographiques ou climatiques et ce, d'autant plus que les sites de contrôle sont quasiment inexistantes (HURLBERT, 1984).

La variabilité induite par l'expérimentation de terrain impose des répliqués d'échantillons dont le nombre dépend du paramètre étudié et de la précision désirée. Les statisticiens ont abordé cet aspect avec des données quantitatives (SOKAL et ROHLF, 1981 ; SCHERRER, 1984). D'autres ont décrit des méthodes pour déterminer, en fonction de la nature de l'unité d'échantillonnage, le nombre et la taille adéquats des répliqués (GREIG-SMITH, 1983 ; CULBERSON, 1955).

Les échantillons sont biaisés s'ils ne représentent pas la population étudiée. Cependant mieux vaut un biais connu, dont les analyses tiennent compte, qu'ignoré. Un biais classique consiste à sélectionner les meilleurs spécimens pour l'analyse, de même que le choix de sites supposé représentatifs. En fait, le plan d'échantillonnage idéal parce que complet consisterait à échantillonner des répliqués dans des zones polluées et non polluées avant et après que la pollution de l'air ait débuté. Une analyse de variance à 2 facteurs (temps et pollution) serait alors la technique appropriée.

Enfin, l'examen détaillé de la littérature montre que de nombreuses études de biomonitoring ne vont pas plus loin que la construction de graphiques. Cependant, les statistiques paramétriques restent l'approche la plus utilisée avec les classiques analyses de variance ou de régression. Parmi les statistiques non paramétriques, ce sont les comparaisons entre les fréquences de distribution, avec le test du Chi-2, qui sont les plus utilisées. Les analyses multivariées ne représentent qu'une faible proportion (WILL-WOLF, 1988).

Références bibliographiques

- ARNOLD F., 1892, Zur Lichenenflora von München, Ber. Bayer. Bot. Ges., 2 : 2-76.
- BARGAGLI R., 1995, The elemental composition of vegetation and the possible incidence of soil contamination of samples, The Science of the Total Environment, 176, 121-128.
- BARKMAN J.J., 1969, The influence of air pollution on bryophytes and lichens, in Air Pollution, Proceeding of the First European Congress on the Influence of Air Pollution on Plants and Animals, 197-209, Wageningen, Neth. (Center for Agriculture Publishing and Documentation).
- BATES J.W., 1997, Effects of intermittent desiccation on nutrient economy and growth of two ecologically contrasted mosses, Annals of Botany, 79, 299-309.
- BELOT Y., CAMUS H., GAUTHIER D. and CAPUT C., 1994, Uptake of small particles by tree canopies, The Science of the Total Environment, 157, 1-6.
- BERG T., ROYSET O. and STEINNES E., 1994, Trace elements in atmospheric precipitation at norwegian background stations (1989-1990) measured by ICP-MS, Atmospheric Environment, 3519-3536.
- BERG T., ROYSET O. and STEINNES E., 1995, Moss (*Hylocomium splendens*) used as biomonitor of atmospheric trace element deposition: Estimation of uptake efficiencies, Atmospheric Environment, 29, 353-360.
- BERG T. and STEINNES E., 1997, Use of mosses (*Hylocomium splendens* and *Pleurozium schreberi*) as biomonitors of heavy metal deposition : from relative to absolute deposition values, Environmental Pollution, 61-71.
- BOLHAR-NORDENKAMPF H.R. and ÖQUIST G., 1993, *Chlorophyll fluorescence as a tool in photosynthesis research*, Chap. 12, 193-206 p, In Photosynthesis and Production in a Changing Environment, a field and laboratory manual, Hall D.O., Scurlock J.M.O., Bolhar-Nordenkampf H.R., Leegood R.C. and Long S.P. (Eds), Chapman & Hall, 406 p.
- BROWN D.H. and BATES J.W., Bryophytes and nutrient cycling, J. Linn. Soc. Lond. Bot., 104, 129-147.
- BROWN D.H. and BECKETT R.P., 1985, Intracellular and extracellular uptake of cadmium by the moss *Rhytidiadelphus squarrosus*, Ann. Bot. Lond., 55 : 179-188.
- BROWN D.H. and BUCK G.W., 1979, Desiccation effects and cation distribution in Bryophytes, New Phytol., 82, 115-125.
- BROWN D.H. and BRUMELIS G., 1993, A biomonitoring method using the cellular distribution of metals in moss, The Science of the Total Environment, 187 : 153-161.
- BROWN D.H. and WELLS J.M., 1990a, Ann. Proc. Phytochem. Soc. Eur., 29 : 299.
- BROWN D.H. and WELLS J.M., 1990b, Physiological effects of heavy metals on the moss *Rhytidiadelphus squarrosus*, Ann. Bot., 66, 641-647.
- BROWN D.H. and WELLS J.M., 1990c, The extracellular and intracellular uptake of inorganic chemicals by bryophytes, in Bryophytes their chemistry and chemical taxonomy, ZINSMEISTER H.D. and MUES R. (eds), Oxford Science Publications, 299-318.
- BROWN D.H., 1995, Physiological and biochemical assessment of environmental stress in bryophytes and lichens, in Bioindicators of Environmental Health, Munawar M., Hänninen O., Roy S., Munawar L., Kärenlampi L. and Brown D. (eds), Ecovision World Monograph Series, SPB Academic Publishing, Amsterdam, The Netherland, 29-44.

- BROWN D.H., 1995 b, sequential elution procedure for estimating the cellular distribution patterns of metals in cryptogamic plants, in Bioindicators of Environmental Health, Munawar M., Hänninen O., Roy S., Munawar N., Kärenlampi L. and Brown D. (eds), Ecovision World Monograph Series, SPB Academic Publishing, Amsterdam, The Netherlands, 203-206.
- BRÜNING F. and KREEB K.H., 1993, Mosses as biomonitors of heavy metal contamination in urban areas, in Plants as Biomonitors : indicators for heavy metals in the terrestrial environment, 382-395, MARKERT B. (ed), Weinheim ; New York ; Basel ; Cambridge ; VCH.
- CAUSSIN C., DESPEGHEL J.P. and BONNEMAIN J.L., 1982, C. R. Acad. Sci. [III], 294, 725.
- CLOUGH W.S., 1975, The deposition of particles on moss and grass surfaces, Atmosph. Environm., 12, 1113-1119.
- CLYMO R.S., 1963, Ion exchange in Sphagnum and its relation to bog ecology, Ann. Bot. Fennici, 12, 309-324.
- COCHRAN W.G., 1977, Sampling Techniques, John Wiley & Sons, New-York, 428 p., Third edition.
- COE J.M. and LINDBERG S.E., 1987, The morphology and size distribution of atmospheric particles deposited on foliage of inert surfaces, J. APCA, 37, 237.
- CULBERSON W.L., 1955, Qualitative and quantitative studies on the distribution of corticolous lichens and bryophytes in Wisconsin, Lloydia, 18, 25-36.
- DHINDSA R.S. and MATOWE W., 1981, Drought tolerance in two mosses : correlated with enzymatic defense against lipid peroxidation, J. Exp. Bot., 32, 79-91.
- FERARD J.F., 1986, Aspects de la toxicité et de la biosorption du cadmium chez l'algue *Chlorella vulgaris*; Thèse d'état, Université de Metz, France, soutenue le 23 Juin 1986; N° enregistrement 005.
- FOLKESON L., 1979, Interspecies calibration of heavy-metal concentrations in nine mosses and lichens : applicability to deposition measurements, Water, Air and Soil Pollution, 11, 253-260.
- FRONTIER S., 1983, Stratégies d'échantillonnage en Ecologie, Masson (ed.), Paris, 494 p. Collection d'Ecologie n°17.
- GALSOMIES L., LETROUIT M.A., DESCHAMPS C., SAVANNE D. and AVNAIM M., 1999, Atmospheric metal deposition in France: initial results on moss calibration from the 1996 biomonitoring, The Science of the Total Environment, 232, 39-47.
- GALSOMIES L., SAVANNE D., LETROUIT M.A., AYRAULT S., CHARRE B., 1999b, Retombées atmosphériques de métaux en France : estimation par dosage dans des mousses-campagne 1996, ADEME Editions, France, 188 p.
- GOODMAN G.T. and ROBERTS T.M., 1971, Plants and soils as indicators of metals in the air, Nature, 231, 287-292.
- GREIG-SMITH P., 1983, Quantitative Plant Ecology, Berkeley (University of California Press), 359 p.
- GRODZINSKA K., 1978, Mosses as bioindicators of heavy metal pollution in Polish national parks, Water, Air and Soil Pollution, 9, 83-87.
- GYDESEN, H., PILEGAARD, K., RASMUSSEN, L. and RÜHLING, A., 1983, Moss analysis used as a means of surveying the atmospheric heavy-metal deposition in Sweden, Denmark and Greenland in 1980, Bulletin SNV PM 1670.
- HALLERT B., 1967, Elemental error theory for measurements, P.A. Nordstedt and Sons (eds), Stockholm, 53 p. (en suédois)

- HALLERAKER J.H., REIMANN C., De CARITAT P., FINNE T.E., KASHULINA G., NISKAAVAARA H. and BOGATYREV I., 1998, Reliability of moss (*Hylocomium splendens* and *Pleurozium schreberi*) as a bioindicator of atmospheric chemistry in the Barents region: Interspecies and field duplicate variability, The Science of the Total Environment, 218, 123-139.
- HERRMANN R., 1990, Biomonitoring of organic and inorganic trace pollutants by means of mosses, in Bryophytes their chemistry and chemical taxonomy, 319-335, ZINSMEISTER H.D. and MUES R. (eds), Oxford Science publications.
- HOFFMAN G.R., 1972, The accumulation of caesium-137 by cryptogams in a Liriodendron-tulipifera forest, Bot. Gaz., 133 : 107-119.
- HOLSEN T.M., NOLL K.E., FANG G., LEE W., LIN J., and KEELER G.J., 1993, Dry deposition and particle size distribution measured during the Lake Michigan urban air toxics study, Environ. Sci. Technol., 27, 1327.
- HUCKABEE J.W. and JANZEN S.A., 1975, Mercury in moss : Derived from atmosphere or the substrate ?, Chemosphere, 1 : 55-60.
- HUCKABEE J.W., 1973, Mosses : sensitive indicators of airborne mercury pollution, Atmos. Environ., 7, 749-754.
- HURLBERT S.H., 1984, Pseudoreplication and the design of ecological field experiment, Ecol. Monogr., 54, 187-211.
- HYNNINEN V., 1986, Monitoring of airborne metal pollution with moss bags near an industrial source at Harjavalta, southwest Finland, Ann. Bot. Fennici, 23 : 83-90.
- JACKSON P.P., ROBINSON N.J. and WHITTON B.A., 1991, Low molecular weight metal complexes in the freshwater moss *Rhynchostegium riparioides* exposed to elevated concentrations of Zn, Cu, Cd and Pb in the laboratory and field, Env. Exp. Bot., 31, 359-366.
- JAENICKE R., 1998, Atmospheric Aerosol Size Distribution, Chapter 1 in Atmospheric Particles, Harrison, R.M. and Van Grieken, R.E. (eds), IUPAC series on analytical and physical chemistry of environmental systems, Volume 5, John Wiley and Sons, 610 p.
- JAHNS H.M., 1989, Guide des Fougères, Mousses et Lichens d'Europe, DELACHAUX et NIESTLE (eds).
- KILLINGBECK K.T. and WALI M.K., 1978, Analysis of a Northern Dakota gallery forest : nutrient, trace element and productivity relations, Oikos, 30, 29-60.
- KNIGHT A.H., CROOKE W.M. and INKSON R.M.E., 1961, Cation-exchange capacities of tissues of higher and lower plants and their uronic-acid contents, Nature, 192, 142-143.
- KÖCK M.D., SCHLEE D. and METZGER U., 1985, Sulfite-induced change of oxygen metabolism and the action of superoxide dismutase in *Euglena gracilis* and *Trebouxia* sp., Biochem. Physiol. Pflanzen, 180, 213-224.
- LESACA R.M., 1977, Monitoring of heavy metals in Philippine rivers, bay waters and lakes; Symp. Proc. Int. Conf. Heavy Metals Environ., Toronto, 27-31 October 1975, 2(1), 285-307.
- LICHTENTHALER H.K. and RINDERLE U., 1988, The role of chlorophyll fluorescence in the detection of stress conditions in plants ; Critical reviews in Analytical Chemistry, 19 (Suppl. 1.), 29-85.
- LOBERSLI E. M., STEINNES E. and ODEGARD M., 1990, A Historical Study of Mineral Elements in Forest Plants from South Norway, Environ. Monitor. Assessment, 15, 111-129.
- LODENIUS M. and TULISALO E., 1984, Environmental Mercury Contamination Around a Chlor-Alkali Plant, Bull. Environ. Contam. Toxicol., 32, 439-444.

- MÄKINEN A., 1977, Moss- and peat bags in air pollution monitoring, Suo, 28, 79-88.
- MÄKINEN A. and LODENIUS M., 1984, Urban levels of cadmium and mercury in Helsinki determined from moss-bags and feather mosses, Ympäristö ja Terveys, 5, 306-317.
- MALMER N., 1988, Oikos, 53, 105.
- MARK D., 1998, Atmospheric Aerosol Sampling, Chapter 2 in Atmospheric Particles, Harrison, R.M. and Van Grieken, R.E. (eds), IUPAC series on analytical and physical chemistry of environmental systems, Volume 5, John Wiley and Sons, 610 p.
- MARKERT B., 1993, Plants as Biomonitors : indicators for heavy metals in the terrestrial environment, MARKERT B. (ed), Weinheim ; New York ; Basel ; Cambridge; VCH 643 p.
- MARKERT B., 1996, Instrumental Element and Multi-Element Analysis of Plant Samples, Methods and Applications, John Wiley & Sons Ltd, 296 p.
- MARKERT B., HERPIN U.; BERLEKAMP J., OEHLMANN J., GRODZINSKA K., MANKOVSKA B., SUCHARA I., SIEWER U., WECKERT V. and LIETH H., 1996, A comparison of heavy metal deposition in selected Eastern European countries using the moss monitoring method, with special emphasis on the "Black Triangle", The Science of the Total Environment, 193, 85-100.
- MARTIN M.H. and COUGHTREY P.J., 1982, Biological Monitoring of Heavy Metal Pollution, London, Applied Science Publishers, 475 p.
- MEENKS J.L.D., TUBA Z. and CSINTALAN Z., 1991, Eco-physiological responses of *Tortula ruralis* upon transplantation around a power plant in west Hungary, J. Hattori Bot. Lab., 69, 21-35.
- MOUVET C., 1987, Accumulation et relargage de plomb, zinc, cadmium chrome et cuivre par des mousses aquatiques en milieu naturel et au laboratoire; Laboratoire d'Ecologie, Université de Metz, France.
- MOUVIER G., 1994, La Pollution Atmosphérique, Flammarion Collection Dominos, 123 p.
- NASH E., 1972, Effect of effluents from a zinc smelter on mosses, Ph. D. thesis, New Brunswick (Rutgers University), 197 p.
- NASH III T.H. and EGAN R.S., 1988, The Biology of Lichens and Mosses, in Lichens, Bryophytes and Air Quality, Bibliotheca Lichenologica, 11-22, NASH III T. H. and WIRTH V. (eds), Cramer J., Berlin, Stuttgart, Band 30.
- NICHOLSON K.W., 1993, Wind tunnel experiments on the resuspension of particulate material, Atmos. Environ., 27A, 181.
- NIEBOER E. and RICHARDSON D.H.S., 1980, The replacement of the nondescript term "heavy metals" by a biologically and chemically significant classification of metal ions, Environmental Pollution (Series B), 1, 3-26.
- NÖLTNER T., MAISENBACHER P. and PUCHELT H., 1990, Microwave Acid Digestion of Geological and Biological Standard Reference Materials for Trace Element Analysis by Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry, Spectroscopy International, 2(7), 36-41.
- PAKARINEN P. and RINNE R.J.K., 1979, Heavy metals concentrations and growth rates of five moss species in paludified spruce forest, Lindbergia ; cité par RINNE R.J.K. and BARCLAY-ESTRUP P., 1980.
- PICKERING D.C. and PUIA I.L., 1969, Physiol. Plant., 22 : 653.
- PUCKETT K.J., 1988, Bryophytes and lichens as monitors of metal deposition, in Lichens, Bryophytes and Air Quality, Bibliotheca Lichenologica, 231-267, NASH III T. H. and WIRTH V. (eds), Cramer J., Berlin, Stuttgart, Band 30.
- RAMADE F., 1984, Eléments d'écologie, écologie fondamentale ; McGraw-Hill (ed.), 403 p.
- RAMADE F., 1992, Précis d'Ecotoxicologie, MASSON (ed.), Paris, 300 p., Collection d'Ecologie n°22.

- RAMEAU J.C., MANSION D. et DUME G., Flore forestière française, Guide écologique illustré 2- Montagnes
- RICHARDSON D.H.S. and NIEBOER E., 1983, Ecophysiological responses of lichens to sulphur dioxide, J. Hattori Bot. Lab., 54, 331-351.
- RICHARDSON D.H.S., 1981, The Biology of Mosses, Blackwell Scientific Publications.
- RIELEY J.O., RICHARDS P.W. and DEBBINGTON A.D., 1979, The ecological role of bryophytes in a North Wales woodland, J. Ecol., 67 : 497-528.
- RINNE R.J.K. and BARCLAY-ESTRUP P., 1980, Heavy metals in a feather moss, *Pleurozium schreberi*, and in soils in NW Ontario, Canada, OIKOS, 34, 59-67.
- ROBERTS B.A., THOMPSON L.K. and SIDHU S.S., 1979, Terrestrial bryophytes as indicators of fluoride emission from a phosphorus plant, Long Harbor, Newfoundland, Canada, Canad. J. Bot., 57 : 1583-1590.
- ROLAND J.C. and VIAN B., 1992, Atlas de biologie végétale tome 1, organisation des plantes sans fleurs, MASSON (ed). 3ème édition.
- ROSS H.B., 1990, On the use of mosses (*Hylocomium splendens* and *Pleurozium schreberi*) for estimating atmospheric trace metal deposition, Water, Air and Soil Pollution, 50, 63-76.
- RÜHLING A. and TYLER G., 1968, An ecological approach to the lead problem, Bot. Notiser, 121 : 321-342 .
- RÜHLING A. and TYLER G., 1969, Ecology of heavy metals-a regional and historical study, Bot. Notiser, 122 : 248-259.
- RÜHLING A. and TYLER G., 1970, Sorption and retention of heavy metals in the woodland moss *Hylocomium splendens* (Hedw.) Br. et Sch., Oikos, 21 : 92-97.
- RÜHLING A., 1994, Atmospheric Heavy Metal Deposition in Europe - estimation based on moss analysis, Nord 1994:9, 58 p.
- RÜHLING A. and STEINNES E., 1998, Atmospheric heavy metals deposition in Europe 1995-1996, NORD 1998: 15; Nordic Council of Ministers, Copenhagen, 66 p.
- RÜHLING A., RASMUSSEN L., PILEGAARD K., MÄKINEN A. and STEINNES E., 1987, Survey of Atmospheric Heavy Metal Deposition, Nordisk Ministerrad report, Nord 1987 : 21, 44p.
- SAWIDIS T., ZACHARIADIS G., STRATIS J. and LADOUKAKIS E., 1993, Mosses as biological indicators for monitoring of heavy metal pollution, Fresenius Envir. Bull., 2, 193-199.
- SASS L., CSINTALAN Z., TUBA Z. and VASS I., 1996, Thremoluminescence studies on the function of Photosystem II in the desiccation tolerant lichen *Cladonia convoluta*, Photosynthesis Research, 205-212.
- SCHERRER B., 1984, Biostatistique, MORIN G. (ed), Montréal, Paris, Casablanca, 850 p.
- SCHMIDT W., SCREIBER U. and URBACH W., 1988, SO₂ injury in intact leaves as detected by chlorophyll fluorescence, Zeitschrift für Naturforschung, 43C, 269-274.
- SCHREIBER U., VIDAVER W., RUNECKLES V.C. and ROSEN P., 1978, Chlorophyll fluorescence assay for ozone injury in intact plants; Plant Physiol., 61, 80-84.
- SFS 5794, 1994, Ilmansuojelu. Bioindikaatio. Sammalpallomenentelmä. Suomen Standardisoimisliitto SFS, 3p. (en Finlandais)
- SHIMAZAKI K., 1987, Thylakoïd membrane reactions to air pollutants, In Schulte-Hostede S., Darral N.M., Blank L.W. and Wellburn A.R. (eds), Air pollution and plant metabolism, 116-133, Elsevier Applied Science Publishers Ltd, Essex.
- SIMOLA L.K., 1977, Can. J. Bot., 55, 426.
- SLACK N.G., 1988, The Ecological Importance of Lichens and Bryophytes, , in Lichens, Bryophytes and Air Quality, Bibliotheca Lichenologica, 23-53, NASH III T. H. and WIRTH V. (eds), Cramer J., Berlin, Stuttgart, Band 30.

- SOKAL R.R. and ROHLF F.J., 1981, Biometry, 2nd ed., San Francisco (W.H. Freeman and Co.), 859 p.
- STEINNES E., 1985, The Use of Mosses in Heavy Metal Deposition Studies, European Monitoring and Evaluation Pollutants (EMEP), EMEP/CCC-Report 3/85.
- STEINNES E., 1989, Biomonitoring of Air Pollution by Heavy Metals, in Control and Fate of Atmospheric Heavy Metals, PACYNA J.M. and OTTAR B. (eds), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 321-338.
- STEINNES E., 1992, Large scale multi-element survey of atmospheric deposition using naturally growing moss as biomonitor, Chemosphere, vol 25, n°5, 735-752.
- STEINNES E., 1993, Some Aspects of Biomonitoring of Air Pollutants Using Mosses, in Plants as Biomonitors : indicators for heavy metals in the terrestrial environment, 379-381, MARKERT B. (ed), Weinheim ; New York ; Basel ; Cambridge ; VCH.
- STEINNES E., JOHANSEN O., ROYSET O. and ODEGARD M., 1993b, Comparison of different multielement techniques for analysis of mosses used as biomonitors, Environmental Monitoring and Assessment, 25, 87-97.
- SYERS J.K. and ISKANDAR I.K., 1973, Pedogenic significance of lichens, in Lichens, AHMADJIAN V. and HALE M.E. (eds), 225-248, New York (Academic Press).
- TAMM C.O., 1953, Growth, yield and nutrition in carpets of a forest moss (*Hylocomium splendens*), Medd. Stat. Skogsforsku, 43 : 1-140.
- TAYLOR F.G. and WITHERSPOON J.P., 1972, Retention of simulated fallout particles by lichens and mosses, Health Physics, 23, 867-869.
- TUBA Z. and CSINTALAN Z., 1993, The Use of Moss Transplantation Technique for Bioindication of Heavy Metal Pollution, in Plants as Biomonitors : indicators for heavy metals in the terrestrial environment, 403-411, MARKERT B. (ed), Weinheim ; New -York ; Basel ; Cambridge ; VCH.
- TUBA Z., 1987, in Proceeding of the IAB Conference of Bryoecology, Symposia Biologica Hungarica : Pocs, SIMON T., TUBA Z., PODANI J. (eds), Budapest : Akadémiai Kiado, Vol. 35, 137-149.
- VOUK V.B., 1979, in handbook on the toxicity of metals, Chapitre 1, FRIBERG L. et al. (Eds), Elsevier, Amsterdam, 2^{ème} édition.
- WELLS J.M., 1988, The role of the cell wall in metal uptake, redistribution and tolerance in the moss *Rhytidiadelphus squarrosus*, Ph. D. Thesis, University of Bristol, Bristol.
- WELLS J.M. and BROWN D.H., 1987, Factors affecting the kinetics of intra- and extracellular cadmium uptake by the moss *Rhytidiadelphus squarrosus*, New Phytol., 105, 123-127..
- WELLS J.M. and BROWN D.H., 1995, Cadmium Tolerance in a Metal-contaminated Population of the Grassland Moss *Rhytidiadelphus squarrosus*, Annals of Botany, 75, 21-29.
- WINNER W.E. and KOCH G.W., 1982, Water relation and SO₂ resistance of mosses, J. Hattori Bot. Lab., 52 : 431-440.
- WINNER W.E. and BEWLEY J.D., 1983, Photosynthesis and respiration of feather mosses fumigated at different hydration levels with SO₂, Canad. J. Bot., 61, 1456-1461.
- WINNER W. E., 1988, Responses of Bryophytes to air pollution, in Lichens, Bryophytes and Air Quality, Bibliotheca Lichenologica, 231-267, NASH III T. H. and WIRTH V. (eds), Cramer J., Berlin, Stuttgart, Band 30.
- WITTIG R., 1993, General Aspects of Biomonitoring Heavy Metals by Plants, 3-28, in Plants as Biomonitors : indicators for heavy metals in the terrestrial environment, MARKERT B. (ed), Weinheim ; New York ; Basel ; Cambridge ; VCH.

- WOLTERBEEK H. Th., KUIK P., VERBURG T.G., HERPIN U., MARKERT B. and THÖNI L., 1995, Moss interspecies comparisons in trace element concentrations, Environmental monitoring and Assessment, **35**, 263-286.
- WU Y.L., DAVIDSON C.I., and RUSSELL A.G., 1992, Controlled wind tunnel experiments for particles bounceoff and resuspension, Aerosol Sci. Technol., **17**, 245.
- ZUFALL M.J. and DAVIDSON C.I., 1998, Dry Deposition of Particles, Chapter 13 in Atmospheric Particles, Harrison, R.M. and Van Grieken, R.E. (eds), IUPAC series on analytical and physical chemistry of environmental sytems, Volume 5, John Wiley and Sons, 610 p.

Annexes Générales

- 1. Annexe I : Eléments de Biologie et d'Ecologie des Bryophytes ;**

- 2. Annexes du Chapitre I ;**

- 3. Annexes du Chapitre II ;**

- 4. Annexes du Chapitre III ;**

- 5. Annexes du Chapitre IV.**

Annexe I : Éléments de Biologie et d' Ecologie des Bryophytes

Caractères Généraux, Systématique

Du point de vue de leur origine, les Bryophytes sont considérées comme l'étape de transition entre les Thallophytes et les Ptéridophytes. Elles représentent les premiers végétaux colonisateurs du milieu terrestre avec des formes dites thalloïdes et feuillées. Ainsi, les Bryophytes se composent de trois classes avec les Anthocérotes, possédant un appareil végétatif thalloïde, les Hépatiques, munies d'appareils thalloïde ou végétatif et les Muscinées. Cette dernière classe regroupe des individus à tiges feuillées répartis en trois ordres les Sphagnales, les Andréales et les Bryales. Les Bryales qui sont couramment appelées "mousses" se présentent sous la forme de tiges feuillées avec quelques 1500 genres et 25000 espèces dont l'identification est très délicate. Plusieurs hypothèses étayent leur origine et sont sujettes à controverse. La première serait expliquée par le lien des Anthocérotes avec les Thallophytes et les Ptéridophytes, d'où seraient issues les Hépatiques puis les mousses feuillées. La seconde hypothèse concerne la possibilité d'une évolution régressive des Ptéridophytes donnant ainsi naissance aux Bryophytes. Des techniques d'analyse chimique ont mis en évidence, chez les mousses, des pigments photosynthétiques (chlorophylles a et b) identiques aux algues vertes mais aussi aux Ptéridophytes et aux Spermaphytes.

