



CENTRE NATIONAL  
DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE



Développement d'outils biologiques d'évaluation des impacts  
des aérosols et des particules atmosphériques dans des  
écosystèmes diversement pollués :  
mesures de réponses précoces induites chez les bryophytes  
(biomarqueurs) et leurs communautés microbiennes  
(biointégrateurs).

Development of biological tools to evaluate the impact of atmospheric aerosols and  
particles in three differently polluted ecosystems : measurements of early response in  
Bryophytes (biomarkers) and their microbial communities (biointegrators).

Programme Primequal 2-Predit  
Rapport de fin de contrat

Laboratoire Chrono-Environnement  
UMR 6249 UFC/CNRS UsC INRA  
Université de Franche-Comté  
25030 Besançon Cedex

Nadine Bernard  
Maître de Conférences  
nadine.bernard@univ-fcomte.fr

N° de contrat : 22-E/2004  
Date du contrat : 02/05/2005

Rapport établi le : 03/03/2008

## TABLE DES MATIERES

	page
<b>Synthèse destinée aux utilisateurs et gestionnaires publics</b>	5
Contexte général	6
Objectifs généraux du projet	7
Quelques éléments de méthodologie	8
Résultats obtenus	8
Implications pratiques, recommandations, réalisations pratiques, valorisation	11
Partenariats mis en place, projetés, envisagés	13
Pour en savoir plus (quelques références)	14
Liste des opérations de valorisation issues du contrat	15
Résumés	19
<b>Rapport scientifique</b>	21
I. Sites et espèces retenues	22
1.1. Sites d'étude	
1.2. Espèces de bryophytes "sentinelles"	
II. Matériels et méthodes	23
2.1. Méthodes d'exposition	23
2.1.1. Axe 1 : expérimentation <i>in situ</i>	
2.1.2. Axe 2 : expositions en conditions contrôlées	
2.2. Méthodes analytiques	24
2.3. Méthodes biochimiques	24
2.4. Dénombrement des microorganismes	25
2.5. Méthodes de traitement des données et d'analyses statistiques	25

**Développement d'outils biologiques d'évaluation des impacts des particules atmosphériques dans des écosystèmes diversement pollués**

III. Résultats	.....27
3.1. Caractérisation de la pollution atmosphérique particulaire	.....27
3.1.1. Mesures <i>in situ</i> de la pollution gazeuse (NO <sub>2</sub> , O <sub>3</sub> ) et particulaire PM <sub>10</sub> présente aux sites trafic/industriel/rural	
3.1.2. Compositions élémentaires de particules issues de sites « trafic » urbain utilisées pour les expositions en conditions contrôlées	
3.2. Caractérisation des dépôts particulaires au sein de bryophytes exposées en sites trafic/ industriel/ rural	.....32
3.2.1. Dépôts particulaires chez <i>Ceratodon purpureus</i>	
3.2.2. Dépôts particulaires chez <i>Scleropodium purum</i>	
3.2.3. Comparaison entre vitesse d'accumulation (Si, j) dans <i>Scleropodium purum</i> et concentration dans les PM <sub>10</sub>	
3.2.4. Corrélations entre éléments atmosphériques inorganiques et éléments au sein des bryophytes exposées aux sites trafic/industriel/rural	
3.2.5. Comparaison des capacités accumulatrices de particules inorganiques des 2 espèces bryophytiques : <i>Scleropodium.purum</i> et <i>Ceratodon purpureus</i>	
3.3. Utilisation des bryophytes : intérêt et choix des biomarqueurs les plus pertinents	.....37
3.3.1. Réponses biochimiques : atteintes membranaires chez <i>Ceratodon purpureus</i> et <i>Scleropodium purum</i>	
3.3.2. Réponses génotoxiques : atteintes nucléaires chez <i>Ceratodon purpureus</i> et <i>Scleropodium purum</i>	
3.3.3. Variation des biomarqueurs d'exposition et d'effet chez <i>Scleropodium purum</i> exposée aux particules en conditions contrôlées	
3.4. Utilisation des micro-organismes : biointégrateurs potentiels de la pollution particulaire	.....42
3.4.1. Structure des communautés microbiennes dans les bryophytes	
3.4.2. Etudes des réponses des communautés microbiennes aux polluants d'origine atmosphérique (PM <sub>10</sub> , NO <sub>2</sub> , O <sub>3</sub> ) chez <i>Scleropodium purum</i> en trois sites différemment pollués	
3.4.3. Etude des réponses des communautés microbiennes aux dépôts humides particulaires en conditions contrôlées	
IV. Discussion	.....46
V. Conclusion et perspectives	.....50
Bibliographie	.....52

**Développement d'outils biologiques d'évaluation des impacts des particules atmosphériques dans des écosystèmes diversement pollués**

Equipes partenaires :

- Laboratoire Chrono-Environnement (LCE), UMR 6249 UFC/CNRS UsC INRA, Université de Franche-Comté, Place Leclerc – 25030 Besançon Cedex.
- Département de Botanique et de Cryptogamie (DBC), Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Université de Lille 2, BP 83 – 59006 Lille Cedex, France.
- Laboratoire Pierre Süe (LPS) – CEA-CNRS, UMR 9956, CE Saclay, 91191 Gif-sur-Yvette Cedex

## **SYNTHESE**

destinée aux utilisateurs et gestionnaires publics

Développement d'outils biologiques d'évaluation des impacts des aérosols et des particules atmosphériques dans des écosystèmes diversement pollués : mesures de réponses précoces induites chez les bryophytes (biomarqueurs) et leurs communautés microbiennes (biointégrateurs).

### **PROGRAMME PRIMEQUAL-PREDIT**

**Responsable scientifique du projet : Nadine BERNARD**

Nadine BERNARD, Daniel GILBERT :  
Laboratoire Chrono-Environnement (LCE), UMR 6249 UFC/CNRS UsC INRA, Université de Franche-Comté, Place Leclerc – 25030 Besançon Cedex.

Franck DENAYER, Chantal VAN HALUWYN :  
Département de Botanique et de Cryptogamie (DBC), Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Université de Lille 2, BP 83 – 59006 Lille Cedex, France.

André GAUDRY, Mélanie MOSKURA, Clarisse MARIET :  
Laboratoire Pierre Süe (LPS) – CEA-CNRS, UMR 9956, CE Saclay, 91191 Gif-sur-Yvette Cedex

## Développement d'outils biologiques d'évaluation des impacts des particules atmosphériques dans des écosystèmes diversement pollués

### CONTEXTE GENERAL

*Quelle situation, quels enjeux motivent ce projet ?*

La métrologie des polluants atmosphériques et l'évaluation des risques environnementaux et sanitaires sont des domaines qui évoluent en permanence et qui participent étroitement à la prise de décision dans le domaine de la qualité de l'air. Les particules et aérosols issus de sources fixes ou mobiles ont une place privilégiée dans la problématique de la pollution de l'air abordée par la loi n° 96-1236 du 30 décembre 1996 sur l'air et l'utilisation rationnelle de l'énergie. En complément des analyses physico-chimiques, il est possible d'évaluer l'impact des polluants atmosphériques en utilisant des organismes « sentinelles » qui permettent d'intégrer les effets de la pollution prise dans sa globalité. Plus largement, on utilise le terme biosurveillance pour décrire l'utilisation d'organismes sentinelles.

Les différents concepts de la biosurveillance sont fonction des niveaux d'organisation biologique et de lisibilité des effets. On distingue les niveaux infra-individuel, individuel et supra-individuel. Un bioindicateur permet d'observer la réponse spécifique d'une espèce testée pouvant réagir ou non à des constituants troposphériques. Un biointégrateur est un indicateur de réaction ou d'effet au niveau des populations et/ou des communautés. Les principaux effets sont la disparition ou l'apparition d'espèces, ainsi que des variations de densité ou de biomasse.

L'utilisation d'un bioindicateur est relativement simple à mettre en œuvre, cependant cette méthode ne donne qu'un reflet très partiel des impacts réels des polluants sur les écosystèmes. En effet, idéalement, il serait essentiel de pouvoir évaluer l'impact de la pollution atmosphérique sur un écosystème pris dans sa globalité, c'est-à-dire d'évaluer non seulement l'impact direct d'une pollution (effets toxiques) mais aussi les effets indirects (effets trophiques). Par exemple, la disparition d'une proie peut entraîner la disparition d'un prédateur, même si ce prédateur est lui-même peu sensible aux polluants. Malheureusement, la description des impacts à l'échelle de l'écosystème se révèle souvent extrêmement complexe, en raison notamment de fortes contraintes spatiales et temporelles.

Pour remédier à cette difficulté, nous avons choisi de travailler sur des écosystèmes très simplifiés, mais disposant malgré tout de tous les éléments classiques d'un écosystème de plus grande taille : les micro-systèmes bryophytes/microorganismes associés. Ces micro-systèmes sont de taille réduite mais sont suffisamment complets pour comporter plusieurs dizaines d'espèces différentes et leurs interactions. De fait les micro-systèmes, bryophytes/microorganismes associés peuvent constituer une alternative intéressante à l'étude des écosystèmes complexes et aider à mieux comprendre les mécanismes de l'effet de la pollution atmosphérique.

## Développement d'outils biologiques d'évaluation des impacts des particules atmosphériques dans des écosystèmes diversement pollués

L'intérêt d'utiliser les microsystemes à bryophytes est multiple :

- De nombreuses espèces de Bryophytes se retrouvent sur la totalité du territoire français et dans tous les milieux, y compris le centre des villes.
- Elles occupent des surfaces extrêmement limitées (quelques cm<sup>2</sup>) y compris sur des supports inertes (pierres, murs, toits ...)
- Elles n'ont pas de racines et ont donc des interactions avec le sol plus limitées que la plupart des autres végétaux, en revanche, elles sont un réceptacle pour les particules atmosphériques et sont utilisées pour établir les cartes de dépôts métalliques en France.
- Elles abritent plusieurs dizaines d'espèces de microorganismes appartenant à des groupes taxonomiques très différents et occupant des niches trophiques variées (producteurs primaires, prédateurs, décomposeurs).
- Ces microorganismes ont des temps de multiplication très courts, variant de quelques heures à quelques semaines, ce qui permet de les étudier sur des temps assez courts.

Les enjeux, qui sous-tendent ce programme, sont les suivants :

- Enjeux fondamentaux : acquérir des connaissances sur les impacts des particules atmosphériques sur les écosystèmes en étudiant des réponses d'organismes à différents niveaux d'organisation biologique à l'aide d'un écosystème simplifié : le microsysteme bryophytes micro-organismes.
- Enjeux finalisés : proposer des outils biologiques performants
  - servant de marqueurs précoces d'exposition et d'effets exploitables pour la surveillance de la qualité de l'air,
  - permettant de mieux caractériser les risques pour les écosystèmes,
  - s'intégrant dans la démarche d'évaluation des risques environnementaux,
  - pouvant aider à la réflexion concernant la détermination de seuils réglementaires

### OBJECTIFS GENERAUX DU PROJET

L'objectif général de ce projet a été d'évaluer l'impact des aérosols et des particules atmosphériques sur un microsysteme Bryophytes et leurs microorganismes associés au cours d'expositions de quelques semaines à quelques mois.

Plus particulièrement, une évaluation des réponses physiologiques chez les bryophytes et des réponses écologiques sur la structure des communautés microbiennes (boucle microbienne : matière organique dissoute et particulaire → bactéries → protozoaires/micrométazoaires) a été réalisée.

Au cours de cette étude, nous avons :

- Caractérisé la composition des particules (CEA Saclay)
- Étudié la réponse physiologique des bryophytes (Université Lille 2)
- Analysé la réponse écologique des communautés microbiennes des bryophytes (Université Franche-Comté)

## **QUELQUES ELEMENTS DE METHODOLOGIE (ET EVENTUELLES DIFFICULTES RENCONTREES)**

Ce travail s'est déroulé selon deux axes :

### **• Axe 1 - expérimentation *in situ***

Trois sites ont été sélectionnés en fonction de la nature des sources potentielles de contamination : un site rural (Montagney), un site contaminé par des retombées industrielles (Dunkerque) et un site exposé au trafic routier (Saclay). Deux espèces de bryophytes ont été transplantées pendant 8 mois dans des conditions d'exposition standardisées (une espèce cultivée de façon standardisée – *Ceratodon purpureus* – et une espèce récoltée en Forêt de Fontainebleau – *Scleropodium purum* –). Des mesures de dioxyde d'azote (NO<sub>2</sub>) et d'ozone (O<sub>3</sub>) ont été effectuées à l'aide d'échantillonneurs passifs. L'échantillonnage des PM<sub>10</sub> a été réalisé par pompe Partisol et les mesures des éléments particuliers ont été effectuées en activation neutronique (INAA) et par ICP-MS (méthodes validées sur des matériaux de référence). L'ensemble des mesures ont été réalisées à T<sub>0</sub> et tous les 2 mois (4 périodes P<sub>1</sub> à P<sub>4</sub>).

### **• Axe 2 - expérimentation en conditions contrôlées**

Des particules PM<sub>10</sub> prélevées en sites « trafic » par les associations de réseaux de mesure de la qualité de l'air ont été préparées par sonication, puis leur composition a été analysée. Des microsystemes bryophytes-microorganismes ont été exposés à ces particules dans des enceintes à nébulisation et les réponses physiologiques et biologiques ont été observées.

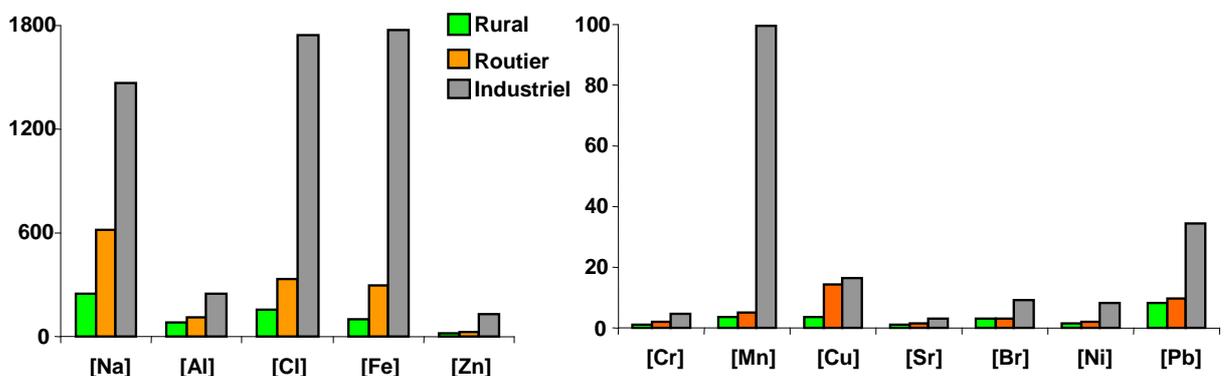
## **RESULTATS OBTENUS**

### **Caractérisation des particules et d'autres contaminants atmosphériques**

#### Mesures de la pollution atmosphérique (NO<sub>2</sub> et PM<sub>10</sub>) dans les trois sites

Les 3 sites sont caractérisés par des concentrations en NO<sub>2</sub> significativement différentes (respectivement de 9, 62 et 42 µg/m<sup>3</sup> dans les sites de Montagney, Saclay et Dunkerque). La composition élémentaire des PM<sub>10</sub> était elle aussi significativement différente dans les trois sites pour de nombreux éléments (Figure 1).

*Figure 1 : compositions élémentaires moyennes présentes dans les particules atmosphériques PM<sub>10</sub> (ng/m<sup>3</sup>) au niveau des 3 sites – Présentation de 12 éléments parmi 50 dosés*



## Développement d'outils biologiques d'évaluation des impacts des particules atmosphériques dans des écosystèmes diversement pollués

L'analyse des teneurs multi-élémentaires en particules PM<sub>10</sub> des filtres collectés sur chacun des sites permet de caractériser la provenance des particules, leur transport à l'échelle locale ou régionale, ainsi que l'influence potentielle des conditions climatiques sur les dépôts. En effet, un site éloigné de sources importantes de pollution sera surtout sensible aux transports de particules à longue distance. De plus, des conditions climatiques stables avec des vents faibles minimiseront les suspensions de poussières terrigènes locales par érosion éolienne. De plus, les comparaisons inter-sites permettent de séparer les apports d'éléments provenant de la croûte terrestre (Ta, Rb, K, Cs, Tl, W, Sc, Tb, Al, Dy, Se, Ni, Nd, Sm, Tm, Y, Au et Th) de ceux liés au trafic routier (Zn, Pb, Sr, Ca, Mn, Cr, V, Mo, Fe, Ba, Sb, et Cu) et aux activités industrielles (Tl, La, V, Mn et Fe).

Les enrichissements (c'est-à-dire la quantité d'éléments apportés en plus des apports naturels liée à l'érosion des sols) les plus importants ont été observés pour les éléments suivants : Br, Cd, Sb, Ir, Se, et surtout pour le Pb (avec un facteur d'enrichissement atteignant jusqu'à 380000). Ces enrichissements résultent en général de l'influence de sources majeures d'émission, le plus souvent liée à certaines activités humaines. Ainsi, la présence de Fe et de Mn est liée aux activités de la sidérurgie à Dunkerque, tandis que la présence de La, employé comme catalyseur lors des opérations de cracking, est plutôt reliée à l'industrie pétrolière. Cependant, certaines particules peuvent aussi être injectés dans l'atmosphère lors des incendies de forêts ou des modes de pollutions liés au trafic routier et peuvent être transportés jusqu'à des sites très éloignés.

### **Impact de la pollution particulaire sur les bryophytes (Biomarqueurs)**

#### Exposition de *Ceratodon purpureus* et *Scleropodium purum* aux aérosols et particules inorganiques (étude *in situ*).

Des accumulations significatives en Eléments Traces Métalliques (ETM) ont été mises en évidence chez les deux espèces étudiées, en particulier pour les deux sites les plus contaminés : le site industriel et le site exposé au trafic routier. Les concentrations en ETM retrouvées chez les mousses sont en concordance avec celles retrouvées dans l'air. De plus nous avons pu observer que l'espèce cultivée (*C. purpureus*) présente le plus souvent de meilleures capacités accumulatrices d'ETM que *S. purum* (par exemple chez *C. purpureus*, pour Fe et Cd).

#### Effets de la pollution particulaire en ETM sur *C. purpureus* et *S. purum*

Les expositions des bryophytes aux ETM se manifestent tout d'abord par la production au niveau cellulaire d'espèces réactives de l'oxygène (ERO), capables d'induire à court terme un stress oxydant, dû aux réactions liées à la présence de métaux. En effet, les membranes plasmiques des cellules de bryophytes sont tout particulièrement exposées aux ERO et subissent une lipopéroxydation dont le résultat est la formation d'aldéhydes et de cétones dont le malondialdéhyde (MDA) semble être le composé majoritaire.

Ce biomarqueur d'exposition a significativement augmenté chez *Ceratodon* tout au long de l'expérimentation sur les sites de Montagney et Saclay. En revanche, aucune variation significativement différente du témoin n'a pu être mise en évidence chez *Scleropodium*, probablement à cause d'une plus grande variabilité intra-espèce, ou d'une compensation plus précoce, due aux plus fortes concentrations en ETM.

## **Développement d'outils biologiques d'évaluation des impacts des particules atmosphériques dans des écosystèmes diversement pollués**

Le stress oxydant peut induire des dommages au niveau membranaire mais peut également atteindre le noyau. Des ERO comme les radicaux hydroxyles (OH) peuvent aller se fixer de façon durable sur l'ADN et ainsi provoquer une génotoxicité. Nous avons, pour la première fois, mis en évidence chez les bryophytes un biomarqueur de génotoxicité reflétant le niveau d'impact des ETM sur l'ADN : la 8 hydroxy 2'déoxyguanosine (8OHdG). Une diminution significative de la quantité de 8OHdG a pu être observée chez *Ceratodon*. Afin de mieux comprendre le phénomène, un test a été réalisé pour évaluer le niveau de dégradation de la molécule d'ADN. Il a révélé une forte fragmentation de l'ADN chez les individus exposés aux plus fortes concentrations en ETM notamment sur le site de Dunkerque. Pour Saclay et Montagny, la dégradation du matériel génétique semble plus lente.

### **Impact de la pollution particulaire sur les communautés microbiennes (Biointégrateurs)**

#### Structure des communautés microbiennes dans les bryophytes

Les bryophytes terrestres constituent un écosystème dont l'humidité varie de façon importante au cours du temps. Pour ces raisons, les groupes microbiens les plus abondants sont ceux qui sont de petite taille et ceux qui sont adaptés à la dessiccation (en s'enkystant ou en adoptant un mode de vie ralenti).

Pour la première fois, nous avons pu quantifier l'importance de chacun de ces groupes : les décomposeurs : bactéries (52,8% de la biomasse microbienne totale) et les champignons (10,7%), les producteurs primaires : algues microscopiques (2,7%) et cyanobactéries (0,4%) et les prédateurs microbiens : protozoaires amibes à thèque (23,4%) et ciliés (0,9%) et les métazoaires rotifères (8,7%) et nématodes (0,3%).

Ainsi, ce sont les Bryophytes qui assurent pour l'essentiel la photosynthèse, les algues et les cyanobactéries étant peu développés. Les restes de ces Bryophytes (feuilles et tiges mortes) sont ensuite décomposés par les bactéries et les champignons qui sont eux-mêmes les proies des prédateurs (protozoaires ou métazoaires microscopiques). Il existe donc bien un couplage Bryophytes / boucle microbienne au niveau de ces microsystèmes, comme cela était attendu.

#### Effet de la pollution particulaire sur les microorganismes

L'effet des polluants particuliers a été évalué en estimant l'abondance et la biomasse des différents groupes microbiens (bactéries hétérotrophes, cyanobactéries, micro-algues, ciliés, amibes à thèque, rotifères et nématodes). Les résultats obtenus lors des deux expérimentations montrent que cette perturbation a un effet négatif significatif sur la biomasse totale microbienne. De plus, le détail des résultats obtenus montre que certains groupes microbiens ont été significativement affectés tandis qu'aucune variation significative n'a pu être observée pour d'autres groupes.

Les résultats obtenus en laboratoire recourent largement ceux obtenus *in situ* et confirment ce qui avait pu être observé dans d'autres études. Les groupes microbiens les plus affectés par la pollution particulaire sont les bactéries hétérotrophes et les protistes (microalgues et protozoaires). Inversement, les cyanobactéries, les champignons et les petits métazoaires semblent peu sensibles à ce type de perturbation (Tableau 1).

## Développement d'outils biologiques d'évaluation des impacts des particules atmosphériques dans des écosystèmes diversement pollués

Tableau 1: Corrélations de Spearman entre les variables environnementales et la biomasse des différents groupes de microorganismes après 8 mois d'exposition *in situ* dans les trois sites (HR : Humidité relative).

groupes variable enviro	Cyanobact.		Micro-algues		Bactéries		Champignons		Ciliés		Rhécamoebiens		Rotifères		Nématodes	
	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p
temperature	0.255	n.s	0.616	<0.0001	0.573	0.0003	0.563	0.0004	-0.053	n.s	0.100	n.s	-0.160	n.s	0.140	n.s
H	-0.370	0.02	-0.658	<0.0001	-0.455	0.006	-0.563	0.0008	0.210	n.s	0.056	n.s	0.137	n.s	-0.070	n.s
[NO2]	0.138	n.s	-0.064	n.s	-0.219	n.s	0.050	n.s	0.161	n.s	-0.618	<0.0001	0.193	n.s	-0.450	0.006
[Na]	0.549	0.001	-0.124	n.s	-0.239	n.s	0.060	n.s	-0.048	n.s	-0.356	0.04	-0.053	n.s	-0.375	0.03
[Al]	0.543	0.001	-0.09	n.s	-0.148	n.s	0.050	n.s	-0.059	n.s	-0.262	n.s	-0.125	n.s	-0.282	n.s
[Cl]	0.349	0.05	-0.284	n.s	-0.397	0.02	-0.050	n.s	0.080	n.s	-0.286	n.s	0.185	n.s	-0.303	n.s
[Cr]	0.132	n.s	-0.283	n.s	-0.316	n.s	0.138	n.s	0.106	n.s	-0.373	0.03	0.164	n.s	-0.332	0.06
[Mn]	0.322	n.s	-0.255	n.s	-0.256	n.s	0.070	n.s	0.060	n.s	-0.272	n.s	-0.012	n.s	-0.307	n.s
[Fe]	0.255	n.s	-0.243	n.s	-0.228	n.s	0.117	n.s	0.067	n.s	-0.305	n.s	-0.012	n.s	-0.313	n.s
[Cu]	0.197	n.s	-0.119	n.s	-0.046	n.s	0.025	n.s	-0.162	n.s	-0.393	0.02	-0.308	n.s	-0.291	n.s
[Zn]	0.171	n.s	-0.341	0.05	-0.352	0.04	0.064	n.s	0.090	n.s	-0.298	n.s	0.107	n.s	-0.314	n.s
[Sr]	0.474	0.006	-0.171	n.s	-0.238	n.s	0.015	n.s	-0.040	n.s	-0.313	n.s	-0.056	n.s	-0.319	n.s
[Br]	0.075	n.s	-0.442	0.01	-0.494	0.004	-0.040	n.s	0.108	n.s	-0.309	n.s	0.248	n.s	-0.304	n.s
[Ni]	0.193	n.s	-0.261	n.s	-0.241	n.s	0.030	n.s	0.112	n.s	-0.280	n.s	-0.213	n.s	-0.325	0.06
[Pb]	0.379	0.03	-0.395	0.02	-0.362	0.04	-0.042	n.s	0.030	n.s	-0.323	n.s	0.017	n.s	-0.321	n.s

n.s : non significatif

### Effets directs et indirects

Les résultats que nous avons obtenus reflètent les effets directs de la pollution sur les microorganismes, c'est-à-dire l'effet toxique des contaminants. Il est aussi probable qu'il existe des effets indirects qui expliquent certaines variations des différentes espèces présentes au cours du temps. Schématiquement, lorsque des proies disparaissent, l'abondance de leurs prédateurs diminue également. Dans ces conditions, les communautés de protozoaires semblent être des biointégrateurs particulièrement intéressants. En effet, ces microorganismes sont affectés directement par la pollution en raison de leur état unicellulaire et indirectement au travers de la prédation qu'ils exercent sur les bactéries notamment.