Les mousses peuvent se diviser en deux groupes selon que l'organe où s'élaborent les spores pousse à l'extrémité ou de façon latérale par rapport à la tige feuillée. Les mousses sont respectivement qualifiées de mousses acrocarpes ou pleurocarpes.

Morphologie des Muscinées, l'appareil végétatif

Les Bryophytes possèdent des tissus différenciés mais pas d'appareil vasculaire véritable ni de racines. Les mousses possèdent une tige, ou Gamétophyte, qui porte les feuilles. La croissance de la tige est assurée par une cellule apicale à trois faces actives qui aboutissent à la formation des feuilles. Les tiges de mousses présentent une anatomie bien différenciée. De l'extérieur vers l'intérieur, la tige est constituée d'un épiderme formé d'une assise de cellules recouvrant un manchon parenchymateux. Au centre de la tige, des cellules allongées dans l'axe, nommées hydroïdes, assurent la conduction de l'eau. Ces cellules mortes sont dépourvues de contenu cytoplasmique et possèdent des parois terminales minces. Ces faisceaux de cellules peuvent être considérés comme les ancêtres des tissus conducteurs des plantes supérieures. Le faisceau de cellules hydroïdes qui part du centre de la tige ne trouve pas de continuité dans les feuilles, exception faite chez certaines espèces de mousses comme le *Polytric* qui présente ainsi une organisation vasculaire similaire aux Ptéridophytes. Ainsi, chez la plupart des mousses, il n'y a pas de continuité entre la conduction tige-feuilles.

Une distinction est faite entre les bryophytes endohydriques et ectohydriques. Les premiers correspondent aux mousses ayant un dispositif vasculaire différencié avec de nombreux hydroïdes assurant la conduction de l'eau. Les espèces ectohydriques n'ont pas ces différenciations et prélèvent l'eau par toute la surface de leur lame thalloïde ou de leur tige.

A la place d'une véritable structure racinaire, les bryophytes possèdent des rhizoïdes situés sur la tige. Ces rhizoïdes ont un double rôle d'ancrage de la plante à ses différents substrats et de fixateur, transporteur d'eau par capillarité.

La reproduction des mousses peut être de deux types : sexuée et végétative. La reproduction sexuée a un rôle secondaire par rapport à la multiplication par voie végétative à partir de fragments de tige, feuilles, débris de feuilles.

Reproduction sexuée (Figure 1)

Les organes reproducteurs, ou gamétanges, sont situés sur le gamétophyte, ou tige, et forment les gamètes. Les gamétanges femelles, ou archégonies, sont en forme de bouteille à long col avec une partie renflée contenant un unique gamète femelle, l'oosphère. Les gamétanges mâles, ou anthéridies, ont une forme de massue et contiennent les gamètes mâles ou anthérozoïdes. Le canal du col de l'archégonie, après lyse des cellules centrales et maturation de l'oosphère, accueille les anthérozoïdes biflagellés qui, attirés par chimiotactisme, viennent féconder l'oosphère. Le milieu aqueux (gouttes d'eau de pluie, rosée) est obligatoire pour permettre le déplacement des gamètes mâles nageurs. Les anthéridies et archégonies peuvent être situés sur des plantes différentes (espèces dioïques) ou sur des ramifications différentes d'une même plante (espèces monoïques) ou unis à l'extrémité de la tige (espèces synoïques). La fécondation forme un zygote à $2n$ chromosomes, ou diploïde, qui est à l'origine du sporophyte. Chez les bryophytes, le sporophyte n'est pas autonome. Le sporophyte non chlorophyllien se développe en parasite sur le gamétophyte. Il est formé d'un pédicel prolongé par une capsule où la méiose donne naissance aux spores haploïdes qui vont assurer la propagation et la dispersion. Le zygote se développe en embryon dans le ventre de l'archégonie puis, en augmentant de taille, le jeune sporophyte déchire l'enveloppe de l'archégonie en deux parties. La capsule sporangiale est capable de photosynthèse. Chez les bryophytes, seule le sporophyte présente des stomates au niveau de son épiderme. Les spores vont germer en un gamétophyte haploïde qui va constituer la phase prédominante chez les bryophytes. La spore formée dans la capsule sporangiale donne une structure filamenteuse, le protonéma, sur lequel vont se former les bourgeons qui vont ensuite se développer en tiges feuillées.

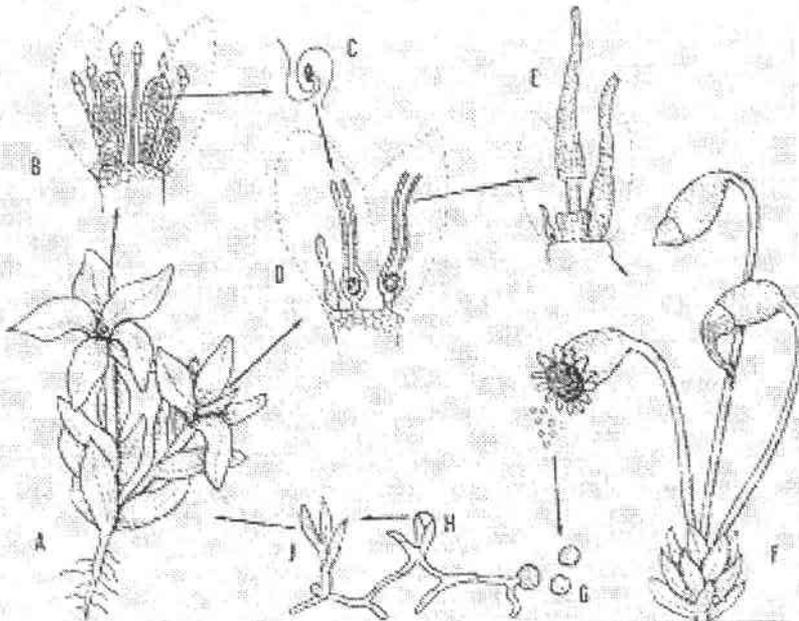


Figure 1 : Cycle de reproduction et alternance des générations chez les Mousses. Le gamétophyte (A) porte les gamétanges, ou organes reproducteurs formant les gamètes, mâles (B) les anthéridies et/ou femelles (D) les archégonies. A la faveur d'une pluie, les anthérozoïdes biflagellés (C), ou gamètes mâles, pénètrent dans l'archégonie pour aller féconder l'oosphère, ou gamète femelle, localisé dans la partie basale renflée de l'archégonie. C'est la fécondation à l'origine du sporophyte (E). Les spores (G) formées dans la capsule sporangiale (F) vont donner une structure filamenteuse, le protonéma (H) sur lequel se forment les bourgeons donnant ensuite une tige feuillée.

Multiplication Végétative

En marge, du cycle sexué, très fréquemment les Bryophytes se multiplient par voie végétative, c'est-à-dire sans fécondation ni réduction chromatique. Les processus sont variables. Dans les cas les plus simples, il s'agit d'une simple fragmentation, simple bouturage, soit de l'extrémité des feuilles, du thalle ou même du protonéma. Parfois, des structures de dissémination plus spécialisées, les propagules, sont mises en jeu. En ce qui concerne les Muscinées, de nombreux bourgeons sont formés en petits bouquets globuleux à l'extrémité des tiges différenciées ou dans des sortes d'entonnoirs formés par des feuilles plus grandes, elles aussi situées à l'extrémité des tiges. L'ensemble du développement est alors haploïde.

Ecologie

Les Bryophytes sont très dépendantes de l'eau à cause de l'absence de véritables racines et du faible développement de tissus conducteurs. L'épiderme de leur face supérieure exposée au soleil ne possède qu'une très fine cuticule protectrice et elles sont sujettes à la dessiccation. L'absorption de l'eau se fait donc par les rhizoïdes mais aussi par capillarité sur toute la surface de la plante elle-même (tige, feuille, lame thalloïde). Elle est donc rapide mais peu durable.

L'apparente contradiction entre l'exigence hydrique des mousses et leur présence sur des stations extrêmement sèches (rochers exposés, toitures, murs) est due à différentes adaptations. En effet, les mousses sont capables de reviviscence, c'est-à-dire qu'elles ont la propriété d'entrer en vie ralentie pendant les périodes de sécheresse et de retrouver toute leur capacités biologiques à la faveur de la première pluie. De plus, la disposition des colonies de mousses en coussinets est un autre moyen d'empêcher une déshydratation trop rapide. D'ailleurs, les coussinets de mousses dans les forêts humides stockent de grandes quantités d'eau et sont capables de la relarguer dans le milieu ambiant, agissant ainsi comme des régulateurs d'eau. Par contre, certaines mousses sont très résistantes à la chaleur et peuvent 70°C en état de vis ralentie. Les mousses possèdent la capacité de s'adapter à des conditions où l'éclairage est très faible (0.1% de la lumière incidente du jour est suffisante). Cette propriété fait qu'elles dominent souvent dans les parties sombres ou dans les cavernes.

Les mousses ont des exigences par rapport à l'acidité du sol et le contenu en calcium. Certaines mousses sont calcicoles et prélèvent dans le sol le carbonate de calcium. D'autres sont calcifuges. Le caractère calcicole ou calcifuge départage bon nombre de bryophytes en raison de l'importance de l'ion Ca^{2+} comme facteur d'alcalinité, néfaste ou favorable. Certains bryophytes sont très résistants à certains cations métalliques.

Avec les lichens, les mousses sont les plantes pionnières dans la colonisation des sols et contribuent à créer les premières couches d'humus. Elles peuvent constituer la biomasse majoritaire de certains écosystèmes et participer au cycle des éléments essentiels comme l'azote.

Description des espèces

Pseudoscleropodium purum (Hedw.) Limpr. (Figure 2)

Plante vert clair, tige verte à jaune vert, plus ou moins régulièrement pennée, faiblement redressée, de 5 à 15 cm de long. Feuilles ovoïdes à bord entier, disposées comme des tuiles, concaves, à l'extrémité arrondie et à petites pointes empilées. Bord de l'extrémité distale de la feuille replié vers l'intérieur, nervure mince, atteignant le milieu de la feuille. Rameaux arrondis à leur extrémité. Sur sol calcaire, sur argile et sol sablonneux, dans les prairies et les forêts ouvertes. Répandue et abondante depuis la plaine jusque vers la limite de la forêt.

***Pleurozium schreberi* (Brid.) Mitt. (Figure 3)**

Plantes se redressant, de 5-10 jusqu'à 20 cm de haut, régulièrement pennées à petites tiges rouges, devenant pointues, jaunes à vert-brun, souvent en grands paillassons plumeux. Feuilles concaves à 2 nervures courtes souvent inégales, larges, ovoïdes, à extrémité arrondie. Angles proximaux des feuilles jaunes ou orangés. Répandues sur sol tourbeux et sur sols forestiers acides, depuis la plaine jusqu'au delà des limites de la forêt.

***Eurhynchium praelongum* (Hedw.) Schimp. (Figure 4)**

Plantes jusqu'à 15 cm de long, très divisées pennées, jaune vert, d'aspect mat à brillant, en gazon lâche. Tige avec de nombreuses excroissances ressemblant à des feuilles. Feuilles triangulaires à lancéolées, petites décurrentes sur la tige par des ailes longues, dentées, devenant brusquement très pointues ; extrémité déjetée à l'horizontale. Soie rugueuse, capsules oblongues. Répandues en plaine sur sols forestiers riches, sur bois pourrissant et sur rochers humides, dans les prairies, dispersées jusque dans les forêts de montagne.

Bibliographie

- ROLAND, J.C. et VIAN, B., *Atlas de Biologie Végétale, Tome 1. Organisation des plantes sans fleurs*, Ed. Masson, Paris, 1990, 123 p.
- DOUIN I., *Nouvelle Flore des Mousses et des Hépatiques*, Ed. Belin, 1986, 186 p.
- JAHNS, H.M., *Guide des Fougères, Mousses et Lichens d'Europe*, Eds Delachaux et Niestlé S.A., Lausanne, Paris, 1989, 1996, 257 p.

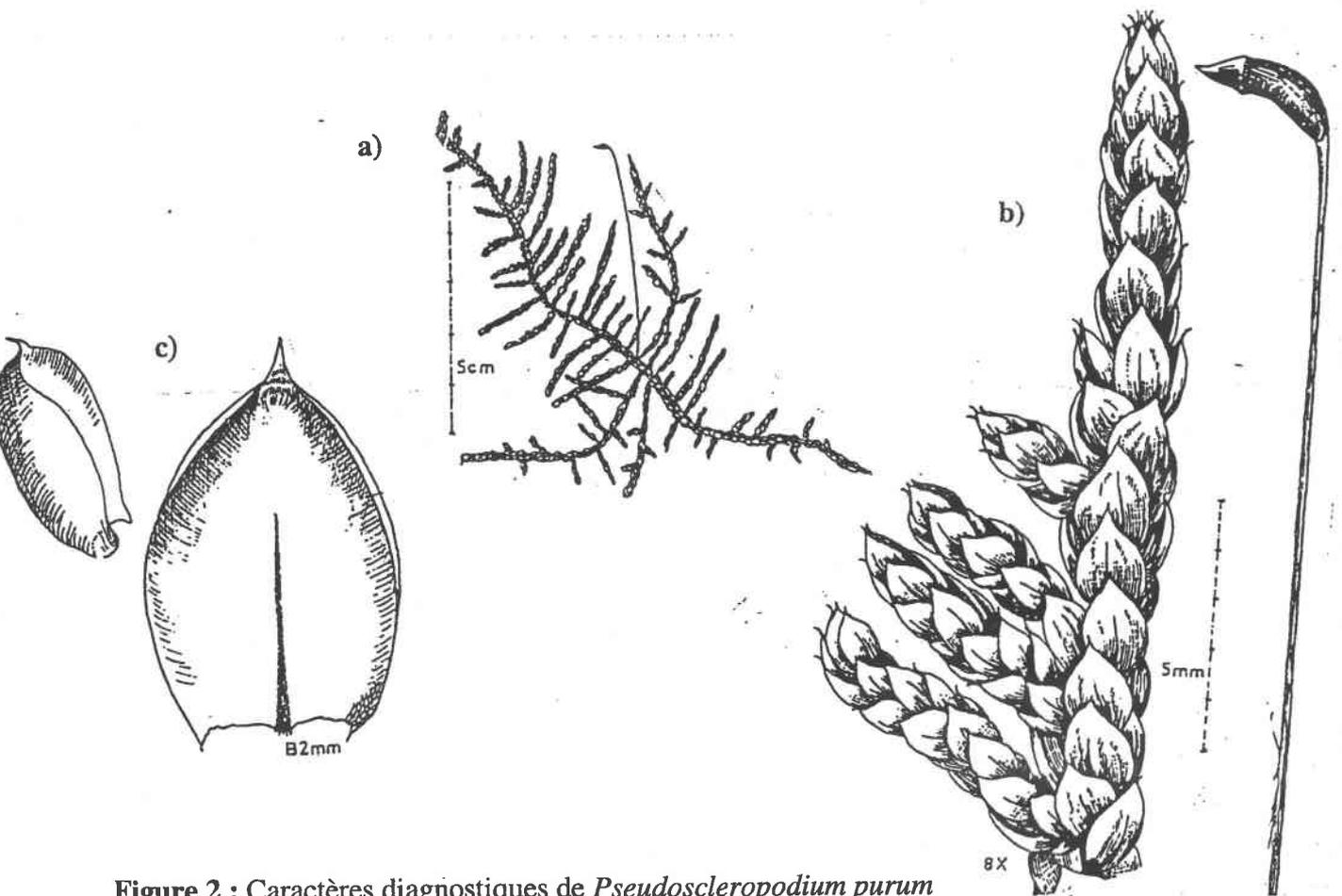


Figure 2 : Caractères diagnostiques de *Pseudoscleropodium purum*

- a- tige généralement rampante, régulièrement ramifiée
- b- rameaux arrondis à feuilles recouvrantes appliquées contre la tige
- c- feuille apiculée à nervure unique et assez courte

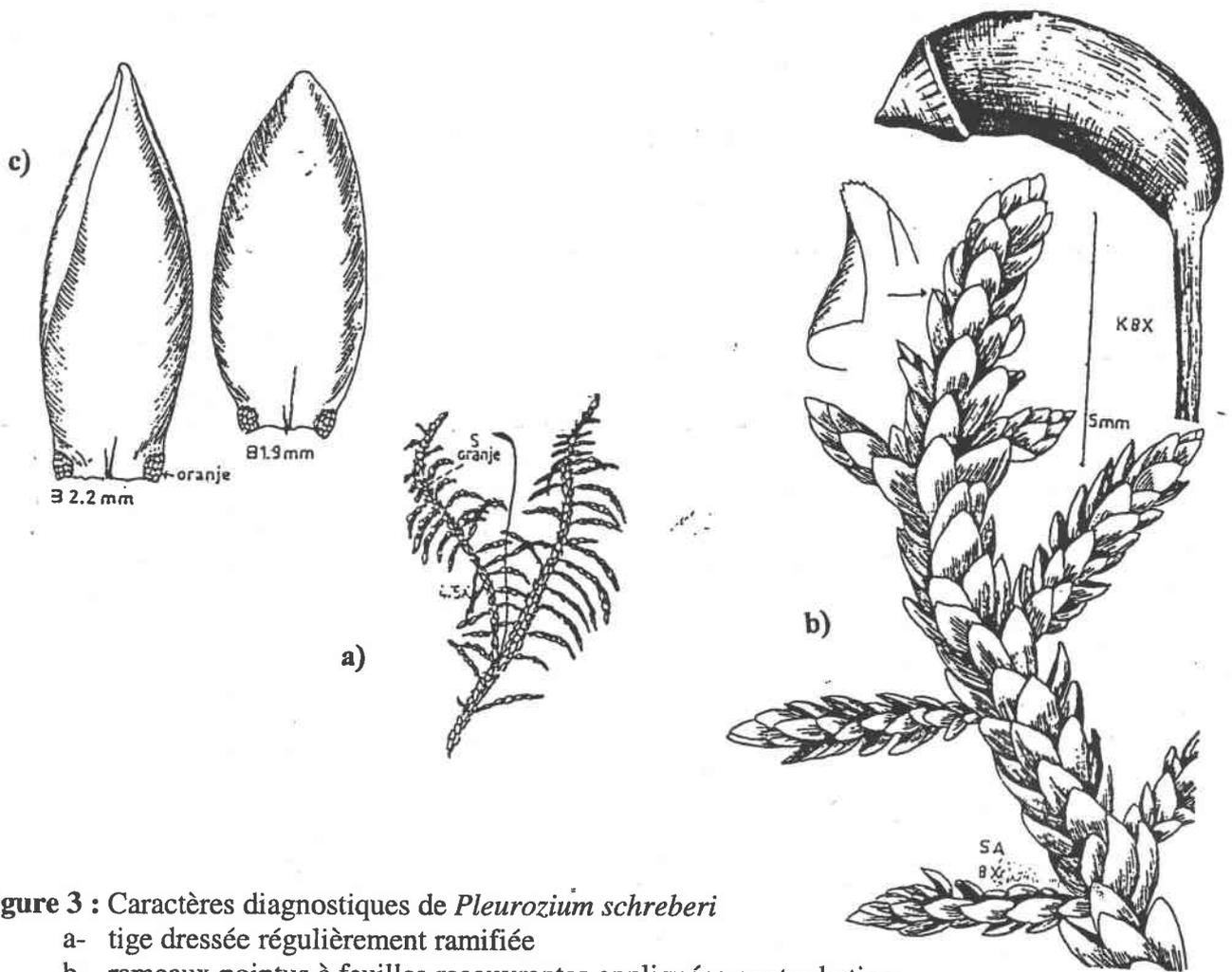


Figure 3 : Caractères diagnostiques de *Pleurozium schreberi*

- a- tige dressée régulièrement ramifiée
- b- rameaux pointus à feuilles recouvrantes appliquées contre la tige
- c- feuilles ovale à nervure unique très réduite

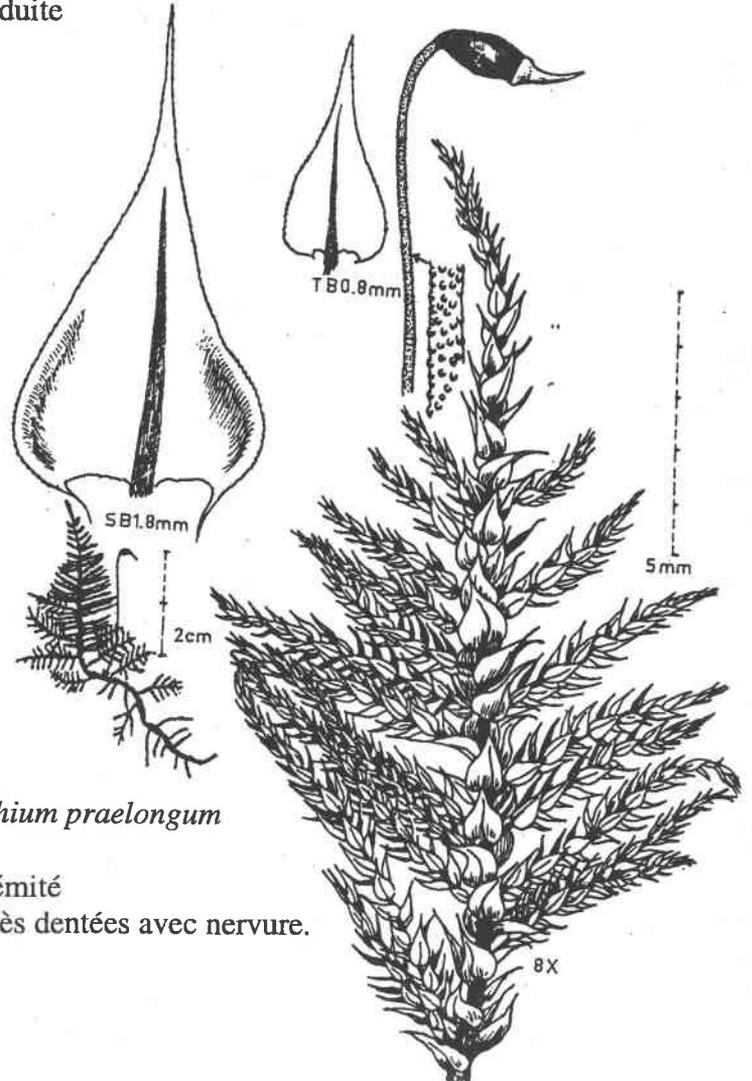


Figure 4 : Caractères diagnostiques de *Eurhynchium praelongum*

- a- tige dressée irrégulièrement ramifiée
- b- rameaux pointus ou effilés à leur extrémité
- c- feuilles à extrémité large et pointue, très dentées avec nervure.

Annexe du Chapitre I

Liste des Figures ajoutées :

- **Figure 1** : Carte d'isoconcentration européenne de As mesuré dans les mousses ($\mu\text{g/g}$) ; -
- **Figure 2** : Carte d'isoconcentration européenne de Cr mesuré dans les mousses ($\mu\text{g/g}$) ;
- **Figure 3** : Carte d'isoconcentration européenne de Cu mesuré dans les mousses ($\mu\text{g/g}$) ;
- **Figure 4** : Carte d'isoconcentration européenne de V mesuré dans les mousses ($\mu\text{g/g}$) ;

- **Figure 5** : Régression linéaire de Ba AAN et ICP-MS ;
- **Figure 6** : Régression linéaire de Ce AAN et ICP-MS ;
- **Figure 7** : Régression linéaire de Cs AAN et ICP-MS ;
- **Figure 8** : Régression linéaire de Fe AAN et ICP-MS ;
- **Figure 9** : Régression linéaire de La AAN et ICP-MS ;
- **Figure 10** : Régression multiplicative de Rb AAN et ICP-MS ;
- **Figure 11** : Régression linéaire de Th AAN et ICP-MS ;
- **Figure 12** : Régression multiplicative de V AAN et ICP-MS ;
- **Figure 13** : Régression linéaire de As AAN et ICP-MS ;
- **Figure 14** : Régression linéaire de Cr AAN et ICP-MS ;

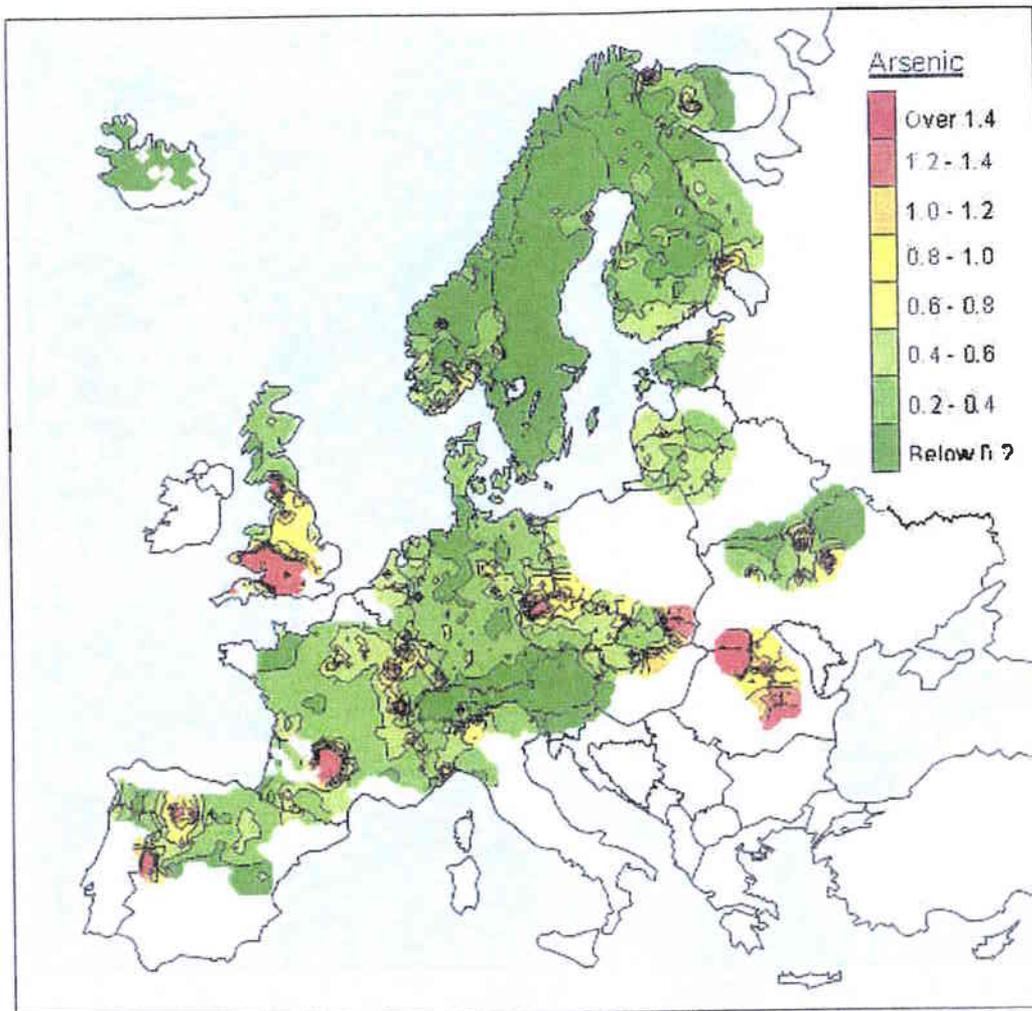


Figure 1* : Carte d'isoconcentration européenne de As mesuré dans les mousses ($\mu\text{g/g}$). Les zones blanches en France concernent des zones échantillonnées mais non analysées (AAN, ICP-MS) au moment de la réalisation des cartographies. [As] au niveau européen varie de 0.2 à 0.6 $\mu\text{g/g}$ avec valeurs médianes nationales allant de 0.06 $\mu\text{g/g}$ pour l'Islande à 0.95 $\mu\text{g/g}$ pour la Roumanie. En France, la concentration moyenne est de 0.63 ± 0.18 $\mu\text{g/g}$ (valeur AAN cartographiée) avec une zone centre, sud-ouest élevée ($>1\mu\text{g/g}$) (1 mesure proche d'exploitations minières). Pour rappel, la concentration moyenne ICP-MS pour As est de 0.99 ± 0.16 $\mu\text{g/g}$ (Chapitre I, TABLEAU III).