### IMPLICATIONS PRATIQUES, RECOMMANDATIONS, REALISATIONS PRATIQUES, VALORISATION

- **Implications pratiques :**

**Le premier acquis de ce travail** a été de confirmer l'intérêt de l'utilisation des Bryophytes en tant qu'intégrateur de la pollution atmosphérique particulaire *in situ*.

- Tout d'abord, l'analyse des teneurs multi-élémentaires en particules < 10 µm sur les filtres collectées de façon régulière sur les 3 sites a été réalisée.

- Parallèlement à ce suivi, ces mêmes teneurs ont été déterminées dans la partie vivante des Bryophytes.

- Par la suite, des particules fournies par les associations de mesure de la qualité de l'air (ASQAB, ASPA, ATMOSF'AIR) ont été utilisées pour réaliser une contamination par nébulisation simulant des dépôts humides *in situ*.

## Développement d'outils biologiques d'évaluation des impacts des particules atmosphériques dans des écosystèmes diversement pollués

Ces 3 expérimentations ont permis de :

- caractériser la provenance des particules, leur transport à l'échelle locale ou régionale, ainsi que l'influence potentielle des conditions climatiques sur les dépôts.
- Montrer (1) que les Bryophytes sont des biocapteurs performants de la pollution particulaire pour la plupart des éléments traces métalliques, c'est-à-dire que les Bryophytes donnent des indications fiables sur l'importance des dépôts atmosphériques (2) que les Bryophytes permettent aussi d'intégrer les variations saisonnières des dépôts particulaires.

**Le second acquis de ce travail** est qu'il a démontré que les Bryophytes et leurs microorganismes associés constituaient des sentinelles de choix pour le suivi des pollutions ;

Les expérimentations ont mis en évidence que :

- Les bryophytes réagissent de façon significative aux perturbations liées aux apports particulaires et pourraient, à terme, permettre de disposer d'un indicateur performant de l'impact des dépôts particulaires sur la physiologie des plantes.
- Les réactions observées sont variables selon les espèces de Bryophytes.
- Les micro-organismes sont des bons indicateurs précoces de la pollution de l'air et l'utilisation simultanée de plusieurs groupes microbiens apporte une information très intéressante. Elle permet notamment de disposer d'effets pour des concentrations relativement faibles en polluants.
- Le suivi des communautés microbiennes (diversité, biomasse) indique que l'effet des polluants atmosphériques se produit à l'échelle des microsystèmes, ce qui permet de supposer qu'il existe bien des effets à l'échelle de l'écosystème.

- **Recommandations et limites éventuelles :**

Sous plusieurs aspects, ces travaux comportent des limites :

- La première concerne la variabilité génétique au sein des espèces de Bryophytes. Ce problème ne pourra être diminué qu'en parvenant à réaliser des cultures standardisées.
- La seconde concerne l'hétérogénéité des communautés microbiennes des Bryophytes. Cette question fait l'objet de débat au sein de la communauté scientifique. Une solution serait d'inoculer les Bryophytes avec des communautés microbiennes connues, mais cette pratique devra être évaluée pour voir si elle est techniquement possible.
- La troisième limite se rapporte à la difficulté de pouvoir réaliser les analyses microbiennes par les laboratoires de suivi de la pollution de l'air. La solution que nous préconisons est d'utiliser uniquement le groupe des amibes à thèque qui comporte l'avantage d'intégrer les effets sur les autres communautés microbiennes. De plus ces protistes disposent d'une enveloppe assez facile à distinguer qui persiste après la mort de l'organisme.

## Développement d'outils biologiques d'évaluation des impacts des particules atmosphériques dans des écosystèmes diversement pollués

### • Réalisations pratiques et valorisation :

#### *Mise au point d'un outil standardisé d'évaluation des effets*

A la suite du présent travail, la ville de Besançon a choisi de financer une thèse sur le même thème en continuité du programme Primequal 2. L'objectif de ce doctorat est de mettre au point des microsystèmes standardisés à Bryophytes, de faible encombrement, d'emploi facile, utilisable par le réseau de mesure de la qualité de l'air. Au cours de cette étude, de tels systèmes seront disposés autour de zones affectées par des émissions de polluants atmosphériques (Incinérateurs d'ordures ménagères, trafic routier important ...).

Ces travaux devront cependant être poursuivis dans le futur pour pouvoir envisager la standardisation d'un protocole d'évaluation de la pollution de l'air basé sur l'utilisation des microsystèmes à Bryophytes.

#### *Production de particules pour les études en laboratoire*

Notre collaboration avec les associations de mesure de la qualité de l'air (ASQAB, ASPA, ATMOSF' AIR) nous a permis de mettre au point une méthode d'extraction et de nébulisation des particules. Les résultats obtenus lors de ce type d'expériences devraient permettre des développements pour des études toxicologiques en évitant :

- l'utilisation en conditions contrôlées de particules prélevées dans d'autres régions du monde (USA) et qui sont peu représentatives des pollutions urbaines européennes,
- ou l'emploi de particules produites à l'aide d'un banc à moteur, dont la composition est essentiellement carbonée et donc peu représentative des pollutions réelles. De plus, ce type de production particulaire est associé à des gaz.

### **PARTENARIATS MIS EN PLACE, PROJETS, ENVISAGES**

Les résultats que nous avons obtenus montrent que les réponses des biomarqueurs face à la pollution particulaire ne sont probablement pas seulement liées aux ETM, mais aussi à d'autres constituants. L'un des axes majeurs de développements futurs consistera à **caractériser ces autres constituants** (gaz, particules minérales, organiques, microbiologiques) présents *in situ* et **d'étudier leurs effets synergiques sur les microsystèmes bryophytes-microorganismes associés**. En effet, les Bryophytes peuvent apporter une meilleure sensibilité et reproductibilité pour les études d'écotoxicité. Il semble donc intéressant de poursuivre ces travaux en recherchant un certain nombre de mécanismes d'action tels que les mécanismes de compensation et/ou réparation chez les bryophytes qui sont de bons modèles biologiques d'évaluation des risques pour l'environnement.

Ces travaux sont en cours de réalisation dans le cadre de financements propres ou apportés par des collectivités locales. Outre la poursuite des travaux avec les partenaires du présent projet, des collaborations sont envisagées avec **l'Université de Haute Alsace (Thierry Lebeau)**.

Un autre axe d'étude en cours de développement dans l'UMR CNRS ChronoEnvironnement (ex laboratoire de Biologie Environnementale) consistera à mettre en évidence l'influence des composés émis par les Bryophytes sur les microorganismes lorsqu'elles sont affectées par des polluants particulaires. Ces travaux ont débuté en collaboration avec **l'Ecole Polytechnique**

**Fédérale de Lausanne (Pr Alexandre Buttler, Pr Edward Mitchell).** Ces mêmes collaborations visent aussi à mieux comprendre l'influence **des changements climatiques globaux** sur le complexe Bryophytes-microorganismes en présence ou en absence de polluants.

Enfin, des contacts doivent être pris prochainement dans le but de **créer des nanoparticules de natures connues** pour pouvoir réaliser des expositions en conditions contrôlées des micro-systèmes bryophytes microorganismes. Cette standardisation permettra de réaliser des expérimentations croisées pour poursuivre l'étude des réponses physiologiques et écologiques. Le partenariat en cours de mise en place sera réalisé avec **l'Institut de Chimie et des matériaux Paris-Est, UMR-CNRS 7182 Université Paris XII (Pr Yannick Champion).**

#### **POUR EN SAVOIR PLUS (QUELQUES REFERENCES)**

- Fabure J., Garçon G., Denayer F.-O., Shirali P., Deram A., Cuny D., Gaudry A., Van Haluwyn C., Bernard N. (2006a) Biomarkers of oxidative stress induced by airborne matter and associated heavy metals in two bryophyte species. 4th International Workshop on Biomonitoring of Atmospheric Pollution (with emphasis on trace elements). 17-21 september, Agios Nikalaos, Crête.
- Gaudry A, Moskura M., Mariet C., Ayrault S., Denayer F., Bernard N. Inorganic pollution in PM10 particles collected over three French sites under various influences: rural conditions, traffic and industry. *Water air and soil pollution*, 193: 91-106.
- Nguyen-Viet H., Gilbert D., Bernard N., Mitchell E.A.D., Badot P.-M. (2006a) Relationship between atmospheric pollution characterized by NO<sub>2</sub> concentrations and testate amoebae density and diversity. *Acta Protozoologica* 43: 233-239.
- Nguyen-Viet H., Bernard N., Mitchell E.A.D., Cortet J., Badot P.-M., Gilbert D. (2006b) Relationship between testate amoebae (protist) communities and atmospheric heavy metals accumulated in *Barbula indica* (Bryophyta) in Vietnam. *Microbial ecology*, 53: 53-65
- Nguyen-Viet H., Gilbert D., Mitchell E.A.D., Badot P.-M., Bernard N. (2007) Effects of experimental lead pollution on the microbial communities associated with *Sphagnum fallax* (Bryophyta). *Microbial ecology*, 54: 232-241
- Nguyen-Viet H., Bernard N., Mitchell E.A.D., Badot P.-M., Gilbert D. Effect of lead on Testate Amoeba communities in *Sphagnum fallax* : an experimental study. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 69 : 130-138.

LISTE DES OPERATIONS DE VALORISATION ISSUES DU CONTRAT (ARTICLES DE VALORISATION, PARTICIPATIONS A DES COLLOQUES, ENSEIGNEMENT ET FORMATION, COMMUNICATION, EXPERTISES...)

PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES	
Publications scientifiques parus	<ul style="list-style-type: none"><li>• GAUDRY A., MOSKURA M., MARIET C., AYRAULT S., DENAYER F., BERNARD N. Inorganic pollution in PM<sub>10</sub> particles collected over three French sites under various influences: rural conditions, traffic and industry. <i>Water air and soil pollution</i>, 193: 91-106.</li></ul>
	<i>Articles soumis</i>
Publications scientifiques prévues	<ul style="list-style-type: none"><li>• FABURE J., MEYER C., DENAYER F.-O., GAUDRY A., GILBERT D., BERNARD N. Atmospheric metal trace element deposition at three differently polluted sites (industrial, urban and rural): a comparison of accumulation capacity between an acrocarpous and a pleurocarpous moss. <i>Atmospheric Environment</i>, soumis.</li><li>• MEYER C., GILBERT D., GAUDRY A., FRANCHI M., NGUYEN-VIET H., FABURE J., BERNARD N. Relationship of Atmospheric Pollution Characterized by gas (NO<sub>2</sub>) and particles (PM<sub>10</sub>) to Microbial Communities Living in Bryophytes at Three Differently Polluted Sites (Rural, Urban and Industrial). <i>Microbial Ecology</i>, soumis.</li></ul>
	<i>Articles en preparation</i>
	<ul style="list-style-type: none"><li>• DENAYER F.-O., CANIVET L., GARÇON G., GAUDRY A., BERNARD N. Determination of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in <i>Ceratodon purpureus</i>, a cultivated bryophyte, exposed to heavy metals airborne matter. <i>Plant Cell Environ.</i>, en préparation.</li><li>• MEYER C., GILBERT D., FRANCHI M., DENAYER F., GAUDRY A., BERNARD N. Effect of urban particles on microbial communities in <i>Scleropodium purum</i> : an experimental study. <i>Ecotoxicology and Environmental Safety</i>, en preparation.</li><li>• MEYER C., GILBERT D., FRANCHI M., DENAYER F., GAUDRY A., BERNARD N. Effect of particulate atmospheric pollution on Testate Amoebae community living in Bryophytes : in situ and experimental studies. <i>Microbial ecology</i>, en preparation.</li></ul>

COLLOQUES

Participations passées à des colloques internationaux

- MEYER C., GILBERT D., FRANCHI M., GAUDRY A., DENAYER F., BERNARD N. (2007) Relationship between atmospheric pollution characterized by NO<sub>2</sub> concentration and microbial communities living in Bryophytes at 3 different sites. SETAC Europe 17<sup>th</sup> Annual Meeting. Porto, Portugal, 20 - 24 May 2007.
- MEYER C., GILBERT D., FRANCHI M., GAUDRY A., DENAYER F., FROTSCH C., BERNARD N. (2008) Interaction between particulate air pollution and environmental variables on microbial communities living in bryophytes: in situ and experimental study comparison. SETAC Europe 18th Annual Meeting. Warsaw, Pologne, 25 - 29 May 2008.
- GAUDRY A., MOSKURA M., SENHOU A., AYRAULT S., DENAYER F., BERNARD N. (2007) Heavy metal concentrations at three French sites under industrial and traffic influences and rural conditions part I: Atmospheric PM10 particles composition. 6th International Conference on Urban Air Quality (Chypre). Comm. Orale.
- GAUDRY A., MOSKURA M., MARIET C., AYRAULT S., DENAYER F., BERNARD N. (2007) Heavy metal concentrations at three French sites under industrial and traffic influences and rural conditions part II: Biomonitoring by mosses. 6th International Conference on Urban Air Quality (Chypre). Comm. Orale.
- FABURE J., GARÇON G., DENAYER F.-O., SHIRALI P., DERAM A., CUNY D., GAUDRY A., VAN HALUWYN C., BERNARD N. (2006) Biomarkers of oxidative stress induced by airborne matter and associated heavy metals in two bryophyte species. 4th International Workshop on Biomonitoring of Atmospheric Pollution (with emphasis on trace elements). 17-21 september, Agios Nikalaos, Crête. Comm. Orale.

Participations passées à des colloques nationaux

- MEYER C., GILBERT D., GAUDRY A., FRANCHI M., NGUYEN-VIET H., DENAYER F., BERNARD N. (2009) Impact de la pollution atmosphérique (particules et dioxyde d'azote) sur les communautés microbiennes de bryophytes dans 3 lieux différemment pollués. 24<sup>ème</sup> Congrès Français sur les Aérosols, Paris, France, 14, 15 Janvier 2009.
- BERNARD N., GILBERT D., MEYER C., N'GUYEN-VIET H., FRANCHI M., TOUSSAINT M-L., MOSKURA M., MARIET C., DENAYER F., FABURE J., GAUDRY A. (2007) Développement d'outils biologiques d'évaluation des impacts des particules atmosphériques dans des écosystèmes diversement pollués : mesures de réponses précoces induites chez les bryophytes et leurs communautés microbiennes. *Colloque de restitution « Qualité de l'air et particules : impacts sur environnement et santé. Quelles mesures préconiser pour demain ? »*

**Développement d'outils biologiques d'évaluation des impacts des particules atmosphériques dans des écosystèmes diversement pollués**

	<p><i>Primequal 2-Predit Ministère de l'écologie et du Développement Durable</i>, Octobre, Rouen. Comm. Orale.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• BERNARD N., GILBERT D., MEYER C., N'GUYEN-VIET H, FRANCHI M., TOUSSAINT M-L., MOSKURA M., MARIET C., DENAYER F., FABURE J., GAUDRY A. (2007) Outils biologiques d'évaluation des impacts des particules atmosphériques dans des écosystèmes diversement pollués. <i>Colloque de restitution Primequal 2-Predit Ministère de l'écologie et du Développement Durable</i>, Octobre, Rouen.</li> <li>• MEYER C., GILBERT D. , FRANCHI M., GAUDRY A., DENAYER F., BERNARD N., (2007) Relation entre pollution atmosphérique caractérisée par le NO<sub>2</sub> et communautés microbiennes chez <i>Scleropodium purum</i> (Bryophytes) dans trois lieux différemment pollués. XIII<sup>e</sup> Forum des Jeunes Chercheurs, Dijon, France, 14-15 juin. 6<sup>th</sup> Price for Oral Communication.</li> <li>• FABURE J., DENAYER F.-O., GARÇON G., VAN HALUWYN C., GAUDRY A., BERNARD N. (2006) Biomarkers of oxidative stress induced by airborne matter and associated heavy metals in two bryophytes species: a new way for environmental risk assessment. 15th IUAPPA conference – 17th EFCA speciality conference. « Air pollution and environmental health, from science to action: the challenge of particulate matter ». 5-8 september, Lille, France</li> <li>• BERNARD N., GILBERT D., N'GUYEN-VIET H, COEURDASSIER M , SCHEIFLER R, BADOT PM. (2004) Développement d'outils biologiques d'évaluation des impacts des aérosols et des particules atmosphériques dans des écosystèmes diversement pollués. <i>Séminaire « Particules » Primequal 2 Ministère de l'écologie et du Développement Durable, ADEME, Paris</i>. Comm. Orale.</li> </ul>
Participations futures à des colloques	Non encore définies mais elles seront dans le cadre des thèses en cours
<b>THESES</b>	
Thèses en cours	<ul style="list-style-type: none"> <li>• MEYER Caroline (Doctorat Environnement, Santé, Société) - 2006 / 2009. <u>Sujet</u> : Analyses des particules atmosphériques et mesures de réponses précoces induites chez les communautés microbiennes de bryophytes. <u>Encadrants</u> : D. GILBERT., N. BERNARD - Université de Franche-Comté - LBE. Financement de thèse : Ville de Besançon</li> <li>• FABURE Juliette (Doctorat Sciences Biologiques – Université Lille 2) – 2006/2009. Sujet : Evaluation écotoxicologique des impacts des composés organiques volatils chez les bryophytes : développement de bioessais d'écotoxicité chez <i>Ceratodon purpureus</i> (HEDW.) Brid. Encadrants : C. VAN HALUWYN, F.-O. DENAYER –</li> </ul>

**Développement d'outils biologiques d'évaluation des impacts des particules atmosphériques dans des écosystèmes diversement pollués**

Université de Lille 2 – Département de Botanique – EA 2690 Toxiques et Cancérogènes industriels et environnementaux  
Financement de thèse : Allocation recherche Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (MESR)

**ARTICLES DE VALORISATION-VULGARISATION**

Articles de valorisation parus      • L'Air Normand Observatoire de la qualité de l'Air – N° spécial colloque « particules et aérosols » N°50 Trimestriel nov-déc 2007- janvier 2008  
ISSN 1169 9280

**ENSEIGNEMENT - FORMATION**

Enseignements/formations dispensés      • Daniel GILBERT et Nadine BERNARD sont intervenus en Master 2 « Diagnostic Environnemental et gestion durable des ressources » UFC Franche-Comté sur le thème : utilisation des microorganismes en surveillance environnementale et plus précisément dans le domaine de la qualité de l'air (2005 à 2008).  
• Franck DENAYER est intervenu dans le cadre de la licence Santé – Mention Ingénierie en Bioenvironnement, Université de Lille 2 Droit et Santé, sur les thèmes : de la biosurveillance de la qualité de l'environnement (air, eau, sol) et de la toxicologie (2005 à 2008).  
Franck DENAYER est intervenu dans le cadre du Master Santé – Mention Santé Publique – Spécialité Qualité et Gestion des Risques Environnementaux et Sanitaires, Université de Lille 2 Droit et Santé, sur les thèmes : de l'écotoxicologie de la génotoxicité des substances chimiques sur les êtres vivants, de l'évaluation des risques environnementaux et sanitaires, des mécanismes d'action toxique des polluants sur les êtres vivants...

Enseignements/formations prévus      • Des interventions sur ces thèmes sont prévues pour le prochain quadriennal (2008 à 2012) à l'Université de Franche-Comté et à l'Université de Lille 2 en Licence 3 et Master 1 et 2.  
• Une intervention sur ce thème est programmée au 1<sup>er</sup> semestre 2008 à l'Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne

## Développement d'outils biologiques d'évaluation des impacts des particules atmosphériques dans des écosystèmes diversement pollués

### RESUME

La pollution atmosphérique particulaire est devenue l'un des problèmes sociétaux majeurs en raison de ses effets sanitaires et environnementaux. Depuis quelques années, les bryophytes sont utilisées pour la surveillance de la qualité de l'air pour les composés gazeux et les composés particulaires. Par ailleurs, la pollution atmosphérique gazeuse peut avoir un impact rapide sur l'abondance et la diversité des communautés microbiennes vivant au sein de ces bryophytes.

L'objectif général de cette étude était d'étudier l'impact des particules atmosphériques sur le micro-système bryophytes et leurs micro-organismes associés. Plus précisément, cette recherche avait pour but de caractériser les effets des aérosols et des particules atmosphériques à différents niveaux d'organisation biologique en évaluant des réponses physiologiques induites chez des bryophytes (biomarqueurs) et des réponses écologiques sur la structure et la composition de leurs communautés de microorganismes (biointérateurs).

Les expérimentations ont été réalisées dans trois sites sélectionnés en fonction de la nature des sources potentielles de contamination : un site rural, un site routier et un site industriel. Deux espèces de bryophytes ont été transplantées sur une période de 8 mois dans des conditions d'exposition standardisées. La pollution atmosphérique gazeuse ( $\text{NO}_2$ ,  $\text{O}_3$ ) a été mesurée à l'aide d'échantillonneurs passifs. L'échantillonnage de la pollution atmosphérique particulaire a été réalisé en continu. Les dépôts de composés particulaires au sein des bryophytes ont été quantifiés et leurs communautés microbiennes (richesse spécifique, biomasse) ont été observées. Parallèlement, des expérimentations en conditions contrôlées ont été effectuées en simulant des expositions proches des dépôts humides *in situ*. Pour cela, des micro-systèmes bryophytes-microorganismes ont été exposés à des particules apportées par nébulisation, puis les réponses physiologiques (bryophytes) et écologiques (communautés microbiennes) ont été observées.

Les résultats obtenus indiquent que les pollutions sont significativement différentes dans les 3 sites pour ce qui concerne la composition élémentaire en  $\text{PM}_{10}$  (site rural < site routier < site industriel) et les concentrations en  $\text{NO}_2$  (site rural < site industriel < site routier). L'analyse des teneurs multi-élémentaires en particules  $\text{PM}_{10}$  a permis de caractériser, les concentrations en éléments traces métalliques de l'aérosol, la provenance des particules, leur transport à l'échelle locale ou régionale et l'influence des conditions climatiques sur les dépôts. De fortes corrélations entre la composition des particules  $\text{PM}_{10}$  de l'air et les éléments inorganiques présents au sein des bryophytes ont été mises en évidence. La bio-accumulation des bryophytes peut différer d'un élément à l'autre et varie en fonction des espèces de bryophytes.

Nos résultats mettent en évidence un effet de la pollution particulaire sur les micro-systèmes bryophytes-microorganismes associés. Ainsi, certains biomarqueurs précoces d'exposition (MDA) et d'effet génotoxique (8OHdG) témoignent des impacts liés à l'exposition aux contaminants atmosphériques et plus particulièrement aux éléments traces métalliques particulaires. La 8OHdG a été pour la première fois mesurée chez les bryophytes, et elle pourrait constituer un biomarqueur pertinent pour des applications futures. Par ailleurs, une réaction significative de la communauté microbienne a été constatée (diminution de la biomasse totale microbienne). De plus, certains groupes microbiens, bactéries hétérotrophes et protistes, ont été plus affectés que les autres. Ces résultats ont donc permis de montrer que certains microorganismes peuvent constituer un biointérateur précoce (c'est-à-dire présentant une réaction rapide) des particules d'origine atmosphérique, y compris lorsque leurs concentrations dans le milieu sont faibles. Les protozoaires, en particulier les amibes à thèque semblent constituer le groupe le plus pertinent pour ce type d'études.

A terme, ces marqueurs précoces d'exposition et d'effets pourraient être utilisés pour la surveillance de la qualité de l'air. Ces outils biologiques pourraient s'intégrer dans une démarche d'évaluation des risques environnementaux et sanitaires, et pourraient aider à la réflexion dans la détermination de seuils réglementaires. C'est pourquoi à la suite du présent travail, le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche et la ville de Besançon ont choisi de financer deux thèses en continuité du programme Primequal 2 Predit. Ces travaux en cours portent sur la recherche de l'écotoxicité de polluants atmosphériques et sur la mise au point des micro-systèmes standardisés à Bryophytes.

## **Développement d'outils biologiques d'évaluation des impacts des particules atmosphériques dans des écosystèmes diversement pollués**

### **MOTS CLES**

Particules, éléments traces métalliques, micro-systèmes Bryophytes-microorganismes, milieux urbains, industriels et ruraux, biomarqueurs, biointégrateurs.