* carte reproduite avec l'aimable autorisation du Nordic Council of Ministers (Rühling, A.; Steinnes, E.; *Atmospheric Heavy Metal Deposition in Europe 1995-1996*, Nord 1998 : 15, Nordic Council of Ministers, Copenhagen 1998, 66 p.)

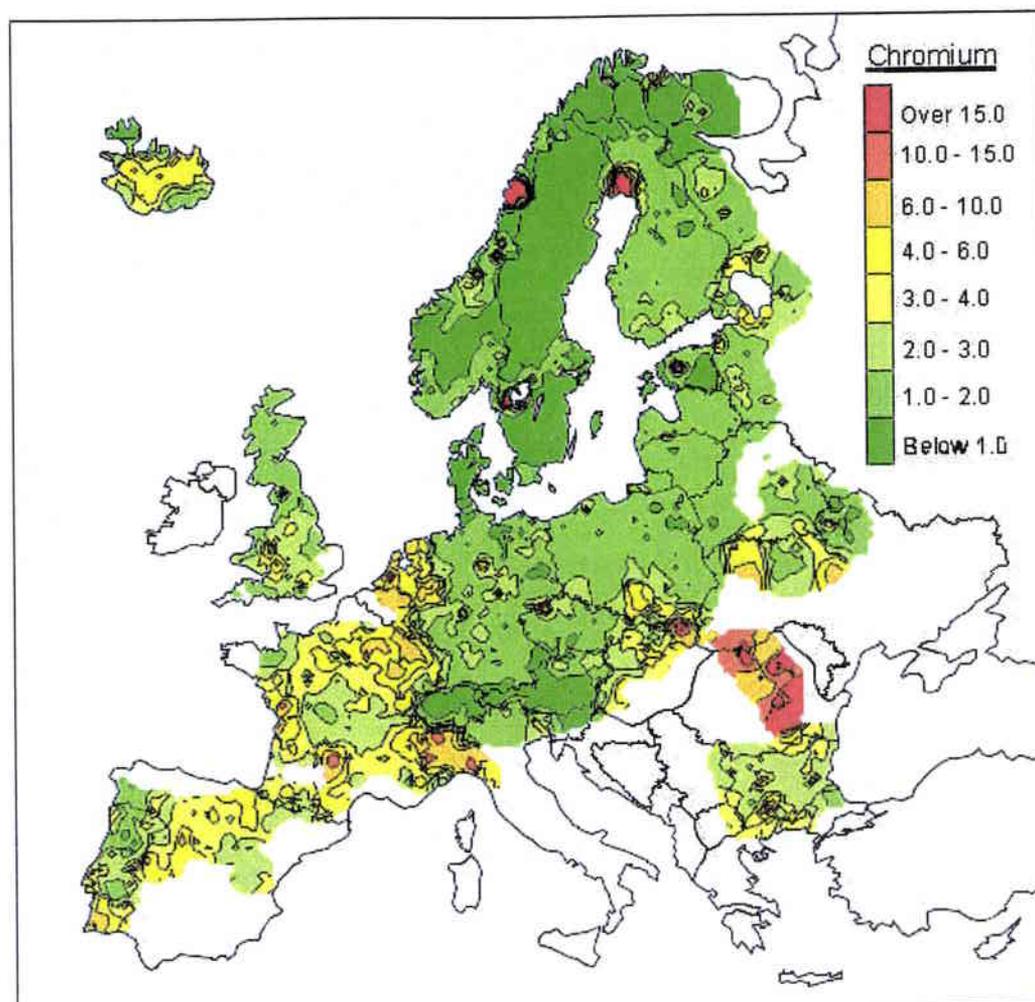


Figure 2* : Carte d'isoconcentration européenne de Cr mesuré dans les mousses ($\mu\text{g/g}$). Les zones blanches en France concernent des zones échantillonnées mais non analysées (AAN, ICP-MS) au moment des cartographies. La valeur de Cr au niveau européen en milieu rural est inférieure à $2 \mu\text{g/g}$. Le niveau élevé des Pays Bas et de la France serait dû à la technique d'analyse (AAN). La valeur médiane en France est de $3.3 \mu\text{g/g}$. Pour la France, la concentration moyenne de Cr est de $4.14 \pm 0.14 \mu\text{g/g}$ (valeur AAN cartographiée) et de $2.23 \pm 0.21 \mu\text{g/g}$ en ICP-MS (Chapitre I, TABLEAU III).

* carte reproduite avec l'aimable autorisation du Nordic Council of Ministers (Rühling, A.; Steinnes, E.; *Atmospheric Heavy Metal Deposition in Europe 1995-1996*, Nord 1998 : 15, Nordic Council of Ministers, Copenhagen 1998, 66 p.)

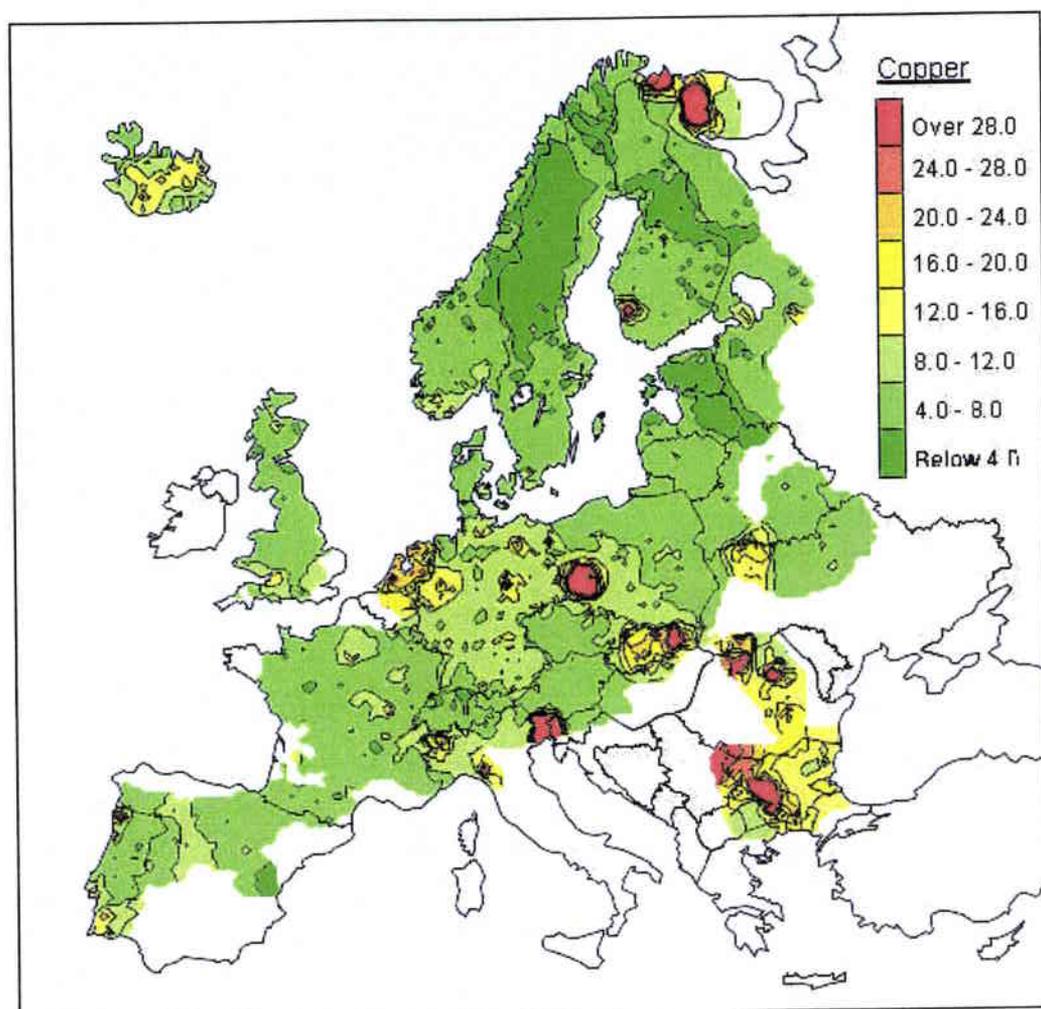


Figure 3* : Carte d'isoconcentration européenne de Cu mesuré dans les mousses ($\mu\text{g/g}$). Les zones blanches en France concernent des zones échantillonnées mais non analysées (AAN, ICP-MS) au moment des cartographies. Les concentrations de fond varient de 4 à 8 $\mu\text{g/g}$. De fortes concentrations sont observées en Pologne, Roumanie, Bulgarie, Nord de la Finlande et de la Norvège. En France, les plus fortes concentrations sont localisées en Ile de France et dans l'Est. Pour la France, la concentration moyenne de Cu est de $8.28 \pm 1.01 \mu\text{g/g}$ (valeur ICP-MS cartographiée). Pour rappel, celle de Cu par AAN est de $11.38 \pm 0.21 \mu\text{g/g}$ (**Chapitre I, TABLEAU III**).

* carte reproduite avec l'aimable autorisation du Nordic Council of Ministers (Rühling, A.; Steinnes, E.; *Atmospheric Heavy Metal Deposition in Europe 1995-1996*, Nord 1998 : 15, Nordic Council of Ministers, Copenhagen 1998, 66 p.)

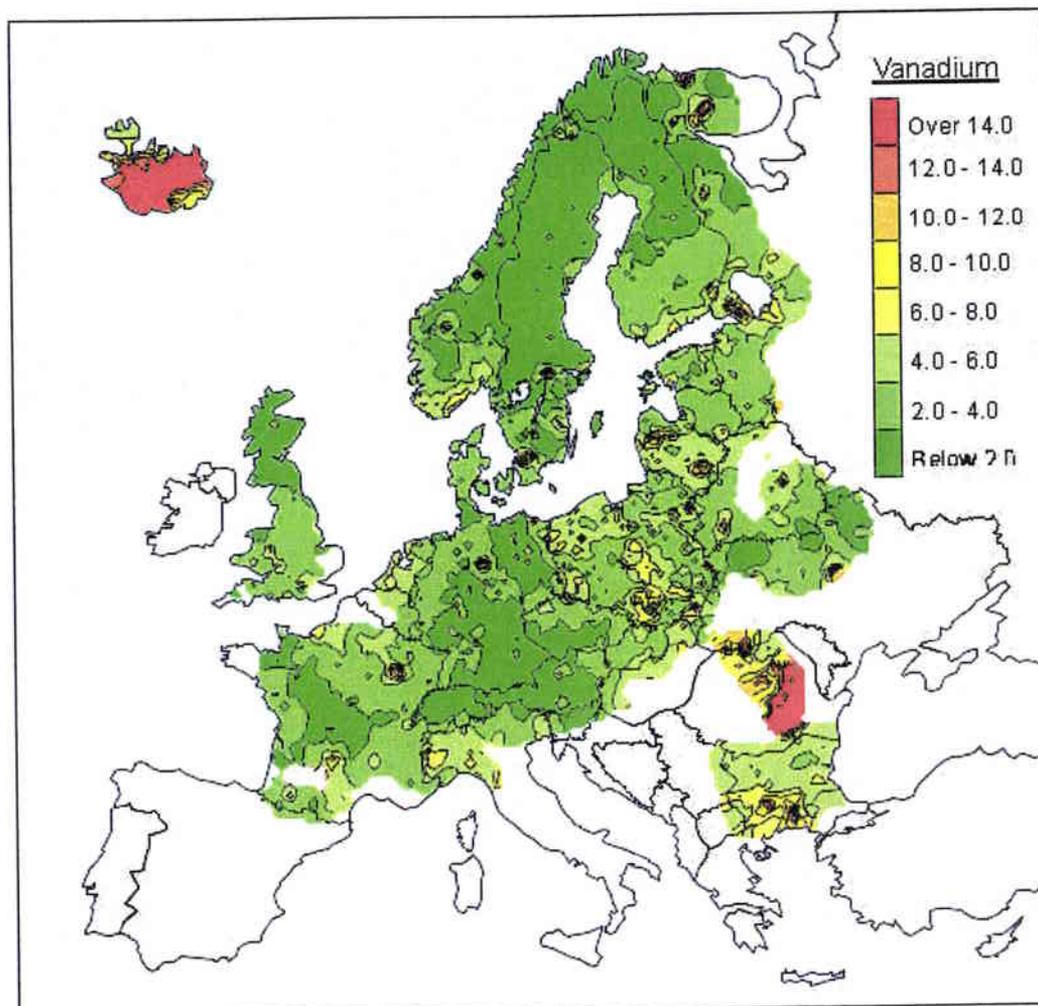


Figure 4* : Carte d'isoconcentration européenne de V mesuré dans les mousses ($\mu\text{g/g}$). Les zones blanches françaises correspondent à des zones échantillonnées mais non analysées au moment de la cartographie. Les concentrations de fond varient de 4 à 6 $\mu\text{g/g}$. En France, la valeur médiane est de 2.5 $\mu\text{g/g}$ et de fortes concentrations sont localisées à l'Est ($>15\mu\text{g/g}$) et au centre-Sud du pays. Pour la France, la concentration moyenne en V est de $3.14\pm 0.23 \mu\text{g/g}$ (valeur AAN cartographiée). Pour rappel, celle de V en ICP-MS est de $3.94\pm 0.28 \mu\text{g/g}$ (**Chapitre I, TABLEAU III**).

* carte reproduite avec l'aimable autorisation du Nordic Council of Ministers (Rühling, A.; Steinnes, E.; *Atmospheric Heavy Metal Deposition in Europe 1995-1996*, Nord 1998 : 15, Nordic Council of Ministers, Copenhagen 1998, 66 p.)

Régression Linéaire pour Ba

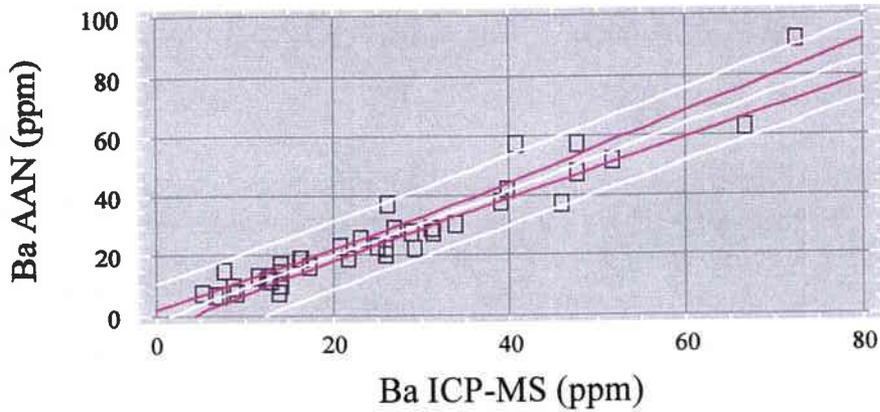


FIGURE 5 : Régression linéaire Ba AAN (y) et ICP-MS (x)
 $Ba\ AAN = (-1.65)^{ns} + 1.09^{***} \times Ba\ ICP$; $R^2 = 91,1\%$; $S_r = 5,66$
 R^2 et S_r sont le carré du coefficient de corrélation et l'écart type de l'estimation. Test de la pente et de l'ordonnée à l'origine : ns, non significativement différent de zéro; *** $p < 0.0001$

régression Linéaire pour Ce

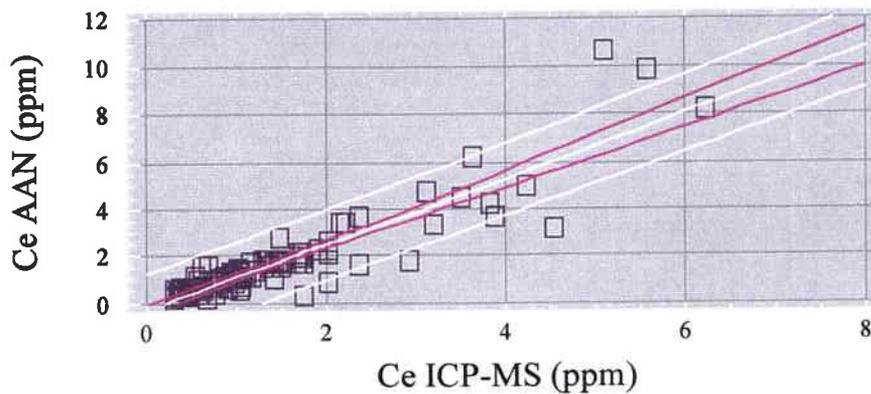


FIGURE 6 : Régression linéaire Ce AAN et ICP-MS
 $Ce\ AAN = (-0.26)^* + (1.38)^{***} \times Ce\ ICP$; $R^2 = 83\%$; $S_r = 0.752$
 R^2 et S_r sont le carré du coefficient de corrélation et l'écart type de l'estimation. Test de la pente et de l'ordonnée à l'origine : * $p < 0.05$; *** $p < 0.0001$

Régression Linéaire pour Cs

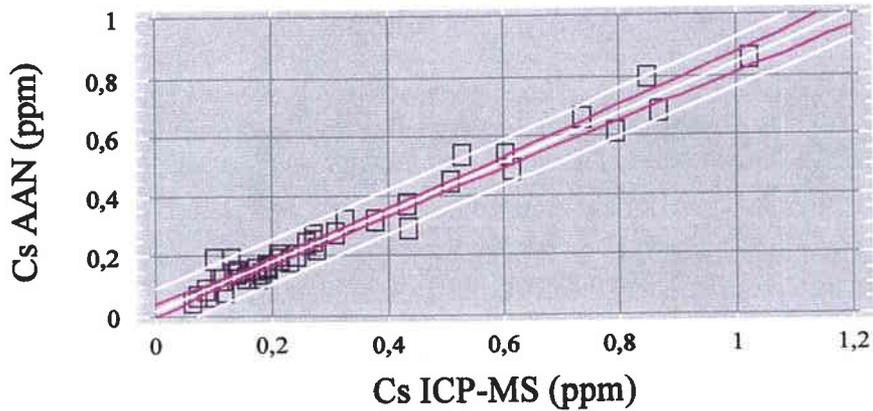


FIGURE 7 : Régression linéaire Cs AAN et ICP-MS
 $Cs\ AAN = (0.017)^{ns} + (0.826)^{***} \times Cs\ ICP$; $R^2 = 96.9\%$; $S_r = 0.037$
 R^2 et S_r sont le carré du coefficient de corrélation et l'écart type de l'estimation. Test de la pente et de l'ordonnée à l'origine : ns, non significativement différent de zéro; *** $p < 0.0001$

Régression Linéaire pour Fe

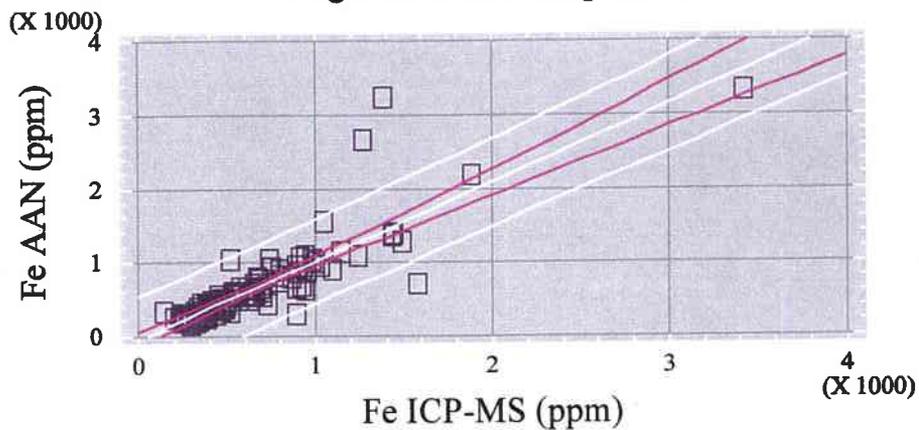


FIGURE 8 : Régression linéaire Fe AAN et ICP-MS
 $Fe\ AAN = (-56.7)^{ns} + (1.07)^{***} \times Fe\ ICP$; $R^2 = 73.23\%$; $S_r = 287.2$
 R^2 et S_r sont le carré du coefficient de corrélation et l'écart type de l'estimation. Test de la pente et de l'ordonnée à l'origine : ns, non significativement différent de zéro; *** $p < 0.0001$.

Régression Linéaire pour La

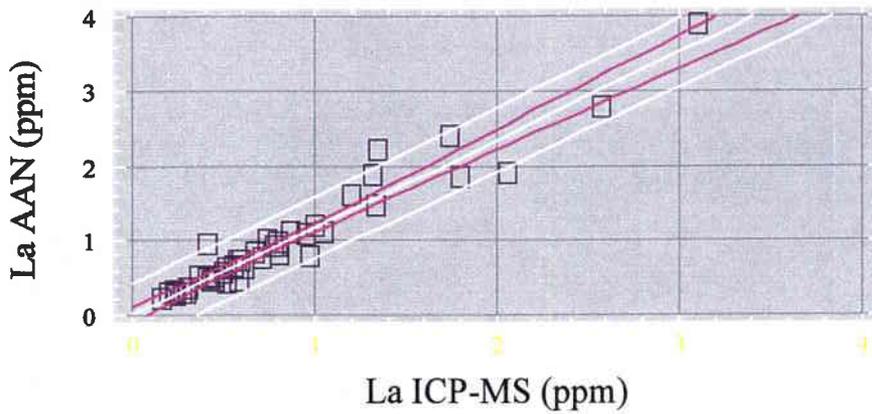


FIGURE 9 : Régression linéaire La AAN et ICP-MS
 $La\ AAN = (0.002)^{ns} + (1.17)^{***} \times La\ ICP$; $R^2 = 93.3\%$; $S_r = 0.202$
 R^2 et S_r sont le carré du coefficient de corrélation et l'écart type de l'estimation. Test de la pente et de l'ordonnée à l'origine : **ns**, non significativement différent de zéro; ******* $p < 0.0001$.

Régression Multiplicative pour Rb

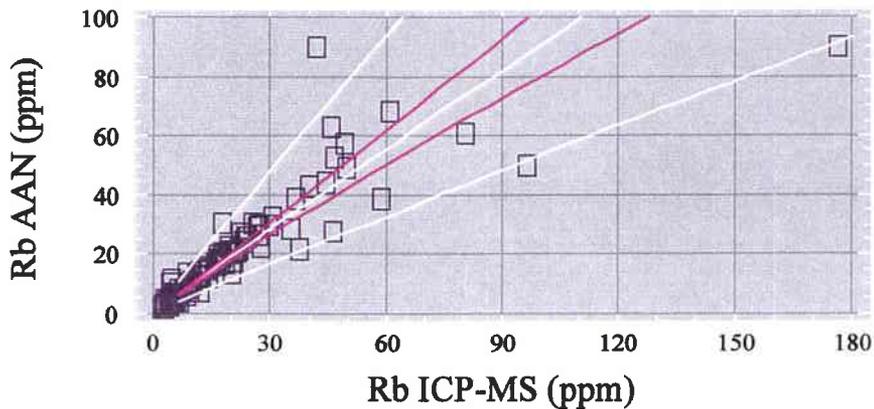


FIGURE 10 : Régression multiplicative Rb AAN et ICP-MS
 $\ln(Rb\ AAN) = (0.09)^{ns} + (0.95)^{***} \times \ln(Rb\ ICP)$; $R^2 = 92.1\%$; $S_r = 0.260$
 R^2 et S_r sont le carré du coefficient de corrélation et l'écart type de l'estimation. Test de la pente et de l'ordonnée à l'origine : **ns**, non significativement différent de zéro; ******* $p < 0.0001$.

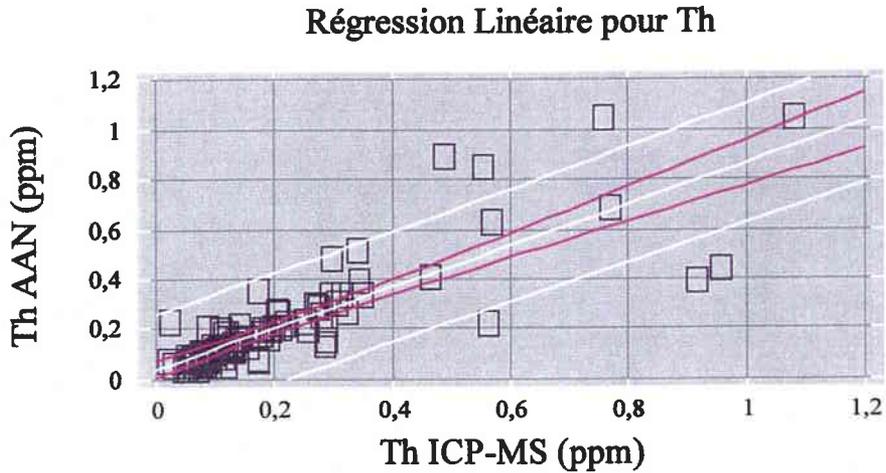


FIGURE 11 : Régression linéaire Th AAN et ICP-MS
 $\text{Th AAN} = (0.04)^* + (0.83)^{***} \times \text{Th ICP}$; $R^2 = 69.6\%$; $S_r = 0.111$
 R^2 et S_r sont le carré du coefficient de corrélation et l'écart type de l'estimation. Test de la pente et de l'ordonnée à

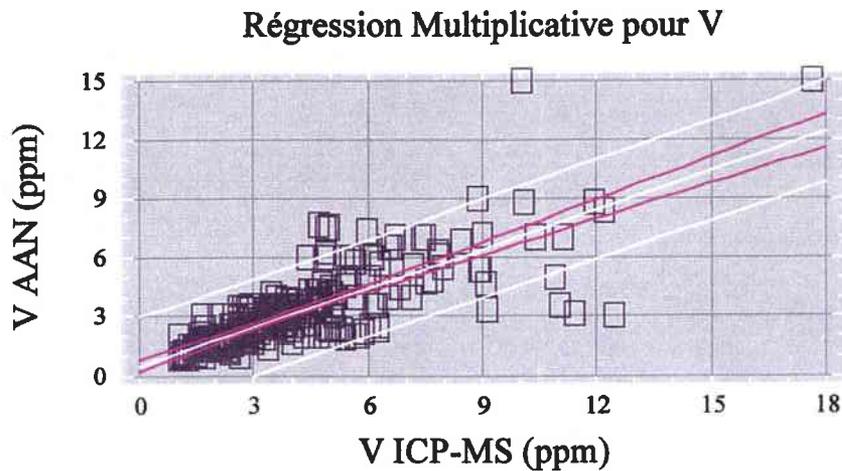


FIGURE 12 : Régression multiplicative V AAN et ICP-MS
 $V \text{ AAN} = (0.5)^{ns} + (0.66)^{***} \times V \text{ ICP}$; $R^2 = 65.1\%$; $S_r = 1.252$
 R^2 et S_r sont le carré du coefficient de corrélation et l'écart type de l'estimation. Test de la pente et de l'ordonnée à l'origine : ns, non significativement différent de zéro; *** $p < 0.0001$.