### **ABSTRACT**

Particulate atmospheric pollution is a major problem for modern societies because of its fatal effects on human health and ecosystems. Air quality monitoring (gases and particulate elements) can be done by using bryophytes. Gas atmospheric pollution may have an early effect on the abundance and diversity of microbial communities living in bryophytes.

The general aim of this study was to examine the impact of atmospheric particles on bryophyte / associated micro-organism microsystems. More precisely, this research characterised the impacts of atmospheric aerosols and particles at different biological levels with an evaluation of physiological responses in bryophytes and ecological responses on the structure and composition of their microbial communities.

Experimentations were carried out at three sites: a rural site, a traffic site and an industrial site.

Two species of bryophytes were used over an 8-month period in standardised conditions of exposure. Gaseous atmospheric pollution (NO<sub>2</sub>, O<sub>3</sub>) was measured by passive samplers. Sampling of particulate atmospheric pollution was done continuously. Deposits of particulate elements in Bryophytes were quantified and their microbial communities (specific richness, biomass) were observed. At the same time, laboratory experiments under controlled conditions were carried out by simulating humid exposures similar to in situ deposits. Thus bryophyte / micro-organism Microsystems were exposed to particles brought in by nebulisation and then, physiological responses (bryophytes) and ecological responses (microbial communities) were observed.

Our results indicate that pollution was significantly different at the 3 sites for PM<sub>10</sub> elementary composition (rural site < traffic site < industrial site) and for NO<sub>2</sub> concentrations (rural site < industrial site < traffic site). By analysing multi-element PM<sub>10</sub> particles, the heavy metal concentrations of the aerosols, the origin of particles, their displacement on a local or regional scale and the influence of climatic conditions on deposits were determined. PM<sub>10</sub> particle atmospheric compositions were significantly correlated with inorganic elements of Bryophytes. Bio-accumulation of metals by Bryophytes can differ according to considered elements and to the bryophyte species used.

Our results show the effect of the particulate pollution on bryophyte / micro-organism micro-systems. Thus, some early biomarkers of exposition (MDA) and genotoxic effect (8OHdG) early monitors show the effect of atmospheric contaminants and more precisely atmospheric heavy metal pollutants. 8OHdG was measured in bryophytes for the first time and could be a pertinent biomarker for future uses.

A significant reaction of the microbial communities was also noted (decrease in the total microbial biomass). Moreover, some microbial groups, heterotrophic bacteria and protists were more greatly affected than others. These results demonstrate that some microorganisms can be considered as early biointegrators of atmospheric particles, even when air concentrations are low.

Protozoa, especially testate amoeba, seem to be the most pertinent group to consider for this type of study.

Eventually, these early monitors of exposure or effect could be used for air quality monitoring. These biological tools could be integrated into an approach for the environmental and health risk assessment. It is the reason why, the Ministry of Higher Education and Research and the City of Besançon have decided to grant two doctoral theses following up the Primequal 2 Predit results. Their work aims to clarify ecotoxicity of atmospheric pollutants and to determine standardised bryophytes microsystems.

### **KEY WORDS**

Particles, metal trace element, Bryophyte/ micro-organism micro-systems, rural, urban and industrial areas, biomarkers, biointegrators

Rapport scientifique

**Développement d'outils biologiques d'évaluation des impacts des aérosols et des particules atmosphériques dans des écosystèmes diversement pollués : mesures de réponses précoces induites chez les bryophytes (biomarqueurs) et leurs communautés microbiennes (biointégrateurs).**

## **PROGRAMME PRIMEQUAL-PREDIT**

**Responsable scientifique du projet : Nadine BERNARD**

Nadine BERNARD, Daniel GILBERT :  
Laboratoire Chrono-Environnement (LCE), UMR 6249 UFC/CNRS UsC INRA, Université de Franche-Comté, Place Leclerc – 25030 Besançon Cedex.

Franck DENAYER, Chantal VAN HALUWYN :  
Département de Botanique et de Cryptogamie (DBC), Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Université de Lille 2, BP 83 – 59006 Lille Cedex, France.

André GAUDRY, Mélanie MOSKURA, Clarisse MARIET :  
Laboratoire Pierre Süe (LPS) – CEA-CNRS, UMR 9956, CE Saclay, 91191 Gif-sur-Yvette Cedex

## **Développement d'outils biologiques d'évaluation des impacts des particules atmosphériques dans des écosystèmes diversement pollués**

Ce programme de recherche avait pour objectif général d'évaluer l'impact des particules atmosphériques sur un micro-système bryophytes et leurs micro-organismes associés.

Plus précisément, cette recherche avait pour but de caractériser les effets des aérosols et des particules atmosphériques à différents niveaux d'organisation biologique en évaluant des réponses physiologiques induites chez des bryophytes (biomarqueurs) et des réponses écologiques sur la structure et la composition de leurs communautés de microorganismes (biointégrateurs).

### **I. SITES ET ESPECES RETENUES**

#### **1.1. Sites d'étude**

Trois sites d'étude ont été sélectionnés en fonction de la nature des sources potentielles de contamination particulaire: (1) un site rural « témoin », Montagney (Haute Saône), situé à 30 km de Besançon (Doubs), (2) un site soumis aux influences du trafic routier, Saclay- (Essonne), à 100 mètres de la RN 118, à 25 km au Sud-Ouest de Paris, et (3) un site contaminé par des retombées industrielles en plein cœur du complexe industriel de Dunkerque (Nord). La période d'étude *in situ* a duré 8 mois, du 26 octobre 2005 au 7 juin 2006.

#### **1.2. Espèces de bryophytes "sentinelles"**

Deux espèces de bryophytes ont été exposées aux dépôts particuliers : *Ceratodon purpureus* (Hedw.) Brid. (espèce issue de cultures standardisées). La culture standardisée de cette espèce acrocarpe permet d'assurer une grande homogénéité génétique et physiologique (maturité biologique des individus). Ce point est un atout pour envisager l'utilisation en routine de cette espèce comme sentinelle de la qualité de l'air dans le cadre de procédures réglementaires. La seconde espèce a été *Scleropodium purum* (Hedw.) Limpr. dont des transplants ont été prélevés dans des sites de référence répertoriés en région de Fontainebleau. Les études menées par le Muséum National d'Histoire Naturelle ont montré que cette espèce se trouvait en quantité abondante sur le site et qu'elle était soumise à une pollution de fond métallique très faible. Cette bryophyte de type pleurocarpe a une morphologie différente de *Ceratodon purpureus*. En revanche, ces deux bryophytes sont ectohydriques, c'est-à-dire qu'elles absorbent l'eau uniquement par capillarité.

Préalablement aux expérimentations *in situ*, ces deux espèces ont été disposées pour acclimatation, pendant une durée de trois mois sur le site « témoin » de Montagney, où des échantillons de bryophytes (N=9) ont été prélevés et dosés. Pour chaque élément, la valeur moyenne et son écart-type ont été calculés, déterminant ainsi la concentration  $C_0$ . Cette donnée est fondamentale pour observer l'évolution des concentrations et de possibles phénomènes de bio-accumulation.

## **II. MATERIELS ET METHODES**

### **2.1. Méthodes d'exposition**

Deux méthodes complémentaires d'exposition ont été privilégiées :

#### **2.1.1. Axe 1 : expérimentation *in situ***

Lors de l'expérimentation *in situ*, *Scleropodium purum* et *Ceratodon purpureus* ont été exposées aux dépôts particulaires. Ces deux espèces ont été placées aux trois sites d'étude selon un protocole standardisé. Les mousses ont été disposées dans des bacs en polyéthylène, à 1 mètre du sol dans des abris dépourvus de parois latérales, mais disposant d'un toit translucide les protégeant de dépôts humides directs. Les conditions environnementales d'exposition (hauteur, orientation) ont également été standardisées. L'arrosage a été effectué par de l'eau de Volvic, très pauvre en charge élémentaire et de composition constante au cours du temps. A chaque site, trois stands d'exposition ont été installés permettant d'effectuer 3 réplicats lors de chaque prélèvement. Les mousses échantillonnées ont été soit fixées à la glutaraldéhyde (concentration finale à 2%), congelées à  $-80^{\circ}\text{C}$ , ou séchées à l'étuve à  $40^{\circ}\text{C}$  selon les analyses à effectuer. Le transport des échantillons de Bryophytes, collectés sur les différents sites, a été fait soit en tubes contenant de la glutaraldéhyde, soit en sachets maintenus à  $-80^{\circ}\text{C}$  dans de la carboglace (glace carbonique). La conservation des échantillons a été réalisée en tubes maintenus à l'abris de la lumière à  $+4^{\circ}\text{C}$  ou en congélateur à  $-80^{\circ}\text{C}$ .

La durée d'exposition des micro-systèmes bryophytes/micro-organismes associés était initialement prévue à 6 mois. Compte tenu des Bryophytes disponibles, cette durée a finalement été de 8 mois avec un échantillonnage tous les 2 mois (de  $T_0$ , moment initial de la mise en place des dispositifs, jusqu'à  $T_4$  (4<sup>ème</sup> prélèvement)).

Les 4 périodes de mesure ont été les suivantes :

- $P_1$  : du 26/10/05 au 20/12/05,
- $P_2$  : du 20/12/05 au 15/02/06,
- $P_3$  : du 15/02/06 au 12/04/06,
- $P_4$  : du 12/04/06 au 07/06/06.

L'importance des dépôts particulaires ( $\text{PM}_{10}$ ) a été estimée en utilisant des pompes « Partisol » disposant d'un débit de  $1\text{ m}^3/\text{heure}$  et recueillant les particules sur des filtres en fibre de quartz (Tissue-Quartz, Pallflex). Ces filtres ont été renouvelés tous les 2 mois. Les filtres collectés sur les différents sites ont été transportés en boîtiers hermétiquement clos.

L'échantillonnage des gaz, dioxyde d'azote ( $\text{NO}_2$ ) et ozone ( $\text{O}_3$ ), a été effectué à l'aide d'échantillonneurs passifs (Palmes *et al.*, 1976 ; Bernard *et al.*, 1997a, 1997b, 1999). Ces dispositifs portatifs ont été disposés, de manière standardisée, aux 3 sites sélectionnés au cours des 8 mois d'étude. Leurs analyses ont été effectuées par spectrophotométrie.

Les principaux facteurs météorologiques (précipitation, température, sens et vitesse du vent, durée d'ensoleillement) ont été mesurés sur les sites ou à proximité immédiate de ceux-ci à l'aide de stations météorologiques.

## **Développement d'outils biologiques d'évaluation des impacts des particules atmosphériques dans des écosystèmes diversement pollués**

### 2.1.2. Axe 2 : expositions en conditions contrôlées

Des expositions particulières représentatives des conditions *in situ* ont été mises en place en conditions contrôlées afin de préciser les réponses physiologiques et biologiques de micro-systèmes bryophytes/micro-organismes associés.

L'espèce *Scleropodium purum* installée dans des bacs de polyéthylène a été acclimatée pendant quatre semaines en phytotron en conditions idéales de croissance, avant d'être placée dans des enceintes à nébulisation en quatre lots : 1 lot témoin et 3 lots recevant respectivement 1, 2 et 3 expositions successives de particules (C1, C2, C3). Ces expositions ont été effectuées tous les 15 jours, à raison d'un apport de 10 ml d'une solution aqueuse de PM<sub>10</sub>. Après exposition, les parties vertes de *Scleropodium purum* correspondant aux trois premiers centimètres sous l'apex ont été collectées à l'aide de ciseaux en céramique afin d'éviter tout risque de contamination métallique.

La solution de PM<sub>10</sub> a été constituée à partir de filtres collectées en site « trafic » grâce aux associations de mesure de la qualité de l'air : ASQAB, ASPA, ATMOSF'AIR, ceci afin de disposer de résultats représentatifs des conditions *in situ*. Après collecte des filtres d'entrée d'air des analyseurs physico-chimiques, les particules ont été séparées de leurs supports par sonication en solution aqueuse. La solution a été homogénéisée par brassage puis filtrée pour éliminer les restes de filtres. La composition élémentaire des particules collectées a été analysée conjointement par ICP-MS et activation neutronique. La taille des particules a été estimée par microscopie inversée couplée à un analyseur d'images (Logiciel Lucia, Nikon).

Les paramètres physiologiques (bryophytes) et écologiques (communautés) mesurés ont été les mêmes que ceux suivis *in situ*.