Régression Linéaire pour As

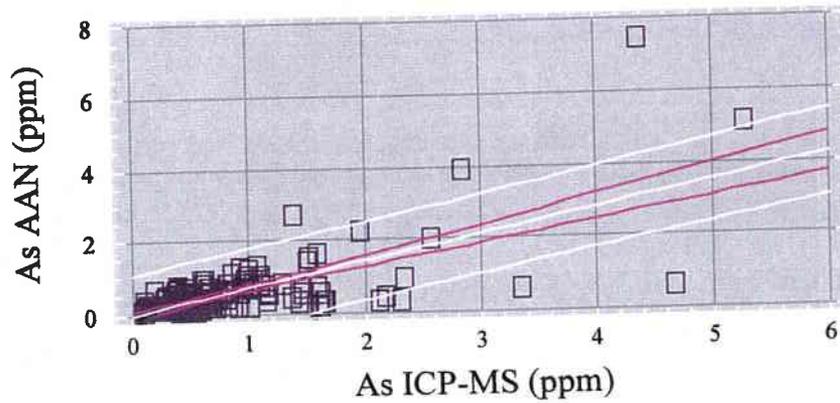


FIGURE 13 : Régression linéaire As AAN et ICP-MS
 $As\ AAN = (0.0)^{ns} + (0.71)^{***} \times As\ ICP$; $R^2 = 48.2\%$; $S_r = 0.545$
 R^2 et S_r sont le carré du coefficient de corrélation et l'écart type de l'estimation. Test de la pente et de l'ordonnée à l'origine : **ns**, non significativement différent de zéro; ******* $p < 0.0001$.

Régression Linéaire pour Cr

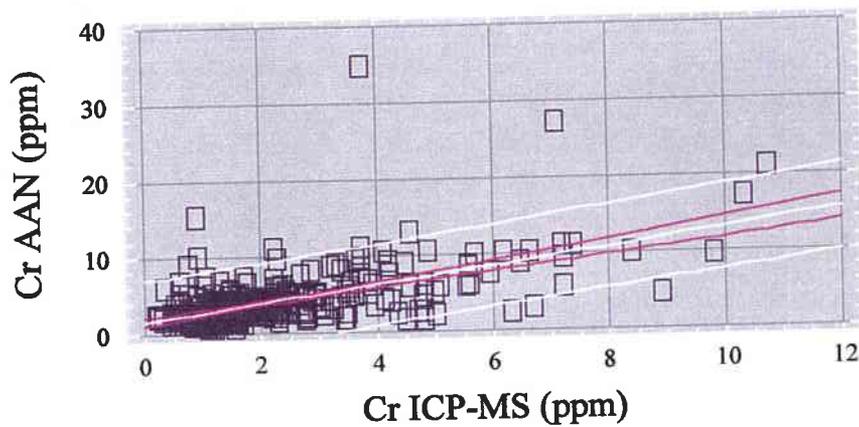


FIGURE 14 : Régression linéaire Cr AAN et ICP-MS
 $Cr\ AAN = (1.51)^{***} + (1.167)^{***} \times Cr\ ICP$; $R^2 = 34.1\%$; $S_r = 2.73$
 R^2 et S_r sont le carré du coefficient de corrélation et l'écart type de l'estimation. Test de la pente et de l'ordonnée à l'origine : ******* $p < 0.0001$.

Annexes du Chapitre II

1. Principaux sites émetteurs référencés par la DRIRE Ile-de-France ;

2. Homogénéité des Broyats :

- Tests
- Résultats

3. Analyse des Composantes de Variance, détail des calculs ;

4. Test de Fisher sur les Variances ;

5. Principe de l'interpolation par Krigeage.

Principaux sites émetteurs référencés par la DRIRE Ile-de-France

Usines et Industries répertoriées pour leurs émissions en métaux et éléments trace (date de Avril 1998) dans la zone étudiée pour la Variabilité Spatiale.

**Communes (n°maille III à proximité)
(Chapitre II, FIGURE III)**

Activités/nom des industries

Samoreau (15)	SITOM
Bagneaux sur Loing (7)	Corning France
	Vidéoglass
Bourron Marlotte (11, 13)	Bernard Bois
Champagne sur Seine (15)	ABB Industrie
Château Landon (6)	Sobogat Chate
Ecuelles (14, 15)	EDF Ade Renardi
	Fonderie du Par
	Piketti
Ferrières (1)	FERE

Sites éloignés des mailles III :

Entre les mailles I (A₂ et A₃)

Voulx

Montereau Fault Yonne

Multilam
Film Argent
Gordon Choisy
Silec
SMB
SOBEA

Entre les mailles I (A₁ et A₂)

St Pierre les Nemours

Nemours

Quartz Silice
Centre Hospitalier

Homogénéité des Broyats

Tests

Afin de déterminer la quantité de poudre à analyser, des tests d'homogénéité sur les broyats des récoltes brutes ont été effectués pour déterminer de façon très empirique la variabilité intra- et inter-échantillons en fonction de la masse de mousses minéralisées. Pour cela, 6 récoltes brutes réduites en poudre sont choisies aléatoirement et 3 sont destinées à la variabilité intra-broyat et les 3 autres à la variabilité inter-broyats (**Figure 1**). Sur chacun des trois échantillons sélectionnés pour la variabilité inter-broyats, $n=3$ pastilles de 50, 100 et 200 mg/échantillon sont préparées et analysées par ICP-MS. Pour la variabilité intra-broyat, les trois autres récoltes brutes sont respectivement préparées en $n=7$ pastilles de 50, 100 et 200 mg minéralisées et analysées en ICP-MS. La même étude est faite sur des matériaux de référence M1 et M2 (14), mousses élaborées dans le cadre du programme européen de recherche mais avec $n=4$ pastilles de 30, 50, 75, 100, 150, 200 et 300 mg. La variabilité est calculée à partir de Coefficients de Variation corrigés (C.V.*) afin de pallier certains biais dans le cas des petits échantillons (15).

Les C.V.* s'expriment en % et sont calculés de la façon suivante :

$$C.V.* = (1 + 1/4n) \times C.V.$$

$$\text{avec } C.V. = 100\sigma/\mu$$

n = taille de l'échantillon

σ = écart-type

μ = moyenne

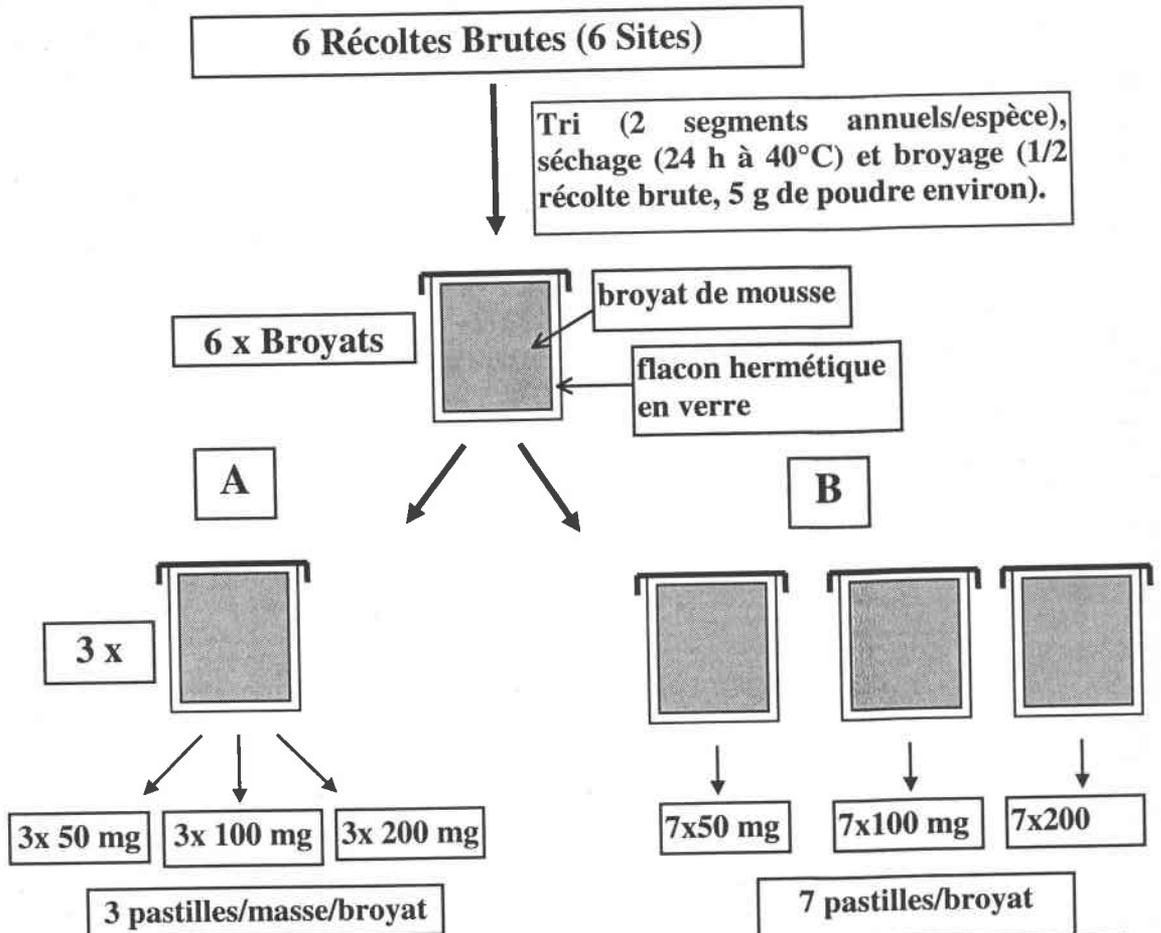


Figure 1 : Schéma du protocole expérimental pour l'estimation de la quantité de poudre représentative d'une récolte brute: A-variabilité inter broyats pour les masses 50, 100 et 200 mg ($n=3$ pastilles; 3 broyats) ; B-variabilité intra broyat pour les masses 50, 100 et 200 mg ($n=7$ pastilles; 3 broyats).

Résultats

Mousses de référence M1 et M2

Les résultats montrent que pour tous les éléments (sauf As, Co, Cu, Cs, Ga, Sb et V dans M1), le C.V.* est inférieur à 20 % pour une masse de 200 mg (**Tableau I**). Ce C.V.* descend même à moins de 10 % pour la mousse la plus chargée M2, moins soumise aux problèmes de limites de détection des éléments (As, Ba, Cd, Co, Cu, Cs, Ga, Pb, Rb, Sb, Sr, V et Zn).

Ces résultats montrent que 200 mg de broyat sont suffisants pour abaisser le C.V.* de l'ensemble des éléments dosés dans les mousses, même les moins chargées (sauf pour As, Co, Sb et V). Pour ces derniers éléments, il faut donc être vigilant quant aux résultats et aux comparaisons entre sites avec un seul dosage même de 200 mg.

Application de ces résultats à la campagne française

La masse moyenne de broyat analysée lors de la campagne française était de 75 mg. Or, le C.V.* correspondant à cette masse est largement supérieur à 30% pour la mousse M1 (sauf Ba, Pb, Rb et Sr) mais semble convenir (C.V.* < 20%) pour les éléments As, Ba, Cd, Cs, La, Pb, Rb et Sr pour la mousse M2 (**Tableau I**).

Une masse de 75 mg analysée sur des mousses fortement concentrées (du même ordre de grandeur que M2) issues de sites différents pourra mettre en évidence des différences relatives pour les éléments As, Ba, Cd, Cs, La, Pb, Rb et Sr. Cependant, pour des concentrations de fond (même ordre de grandeur que M1), il sera difficile de mettre en évidence des comparaisons relatives entre sites pour Cd, Cu, La et Zn avec des masses inférieures à 100 mg.

Broyats de la campagne d'échantillonnage variabilité Spatiale

Le même calcul de Coefficient de Variation corrigé (C.V.*) a été fait sur les récoltes brutes de la campagne d'échantillonnage (**Tableau II**).

Les C.Vs.* intra et inter-broyats des différentes quantités de poudre analysées confirment le choix d'une masse de 200 mg. Cette quantité de mousse analysée dans chaque récolte brute montre un C.V.* < à 20% voire même < à 10% pour la majorité des éléments. La quantité de 200 mg améliore grandement le C.V.* surtout de As qui restait élevé à 100 mg (40.7%). Il faut rester prudent quant à la représentativité d'un échantillon de 200 mg pour les éléments Th et U, qui ne présentent pas toujours des C.V.* assez bas.

Une masse de 200 mg de mousse broyée semble cependant représenter un prélèvement relativement homogène de la récolte brute de départ (telle qu'elle a été faite dans cette étude) pour les éléments As, Ba, Cd, Co, Cs, Cu, Ga, La, Mo, Pb, Rb, Sb, Sr, V, Zn et peut-être Th et U.

Eléments C.V.* (%)	V51		Co59		Cu63		Zn64		Cu65		Zn66	
	M1	M2										
4x30 mg	74,6	8,6	944	15,6	43,7	6,4	68,1	19,2	42,3	4,2	39,8	4
4x50 mg	44,9	17,6	229	17,2	31,5	8,7	49,6	13,9	26,2	8,7	31,5	8,3
4x75 mg	39,5	45,2	477	55,7	42,3	41,4	46,3	37,3	40,3	35,7	34,9	37,7
4x100 mg	36,3	6,2	62,9	9,3	44	5,8	39,2	5,9	43,7	6,5	32,7	2,6
4x150 mg	33,5	8,3	1300	1,1	19,3	3,8	15,1	10	22,2	7,2	14,8	9,5
4x200 mg	36,3	6,1	604	7,2	20,6	5,2	13,1	7,4	18,6	5,7	13,2	9,7
4x300 mg	nd	5,5	nd	2,8	nd	6,1	nd	9,5	nd	2,8	nd	7,3

C.V.* (%)	Ga69		As75		Rb85		Sr88		Cd111		Cd114	
	M1	M2	M1	M2	M1	M2	M1	M2	M1	M2	M1	M2
4x30 mg	84,9	8,7	156	16,6	6,1	1,4	4,8	1,6	213	2,6	54,5	5,6
4x50 mg	48,5	20	78	18	3,4	4,2	6,1	4,9	195	12	29	7,5
4x75 mg	58,1	39,6	64,8	12,8	5,7	17,7	7,9	15,3	70,5	6	33,5	9,6
4x100 mg	40	3,7	55,1	15,4	4,2	8	6,1	5,5	27,2	11,6	26,4	7,5
4x150 mg	30	6,1	84,2	5,4	11,7	4,6	15,9	2,9	151	5,4	12,3	3,5
4x200 mg	29,1	9,6	69,9	7,6	13,7	3,3	15,1	5,2	13,4	9,4	13,4	6,3
4x300 mg	nd	6,4	nd	12,2	nd	5,5	nd	5,9	nd	4,3	nd	2,1

C.V.* (%)	Sb121		Cs133		Ba138		La139		Pb206	
	M1	M2	M1	M2	M1	M2	M1	M2	M1	M2
4x30 mg	69,4	8,7	154	5,6	10	5,6	ld	3,8	27,3	2,4
4x50 mg	60	6,5	222	1,9	30,2	9,1	32,4	11	46,7	3,9
4x75 mg	68,3	21,5	70	2,7	10,3	3,4	42,6	13,5	18,8	4,3
4x100 mg	61,1	14,4	20	7	8,1	8,4	ld	16,4	12,4	10,1
4x150 mg	125	13,1	49	1,9	11,4	1,1	32,6	9	9,4	1,7
4x200 mg	66,6	8,7	36,7	2,8	6,3	5,9	11,9	18,8	8,1	4,2
4x300 mg	nd	2,4	nd	2,6	nd	2,9	nd	11,8	nd	4,9

Tableau I : Coefficients de variation corrigés (C.V.*, %) des éléments dosés dans les mousses de référence M1 (peu concentrée) M2 (très concentrée) en fonction de différentes masses analysées en ICP-MS (30, 50, 75, 100, 150, 200 et 300 mg) (4 pastilles/masse/mousse de référence). La masse 200 mg donne un C.V.* <20% pour une majorité des éléments, à l'exception de V, Co, Ga, As, Sb et Cs dans M1, la mousse la moins chargée. Les éléments hachurés ont des C.V.* <20%, ceux en grisés ont un C.V.* <10% et les éléments surlignés ont le C.V.* le plus faible dans les 2 catégories.

nd : non déterminé ; ld : analyse en limite de détection.

Eléments	Variabilité intra-broyat, C.V.* (%)			Variabilité inter-broyats, C.V.* (%)		
	broyat n°1	n°2	n°3	n°4, 5, 6		
	7x50mg	7x100mg	7x200mg	3x50mg	3x100mg	3x200mg
V51	6	12	1,8	6,3	4,0	2,2
Co59	38,4	30,1	9,3	15,1	12,5	12,0
Cu63	7,9	10,2	3	3,4	3,3	1,0
Zn64	9,2	11,8	3,1	4,6	3,5	2,2
Cu65	6	11,2	3,1	2,5	3,1	1,9
Zn66	7,7	11,3	2,3	4,9	3,0	1,9
Ga69	8,6	11,1	1,7	13,3	8,5	4,9
As75	32,8	40,7	7,3	ld	46,2	9,8
Rb85	4,7	10,5	2,9	5,1	3,4	2,8
Sr88	3,8	10,3	1,9	6,3	4,0	1,6
Mo95	1215,5	54,7	6,9	34,3	12,5	7,0
Cd111	20,5	13,6	10,8	16,7	12,1	6,6
Cd114	14,9	12,7	6,7	12,8	6,7	2,5
Sb121	8,6	14,5	5,5	29,6	6,3	6,2
Cs133	17,3	14,1	2,8	11,6	7,9	2,1
Ba138	3,9	11	1,5	11,6	7,6	4,6
La139	11,7	16,3	5,6	8,6	11,4	5,0
Pb206	5,3	11,8	3,3	22,1	1,8	4,0
Pb207	5,1	10,8	3,8	22,3	2,4	4,2
Pb208	3,5	11,5	3,2	21,4	2,2	4,2
Th232	ld	ld	9,4	ld	ld	30,9
U238	ld	ld	14,7	ld	12,3	2,9

Tableau II : Coefficients de variation corrigés (C.V.*, %) intra et inter broyats pour les échantillons de la variabilité spatiale en fonction de la masse d'échantillon analysée par ICP-MS (50, 100, 200 mg). La variabilité intra-broyat des masses d'échantillons est estimée par l'analyse de 7 pastilles de 50, 100 et 200 mg sur les broyats n°1, 2 et 3, respectivement. La variabilité inter-broyats est estimée par l'analyse de 3 pastilles de 50, 100 et 200 mg sur chaque broyat n°4, 5 et 6. Pour la plupart des éléments pris en compte, le C.V.* pour 200 mg est minimal (en majorité <20 % voire 10%). Les éléments grisés et surlignés correspondent aux masses de poudre avec le C.V.* le plus faible.

ld : analyse en limite de détection.

Analyse des Composantes de Variance, détail des calculs

La variance associée à chaque taille de maille est déterminée par une analyse de la variance selon un plan pyramidal. L'analyse de variance est un moyen statistique à employer pour vérifier l'existence supposée de phénomènes réels dans les meilleures conditions de coût et d'efficacité. Elle permet d'isoler l'influence des facteurs non contrôlés et de caractériser celle des facteurs contrôlés (taille des mailles) en décomposant en plusieurs parties la variance globale de la population des résultats (échantillons et analyses).

Après avoir défini le plan d'expérience (plan emboîté à 3 degrés) et identifié les facteurs contrôlés (3 tailles de mailles), les modalités des facteurs sont choisies aléatoirement (3 mailles I, 3 mailles II et 3 mailles III). Avant toute analyse, les hypothèses fondamentales doivent être vérifiées comme la normalité de la variable étudiée et l'égalité des variances au sein des répétitions réalisée pour une combinaison donnée de facteurs contrôlés. A cet effet, les résultats expérimentaux ont fait l'objet d'une transformation logarithmique préalable.

L'analyse de variance, réalisée par StatGraphic Plus®, donne les sommes de carrés (Q) associées aux différents facteurs. Ces sommes de carrés permettent ensuite l'estimation des composantes de variance caractérisant chaque niveau de l'échantillonnage.

La relation entre les différentes sommes de carrés est :

$$Q_T = Q_A + Q_B + Q_C + Q_R, \text{ avec}$$

Q_T somme des carrés totale ;

Q_A somme des carrés caractérisant la variabilité au niveau de la Maille I ;

Q_B somme des carrés caractérisant la variabilité au niveau de la Maille II ;

Q_C somme des carrés caractérisant la variabilité au niveau de la Maille III ;

Q_R somme des carrés correspondant à la variance résiduelle.

Q_R englobe la variabilité induite par l'ensemble des facteurs non contrôlés et notamment la variabilité propre à la méthode analytique (ICP-MS) et biologique ("outil mousse").

Les calculs détaillés de chaque somme de carrés sont :

$$\begin{aligned} Q_T &= \sum_i \sum_j \sum_k \sum_\alpha X_{ijk\alpha}^2 - 1/N [\sum_i \sum_j \sum_k \sum_\alpha X_{ijk\alpha}]^2 \\ Q_A &= 1/nqr \sum_i [\sum_j \sum_k \sum_\alpha X_{ijk\alpha}]^2 - 1/N [\sum_i \sum_j \sum_k \sum_\alpha X_{ijk\alpha}]^2 \\ Q_B &= 1/nr \sum_i \sum_j [\sum_k \sum_\alpha X_{ijk\alpha}]^2 - 1/nqr \sum_i [\sum_j \sum_k \sum_\alpha X_{ijk\alpha}]^2 \\ Q_R &= \sum_i \sum_j \sum_k \sum_\alpha X_{ijk\alpha}^2 - 1/n \sum_i \sum_j \sum_k [\sum_\alpha X_{ijk\alpha}]^2 \\ Q_C &= Q_T - Q_A - Q_B - Q_R \end{aligned}$$

Le résultat expérimental est noté $X_{ijk\alpha}$ quand il correspond à la modalité i du facteur A ($i=1, 2, \dots, p$) (Maille I avec $p=3$ modalités), à la modalité j du facteur B ($j=1, 2, \dots, q$) (Maille II avec $q=3$ modalités) et à la modalité k du facteur C ($k=1, 2, \dots, r$) (Maille III avec $r=3$ modalités). L'indice α correspond à la répétition ($\alpha=1, \dots, 4$) obtenue pour la combinaison ijk des 3 facteurs (plan d'expérience avec $\alpha=4$ répétitions pour 2 sous unités et 2 espèces échantillonnées/maille III).

Ensuite, les composantes de variance correspondantes (σ_A^2 , σ_B^2 , σ_C^2 et σ_R^2) sont déduites pour chaque niveau de l'échantillonnage (Tableau I). Afin de vérifier que les valeurs trouvées

sont différentes de zéro, des tests de Fisher-Snedecor sont appliqués sur chaque composante de variance¹.

Source de Variation	Somme de carrés Q	d.l. v	Quantité estimée par Q/v ABC aléatoires
Facteur A	Q_A	$p-1$	$nrq\sigma^2_A + nr\sigma^2_B + n\sigma^2_C + \sigma^2_R$
Facteur B	Q_B	$p(q-1)$	$nr\sigma^2_B + n\sigma^2_C + \sigma^2_R$
Facteur C	Q_C	$pq(r-1)$	$n\sigma^2_C + \sigma^2_R$
Résiduelle	Q_R	$N-pqr$	σ^2_R
Totale	Q_T	$N-1$	

Tableau I : Tableau général d'une analyse de variance selon un plan pyramidal avec 3 facteurs contrôlés et n répétitions. Q_A , Q_B , Q_C et Q_R correspondent aux sommes de carrés utilisées pour estimer σ^2_A , σ^2_B , σ^2_C et σ^2_R , composantes de variance relatives aux facteurs A, B et C (compte tenu des degrés de liberté v). σ^2_R représente la variance résiduelle. d.l. : degrés de liberté.

C'est à partir des σ^2_A , σ^2_B , σ^2_C et σ^2_R que l'estimation de la Variance Totale σ^2_X est possible.

¹ Pour plus de détails, voir Annexes Générales, Annexes du Chapitre II, Tests de Fisher sur les variances.

Test de Fisher sur les Variances

Afin de tester si les composantes de variance σ^2_A , σ^2_B , σ^2_C et σ^2_R sont différentes de zéro, des tests de Fisher-Snedecor ont été effectués.

A cet effet, il faut faire les tests de variabilité à chaque niveau :

- Pour le niveau 3 :

soit l'hypothèse nulle $H_0 : \sigma^2_C = 0$

sous H_0 , on a :

$$L[[Q_C/pq(r-1)] / [Q_R/N-pqr]] = F[pq(r-1) ; N-pqr]$$

où $F[pq(r-1) ; N-pqr]$ représente la loi de Fisher avec $pq(r-1)$ et $N-pq$ degrés de liberté.

Compte tenu du calcul du rapport et des degrés de liberté, la table de Fisher permet de décider si cette valeur est située ou non dans la zone de rejet ou d'acceptation avec un risque de première espèce prédéterminé, par exemple 5%.

Il en est de même pour les autres composantes de variance avec :

- Pour le niveau 2

soit l'hypothèse $H_0 : \sigma^2_B = 0$

sous H_0 , on a :

$$L[[Q_B/p(q-1)] / [Q_C/pq(r-1)]] = F[p(q-1) ; pq(r-1)]$$

Autrement dit, sous H_0 la variable $[Q_B/p(q-1)] / [Q_C/pq(r-1)]$ suit une loi de Fisher à $p(q-1)$ et $pq(r-1)$ degrés de liberté.

- Pour le niveau 1

soit l'hypothèse $H_0 : \sigma^2_A = 0$

sous H_0 , on a :

$$L[[Q_A/(p-1)] / [Q_B/p(q-1)]] = F[(p-1) ; p(q-1)]$$

Les calculs et tests sont effectués pour chaque élément dosé dans les mousses. Si ces composantes de variance sont significativement différentes de zéro, cela signifie qu'elles quantifient une réelle hétérogénéité à l'échelle de maille considérée.

Principe de l'interpolation par Krigeage

Les résultats des dosages multiélémentaires et les facteurs déterminés par l'ACP ont été cartographiés par la méthode d'interpolation dite de "Krigeage", disponible sur le logiciel Tecplot®. L'obtention de cartes d'isoconcentrations nécessite d'interpoler les résultats sur l'ensemble de la zone échantillonnée et pour cela, il faut un interpolateur exact comme le krigeage. A l'origine, cette technique d'interpolation était utilisée dans l'étude des gisements miniers (17) et son usage s'est étendu aux problématiques environnementales (18, 19).

Le problème le plus simple posé en estimation est d'interpoler en un point x la fonction z qui est inconnue en ce point mais dont on connaît les valeurs en N points $z(x_1, x_2, \dots, x_N)$ (lieux d'échantillonnage lors d'une campagne de prélèvement, par exemple). Le but est donc de construire un estimateur $z^*(x)$ qui approche au mieux la valeur inconnue $z(x)$. On cherche à minimiser la variance de l'erreur d'estimation $Z^*(x) - Z(x)$. Dans le cas particulier de la méthode de Krigeage, une contrainte supplémentaire est imposée à l'erreur d'estimation pour garantir le non biais de l'estimateur de Krigeage.

L'ensemble possède ainsi un certain nombre de propriétés :

- c'est un estimateur sans biais, c'est-à-dire que l'erreur d'estimation est nulle et qu'au niveau de la variable régionalisée, l'erreur moyenne des estimations ponctuelles est nulle sur un grand domaine ;
- c'est un estimateur exact et si on "krige" en un point donné, on retrouve comme estimateur la valeur de la donnée ;
- en supposant fixé le jeu de données utilisées, le Krigeage d'une combinaison linéaire de valeurs ponctuelles est identique à la même combinaison linéaire appliquée aux krigeages de ces valeurs ponctuelles. Si $*$ représente l'opérateur "estimation par krigeage" et L représente un certain opérateur linéaire,

$$[L(Z)]^* = L(Z^*)$$

La méthode d'interpolation du Krigeage utilise un ensemble de données numériques réparties dans l'espace (et/ou le temps), en l'occurrence les résultats des dosages multiélémentaires dans les mousses. Ces résultats peuvent être assimilés à une variable régionalisée. Les variables régionalisées peuvent correspondre par exemple à des teneurs minières, d'altitude, de pression atmosphérique ou des teneurs en polluant.

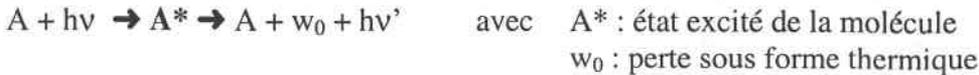
Cette variable régionalisée est la réalisation d'une fonction aléatoire. Afin de mesurer la qualité de l'estimateur, on regarde l'hétérogénéité de l'échantillonnage et les tendances, en construisant une nuée variographique. Les données sont ensuite classées de façon arbitraire et chaque classe est traitée indépendamment afin de construire le variogramme expérimental. L'ultime phase consiste ensuite à ajuster au mieux le variogramme expérimental à une courbe d'expression théorique connue ou variogramme modélisé. Cette modélisation est interactive et tente d'établir la structure de la variable étudiée.

Annexes Chapitre III

1. Principe de la méthode d'Induction de la Fluorescence de la Chlorophylle
2. Protocole de préparation des échantillons de mousses et des jauges "Owen" du terrain à l'analyse
3. Tests de représentativité des masses d'échantillons prélevés et analysés dans chaque sous-unité du "Moss Plate"
4. Figures 4, 5, 6 et 7 ;
5. Conversion Stock-Flux
 - Codage des variables ;
 - Figures 8, 9, 10 , Exemples d'application pour Pb ; Tableaux VI à IX, Exemples de modélisation pour Ba, Pb, Sb et Ti.

Principe de l'Induction de la Fluorescence de la Chlorophylle

Lorsqu'une feuille est éclairée, l'énergie emmagasinée est utilisée pour former les propres stocks énergétiques de la plante. Mais toute l'énergie absorbée n'est pas utilisée. Une majeure partie est perdue sous forme de chaleur et une plus faible sous forme de fluorescence. Cette fluorescence est émise par les molécules de chlorophylle lors du retour de l'état excité (après absorption de photon) vers l'état fondamental de la molécule :



Cette fluorescence peut apparaître sous forme d'un photon hv' avec $hv' < hv$, et donc $\lambda' > \lambda$.

Le principe de la méthode consiste donc à éclairer l'échantillon étudié par des flashes lumineux et exciter ainsi les molécules de chlorophylles. Au cours de cette excitation, les électrons passent d'une orbitale pleine à une orbitale libre. Lorsque les molécules se dés excitent, il y a émission de photons. L'émission de fluorescence se produit donc entre le niveau le plus bas de S1 et le niveau S0 où l'électron est à nouveau à l'état fondamental.

Les mesures de fluorescence effectuées dans le cadre de cette thèse permettent d'estimer l'efficacité de capture du photosystème II (PSII) : l'énergie excitatrice est captée par les antennes et conduite jusqu'au centre réactionnel. Dans le photosystème II, elle est transmise à la sous unité P680 qui est alors excitée par l'énergie qu'elle reçoit (P680*). Il s'en suit une séparation de charges qui libère un électron. Cet électron est ensuite capté par le premier accepteur de la chaîne de transporteurs, la phéophytine. Il est ensuite transmis à l'accepteur quinonique primaire QA puis plus lentement à l'accepteur secondaire QB.

Une mesure de fluorescence estime l'efficacité de conversion des photons en flux d'électrons dans le photosystème II :

$$\text{Efficacité Max} = (F_m - F_0) / F_m = F_v / F_m \quad \text{(Figure A)}$$

avec F_0 , le niveau de fluorescence minimal obtenu pour une faible intensité excitatrice;

F_v , fluorescence variable ;

F_m , le niveau de fluorescence maximal obtenu après un intense flash lumineux provoquant la saturation des centres réactionnels ;

Le paramètre clé est le rapport F_v/F_m qui est considéré comme une mesure du rendement quantique du photosystème II et qui est un paramètre relativement stable dans les feuilles non stressées de différentes plantes.

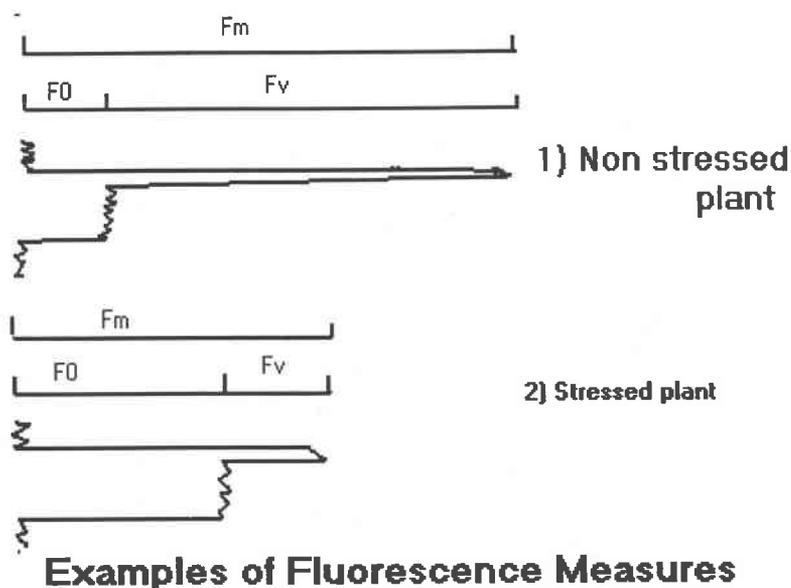


Figure A : Schéma de l'évolution des paramètres du signal de fluorescence (F_0 , F_v et F_m) dans le cas de plantes stressée et non stressée. F_0 correspond à la fluorescence minimale, F_m à la fluorescence maximale et F_v à la fluorescence variable.

Les mesures de fluorescence sont effectuées sur un "fluorimètre" PAM-Walz relié par un guide optique multibrins à :

- une diode éclairant l'échantillon en lumière blanche pour exciter les antennes chlorophylliennes ;
- une cellule photosensible permettant de capter le signal de fluorescence ;
- des brins supplémentaires utilisés pour un éclairage en flash ou en lumière rouge sombre.

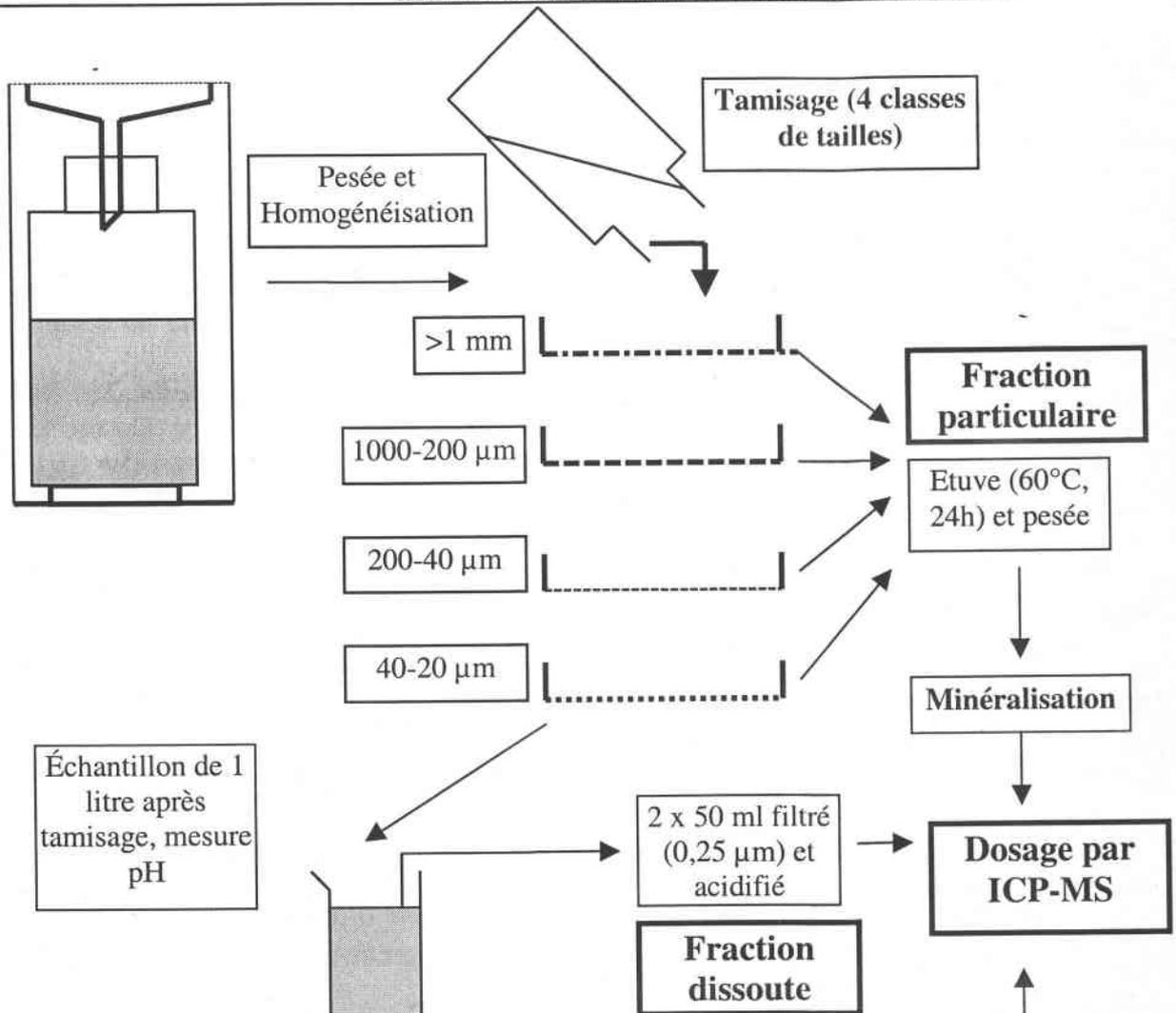
Le PAM est relié à un enregistreur qui retranscrit l'amplitude des signaux F_0 et F_m . Ces deux mesures permettent de calculer le rapport F_v/F_m qui est directement proportionnel à l'efficacité de capture des photons par le photosystème II. Plus cette valeur est faible, plus le processus photochimique est inhibé.

La fluorescence a été mesurée dans des conditions de laboratoire et après avoir adapté les mousses à l'obscurité (2h00 à l'obscurité avant toute mesure). Les mousses sont ensuite introduites dans la chambre d'analyse et légèrement humidifiées pour une meilleure conduction du signal. Les échantillons sont maintenus 120 secondes à 20°C puis 60 secondes à 10°C. Puis, à 20°C deux flashes lumineux intenses sont utilisés pour réduire les accepteurs d'électrons des photosystèmes II et induire ainsi la fluorescence.

Protocole de préparation des échantillons (mousses, jauges "Owen") du terrain à l'analyse

Figure B

A



B

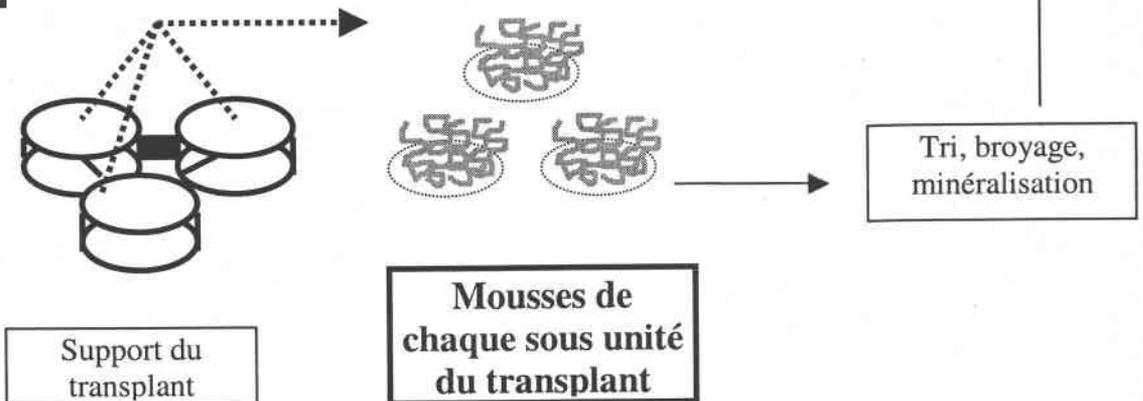


Figure B : Protocole de traitement des jauges Owen (A) et des transplants de mousses (B) après chaque exposition mensuelle. Les retombées sèches sont séparées en classes de tailles de poussières (>1000 μm, 1000-200 μm, 200-40 μm, 40-20 μm), la fraction dissoute des éléments est obtenue après filtration sur 0,25 μm (résultats non exploités dans la thèse) et chaque sous unité du transplant de mousses est traitée individuellement pour une meilleure statistique des mesures. Après minéralisation, l'ensemble est analysé par ICP-MS.

Tests de représentativité du "Moss Plate", Limites de détection et de quantification (ICP-MS)

Tests d'Homogénéité des Broyats

Afin de déterminer la quantité représentative de mousse à analyser pour chaque sous unité du transplant, des tests d'homogénéité des broyats intra- et inter sous unité ont été effectués pour différentes masses de poudre de mousses.

Pour cela, deux transplants sont utilisés, un de *Pseudoscleropodium purum* (Sp) et un autre de *Pleurozium schreberi* (Ps) exposés deux mois sur le site Saclay Village. Chaque sous-unité du premier transplant est broyée et divisée en 3 pastilles de 50 mg, 3 pastilles de 100 mg et 3 pastilles de 200 mg. Les sous-unités du second transplant sont broyées et la première est divisée en 9 pastilles de 50 mg, la deuxième en 9 pastilles de 100 mg et la troisième en 5 pastilles de 200 mg.

La variabilité est calculée à partir des Coefficients de Variation corrigés (C.V.*) en raison de certains biais dans le cas des petits échantillons.

Les C.V.* s'expriment en % et sont calculés de la façon suivante :

$$C.V.* = (1+1/4n) \times C.V. \quad \text{avec} \quad C.V. = 100\sigma/\mu$$

n = nombre d'analyses
 σ = écart type
 μ = moyenne

7.1.1.2.1 Résultats des tests d'Homogénéité des Broyats des Moss Plates

Afin de déterminer la masse représentative à analyser et la répétabilité des mesures par sous unité du transplant, des Coefficients de Variations Corrigés (C.V.*) sont calculés. Les C.V.* montrent des variations intra- et inter broyats prononcées pour des masses de poudre analysées inférieures à 100 mg (**Tableau A**).

Les C.V.* inter broyat montrent qu'un échantillon de 200 mg prélevé dans chaque sous unité donne une bonne représentation de la teneur globale du transplant. En effet, l'analyse d'échantillons de masse inférieure à 200 mg dans chaque sous unité donne de forts C.V.* (>20 %) pour tous les éléments (sauf Sr, Cd114, Cs, Ba et Pb). Une prise de 200 mg améliore significativement la représentativité des mesures pour les éléments Co, Cu, Zn, As, Rb, Mo, Sb, La et U qui avaient un C.V.* supérieur à 20% pour 50 et 100 mg de poudre. Cependant, malgré les 200 mg d'échantillon analysés dans chaque sous unité, les C.V.* restent très supérieurs à 20 % pour les éléments Co, Ga, As et Th. Th ne semble pas pouvoir être analysé avec cette matrice et ce type de transplants. Les C.V.* de Co et As sont malgré tout inférieurs à 30 % et les résultats des dosages pourront être pris en considération mais seront interprétés avec prudence. Pour Ga, le C.V.* reste élevé (>40%), il ne sera donc pas pris en compte dans les traitements de données ultérieurs.

Eléments	C.V.* inter broyat (%)			C.V.* intra broyat (%)		
	50 mg	100 mg	200 mg	50 mg	100 mg	200 mg
V51	33.2	27.3	2.5	7.3	6.4	8.8
Co59	69.7	44.5	26.8	41.4	29.6	21.3
Cu63	44.2	38.1	18.4	6.9	6.3	8.6
Zn64	44.5	39.9	21.5	6.5	5.7	5.7
Cu65	44.6	40.5	21.1	8.4	6.6	8.5
Zn66	41.6	39.3	20.7	6.1	5.3	5.1
Ga69	56.7	52.1	41.9	12.9	7.6	14.3
As75	61.1	40.7	28	31.4	34.1	23
Rb85	25.5	21.4	9.1	6.4	5.9	6.7
Sr88	14.9	10.8	5.4	4.2	4.2	7
Mo95	98.2	17.4	17.3	82.7	52.7	18.6
Cd111	31.5	23.4	21.4	20.4	10.9	14.6
Cd114	13.4	15.3	8.3	6.1	5.1	8.2
Sb121	30	20.4	12.4	4.9	11.9	3.8
Cs133	8.4	12.2	11.9	5.3	4.1	4.9
Ba138	6.5	7.3	23.7	4.8	4.5	6.1
La139	36.5	31.8	17.3	4.4	21.6	24.8
Pb206	19.3	11	6.9	5.3	4.1	6.5
Pb207	16.4	10.7	6.8	2.9	4.4	4.4
Pb208	16.8	10.3	7	4.2	4.4	5.5
Th232	277.6	-595	169.9	945	-61	144
U238	91.7	204.3	23.4	42.9	-95	14.8

Tableau A : Coefficients de Variation corrigés (C.V.*) (%) inter-et intra broyats calculés de façon empirique pour différentes masses de poudre de mousses analysées (50, 100 et 200 mg). Le C.V.* inter broyat est calculé avec 9 pastilles de mousses (3x50 ; 3x100 et 3x200 mg) prélevées sur chacune des trois sous unités d'un transplant analysée individuellement. Le C.V.* intra broyat est calculé sur un second transplant dont les trois sous unités sont respectivement analysées en 9x50 mg, 9x100 mg et 5x200 mg. Les éléments en gras ont un C.V.* <20% (sauf pour Co).

Globalement, les C.V.* intra broyat sont faibles et en majorité inférieurs à 20% pour les trois masses d'échantillons (50, 100 et 200 mg). Ceci montre que la poudre de mousses réalisée dans chacune des trois sous unités du transplant est homogène. Mais, une prise de 200 mg améliore cependant significativement la représentativité de l'analyse pour les éléments Co, As, Mo et U. Seul Th a de forts C.V.* même pour la masse de 200 mg posant ainsi des problèmes de représentativité des analyses. Cet élément ne peut donc pas être considéré comme homogène pour des analyses de 50, 100 ou 200 mg dans les mousses transplantées.

Limites de Détection et de Quantification

Les limites de détection et de quantification sont déterminées sur les blancs préparés au cours du protocole de minéralisation des mousses.

Les éléments retenus sont ceux dont la limite de quantification est inférieure à la concentration moyenne de l'éléments obtenue dans les mousses au cours de l'expérimentation (6 mois d'exposition).

Les éléments à considérer dans la suite des traitements statistiques des données sont :

Ti, V, Cu, Zn, Ga, Rb, Sr, Cd, Sb, Cs, Ba, La, Pb et U (**Tableau B**).

Les limites de détection et de quantification comparées à la moyenne des dosages confirment, comme pour les C.V.*, la mise de côté des éléments Co, As et Th. Mais, il faut également renoncer à Cr, Ni et Mo pour les analyses statistiques ultérieures car leur moyenne est inférieure aux limites de quantification apportant une incertitude supplémentaire aux mesures. Même si la moyenne de Ga est supérieure à la limite de quantification, il faudra considérer la représentativité des dosages de cet élément avec précaution compte tenu de son fort C.V.*.

Eléments ($\mu\text{g/g}$)	Moyenne (n=140)	écart type	Médiane	Min	Max	LD (3*etb)	LQ (10*etb)
Ti49	17.44	1.1	31.46	19.95	72.94	4.6	15.3
V51	1.3	0.34	1.28	0.75	2.15	0.07	0.23
Cr52	-0.05	0.64	-0.27	-0.63	4.94	0.5	1.67
Co59	0.21	0.14	0.18	-0.32	1.57	0.08	0.27
Ni60	-0.9	0.83	-1.33	-1.74	3.8	0.8	2.67
Cu63	5.74	3.28	5.42	-2	38.06	0.42	1.4
Zn64	67.78	41.1	69.86	-218.6	270.47	1.72	5.73
Cu65	5.53	3.78	5.43	-55.34	37.52	0.35	1.17
Zn66	83.8	153.37	71.03	-58.74	2625.5	0.63	2.1
Ga69	0.82	0.62	0.71	-0.79	4.29	0.02	0.07
As75	0.17	0.18	0.14	-0.35	1.2	0.06	0.2
Rb85	22.97	13.39	24.83	-33.41	86.31	0.08	0.27
Sr88	13.34	6.93	11.97	-7.01	36.23	0.07	0.23
Mo95	0.16	0.08	0.16	-0.11	0.58	0.2	0.68
Cd111	0.23	0.1	0.24	-0.04	0.92	0.03	0.1
Cd114	0.22	0.09	0.23	-0.06	0.81	0.02	0.07
Sb121	0.29	0.17	0.29	-0.17	0.71	0.03	0.11
Cs133	0.58	0.39	0.55	-0.42	3.31	0.01	0.03
Ba138	13.11	6.92	12.94	-6.34	66.21	0.3	1
La139	0.36	0.37	0.3	-1.22	3.3	0.02	0.06
Pb206	9.41	5.12	8.88	-2.68	59.82	0.1	0.33
Pb207	9.85	5.4	9.2	-3.13	61.89	0.09	0.3
Pb208	9.79	5.53	9.16	-3.06	62.77	0.08	0.28
Th232	0.34	0.29	0.2	-0.5	1.4	0.13	0.43
U238	0.11	0.05	0.1	-0.05	0.53	0.01	0.03

Tableau B : Statistiques des analyses des transplants de mousses pour toute la durée d'exposition (3x2 mois, 2 espèces, 4 stations) avec les moyennes, écarts types, médianes, minima et maxima pour les 140 analyses ICP-MS (exprimées en $\mu\text{g/g}$ de matière sèche). Les limites de détection (LD) et de quantification (LQ) sont calculées sur les écarts types des blancs d'analyse (LD=3x etb ; LQ=10x etb). Les éléments grisés ont des moyennes inférieures aux LQ et ne sont donc pas considérés comme quantifiables.

Figures 4, 5, 6 et 7

Un effet "Fractions" est visible pour tous les éléments ce qui montre une répartition différentielle des éléments en fonction des classes de tailles des poussières.

La répartition de Ti entre les tailles de poussières montre une concentration maximale à la classe de taille 3 correspondant à la gamme de tailles 200-40 μm . Les concentrations en Ti sont ensuite plus basses pour les classes 2 et 4 avec les tailles 1000-200 et 40-20 μm pour être minimale à la taille de poussières >1 mm (**Figure 4**).

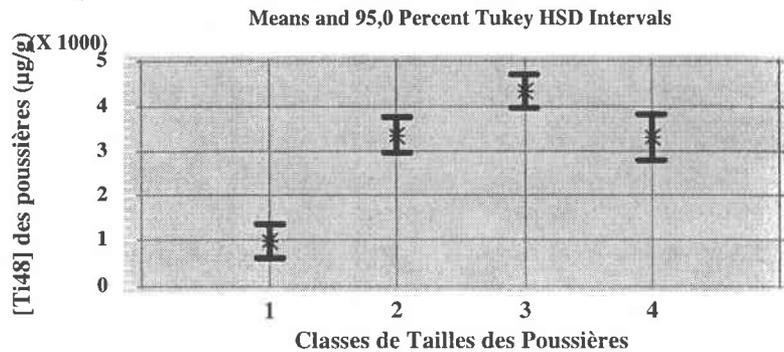


Figure 4 : Effet "Fractions" pour Ti48 ($\mu\text{g/g}$) des poussières (toutes stations, exposition et temps confondus) avec (1) pour les tailles de poussières >1mm; (2) pour les poussières comprises entre 1000-200 μm ; (3) pour les poussières comprises entre 200-40 μm ; (4) pour les poussières comprises entre 40-20 μm . Les comparaisons de moyennes sont effectuées par un test de Tukey HSD (95%).

Cette répartition en dôme est identique pour Sb dont la concentration est maximale pour la classe 3 (200-40). Cette classe de taille est statistiquement supérieure par rapport aux classes 1 et 4 (>1 mm et 40-20 μm) mais n'est pas différente de la classe 2 (1000-200 μm) même si une tendance à la baisse est remarquée pour cette dernière (**Figure 5**).

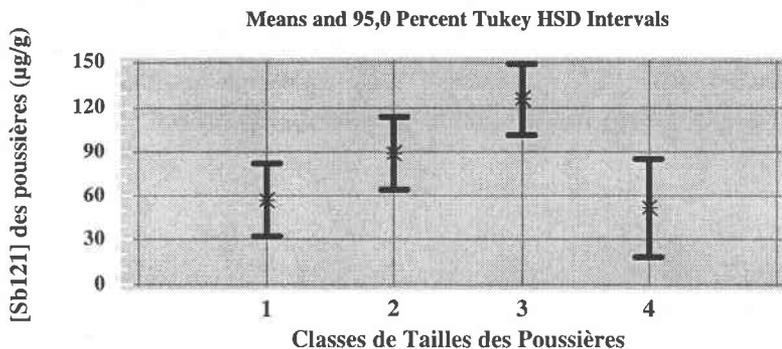


Figure 5 : Effet "Fractions" pour Sb121 ($\mu\text{g/g}$) des poussières (toutes stations, exposition et temps confondus) avec (1) pour les tailles de poussières >1mm; (2) pour les poussières comprises entre 1000-200 μm ; (3) pour les poussières comprises entre 200-40 μm ; (4) pour les poussières comprises entre 40-20 μm . Les comparaisons de moyennes sont effectuées par un test de Tukey HSD (95%).