### 2.2. Méthodes analytiques

Deux techniques d'analyse multi-élémentaires ont été mises en œuvre pour caractériser la composition des particules atmosphériques et des éléments présents dans les tissus des bryophytes : l'analyse par activation neutronique pratiquée le plus souvent en mode instrumental (INAA : instrumental neutron activation analysis) et l'analyse par spectrométrie de masse couplée avec un plasma produit par induction (ICP-MS). Cette dernière a nécessité la mise en solution des échantillons par voie acide, en faisant agir successivement les acides nitrique, perchlorique, fluorhydrique puis le perhydrol. Les réactifs ont été évaporés et le résidu final repris en acide nitrique dilué à 2%. Plusieurs dilutions ont dû être pratiquées selon les gammes de concentration des éléments pour respecter les sensibilités et linéarités de l'appareillage. Les techniques analytiques ont été contrôlées au moyen de matériaux standards de référence fournis par le NIST (US National Instruments Standards and Technology) ou l'IAEA (International Atomic Energy Agency).

L'INAA a permis d'analyser les éléments suivants : Na, Mg, Al, Cl, Ca, K, Sc, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Zn, As, Se, Br, Rb, Ag, I, Sb, Cs, La, Ce, Sm, Eu, Hf, Ta, Th, Au et Ir.

L'ICP-MS a permis de déterminer la teneur des éléments suivants : Li, Ti, Cu, Sr, Zr, Nb, Mo, Cd, Sn, Ba, Pb, U, ainsi que toutes les terres rares.

### 2.3. Méthodes biochimiques

Les réponses individuelles chez les bryophytes ont reposé sur la recherche de biomarqueurs de toxicité. Les mesures ont été effectuées sur les parties vivantes des mousses, à partir desquelles ont été extraits les protéines et/ou les métabolites à doser.

## **Développement d'outils biologiques d'évaluation des impacts des particules atmosphériques dans des écosystèmes diversement pollués**

Les protéines extraites ont été dosées par l'acide bicinchoninique (Smith *et al.*, 1985), et les réactifs du kit BCA protein (Pierce). Ce dosage est basé sur la réduction des ions  $\text{Cu}^{2+}$  par les protéines, les ions  $\text{Cu}^{2+}$  réagissant avec le BCA pour former un complexe pourpre qui absorbe à 562 nm.

La lipoperoxydation des membranes a été évaluée grâce au dosage du Malondialdéhyde (MDA). La concentration en MDA est déterminée par une méthode HPLC développée par Boutin *et al.* (1998).

Des biomarqueurs de génotoxicité ont également été recherchés par l'évaluation de la formation d'adduit au DNA : 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8OHdG) et par l'évaluation de la fragmentation du DNA : test du DNA Ladder.

Après l'extraction du DNA et son isolation avec le kit DNeasy™ Plant Mini (Qiagen, Courtaboeuf, France), la concentration en DNA a été déterminée par la mesure de l'absorbance à 260 nm avec un GeneQuantII RNA/DNA Calculator (Pharmacia Biotech Europe, Orsay, France). Ensuite, les échantillons de DNA ont été digérés par une nucléase P1 (incubation d'une nuit à 37°C) et une phosphatase alcaline. La détermination de la concentration en 8OHdG a été réalisée à l'aide du kit 8OHdG ELISA (New 8OHdG Check, Gentaur, Japan Institute for the Control of Aging, Haruoka, Japan). Cette méthode immunoenzymatique par compétition est basée sur l'addition d'anticorps monoclonal IgG anti-8OHdG, puis d'anticorps polyclonaux anti-8OHdG combiné à une peroxydase et tetraethylbenzidine. L'intensité de la coloration absorbée à 450 nm, est inversement proportionnelle à la concentration en 8OHdG dans les standards ou échantillons analysés. Pour le test du DNA Ladder, les échantillons de DNA isolés, avec ajout de bleu de bromophenol, ont subi une électrophorèse dans un gel d'agarose à 1% dans un tampon de Tris/borate/EDTA. Le DNA a été visualisé avec un illuminateur UV après une imprégnation au bromure d'éthidium.

Les dosages ont été réalisés au sein du laboratoire de Recherche en Toxicologie Industrielle de l'Université du Littoral Côte d'Opale à Dunkerque du Pr. Pirouz Shirali en collaboration avec le Dr. Guillaume Garçon et M. Anthony Verdin (Ingénieur de Recherches).

### **2.4. Dénombrement des microorganismes**

Le dénombrement et l'identification des communautés microbiennes ont été réalisés, en microscopie inversée pour les protistes et, en microscopie inversée à épifluorescence pour les bactéries, assistée par un logiciel d'analyse d'images (Lucia, Nikon). Les biovolumes cellulaires ont été déterminés à partir de la forme générale des cellules et ont été convertis en biomasse exprimée en biomasse-carbone à partir de facteurs de conversion trouvés dans la bibliographie. L'association des trois paramètres : diversité spécifique et abondance, biomasse, a permis de déterminer de façon précise la réaction des communautés microbiennes à la perturbation (Gilbert *et al.*, 1998a, 1998b).

### **2.5. Méthodes de traitement des données et d'analyses statistiques**

Un facteur d'enrichissement (FE) a été calculé pour les éléments inorganiques mesurés dans les particules et dans les bryophytes. FE correspond au rapport d'une concentration d'un élément (i) dans un échantillon à la concentration d'un élément pris comme référence dans le même échantillon. La concentration  $\text{XN}_i$  est ainsi normée au moyen d'une autre concentration. L'élément pris comme référence est le scandium (Sc), car il est issu de sources

## Développement d'outils biologiques d'évaluation des impacts des particules atmosphériques dans des écosystèmes diversement pollués

« naturelles » et non anthropiques. Un rapport équivalent  $SN_i$  est calculé dans un matériau de référence susceptible de représenter au mieux une moyenne géologique de concentration élémentaire dans les poussières. Ce calcul est réalisé grâce à la table de Taylor et McLenan (1985), et plus particulièrement, à l'aide de la composition moyenne de la croûte continentale supérieure (CCS), sensée être celle qui peut être soulevée par l'érosion éolienne et venir apporter une influence à l'aérosol.

Ainsi pour l'élément (i) dans l'échantillon son  $FE_i$  par rapport à la CCS peut être exprimé :  
 $FE_i = XN_i/CN_i$

Une certaine variabilité naturelle régionale est admise, c'est pourquoi des valeurs représentatives de mécanismes naturels ont des valeurs du FE comprises entre 1 et 7. Cette variabilité est due au fait que les poussières arrachées par les vents peuvent avoir des origines locales ou lointaines, avec des rapports de mélanges très variables, et des concentrations régionales de variabilité reflétant cet éventail.

Si  $7 < FE < 10$ , les enrichissements observés sont liés à des processus naturels et à des activités humaines. Si  $FE > 10$ , un enrichissement significatif est considéré, lié à des processus de pollution atmosphérique, ou éventuellement à des processus naturels particuliers qui enrichissent certains éléments volatils (volcanisme...).

Les concentrations des éléments présents dans les mousses ont été mesurées pour chaque stand de chaque site aux différentes dates de prélèvement (de  $T_0$  à  $T_4$ ). La régression linéaire de chaque élément a été déterminée, avec un coefficient  $r$  qui permet d'identifier la performance statistique de l'ajustement. La valeur de la pente, calculée lorsque  $r > 0,7$ , indique une vitesse moyenne d'accumulation pour 1 gramme de mousse par mois sur la période des 8 mois d'expérimentation.

Les données ont été comparées statistiquement par des méthodes univariées paramétriques ou non paramétriques ou par des méthodes multivariées choisies en fonction des objectifs et des pré-requis propres à chaque méthode. Les analyses de biomarqueurs de toxicité lors de l'expérimentation en conditions contrôlées de *Scleropodium purum*, ont été réalisées avec cinq réplicats ( $n=5$ ) par échantillon. Des analyses de variances (ANOVA) pour les biomarqueurs chez les deux espèces de bryophytes ainsi que pour les teneurs en ETM ont été réalisées. De plus, des corrélations de Spearman ( $p < 0,05$ ) entre les teneurs bioaccumulées chez *S. purum* et *C. purpureus* ont été calculées. Des corrélations de Spearman ont été calculées entre les variables environnementales et la biomasse des différents groupes de microorganismes. Des corrélations de Spearman ont été calculées entre les éléments traces métalliques retrouvés sur les filtres et ceux mesurés chez les Bryophytes. Les logiciels utilisés ont été Statistica (version 6.0) ou S-plus pour les méthodes univariées et Canoco pour les méthodes multivariées.

### **III. RESULTATS**

#### **3.1. Caractérisation de la pollution atmosphérique particulaire**

##### 3.1.1. Mesures *in situ* de la pollution gazeuse (NO<sub>2</sub>, O<sub>3</sub>) et particulaire PM<sub>10</sub> présente aux sites trafic/industriel/rural

Les 3 sites sont caractérisés par des concentrations en NO<sub>2</sub> significativement différentes (respectivement de 9,5, 62,2 et 41,8 µg/m<sup>3</sup> dans les sites de Montagney, Saclay et Dunkerque). Les concentrations en O<sub>3</sub> ne sont pas significativement différentes entre les 3 sites au cours des 8 mois d'étude.

*In situ*, le gradient des concentrations des éléments inorganiques mesurés dans les PM<sub>10</sub> est large. Il est de quelques picogrammes / m<sup>3</sup> (Ir) jusqu'à quelques centaines de nanogrammes / m<sup>3</sup> (Na, K et Ca), à Montagney et Saclay, et jusqu'à quelques microgrammes / m<sup>3</sup> (Na, Fe) à Dunkerque. Un accroissement de teneurs est constaté dans l'ordre : Montagney<Saclay<Dunkerque pour la plupart des éléments.

La composition élémentaire des PM<sub>10</sub> était significativement différente dans les trois sites pour de nombreux éléments (Tableau 1).

*Tableau 1 : Compositions élémentaires moyennes présentes dans les particules atmosphériques PM<sub>10</sub> (ng/m<sup>3</sup>) au niveau des 3 sites pour les périodes P1 à P4 (Gaudry et al., accepté).*

elements (ng/m3)	MONTAGNEY				SACLAY				DUNKERQUE			
	P1	P2	P3	P4	P1	P2	P3	P4	P1	P2	P3	P4
[Na]	193.57	268.21	242.86	283.21	596.56	NA	753.71	504.62	1379.31	1239.81	1917.41	1317.00
[Al]	76.40	98.88	47.68	112.99	100.97	NA	105.03	117.03	206.45	205.76	277.31	324.80
[Cl]	215.28	379.27	40.09	5.03	550.67	NA	412.38	21.90	2072.25	1845.23	2432.49	614.00
[Cr]	0.87	1.56	0.83	1.17	2.42	NA	2.11	1.93	5.68	5.49	3.40	4.20
[Mn]	2.88	5.45	2.45	2.86	5.10	NA	5.74	3.98	101.76	94.50	80.22	122.30
[Fe]	78.62	123.24	71.49	127.41	314.34	NA	257.68	308.90	1885.59	1730.74	1141.37	2317.14
[Cu]	3.12	7.44	2.25	2.24	16.63	NA	12.24	14.52	11.53	11.40	7.19	36.32
[Zn]	15.71	35.51	16.58	13.18	30.00	NA	26.78	20.71	142.07	149.45	92.08	121.57
[Sr]	0.78	1.62	0.85	1.04	1.45	NA	1.67	1.52	3.07	2.60	3.46	3.40
[Br]	2.81	4.56	2.35	1.71	4.55	NA	3.12	2.08	10.45	12.19	8.05	5.22
[Ni]	0.84	1.90	1.94	0.97	2.35	NA	1.79	1.34	5.32	8.62	6.98	12.27
[Pb]	7.43	16.07	5.43	3.83	12.31	NA	10.34	7.09	35.37	36.09	25.34	40.80

NA : non available

Périodes :- P1 : 26/10/05 au 20/12/05 -- P2 : 20/12/05 au 15/02/06 -- P3 : 15/02/06 au 12/04/06 -- P4 : 12/04/06 au 07/06/06 -

L'étude des facteurs d'enrichissement (FE) montre que pour le site de Montagney, les éléments Nb, Sc, Th Y, Zr, terres rares, Ti, Mg, Ta, Fe, Sr, U et Ba ont un comportement typiquement crustal. Les éléments suivants ont un comportement influencé par des activités humaines, en ordre croissant :

V<Cr<W<Tl<Ni<Cu<Sn<Cl<Zn<As<Au<Ag<Mo<Bi<I<Br<Cd<Sb<Ir<Se<Pb.