La répartition de Pb dans les classes de tailles des poussières montre la même répartition de l'élément que pour Sb avec Pb surtout concentré dans les tailles 200-40 μm (**Figure 6**). Il faut remarquer aussi la présence répartie de Pb dans les autres fractions (>1 mm, 1000-200 et 40-20 μm) qui ne sont pas statistiquement différentes. Mais, c'est apparemment la même classe de taille 3 (200-40 μm) qui contiendrait les plus fortes concentrations.

Il y a donc une présence assez homogène de Pb et Sb dans l'ensemble des tailles de poussières récupérées alors que Ti est réparti de façon plus nette entre les tailles de poussières.

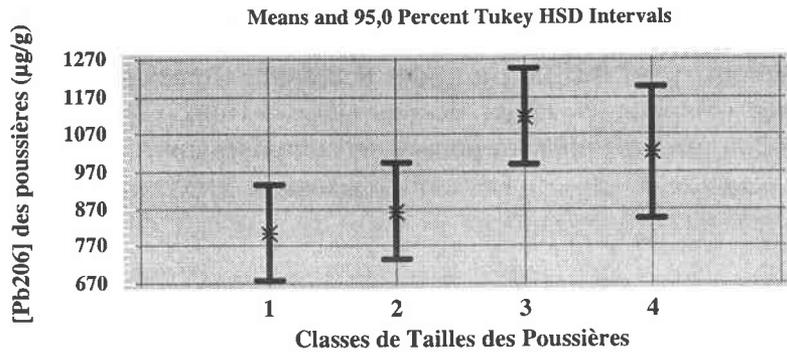


Figure 6 : Effet "Fractions" pour Pb206 ($\mu\text{g/g}$) des poussières (toutes stations, exposition et temps confondus) avec (1) pour les tailles de poussières >1mm; (2) pour les poussières comprises entre 1000-200 μm ; (3) pour les poussières comprises entre 200-40 μm ; (4) pour les poussières comprises entre 40-20 μm . Les comparaisons de moyennes sont effectuées par un test de Tukey HSD (95%).

Pour Ba (**Figure 7**), la répartition de l'élément entre les tailles de poussières ressemble à celle de Zn avec une concentration statistiquement supérieure dans les tailles 1000-200 μm et 40-20 μm par rapport aux autres et surtout à la taille de poussières >1 mm. Il s'agit d'un élément avec une présence ubiquiste dans les trois classes de tailles rassemblant les poussières entre 1000 et 20 μm .

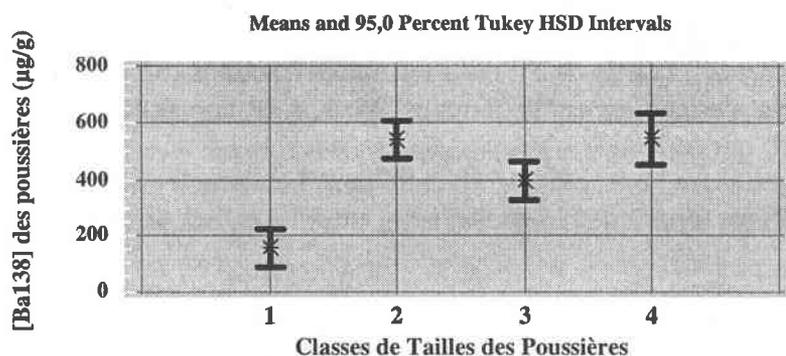


Figure 7 : Effet "Fractions" pour Ba138 ($\mu\text{g/g}$) des poussières (toutes stations, exposition et temps confondus) avec (1) pour les tailles de poussières $>1\text{mm}$; (2) pour les poussières comprises entre $1000\text{-}200\ \mu\text{m}$; (3) pour les poussières comprises entre $200\text{-}40\ \mu\text{m}$; (4) pour les poussières comprises entre $40\text{-}20\ \mu\text{m}$. Les comparaisons de moyennes sont effectuées par un test de Tukey HSD (95%).

Conversion Stock-Flux

Modélisation de la relation Stock-Flux par Régression Multiple, Codage des variables

Pour corrélérer les concentrations multiélémentaires des transplants de mousses à des variables quantitatives (flux de poussières, temps d'exposition) et qualitatives (espèces de mousses, stations d'exposition), des régressions multiples sont utilisées. Elles relient au mieux la variable à expliquer Y ou "variable dépendante" (concentration dans la mousse) avec les variables explicatives X_1, X_2, \dots, X_p ou "variables indépendantes" (variables quantitatives et qualitatives).

L'application d'une telle analyse suppose la vérification préalable de conditions sous jacentes (normalité et équivariance). Au besoin, les variables quantitatives peuvent être transformées par des fonctions logarithmes, par exemple. Il faut également coder les variables qualitatives de façon binaire pour qu'elles entrent dans le modèle.

Quand ces points sont vérifiés, la régression de Y sur X_1, X_2, \dots, X_p peut se traduire par la relation :

$$Y = a_0 + a_1 X_1 + \dots + a_p X_p + \varepsilon, \quad \text{où } \varepsilon \text{ suit une loi normale d'espérance nulle et d'écart type un.}$$

L'ensemble des variables quantitatives et qualitatives transformées et codées se présente sous une matrice finale de la forme :

Variables Quantitatives								Variables Qualitatives			
Y	Eau	F1	F2	F3	F4	t1	t2	Espèce	St1	St2	St3
($\mu\text{g/g}$)	($\mu\text{g/m}^2/\text{t}$)	($\mu\text{g/m}^2/\text{t}$)				(temps)					
(mousses)		(classes de tailles poussières)									
								-1	+1	0	0
								+1	0	+1	0
									0	0	+1
									-1	-1	-1
								$\Sigma =$	0	0	0

Dans le modèle, le codage des variables qualitatives permet de déduire les valeurs des coefficients a_i pour chaque station ou espèce. Si une variable qualitative n'est pas significative, elle n'apparaîtra pas dans le modèle.

Pour sélectionner les variables significatives, la procédure employée a consisté en une régression ascendante puis en une étape de stepwise ou régression descendante. Pour cela, dans la première étape, les variables sont ajoutées les unes après les autres et, en parallèle, les paramètres p-value et R^2 sont observés. L'ajout de variables est arrêté lorsque la p-value n'est plus significative ($p > 0,05$), ce qui signifie qu'il n'est plus nécessaire d'ajouter d'autre variable explicative au modèle. Dans la seconde étape, les variables sont retirées du modèle les unes après les autres afin d'observer sa robustesse. Le gain, ou la perte d'explication, du modèle est observée au travers, là encore, de la p-value et du R^2 . Au bout d'un moment, le modèle se stabilise avec une p-value significative ($p < 0,05$) et un R^2 maximum. Il peut arriver parfois, que des associations fortes (p-value très significative) soient mises en évidence mais qu'elles

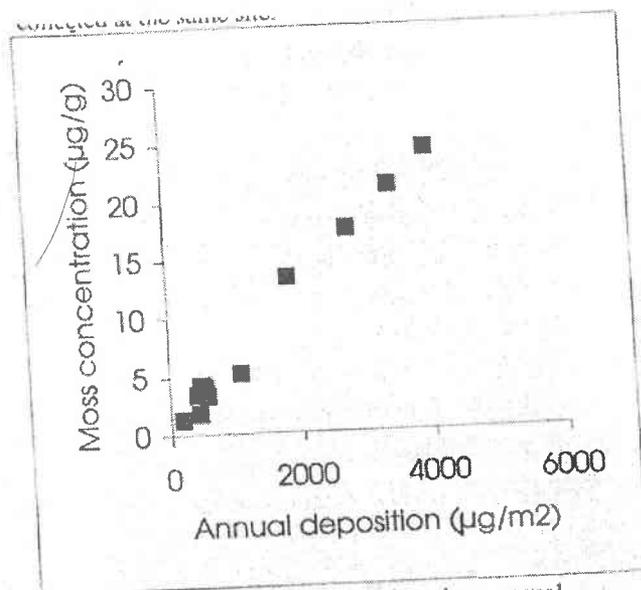


Fig 6. Pb concentration in moss plotted vs. annual deposition of Pb.

Figure 8 : Modélisation de la conversion Stock-Flux obtenue pour Pb entre *Hylocomium splendens* et les flux de retombées atmosphériques humides annuelles (eaux de pluie)(BERG, T. and STEINNES, E., 1997, Use of mosses (*Hylocomium splendens* and *Pleurozium schreberi*) as biomonitors of heavy metals deposition: From relative to absolute values, *Environ. Pollut.*, 98: 61-71).

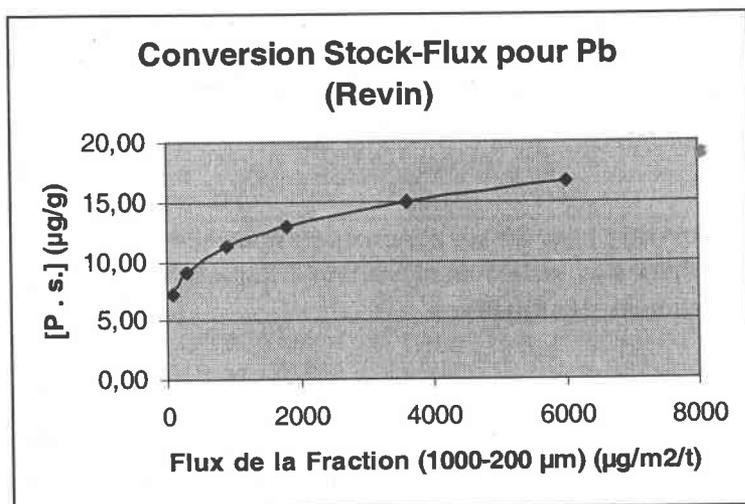


Figure 9 : Modélisation de la conversion Stock-Flux obtenue dans le cadre de la thèse pour Pb entre *Pleurozium schreberi* (P .s.) et les flux de retombées atmosphériques sèches après deux mois d'exposition pour la fraction 1000-200 µm, simulation pour la station de Revin.

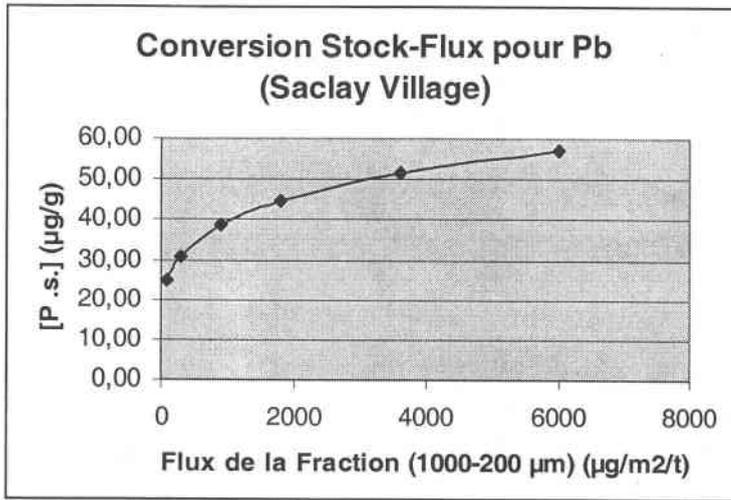


Figure 10 : Modélisation de la conversion Stock-Flux obtenue dans le cadre de la thèse pour Pb entre *Pleurozium schreberi* (P .s.) et les flux de retombées atmosphériques sèches après deux mois d'exposition pour la fraction 1000-200 µm, simulation pour la station de Saclay-Village.

Sb	Flux de Sb (µg/m ²)						
	Station de Revin, "R" (réseau MERA)			Station de Saclay Village, "SV" (réseau CEA)			
[P.s.] (µg/g)	Fraction (1000-200 µm)	Fraction (200-40 µm)	Fraction (40-20 µm)	[P.s.] (µg/g)	Fraction (1000-200 µm)	Fraction (200-40 µm)	Fraction (40-20 µm)
0,14	2	3	1	0,30	2	3	
0,25	4	8	2	0,58	8	12	
0,32	8	12	5	0,89	15	20	1
0,43	15	20	11	1,09	20	28	1

Tableau VIII : Essais de conversion stock-flux pour Sb sur *Pleurozium schreberi* (P .s.) après deux mois d'exposition et pour les deux stations Revin et Saclay-Village, avec les variables quantitatives (fractions de poussières) significatives.

Ti	Flux de Ti (µg/m ²)				
	Station de Revin, "R" (réseau MERA)		Station de Saclay Village, "SV" (réseau CEA)		
[P.s.] (µg/g)	Fraction (>1 mm)	Fraction (40-20 µm)	[P.s.] (µg/g)	Fraction (>1 mm)	Fraction (40-20 µm)
25,36	40	600	44,65	40	600
25,50	100	1200	44,91	100	1200
25,97	700	5000	45,72	700	5000
27,25	2000	8000	47,99	2000	8000

Tableau IX : Essais de conversion stock-flux pour Ti sur *Pleurozium schreberi* (P .s.) après deux mois d'exposition et pour les deux stations Revin et Saclay-Village, avec les variables quantitatives (fractions de poussières) significatives.

Annexes Chapitre IV

1. **Principe de la Méthode d'Analyse par SXRF (Synchrotron Radiation induced X-Ray Fluorescence) ;**
2. **Principe de la Méthode d'Analyse par PIXE (Particle Induced X-Ray Emission) ;**
3. **Schémas des protocoles expérimentaux appliqués au Biomonitoring Passif**
 - **Protocole Général ;**
 - **Protocole pour estimer l'effet d'un pré-traitement par Lavage des Brins ;**
 - **Protocole pour estimer l'effet d'un pré-traitement par Lavage des Brins avec ou sans Ajout Initial de Zn (50 µg/l) ;**
4. **Schéma du protocole expérimental appliqué au Biomonitoring Actif ;**
5. **Schéma du protocole expérimental pour Micro faisceau PIXE ;**
6. **Détails des résultats :**
 - **Analyses ICP-MS des mousses échantillonnées dans les 7 Sites ;**
 - **Analyses ICP-MS des mousses transplantées sur les Sites A et B ;**
 - **Régressions linéaires de As, Ba, Cu, Ni, Pb, Ti et Zn pour conversion entre les données SXRF et ICP-MS ;**
 - **Effets du Lavage des brins :**
 - **comparaison des pastilles SXRF/ICP-MS ;**
 - **avec ou sans ajout initial de Zn ;**

Principe de la Méthode d'Analyse par SXRF (Synchrotron Radiation induced X-Ray Fluorescence)

Rayons X

Les rayons X sont des ondes électromagnétiques de longueur d'onde de l'ordre de 1 \AA , produites par le bombardement d'électrons sur une substance. Les rayons X représentent le rayonnement le plus énergétique que puisse émettre un atome. Depuis plusieurs années, on utilise des anneaux de stockage à électrons, ou positrons, pour produire des flux intenses de rayons X. On observe qu'une particule chargée en accélération émet une onde électromagnétique. Ce phénomène peut se produire dans une antenne d'un émetteur radio (courant alternatif= accélération d'électrons) mais, il peut aussi s'agir d'une accélération radiale des électrons, en orbite circulaire sous l'effet d'un champ magnétique uniforme (**Figure A**). On parle alors de **Rayonnement Synchrotron**.

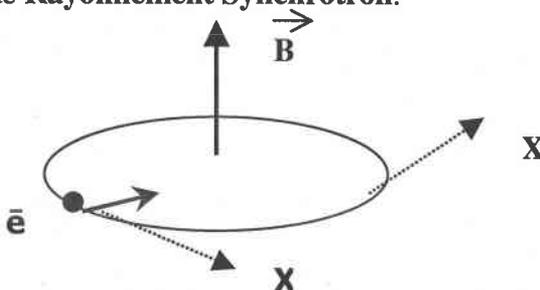


Figure A : Emissions de rayons X par accélération radiale d'un électron (e), en orbite circulaire sous l'effet d'un champ magnétique uniforme (B).

Les émissions X obtenues forment un large spectre (du visible aux X durs) et peuvent être décomposées et fournir des faisceaux monochromatiques X beaucoup plus intenses et beaucoup plus directs que ceux obtenus avec des tubes classiques. De part la taille des anneaux à électrons qu'elle impose, cette technique est réservée à quelques laboratoires dans le monde, tel que le LURE (Laboratoire pour l'Utilisation du Rayonnement Electromagnétique) à Orsay.

Spectres de Fluorescence X et Pic de Diffusion

L'irradiation d'un échantillon par un faisceau de photons de quelques keV conduit à la création d'ionisations dans les couches électroniques profondes des atomes de l'échantillon. Le spectre de fluorescence X émis au cours du réarrangement du cortège électronique est caractéristique de l'espèce atomique ionisée et son intensité est proportionnelle à la quantité d'atomes de cette espèce présents dans l'échantillon. L'étude du spectre de fluorescence X constitue donc une méthode d'analyse qualitative et quantitative (**Tableau I**).

L'interaction du rayonnement avec la matière ne conduit pas uniquement à la création d'ionisations : les photons peuvent également subir une diffusion avec ou sans changement d'énergie. Ces phénomènes de diffusion sont responsables du bruit de fond mais peuvent aussi contribuer à connaître la quantité de matière sous le faisceau. On distingue deux types de diffusion : la diffusion élastique et non élastique. La diffusion élastique, ou diffusion de Rayleigh, correspond à la diffusion sans changement de longueur d'onde des photons du faisceau incident sur les électrons liés. La diffusion inélastique correspond à la diffusion avec perte d'énergie du photon incident sur les électrons "libres". On l'appelle également diffusion Compton. C'est la diffusion élastique qui a été utilisée pour les mousses afin de normaliser les acquisitions par rapport à la quantité de matière sous le faisceau.

<u>Eléments</u>	<u>Raies détectées</u>	<u>Energie (keV)</u>
S	Ka1	2.308
K	Ka1	3.314
Ca	Ka1	3.692
Ti	Ka1	4.511
Cr	Ka1	5.415
Mn	Ka1	5.899
Fe	Ka1	6.404
	Kβ1	7.058
Ni	Ka1	7.478
Cu	Ka1	8.048
Zn	Ka1	8.639
	Kβ1	9.572
Pb	La1	10.55
	Lβ1	12.61
Se	Ka1	11.222

Tableau I : Eléments analysés dans les expérimentations avec les mousses avec les raies détectées (Ka et La, raies K alpha et L alpha ; Kβ et Lβ, raie K bêta et L bêta) et leur énergie correspondante.

Description des machines

Ce sont souvent des anneaux de stockage d'électrons ou de positrons.

Les particules produites dans un canon à électrons sont accélérées par des klystrons dans un accélérateur linéaire puis parfois dans un petit anneau synchrotron appelé " booster " qui porte les particules à énergie nominale avant d'être injectées dans l'anneau de stockage proprement dit. Le choix de l'accélérateur conditionne le domaine spectral du laser. l'IR lointain correspond à un accélérateur de Van de Graff ou microtron (1 à 5 MeV), IR proche accélérateur linéaire (10 à 200 MeV), l'UV et anneaux de stockage (0,2 à 1,5 GeV).

Equipement associé au Rayonnement Synchrotron

Lignes de lumière :

Une fois issue de l'anneau, la nappe de rayonnement circule dans un tube (ou ligne de lumière) et est divisée pour alimenter plusieurs expériences. Aux extrémités des lignes de lumière, on trouve les expériences qui se divisent en 3 parties : l'Optique, le Poste de Travail et le Détecteur,

L'Optique :

Il transforme le rayonnement sorti de la ligne de lumière en un rayonnement adapté à l'utilisation souhaité (énergie incidente, taille du faisceau).

Il est composé de :

- Monochromateurs pour les RX : lame cristalline (silicium, germanium) qui sélectionne une longueur d'onde (et ses harmoniques). Pour les UV, on utilise des réseaux. La réflectivité des métaux varie fortement avec l'angle d'incidence et la longueur d'onde du rayonnement pour les UV proches, monochromateurs à incidence normale et à incidence rasante pour les X mous.

- Miroirs : ils travaillent en incidence rasante, éliminent les harmoniques du rayonnement fondamental choisi issu des monochromateurs et focalisent le faisceau dans une direction perpendiculaire à celle obtenue par le monochromateur. Dans le meilleur des cas, on le concentre sur une section de 200 x 200 μm .

- Collimateurs : pour les RX, ils limitent la taille du faisceau incident sur l'échantillon. Ce sont des trous coaxiaux qui permettent de descendre à des diamètres de faisceau de quelques μm .

Pour atteindre l'ordre du μm (et même moins), il est possible d'utiliser des lentilles à RX dérivées des lentilles de Bragg-Fresnel. Elles focalisent le faisceau et permettent d'obtenir un flux élevé concentré sur une surface de l'ordre du μm^2 . Cela permet des microanalyses.

Le Poste d'Analyse : Diffraction, Absorption ou Emission.

Pour les RX, toutes les expériences sont enfermées dans des enceintes imperméables aux rayonnements. Pas besoin de protection pour les UV et les RX mous. Les expériences avec le Rayonnement Synchrotron ont un mode de fonctionnement continu jour et nuit.

Environnement d'Echantillons :

- Pour les RX durs ($E > 3 \text{ keV}$), l'échantillon est placé à l'air (fenêtre de Béryllium) ;
- Pour les RX mous ($E < 3 \text{ keV}$), l'échantillon est placé sous vide (pas de fenêtre convenable).

Dans le 1er cas, l'échantillon peut être étudié dans un environnement spécifique (cellule haute, basse pression, température, atm réactive, chauffage laser...). Il y a une grande flexibilité et donc une grande variété d'applications.

Les Détecteurs :

Les détecteurs de photons utilisés dépendent du type de mesure souhaité. Compteur ponctuel, détecteurs linéaires, bidimensionnels...Parfois, le développement de certains paramètres se fait au détriment des autres.

Utilisation actuelle du rayonnement synchrotron

L'utilisation principale de ces sources de lumières concerne la caractéristique et l'analyse des matériaux, au niveau atomique au-delà des techniques classiques essentiellement par des expériences d'absorption, diffraction et émission.

Performances de la Fluorescence X avec Rayonnement Synchrotron

(Fluorescence X avec Rayonnement Synchrotron, microsonde X)

L'analyse élémentaire à 100 atogrammes 10^{-16} g est ultime. De l'imagerie avec une résolution latérale inférieure au μm et pour des surfaces de l'ordre du μm^2 est possible. La sensibilité est très bonne et inférieure à 1 $\mu\text{g/g}$ pour les éléments lourds. Une grande flexibilité pour l'environnement de l'échantillon offre de nombreuses possibilités d'analyse de matériaux et la durée minimale d'une prise de donnée, de l'ordre de la microseconde, permet la multiplication des analyses. La détérioration de l'échantillon est très faible mais elle dépend bien évidemment de l'énergie du faisceau incident et intervient plus facilement pour les échantillons à faible Z.

Technique de caractérisation et d'analyse

Fluorescence

C'est la réémission de photons d'énergie plus faible que l'énergie incidente suite à des processus de re-structuration électronique de l'atome (fluorescence X), ou au niveau des liaisons chimiques (fluorescence UV). Les longueurs d'ondes des faisceaux re-émis sont caractéristiques des atomes ou des liaisons chimiques.

Technique d'émission de particules et de rayonnement

Fluorescence X (FX)

L'analyse par FX est une méthode non destructive et parfaitement adaptée à la caractérisation qualitative et quantitative d'éléments en faible teneur. Le Rayonnement Synchrotron constitue une source idéale pour l'excitation de la FX. et ses caractéristiques peuvent améliorer les limites de détection de très petites quantités de matière.

Le spectre continu permet de travailler avec un faisceau monochromatique à n'importe quelle énergie (rayonnement diffusé pratiquement supprimé). Le haut flux recule les limites de détection. La surface parfaitement plane attaquée en incidence rasante par le RX réfléchi totalement : profondeur de pénétration est très faible et la surface analysée est importante. Les limites de sensibilité du domaine sont de l'ordre du femtogramme.

Le haut flux et la faible divergence peuvent être exploités à la réduction de la taille du faisceau d'analyse. Les lentilles de Bragg-Fresnel permettent d'obtenir des faisceaux monochromatiques de l'ordre du μm et même inférieur. C'est le nouveau champs de la microanalyse par fluorescence X.

La microanalyse trouve de nombreuses applications dans les sciences de la vie, toxicologie, biologie cellulaire. Dans le domaine de l'Environnement ou les sciences de la terre, la FX permet l'analyse des traces dans divers matériaux.

Bibliographie

Nenner, I.; Doucet, J.; Dexpert, H.; Rayonnement Synchrotron et Applications, Collection Techniques de l'ingénieur, Traité Analyse et Caractérisation, P 2700, **1996**, 23p.

Chevallier, P.; Dhez, P.; Legrand, F.; Erko, A.; Agafonov, Y.; Panchenko, L.A.; Yakshin, A.; J. Trace and Microprobe Techniques, **1996**, 14(3), 517-539.

Legrand, F.; **1995**, Mise au point d'une microsonde par Fluorescence X excitée par le rayonnement synchrotron, Thèse de Doctorat, Université d'Orsay-Paris XI, 156 p.

Principe de la Méthode d'Analyse par PIXE (Particle Induced X-Ray Emission)

Principe

Les émissions de particules ou de rayonnement qui accompagnent la pénétration des ions légers dans la matière, à une énergie incidente de quelques MeV, ont donné lieu à plusieurs méthodes de dosage élémentaire. La focalisation de ces faisceaux de particules à l'échelle du micromètre sur les échantillons a conduit à la réalisation d'une génération d'instruments appelés **microsondes nucléaires**. Cette technique permet la localisation latérales très fines directement liées à la taille des faisceau et accède ainsi à la microrépartition des éléments dans les tris dimension. Les applications concernent des disciplines aussi variées que la physique du solide, la métallurgie, la géochimie, la biologie, la médecine, l'archéologie...

La microsonde du Laboratoire Pierre Süe est opérationnelle depuis 1993. Son principe de fonctionnement est l'utilisation de réactions atomiques ou nucléaires induite par des faisceaux de particules légères (protons, deutons, helium-3 et alpha) d'énergie comprise entre 0,3 et 3,8 MeV. Le faisceau peut descendre à une taille de quelques microns. Deux lignes d'analyse sont disponibles, une ligne dédiée à l'analyse des échantillons non radioactifs et une deuxième uniquement utilisée pour les matériaux irradiant.

Dans le domaine d'énergie des microsondes nucléaires, l'interaction avec les atomes de la cible est principalement d'origine électronique. Les ions perdent partiellement leur énergie par interaction avec les électrons de ces atomes, provoquant ainsi une forte ionisation. En revanche, ils sont très peu déviés de leur trajectoire qui demeure rectiligne. La réorganisation des atomes de la cible se fait par émissions de rayons X et d'électrons Augers.

Emission X induite par des particules chargées (PIXE)

Cette méthode est utilisée pour des analyses quantitatives et qualitatives.

Après ionisation des atomes de l'échantillon par le faisceau d'ions, ils se réorganisent rapidement (10^{-17} à 10^{-13} s) pour retomber vers un état d'énergie plus faible. Deux processus de relaxation de l'atome ionisé sont en compétition : l'émission de rayon X caractéristique et l'effet Auger. Au cours de ces deux processus, un électron d'un niveau externe vient combler la lacune initiale. L'énergie libérée au cours de cette transition peut être :

- soit dissipée sous forme de rayonnement, c'est l'émission X ;
- soit transférée à un autre électron de l'atome et permettre son éjection, c'est l'effet Auger.

Aspects Analytiques

Des détecteurs à semiconducteurs constitués de Si dopé au Li sont utilisés et leur résolution est au mieux de 140 eV à 5,9 keV. Le programme RISMIN utilisé au LPS permet le dépouillement des spectres et la réalisations à posteriori de cartes bidimensionnelles des répartitions élémentaires.

Avec des faisceau de l'ordre du micromètre, il est possible d'atteindre des limites de détection de l'ordre de 10^{-5} g avec une microsonde électronique, alors que les limites sont en général de 10^{-3} g avec les microsondes électroniques classiques. L'utilisation du balayage XY permet d'obtenir, au cours d'une même analyse, la cartographie d'un grand nombre d'éléments à l'échelle micrométrique. L'analyse multiélémentaire PIXE est très sensible pour les éléments avec $Z > 11$.

Appareillage

Une microsonde nucléaire se compose habituellement d'un accélérateur de particules, d'une ou plusieurs lignes de faisceau, d'un système de focalisation et de balayage, d'une chambre d'analyse et d'une informatique de gestion d'acquisition et de traitement des signaux.

Schémas des protocoles expérimentaux appliqués au Biomonitoring Passif

Protocole Général ;

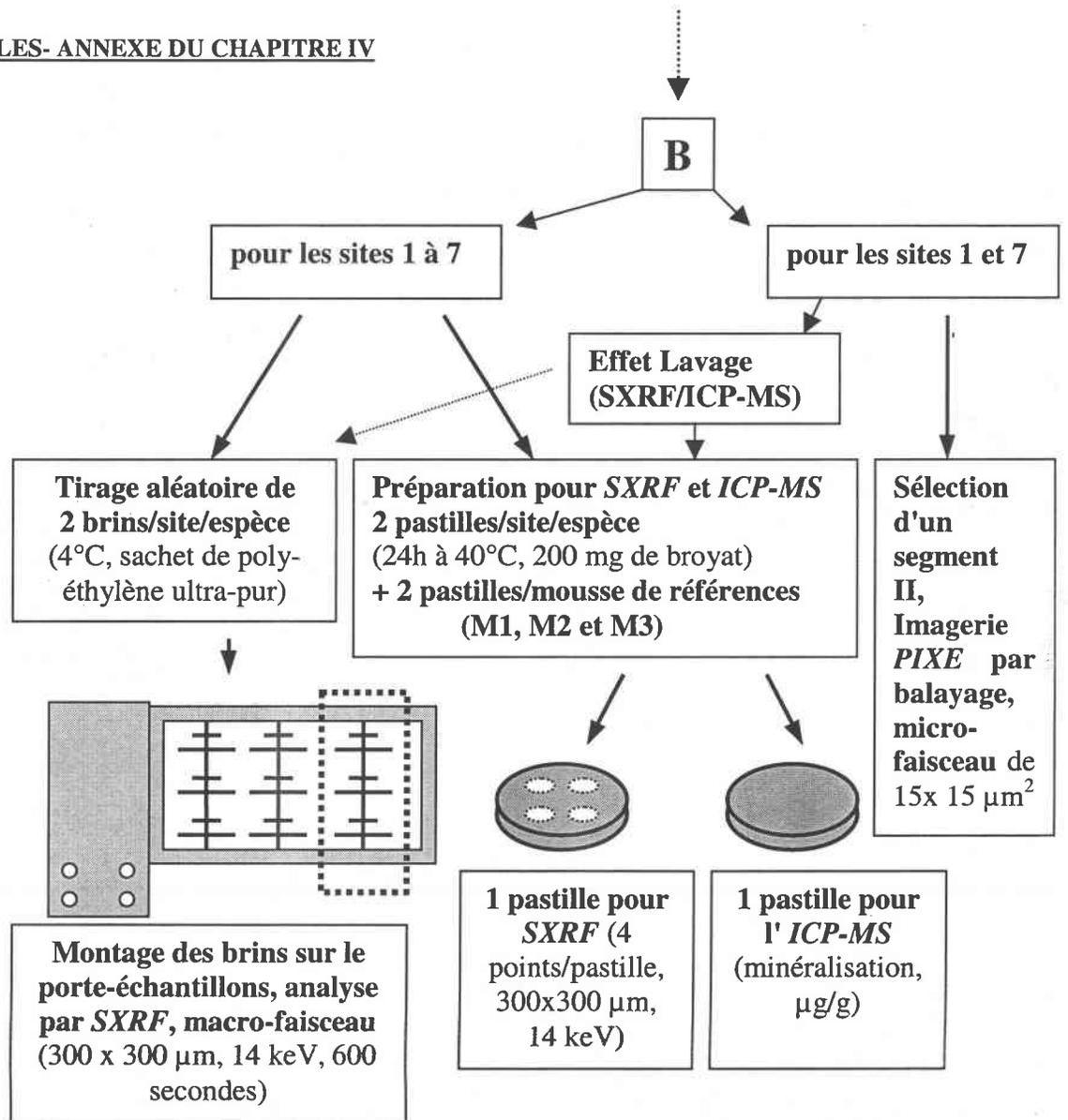
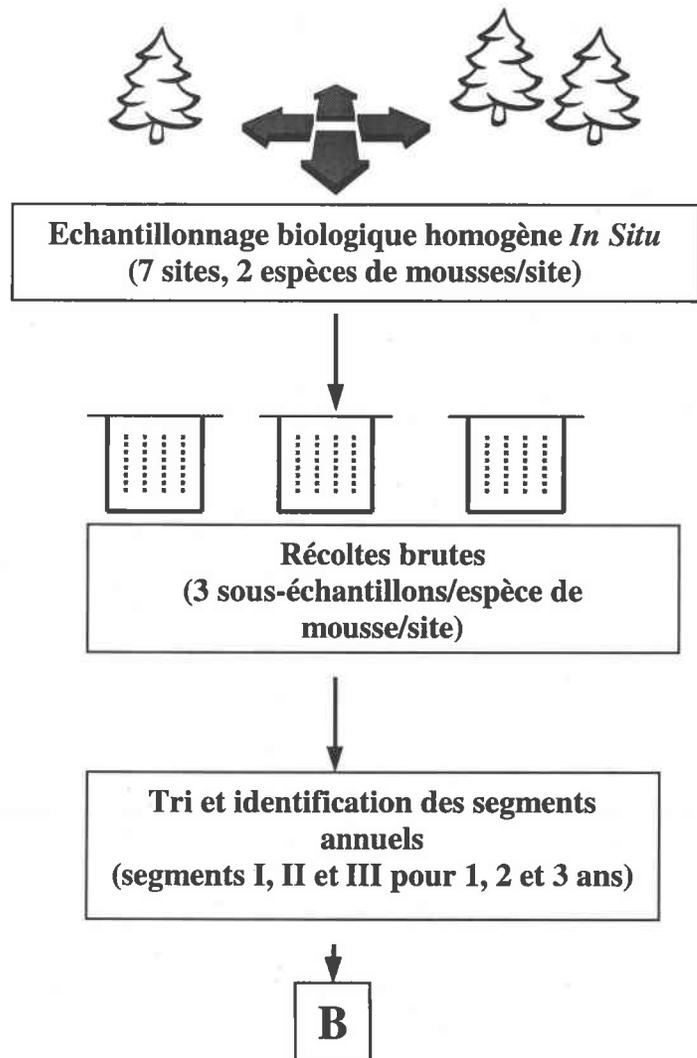


Figure 1 : Schéma du protocole expérimental appliqué au Biomonitoring Passif, depuis l'échantillonnage de terrain jusqu'aux analyses par SXRF, ICP-MS et PIXE. Après un échantillonnage homogène de 2 espèces de mousses/site (sites 1 à 7), les brins sont triés et les segments annuels identifiés. 2 brins/espèce/site sont choisis aléatoirement pour l'étude de la distribution des éléments le long du brin par SXRF (macro-faisceau de $300 \times 300 \mu\text{m}^2$, 14 keV, 600 secondes). Le reste des échantillons est broyé et partagé en 2 pastilles : 1 pour la SXRF (4 points/pastille, de $300 \times 300 \mu\text{m}^2$, 14 keV, 600 secondes), 1 pour l'ICP-MS. Le balayage PIXE de 4 mm^2 par micro-faisceau ($15 \times 15 \mu\text{m}^2$, 3 MeV, 1 nA) est effectué sur 1 segment annuel II (2 ans) prélevé sur *Eurhynchium praelongum*, sites 1 et 7.

Protocole pour estimer l'effet d'un pré-traitement par Lavage des Brins

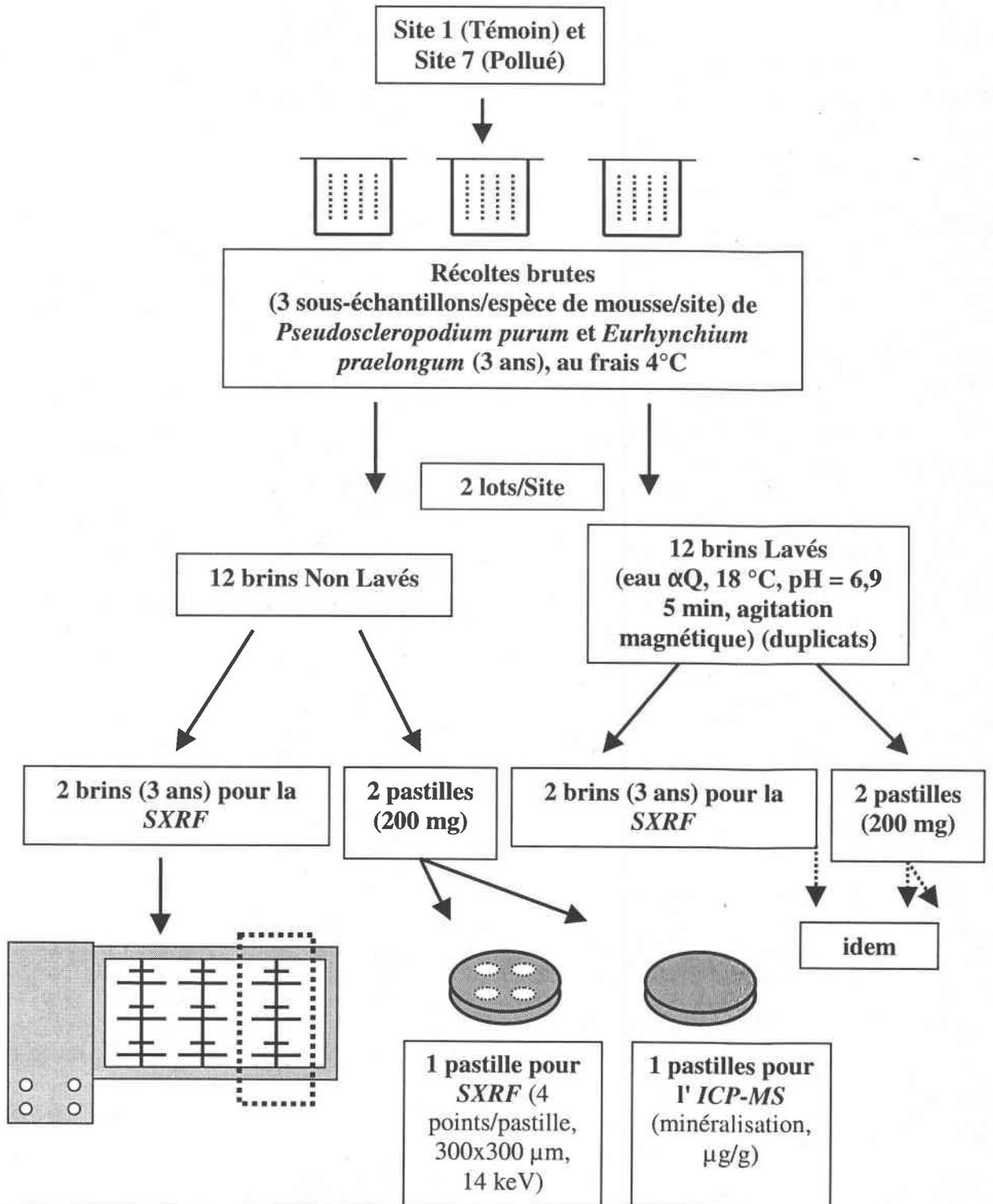


Figure 2 : Schéma du protocole expérimental pour estimer l'effet d'un pré-traitement par lavage appliqué à *Pseudoscleropodium purum* et *Eurhynchium praelongum* des Sites 1 et 7 (site témoin, supposé indemne de toute pollution ; site pollué avec émissions riches en Pb et Ba).

12 brins de *Pseudoscleropodium purum* sont répartis en 2 groupes : non lavés et lavés (200 ml d'eau ultra pure αQ , 18°C, pH = 6,9 ; 5 minutes sous agitation magnétique). Les mousses sont retirées du bain, 2 brins de chaque lot sont analysés par macro-faisceau SXRF (montage porte-échantillons ; 300 x 300 μm^2 , 14 keV, 600 s). Le reste des lots est séché, broyé et pastillé en 2 pastilles, l'une pour la SXRF (4 points/pastilles en macro-faisceau) et l'autre pour l'ICP-MS (minéralisation et dosage multiélémentaire en $\mu g/g$).

Protocole pour estimer l'effet d'un pré-traitement par lavage des brins avec ou sans ajout initial de Zn (50 µg/l)

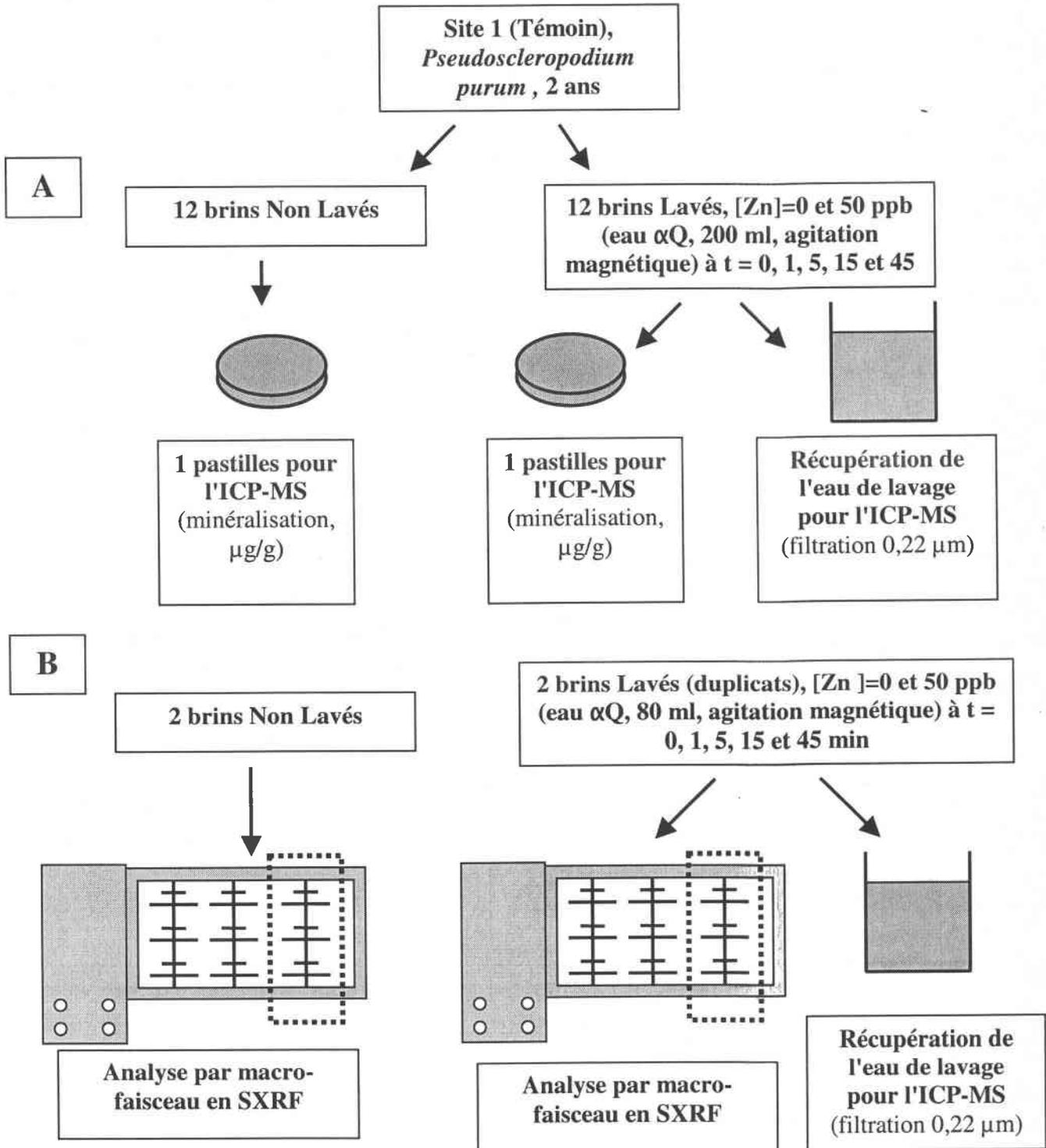


Figure 3 : Schéma du protocole expérimental appliqué à *Pseudoscleropodium purum* du Site 1 (site témoin supposé indemne de toute pollution) pour estimer l'effet temporel du pré-traitement par lavage (200 ml d'eau ultra-pure αQ, 18°C, pH = 6,9 ; agitation magnétique) sur un nombre différent de jeunes brins (2 ans) avec ou sans ajout initial de Zn :

A- 12 brins dans 2 groupes non lavés et lavés ([Zn]=0 et 50 ppb). A t = 0, 1, 5, 15 et 45 minutes les mousses sont retirées du bain, séchées, pastillées et minéralisées et l'eau de lavage est filtrée (0,22 µm). L'ensemble est analysé par ICP-MS ;
B- 2 brins dans 2 groupes non lavés et lavés. A t = 0, 1, 5, 15 et 45 minutes les mousses sont retirées du bain et analysées par SXRF (300 x 300 µm², 14 keV, 600 s). L'eau de lavage est filtrée (0,22 µm) et analysée par ICP-MS.

Schéma du protocole expérimental appliqué au Biomonitoring Actif

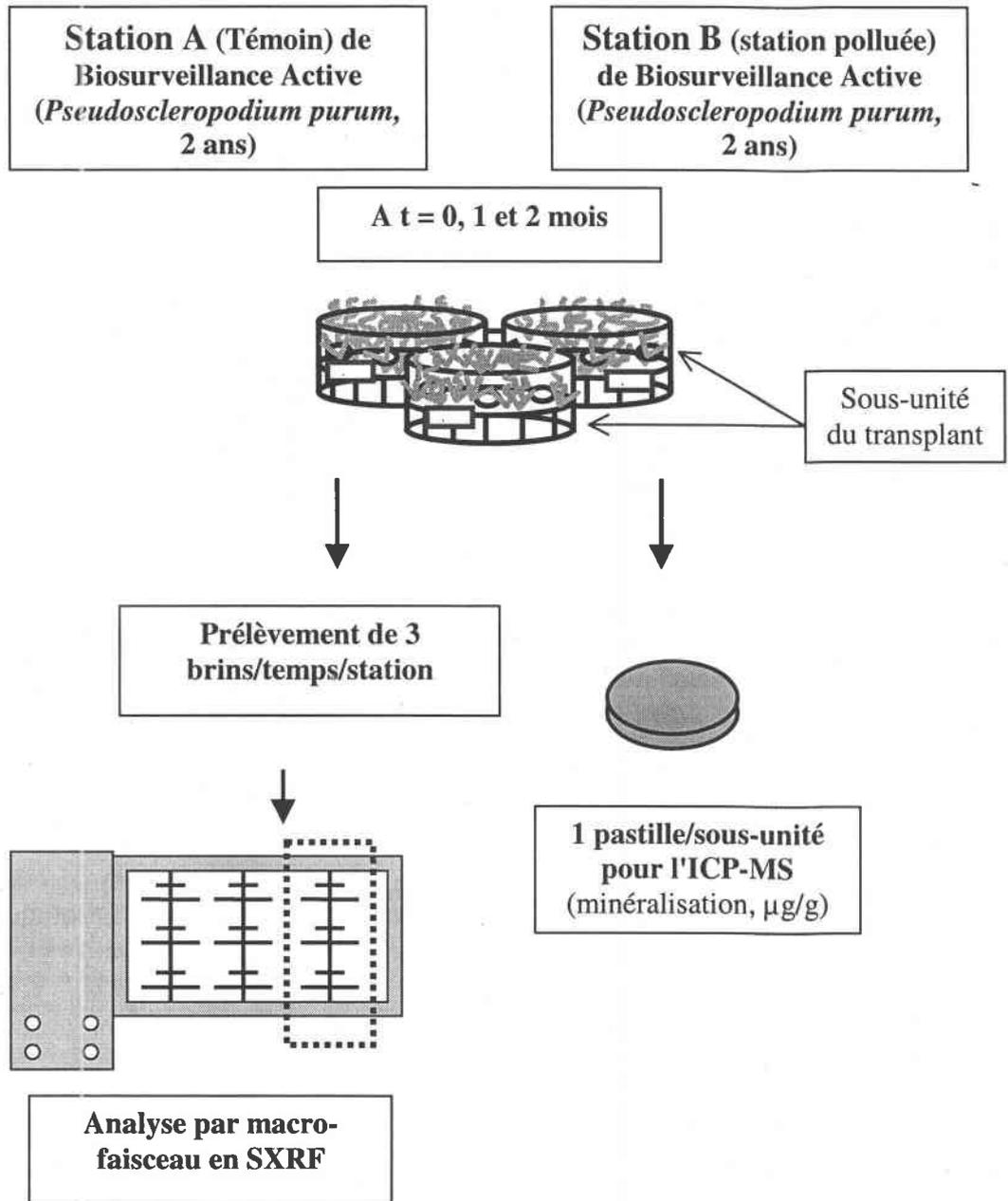


Figure 4 : Schéma du protocole expérimental appliqué au Biomonitoring Actif des stations A (station témoin, supposée indemne de toute pollution) et B (station polluée, forte influence automobile) par *Pseudoscleropodium purum* (2 ans). L'influence d'une exposition court terme (2 mois maximum) sur la distribution des éléments a été estimée aux temps $t = 0, 1$ et 2 mois d'exposition pour 3 brins/station/temps. Les pastillage et minéralisation des mousses transplantées ont été faits pour l'analyse parallèle en ICP-MS.

Schéma du protocole expérimental pour l'analyse en Micro faisceau PIXE

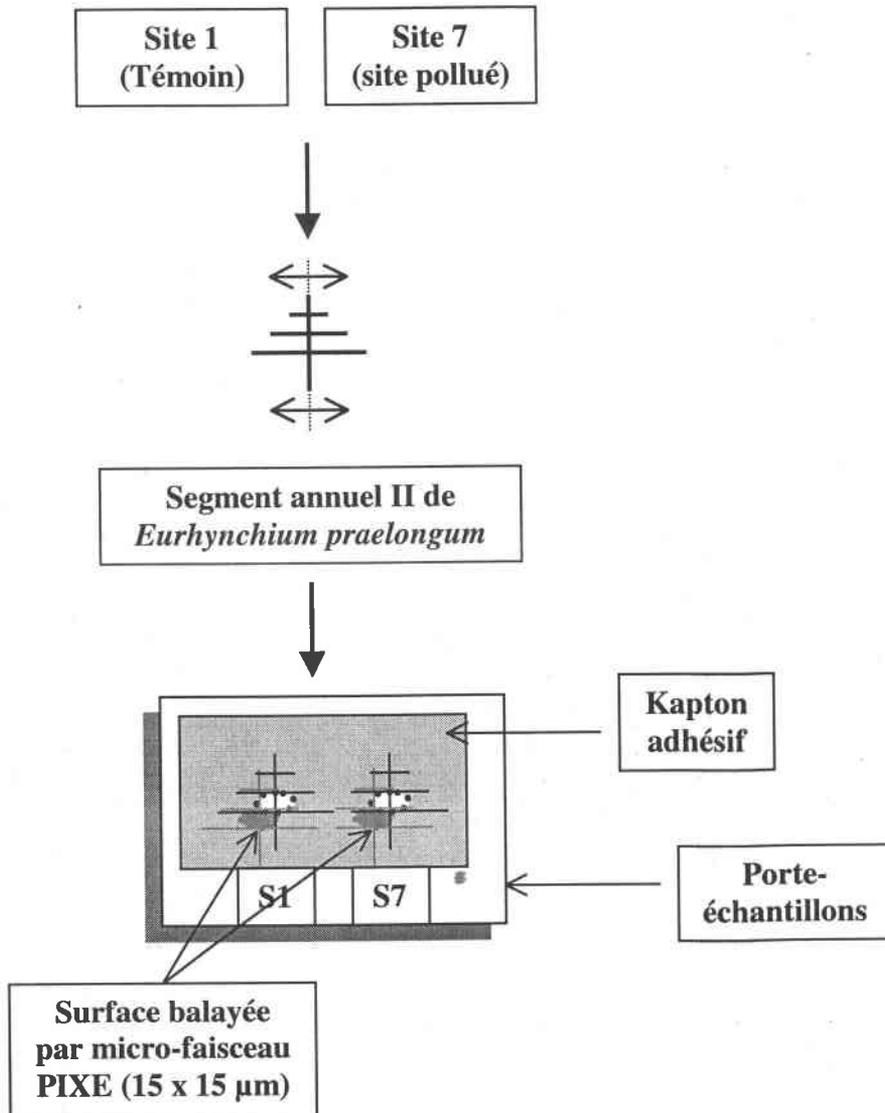


Figure 5 : Schéma du protocole expérimental appliqué au balayage en micro-faisceau PIXE ($15 \times 15 \mu\text{m}^2$, 3 MeV, 1 nA) des segments annuels II de *Eurhynchium praelongum* des sites 1 et 7 (témoin ; pollué). Les segments annuels II sont collés sur du kapton adhésif disposé sur porte-échantillons. Des balayages par micro-faisceau de 4 mm^2 (pas de $20 \mu\text{m}$, 10 ms/point) sont effectués ainsi que des agrandissements des agglomérats de poussières ($0,2 \text{ mm}^2$ balayé, 7 s/point).