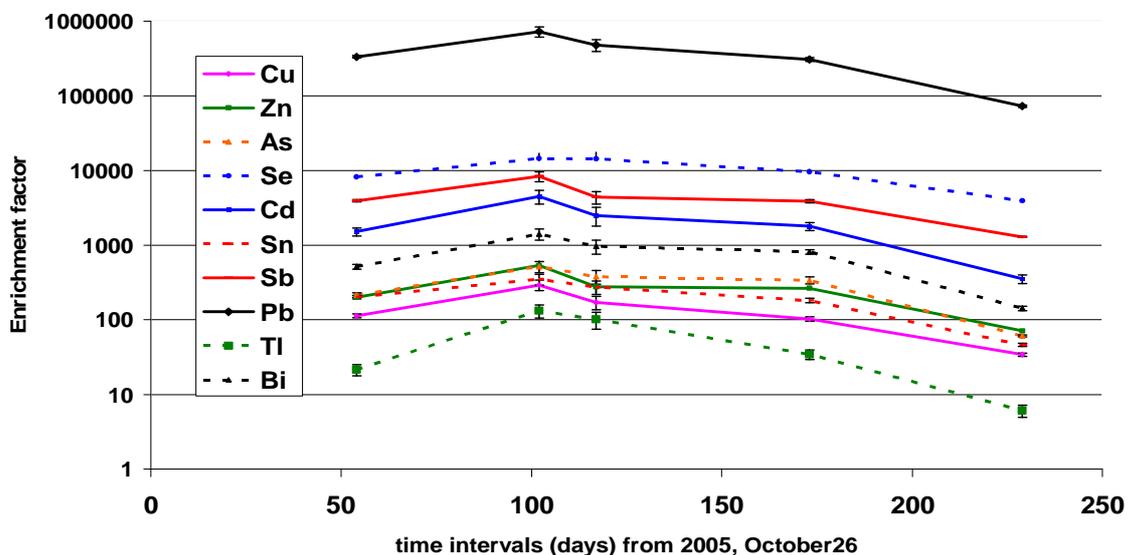
Les 6 derniers éléments ont un FE dépassant 1000, et même de 10000 pour Pb.

## Développement d'outils biologiques d'évaluation des impacts des particules atmosphériques dans des écosystèmes diversement pollués

Un FE élevé est obtenu pour Ir, pour lequel la méthode de détection utilisée (INAA) est très sensible. Cet élément commence à être observé dans les  $PM_{10}$  car il est associé aux métaux platinoïdes des pots catalytiques où il est considéré comme faisant partie des impuretés à un niveau de 1 à quelques %. Ces métaux et Ir sont maintenant rencontrés dans l'aérosol. Un FE élevé est également obtenu pour Pb alors que cet élément n'est plus ajouté dans les carburants en Europe et une décroissance de son influence dans l'aérosol était attendue. Cependant des quantités non négligeables sont mesurées dans les  $PM_{10}$  et sont apparemment liées aux activités humaines étant donné l'enrichissement observé. Le plomb est émis à l'état de traces à partir de la combustion de toutes les sources chaudes : carburants (présence de plomb qui accompagne la distillation des carburants), bois, charbon, incinération de déchets. Cet élément introduit en fortes quantités dans l'environnement par le passé peut très bien ne pas avoir été lixivié en totalité, et ainsi être remis en suspension.

La figure 1 montre une bonne corrélation temporelle des FE, à Montagney pour les éléments Cu, Zn, As, Se, Cd, Sn, Sb, Pb, Tl et Bi, avec un maximum hivernal correspondant au prélèvement P3 (décembre 2005 à février 2006). En Europe de latitude moyenne, cette période correspond à un besoin de chauffage assuré par la combustion d'énergies fossiles et de bois. Cette fourniture d'énergie est à l'origine de la modulation temporelle de FE, car une modulation liée à des activités lointaines de productions industrielles ou du trafic routier est peu probable.

Figure 1 : Facteurs d'enrichissement au site rural (Montagney) pour les éléments volatils du 26 octobre 2005 au 7 juin 2006.



A Saclay, certains éléments ont également un comportement terrigène (figure 2). Ce sont les terres rares, Y, Ta, Th, Nb, Sc, Ti, Rb, U, Zr, Sr, K, Hf, Mg, Fe.

## Développement d'outils biologiques d'évaluation des impacts des particules atmosphériques dans des écosystèmes diversement pollués

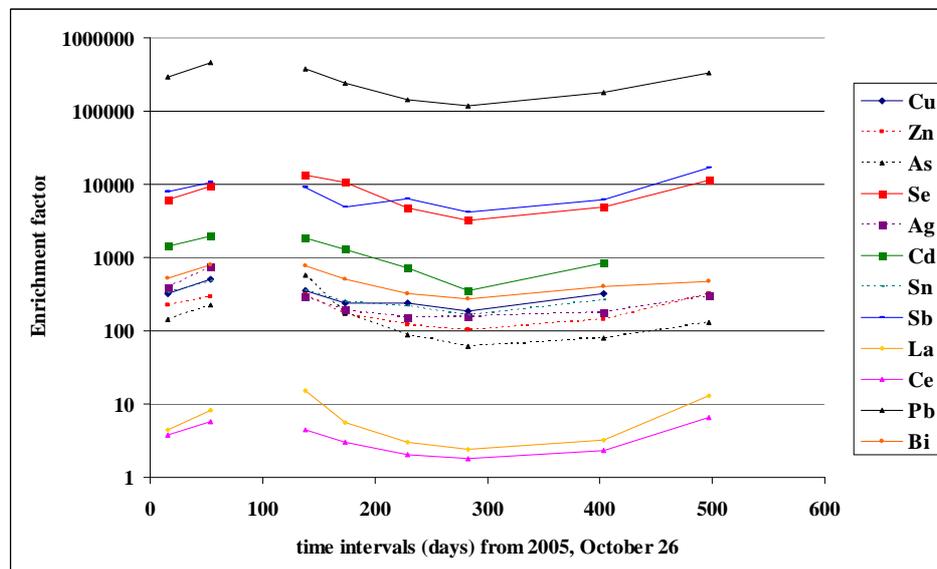
Les éléments de FE >10 sont les suivants, en ordre croissant de FE :

Co<Na<Tl<V<W<Cr<Ni<Zn<As<Sn<Cu<Ag<Cl<Au<Bi<I<Mo<Ir<Br<Cd<Sb<Pb

Parmi ces éléments, Zn, Mo, Cu, Sb, Br, Pb, Cr, Fe, sont connus pour être émis par le trafic routier. Ils peuvent être associés soit à la combustion des carburants, soit à l'usure de pièces mécaniques ou à celle des pneus. A Saclay, d'autres éléments associés au trafic tels que Ba, Fe, Mg et Mn n'ont pas de FE particulièrement élevés. Ainsi, les particules qui les supportent ne seraient pas assez fines pour être transportées jusqu'au site de prélèvement situé à 100 mètres de la route. Par contre, des valeurs élevées de FE sont relevées à Saclay pour Br, I, Ir et Se. Le comportement de Ir est lié à la même cause qu'à Montagney (pots catalytiques et transport à longue distance). Pour Br, I et Se, d'autres sources potentielles sont possibles : trafic routier, combustion de déchets urbains ou chauffage urbain au pétrole de la ville des Ulis localisée à 7 km du site de mesure.

A Saclay, des valeurs manquantes liées à un problème technique (fuite interne dans la pompe) apparaissent vers les 100 premiers jours de l'étude (Figure 2). Pour cette raison les prélèvements ont été poursuivis sur une année complète afin d'observer de possibles variations saisonnières. Des maximums hivernaux de FE sont obtenus pour les éléments suivants : Cu, Zn, As, Se, Ag, Cd, Sn, Sb, La, Ce, Pb et Bi. A Saclay comme à Montagney, ces éléments ont un accroissement en hiver dû à l'emploi de combustibles pour le chauffage.

Figure 2 : Facteurs d'enrichissement au site trafic router (Saclay) pour les éléments volatils du 26 octobre 2005 au 7 juin 2006.

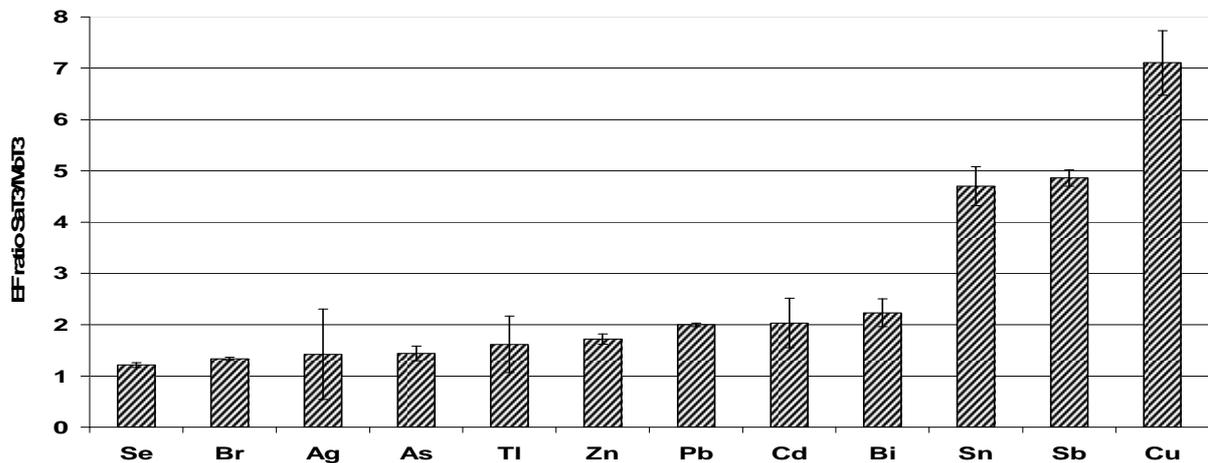


Afin de connaître la part liée au trafic routier, les FE obtenus à Saclay ont été comparés à ceux du site rural de Montagney lors d'une période excluant les activités de chauffage (période P4 : de avril à juin 2006). La figure 3 indique les valeurs du rapport  $FE_{t4, Saclay} / FE_{t4, Montagney}$

## Développement d'outils biologiques d'évaluation des impacts des particules atmosphériques dans des écosystèmes diversement pollués

Sn, Sb et Cu présentent un rapport dépassant 5 ce qui témoigne d'émissions beaucoup plus élevées à Saclay. Sb et Cu sont connus pour être liés au trafic routier, notamment dans les PM<sub>10</sub>. Sn pourrait être un élément associé à Sb et Cu.

Figure 3 : Rapport des concentrations au printemps (du 12 avril au 7 juin 2006) entre Saclay et Montagney



Sur le site de Dunkerque, le concept de FE ne peut pas être utilisé car la majorité des éléments, y compris le scandium, sont influencés par les activités industrielles, à savoir la sidérurgie et/ou les fonderies d'aluminium.

Les concentrations obtenues à Dunkerque ont été comparées à celles du site rural de Montagney (site de référence pour des concentrations de bruit de fond). Les rapports sont proches de 1 pour Hf, W, K, Ir, Ta et I. Pour tous les autres éléments les rapports sont supérieurs à 1 témoignant de l'existence de sources à Dunkerque. Les rapports sont supérieurs à 5 pour les éléments suivants, en ordre croissant : Cd, Zn, Na, Ni, Cs, Co, Cl, Nb, Tl, La, V, Fe et Mn. Le fer et le manganèse, émis par la sidérurgie, présentent les facteurs de multiplication les plus élevés : respectivement 13 et 19 fois plus concentrés dans les PM<sub>10</sub> de Dunkerque que celles de Montagney.

Par contre, bien qu'il existe une industrie de l'aluminium importante à Dunkerque, le rapport mesuré entre Dunkerque et Montagney, est proche de 1. On peut supposer que l'aluminium à Dunkerque doit exister dans des particules plus grosses que les PM<sub>10</sub>, non collectées par notre système.

### 3.1.2. Compositions élémentaires de particules issues de sites « trafic » urbain utilisées pour les expositions en conditions contrôlées

Les particules PM<sub>10</sub> collectées par des associations agréées de surveillance de la qualité de l'air (ASQAB, ASPA, ATMOSF'AIR) ont été mises en solution pour pouvoir réaliser les expositions en conditions contrôlées dans des enceintes à nébulisation. Elles ont été caractérisées en composition (Tableau 2) et en taille (Figure 4).

Les concentrations moyennes mesurées dans les particules recueillies en sites « trafic » sont faibles à modérées et 90% des particules ont un diamètre < 12µm.