Détails des résultats

Analyses ICP-MS des mousses échantillonnées dans les 7 Sites

Sites	Espèces	Départements		As	Ba	Cr	Cu	Ni	Pb	Ti	Zn
1	Sp	77	Seine et Marne	0,4	21,9	4,2	5,7	1,4	10,3	60,9	33,6
	Ps	77	Seine et Marne	0,4	20,6	4	6,1	2,3	12,5	63,2	59,9
2	Ps	4	Alpes de Haute	0,2	26	0,7	4,8	<2,5	7,1	33	28
	Sp		Provence	<0,3	32	2	3,2	<2,5	7,4	36	34
3	Ps	66	Pyrénées Orientales	0,7	44	4,8	7,5	2,5	21	176	27
4	Ps	70	Haute Saône	0,4	30	2,9	6,5	2	27,8	61,5	55
5	Sp	78	Yvelines	0,9	31	6	9,6	4	29,2	119	70
6	Sp	93	Seine St Denis	0,5	47	4,9	14,7	3,9	56,5	83	97
7	Sp	77	Seine et Marne	13,9	119,6	7,7	3,1	4,7	94,5	279,8	45,1
	Ep	77	Seine et Marne	22,5	469,6	8,5	5	10,8	316,5	142,5	43,4

Tableau 2 : Description des sites de prélèvements 1 à 7 (Chapitre IV, FIGURE 1) en fonction des espèces de mousses échantillonnées (Sp, *Pseudoscleropodium purum* ; Ps, *Pleurozium schreberi* ; Ep, *Eurynchium praelongum*) et des concentrations d'éléments mesurées en ICP-MS ($\mu\text{g/g}$ ou ppm).

Analyses ICP-MS des mousses transplantées sur les Sites A et B

Sites	Espèce	Départements	Temps d'exposition	As (ppm) μ+-int conf	Ba (ppm) μ+-int conf	Cr	Cu (ppm) μ+-int conf	Ni	Pb (ppm) μ+-int conf	Ti (ppm) μ+-int conf	Zn (ppm) μ+-int conf
A	Sp	67 Bas Rhin	t= 0	0,05+-0,04	9,08+-2,23	ld	4,12+-0,08	ld	5,07+-1,43	19,95+-0,07	51,6+-12,51
	Sp	67 Bas Rhin	t= 1 mois	0,14+-0,02	9,37+-0,33	ld	5,77+-0,19	ld	6,91+-0,12	32,22+-4,07	121,2+-16,78
	Sp	67 Bas Rhin	t= 2 mois	0,10+-0,02	10,66+-2,61	ld	4,64+-0,16	ld	7,27+-0,63	32,48+-1,43	70,28+-1,23
B	Sp	91 Essonne	t= 0	0,05+-0,04	9,08+-2,23	ld	4,12+-0,08	ld	5,07+-1,43	19,95+-0,07	51,6+-12,51
	Sp	91 Essonne	t= 1 mois	0,14+-0,01	15,93+-0,18	ld	5,41+-0,17	ld	8,06+-0,5	37,72+-1,07	51,77+-2,14
	Sp	91 Essonne	t= 2 mois	0,22+-0,04	25,61+-6,16	ld	7,48+-1,22	ld	9,73+-1,58	58,91+-13,21	81,81+-12,55

Tableau 3 : Evolution temporelle de la concentration multiélémentaire (μg/g ou ppm) des transplants de *Pseudoscleropodium purum* (Sp) ex 2 stations A (site témoin) et B (site sous influence automobile) dans l'expérimentation de Biosurveillance Active. Les moyennes (μ) et leur intervalle de confiance à 95 % (int conf) correspondent aux mesures ICP-MS exprimées en μg/g (ou ppm) et effectuées sur chaque sous-unité de transp. Seuls Cr et Ni n'ont pu être dosés en raison de problèmes de limites de détection. ld : limite de détection

**Analyses de Régressions sur As, Ba, Cu, Ni, Pb, Ti et Zn pour la conversion
entre les données SXRF *in vivo* et ICP-MS**

Modèle de régression linéaire pour As

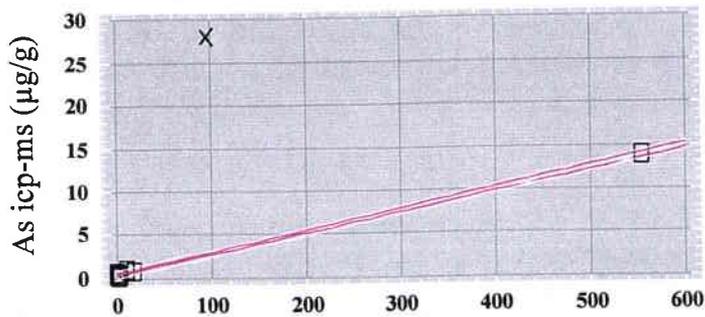


Figure 6 : As

$R^2 = 99,90\%$

$As\ icp-ms = 0,3757 + 0,0244 * As\ SXRF$

$S_r = 0,1549$

As SXRf des brins de mousses (taux de comptage/taux de diffusion)

Modèle de régression linéaire pour Ba

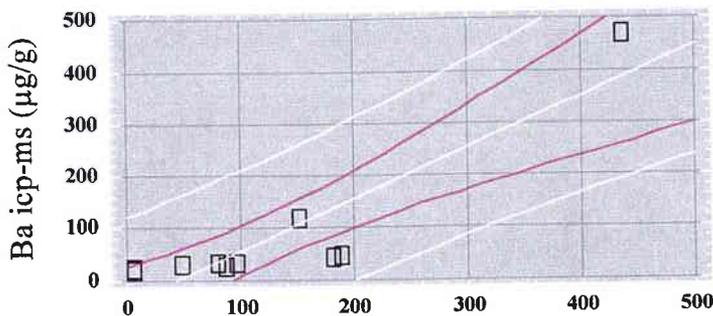


Figure 7 : Ba

$R^2 = 80,97\%$

$Ba\ icp-ms = -41,96 + 0,9865 * Ba\ SXRF$

$S_r = 64,0716$

Ba SXRf des brins de mousses (taux de comptage/taux de diffusion)

Modèle de régression linéaire pour Cu

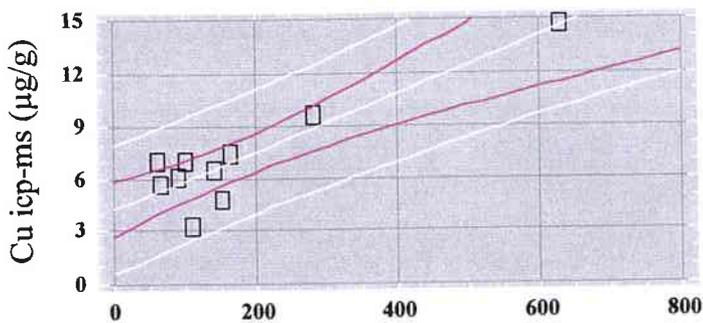


Figure 8 : Cu

$R^2 = 80,37\%$

$Cu\ icp-ms = 4,2679 + 0,01643 * Cu\ SXRF$

$S_r = 1,4687$

Cu SXRf des brins de mousses (taux de comptage/taux de diffusion)

Modèle de régression linéaire pour Ni

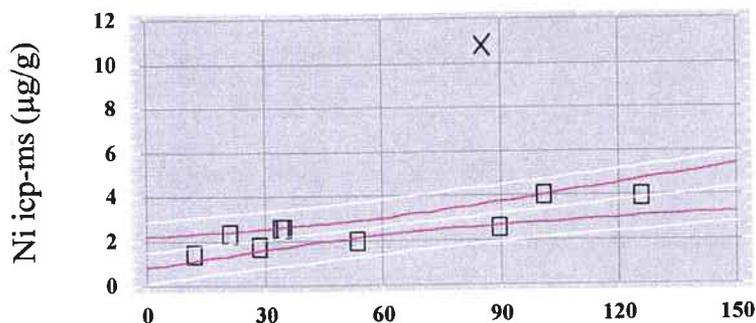


Figure 9 : Ni

$R^2 = 72,81\%$

$Ni\ icp-ms = 1,4827 + 0,01889 * Ni\ SXRF$

$S_r = 0,4963$

Ni SXRf des brins de mousses (taux de comptage/taux de diffusion)

Figures 6, 7, 8 et 9 : Régressions linéaires entre les concentrations obtenues en ICP-MS ($\mu\text{g/g}$) pour As, Ba, Cu et Ni (variables indépendantes) et les mesures SXRf des brins de mousses intacts (taux de comptage/taux de diffusion) pour les même éléments (variables dépendantes). Les R^2 indiquent le % de variabilité expliqué par les différents modèles linéaires indiqués. S_r est l'estimation de l'écart-type des résidus

Modèle de régression linéaire pour Pb

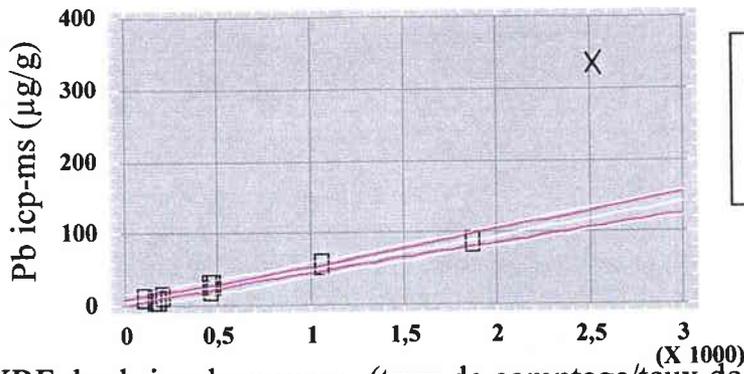


Figure 10 : Pb

$R^2 = 98,07\%$

$Pb\ icp-ms = 3,5635 + 0,0456 * Pb\ SXRF$

$S_r = 3,9380$

Pb SXRF des brins de mousses (taux de comptage/taux de diffusion)

Modèle de régression linéaire pour Ti

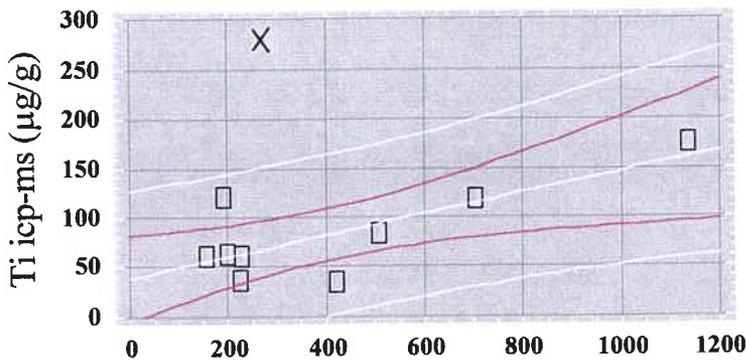


Figure 11 : Ti

$R^2 = 56,90\%$

$Ti\ icp-ms = 38,475 + 0,1081 * Ti\ SXRF$

$S_r = 32,7589$

Ti SXRF des brins de mousses (taux de comptage/taux de diffusion)

Modèle de régression logarithmique pour Zn

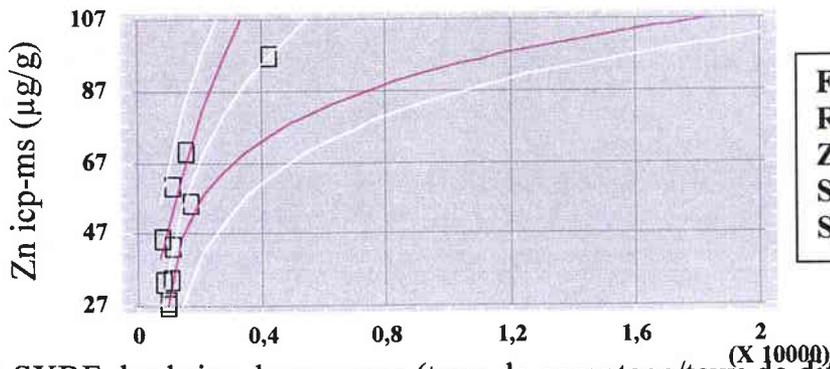


Figure 12 : Zn

$R^2 = 77,19\%$

$Zn\ icp-ms = -226,498 + 38,7877 * \ln(Zn\ SXRF)$

$S_r = 11,117$

Zn SXRF des brins de mousses (taux de comptage/taux de diffusion)

Figures 10, 11 et 12 : Régressions linéaires et logarithmique entre les concentrations ICP-MS ($\mu\text{g/g}$) pour Pb, Ti et Zn (variables indépendantes) et les mesures SXRF des brins de mousses entiers (taux de comptage/taux de diffusion) pour les mêmes éléments (variables dépendantes). Les R^2 indiquent le % de variabilité expliquée par les différents modèles indiqués. S_r est l'estimation de l'écart-type des résidus.

Effets du Lavage des brins

comparaison des pastilles SXRF/ICP-MS

Comparaison Pastilles SXRF/ICP- MS		As		Ba		Cr	
Espèce	Sp	Non lavés	Lavés	Non lavés	Lavés	Non lavés	Lavés
Site 1	ICP-MS ($\mu\text{g/g}$)	0,4	0,1	21,9	22,7	4,2	2,1
	SXRF (Txc/TxD)	18,6+-11,6	7,1+-7,9	5,1+-0,4	7,5+-0,4	6,2+-2,1	3,3+-0,9
Site 7	ICP-MS ($\mu\text{g/g}$)	13,9	14,5	119,6	124,5	7,7	6,2
	SXRF	1989,8+-3276,7	498,4+-63,1	40,6+-10,7	38,2+-1,0	6,7+-2,8	8,5+-2,5
Ep		Non lavés	Lavés	Non lavés	Lavés	Non lavés	Lavés
Site 7	ICP-MS ($\mu\text{g/g}$)	22,5	15,4	469,6	500,8	8,5	7,9
	SXRF (Txc/TxD)	814,9+-29,9	526,7+-48,4	127,1+-8,3	147,3+-18,6	13,3+-2,5	3,1+-1,2
		Ni		Pb		Ti	
Espèce	Sp	Non lavés	Lavés	Non lavés	Lavés	Non lavés	Lavés
Site 1	ICP-MS ($\mu\text{g/g}$)	1,4	2,8	10,4	10	60,9	54,7
	SXRF (Txc/TxD)	13,9+-3,6	13,9+-0,5	127,9+-4,5	156,5+-10,6	34,6+-6,2	42+-13,1
Site 7	ICP-MS ($\mu\text{g/g}$)	4,7	5,1	85,8	94,1	279,9	199,4
	SXRF (Txc/TxD)	16,5+-1,1	36,9+-36,2	1208,8+-56,1	1391,9+-40,9	167,8+-19	145,2+-11,6
Ep		Non lavés	Lavés	Non lavés	Lavés	Non lavés	Lavés
Site 7	ICP-MS ($\mu\text{g/g}$)	10,8	12,7	288,2	334,8	142,5	155
	SXRF (Txc/TxD)	275,9+-396,1	86,1+-46,9	4644,2+-590,9	5116,1+-351	69,5+-8,9	80,2+-15,0

Tableau 4 : Comparaison des résultats obtenus sur les pastilles de mousses avec pré-traitement des brins (lavés, non lavés) par les méthodes SXRF (taux de comptage/taux de diffusion) (Txc/TxD) et ICP-MS ($\mu\text{g/g}$). Les mousses pastillées et analysées sont Sp, *Pseudoscleropodium purum* et Ep, *Eurynchium praelongum* (Site 1 et Site 7) avec ou sans pré-traitement des brins par lavage (5 minutes, eau ultra pure, 18°C, pH=6,9, agitation magnétique). *** dans le cas d'ajout de 50 $\mu\text{g/l}$ de Zn dans solution initiale.

avec ou sans ajout initial de Zn

A

Zn eau = 0 ppb

B

Zn eau = 50 ppb

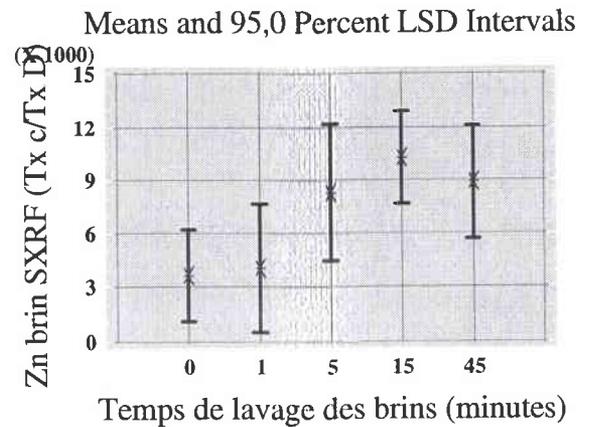
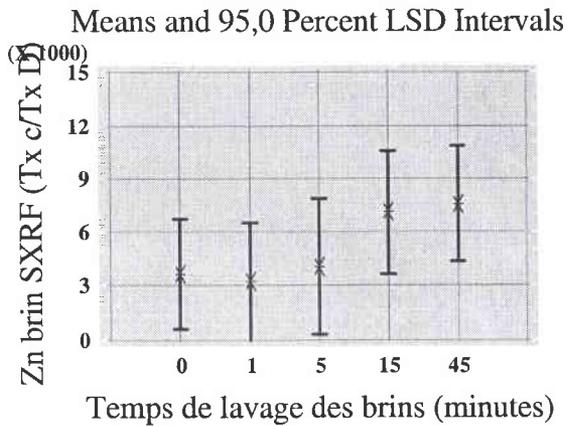


Figure 13 : Evolution temporelle de Zn mesurés par SXRF (taux de comptage/taux de diffusion) dans de jeunes brins entiers de Sp, *Pseudoscleropodium purum*, (2 ans) lavés pendant t=0, 1, 5, 15 et 45 minutes (eau ultra pure, 18°C, pH=6,9). L'évolution temporelle dans les 2 brins lavés/temps a été observée dans des eaux de lavage avec :

A- [Zn]_{t0} = 0 µg/l (ppb)

B- [Zn]_{t0} = 50 µg/l (ppb) de Zn

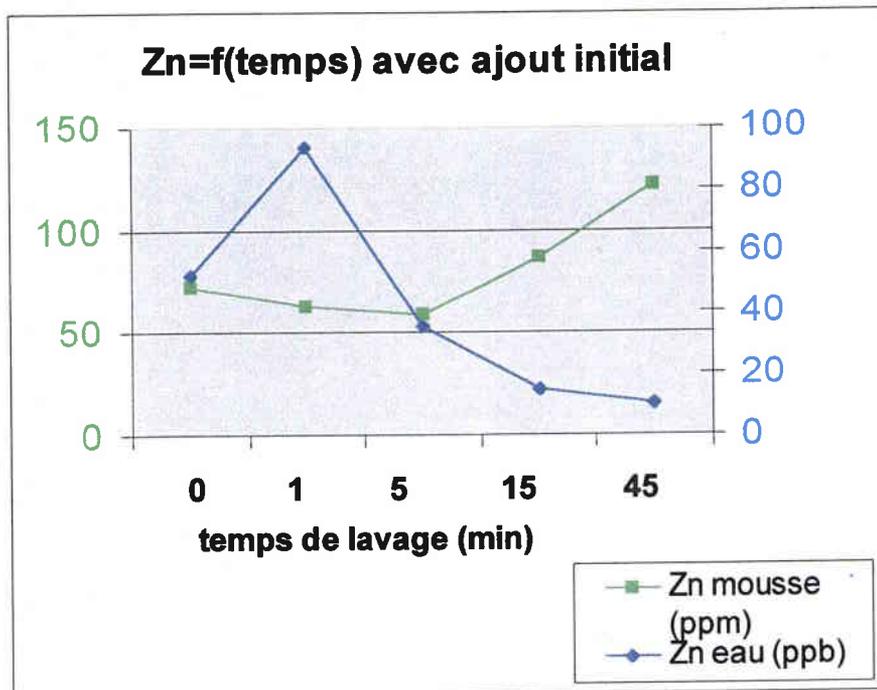


Figure 14 : Evolution temporelle de [Zn] dans les 12 brins de mousses (ppm ou $\mu\text{g/g}$) et leur eau de lavage (ppb ou $\mu\text{g/l}$) analysés en ICP-MS. Le lavage des brins est fait dans une eau avec apport initial de Zn ([Zn] à $t_0 = 50$ ppb) pendant $t = 1, 5, 15$ et 45 minutes.

RÉSUMÉ en français

Les Mousses, ou Bryophytes, sont des organismes sentinelles de la pollution atmosphérique utilisés pour surveiller les variations spatio-temporelles des retombées atmosphériques en métaux et éléments traces à des échelles locales, régionales voire nationales. Les résultats du chapitre I mettent en évidence l'influence significative des techniques d'analyse multiélémentaires (AAN, ICP-MS) dans l'interprétation des cartographies élaborées à la suite de campagne européenne d'échantillonnage. L'étude de la variabilité spatiale d'échantillonnage du chapitre II met en évidence la faible précision de cet outil biologique pour détecter des variations spatiales de As, Ti, V, entre autre, mais autorisant la cartographie de Cu, Pb, Sb et Zn. Au chapitre III, un outil standardisé de bio-surveillance active est élaboré. Ce transplant baptisé "Moss Plate" permet la conversion des concentrations de mousses vivantes en flux de poussières de différentes tailles pour les éléments Pb, Sb, Ti et Ba. Enfin, le chapitre IV étudie la localisation *in vivo* d'éléments non essentiels et essentiels le long des segments annuels de croissance des mousses par les méthodes SXRF (fluorescence X sous rayonnement synchrotron) et PIXE (émission X induite par les particules). Une accumulation préférentielle des éléments non essentiels et peu solubles est mesurée dans les segments les plus âgés. Ces répartitions préférentielles le long des brins sont observées sur des mousses échantillonnées *in situ* ainsi que sur les mousses transplantées et exposées pendant deux mois. Une dynamique de l'accumulation court terme des retombées est ainsi illustrée avec une localisation préférentielle des retombées récentes sur les parties âgées de la plante. Des échanges ioniques sont également mis en évidence par la méthode de fluorescence X à la suite du lavage des mousses avec une perte de K des segments âgés.

TITRE en anglais

Biomonitoring of atmospheric metals and trace element depositions with Bryophytes, variability description for different scale studies

RÉSUMÉ en anglais

Mosses, or Bryophytes, are well-known atmospheric pollution indicators and are used to supervise temporal and spatial evolution of atmospheric deposition at local, regional and national scale studies. Chapter I results put in evidence the significant influence of multielemental analysis techniques (NAA, ICP-MS) in the result interpretations of maps elaborated for european scale study with mosses. The spatial variability study of sampling in chapter II demonstrates the weak precision of this biological tool in detecting spatial concentration variations for As, Ti, V but allowing Cu, Pb, Sb and Zn maps. The chapter III deals with the standardized elaboration of an active biomonitoring tool. This transplant named "Moss Plate" allows the stock conversion of alive moss concentration into fluxes terms for Pb, Sb, Ti and Ba analysed in different dust class sizes. The chapter IV deals with the *in vivo* localization of essential and unessential elements along annual segment increments of mosses with SXRF (Synchrotron radiation Induced X-ray Fluorescence) and PIXE (Particule Induced X-ray Emission) methods. A preferential accumulation of unessential and poorly soluble elements is measured in the older plant parts. These preferential repartitions along the moss shoot are observed for *in situ* mosses as well as for shoots taken from transplants exposed for a two month period. A short term and passive accumulation of dusts is illustrated with the localization of recent depositions on older annual segments. Ionic exchanges are also put in evidence with X-ray fluorescence method following shoot washing treatment with K older part losses.

DISCIPLINE

TOXICOLOGIE DE L'ENVIRONNEMENT

MOTS-CLÉS

Biomonitoring, Bryophytes, Métaux, Retombées atmosphériques, Variabilité, ICP-MS, AAN, SXRF, PIXE.

RÉSUMÉ en français

Les Mousses, ou Bryophytes, sont des organismes sentinelles de la pollution atmosphérique utilisés pour surveiller les variations spatio-temporelles des retombées atmosphériques en métaux et éléments traces à des échelles locales, régionales voire nationales. Les résultats du chapitre I mettent en évidence l'influence significative des techniques d'analyse multiélémentaires (AAN, ICP-MS) dans l'interprétation des cartographies élaborées à la suite de campagne européenne d'échantillonnage. L'étude de la variabilité spatiale d'échantillonnage du chapitre II met en évidence la faible précision de cet outil biologique pour détecter des variations spatiales de As, Ti, V, entre autre, mais autorisant la cartographie de Cu, Pb, Sb et Zn. Au chapitre III, un outil standardisé de bio-surveillance active est élaboré. Ce transplant baptisé "Moss Plate" permet la conversion des concentrations de mousses vivantes en flux de poussières de différentes tailles pour les éléments Pb, Sb, Ti et Ba. Enfin, le chapitre IV étudie la localisation *in vivo* d'éléments non essentiels et essentiels le long des segments annuels de croissance des mousses par les méthodes SXRF (fluorescence X sous rayonnement synchrotron) et PIXE (émission X induite par les particules). Une accumulation préférentielle des éléments non essentiels et peu solubles est mesurée dans les segments les plus âgés. Ces répartitions préférentielles le long des brins sont observées sur des mousses échantillonnées *in situ* ainsi que sur les mousses transplantées et exposées pendant deux mois. Une dynamique de l'accumulation court terme des retombées est ainsi illustrée avec une localisation préférentielle des retombées récentes sur les parties âgées de la plante. Des échanges ioniques sont également mis en évidence par la méthode de fluorescence X à la suite du lavage des mousses avec une perte de K des segments âgés.

TITRE en anglais

Biomonitoring of atmospheric metals and trace element depositions with Bryophytes, variability description for different scale studies

RÉSUMÉ en anglais

Mosses, or Bryophytes, are well-known atmospheric pollution indicators and are used to supervise temporal and spatial evolution of atmospheric deposition at local, regional and national scale studies. Chapter I results put in evidence the significant influence of multielemental analysis techniques (NAA, ICP-MS) in the result interpretations of maps elaborated for european scale study with mosses. The spatial variability study of sampling in chapter II demonstrates the weak precision of this biological tool in detecting spatial concentration variations for As, Ti, V but allowing Cu, Pb, Sb and Zn maps. The chapter III deals with the standardized elaboration of an active biomonitoring tool. This transplant named "Moss Plate" allows the stock conversion of alive moss concentration into fluxes terms for Pb, Sb, Ti and Ba analysed in different dust class sizes. The chapter IV deals with the *in vivo* localization of essential and unessential elements along annual segment increments of mosses with SXRF (Synchrotron radiation Induced X-ray Fluorescence) and PIXE (Particule Induced X-ray Emission) methods. A preferential accumulation of unessential and poorly soluble elements is measured in the older plant parts. These preferential repartitions along the moss shoot are observed for *in situ* mosses as well as for shoots taken from transplants exposed for a two month period. A short term and passive accumulation of dusts is illustrated with the localization of recent depositions on older annual segments. Ionic exchanges are also put in evidence with X-ray fluorescence method following shoot washing treatment with K older part losses.

DISCIPLINE

TOXICOLOGIE DE L'ENVIRONNEMENT

MOTS-CLÉS

Biomonitoring, Bryophytes, Métaux, Retombées atmosphériques, Variabilité, ICP-MS, AAN, SXRF, PIXE.