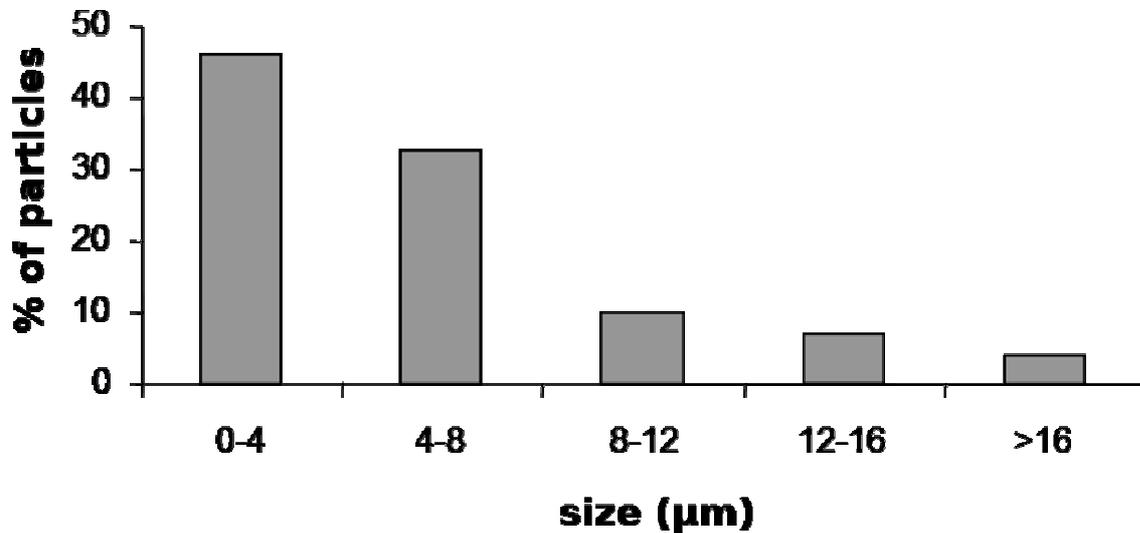
**Développement d'outils biologiques d'évaluation des impacts des particules atmosphériques dans des écosystèmes diversement pollués**

*Tableau 2 : compositions élémentaires des PM<sub>10</sub> (µg/ml) mises en solution, issues d'analyses par activation neutronique ou par ICP-MS (méthodes validées sur des matériaux de référence)*

<b>Eléments</b>	<b>Moyenne</b>	<b>SD</b>	<b>Eléments</b>	<b>Moyenne</b>	<b>SD</b>
<b>Ti</b>	1,6	0,2	<b>118Sn</b>	0,0202	0,0027
<b>Cr</b>	0,0088	0,0049	<b>120Sn</b>	0,02	0,0026
<b>Mn</b>	0,0042	0,0008	<b>Sb</b>	0,00283	0,00032
<b>Fe</b>	0,27	0,05	<b>135Ba</b>	0,068	0,038
<b>Co</b>	0,00021	0,00016	<b>137Ba</b>	0,068	0,038
<b>Ni</b>	0,0054	0,0032	<b>La</b>	0,00032	0,00004
<b>Cu</b>	0,0061	0,0006	<b>Ce</b>	0,00039	0,00004
<b>66Zn</b>	0,054	0,041	<b>W</b>	0,0004	
<b>68Zn</b>	0,055	0,042	<b>Ti</b>	0,0001	0,0001
<b>Rb</b>	0,0023	0,0003	<b>204Pb</b>	0,0134	0,0019
<b>Sr</b>	0,0019	0,0003	<b>206Pb</b>	0,0129	0,0019
<b>Y</b>	0,00006	0,00005	<b>207Pb</b>	0,0137	0,002
<b>Mo</b>	0,00101	0,00012	<b>208Pb</b>	0,0132	0,0019
<b>Ag</b>	0,00015	0,00017	<b>Bi</b>	0,0002	0
			<b>U</b>	0,00022	

Les analyses réalisées à partir des particules issues de filtres provenant de sites « trafic » en zones urbaines, a permis de déterminer la distribution en taille des particules atmosphériques. La part des particules fines apparaît comme majoritaire. Cependant, il faut noter qu'il peut exister un biais lié à la sonication des particules. Ce procédé est susceptible de les fractionner en élément de plus petite taille ou, au contraire, de les agglomérer en éléments de taille supérieure à 10 µm, alors que les collecteurs PM<sub>10</sub> captent des particules ayant un diamètre inférieur ou égale à 10 µm. Des tests complémentaires seraient nécessaires afin d'étudier le comportement des particules lors de leur aspiration par la pompe « Partisol » et surtout lors de leur préparation pour réaliser la solution particulaire. Les potentiels fractionnements ou agglomérations des particules et leurs éventuels changements de nature seraient à étudier plus spécifiquement au cours de la phase de sonication.

Figure 4 : Diamètres des particules contenues dans la solution particulaire après sonication (Meyer et al., en préparation)



### 3.2. Caractérisation des dépôts particulaires au sein de bryophytes exposées en sites trafic/ industriel/ rural

#### 3.2.1. Dépôts particulaires chez *Ceratodon purpureus*

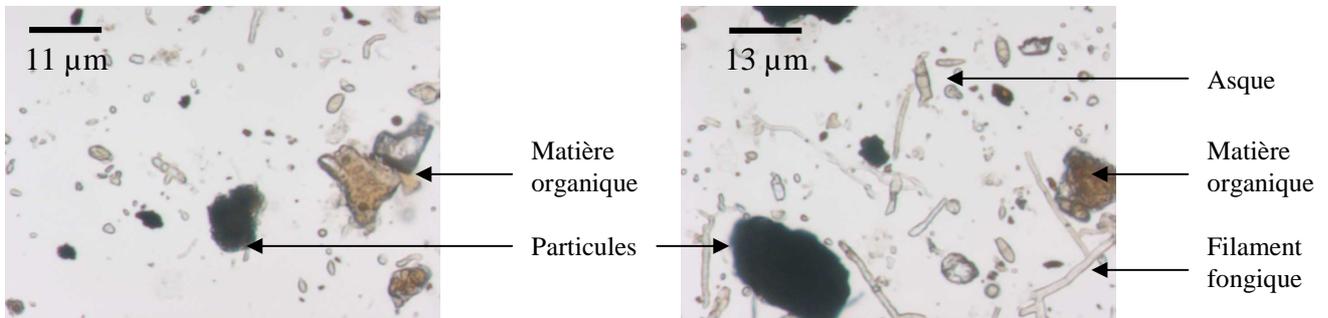
Cette espèce de bryophytes est issue de cultures standardisées sur substrat minéral. C'est une mousse rase, très proche du substrat. Les analyses ont révélé des contaminations en silice fréquentes et très importantes venant du substrat qui a pu être projeté sur le végétal pendant la période de culture ou lors des prélèvements. Pour ces raisons, aucun résultat d'analyse sur cette espèce ne sera présenté dans ce document.

#### 3.2.2. Dépôts particulaires chez *Scleropodium purum*

Les dépôts particulaires au sein des bryophytes peuvent être de plusieurs natures : particules organiques et minérales (Figure 5).

## Développement d'outils biologiques d'évaluation des impacts des particules atmosphériques dans des écosystèmes diversement pollués

Figure 5 : Observations de matières organiques, champignons et agrégats particulaires en microscopie inversée. Particules issues de *Scleropodium purum* exposé pendant 8 mois au site industriel de Dunkerque avec extraction < 180 µm et lavage, MEYER Caroline (2006) UFC.



Une faible variabilité a été observée entre les trois réplicats pour un même site et au même temps de prélèvement. Elle peut être due à plusieurs facteurs :

- variabilité dans la mousse de départ,
- arrivée stochastique non régulière de poussières de taille importante,
- modulations liées à des différences d'exposition (effet d'ombre qui influence la photosynthèse, présence d'un obstacle qui influence la turbulence),
- caractère biologique intrinsèque de l'échantillon du lot, pouvant influencer le pouvoir de bio-accumulation.

Au niveau du site rural, 14 éléments se sont accumulés dans les mousses, avec des croissances non régulières pour Ca, Sc, Cr, Fe, Co, Cu, Rb, Nb, Sb, Cs et Th. Ces enrichissements sont attribués aux apports crustaux. Les éléments Li, Na et Cl n'ont pas un accroissement linéaire. Il est probable que ce phénomène soit lié à l'utilisation de l'eau minérale pour couvrir les besoins en eau des bryophytes. Il est cependant possible que certains enrichissements soient aussi liés à des apports d'éléments volatils et de particules de petite taille provenant du trafic lointain diffus, suivis d'un transport à longue distance.

Sur le site de Saclay, proche d'un axe à grande circulation, les taux d'accumulation observés ont été plus élevés qu'au niveau du site rural pour certains éléments. En particulier, les concentrations de différents éléments connus pour être liés au trafic routier, tels que Sb, Fe, Cr, Cu, V, Ti et Al, ont augmenté dans *S. purum*. Cette bryophyte est connue pour sa propriété à bioaccumuler ces éléments près d'un axe routier. L'accumulation d'autres éléments (Sb, Co, Fe, Cr, Sc, Sn, I, Zr, As, Cu, V, Ti et Al) peut être associée au trafic routier, mais peut également provenir d'une pollution métallique issue d'un incinérateur d'ordures ménagères et d'une unité de chauffage fonctionnant au pétrole dans une localité voisine.

C'est au niveau du site industriel de Dunkerque que les vitesses d'accumulation ont été les plus fortes. L'accumulation de certains éléments sont à mettre en relation avec les activités de sidérurgie (Fe, Mn, Cr, V), de l'industrie pétrolière (V, La) et de la production d'aluminium (Al). D'autres éléments tels que Sn, terres rares, Pb et Zn sont aussi liés à une ou plusieurs de ces activités en tant qu'éléments accompagnant, ou à la pollution due au trafic routier intense

## Développement d'outils biologiques d'évaluation des impacts des particules atmosphériques dans des écosystèmes diversement pollués

dans la ville, qui est un port de marchandise très important. En ce qui concerne le fer, élément issu de l'industrie sidérurgique, la vitesse de bioaccumulation qui est de 2530 microgrammes/g mousse/mois, est la plus élevée. Cependant le coefficient de régression est faible ( $r=0,65$ ) en raison d'une grande variabilité inter-stands et d'une déplétion importante trouvée sur le dernier point de prélèvement, comme si le fer pour cette période, s'était trouvé plus mobile. L'aluminium qui ne présente pas de fort enrichissement dans les  $PM_{10}$  est toutefois bio-accumulé dans les mousses, ce qui conforte l'idée que Al est plutôt supporté par des particules de tailles supérieures à 10 microns, impliquant éventuellement une cinétique de grossissement rapide entre la source et le point de collection.

### 3.2.3. Comparaison entre vitesse d'accumulation ( $S_{i,j}$ ) dans *Scleropodium purum* et concentration dans les $PM_{10}$

Pour chaque élément ( $i$ ), et à chaque site ( $j$ ), le rapport  $V_{i,j}$  a été établi entre la vitesse d'accumulation ( $S_{i,j}$ ) et la concentration dans les  $PM_{10}$  ( $C_{i,j}$ ), soit  $V_{i,j}=S_{i,j}/C_{i,j}$ .

$V_i = \Sigma_j(V_{i,j})$  : est la moyenne de ces grandeurs sur les 3 sites, car elles sont proches les unes des autres sur chaque site

$V_i$  : dimension du volume d'air virtuel représentant le volume total d'air dont toutes les particules  $PM_{10}$  auraient pu être fixées par 1 gramme de bryophyte pendant un mois.

$V_i$  n'a pas de sens physique intrinsèquement, mais permet une estimation comparative d'un élément à l'autre par rapport à la capacité de la bryophyte à capter un élément à partir de la masse d'air qui circule au-dessus. Le processus de bio-accumulation nécessite au préalable une phase de grossissement de l'aérosol en particules TSP (Total Suspended Particles), suivie d'un dépôt sur la mousse.

Cependant plus  $V_i$  est petit et moins la mousse reçoit l'élément  $i$ . Inversement plus  $V_i$  est grand, plus la bryophyte reçoit l'élément qui la survole, car la phase de grossissement de l'aérosol pour cet élément est effective, ou la bioaccumulation est efficace pour  $i$ , ou encore les deux phénomènes se conjuguent.

Les vitesses d'accumulation pour 1 gramme de mousse par mois sur la période des 8 mois d'expérimentation sont présentées en Tableau 3.

Pour la plupart des éléments, l'accroissement de concentration dans la mousse suit l'ordre suivant : MONTAGNEY < SACLAY < DUNKERQUE

De faibles valeurs de  $V_i$  (<500) sont obtenues pour Se, Sb, Pb, V, Cu, Zn, As, Ni, Cr. Ces éléments font partie des plus volatils et peuvent être transportés sur de longues distances. Ils sont vraisemblablement associés à des particules de petites tailles qui n'ont pas la propension à grossir rapidement et à se déposer entre la source d'émission et le point de collection des mousses.

Les valeurs les plus élevées de  $V_i$  (>1500) sont obtenues pour Br, Th, Ca, Cl, et Rb. Ces éléments pourraient être apportés à la mousse par de grosses particules TSP et/ou être plus efficacement retenus par la bryophyte. Ce sont plutôt des éléments terrigènes et la première hypothèse d'une arrivée de poussières lourdes locales est très probable.

**Développement d'outils biologiques d'évaluation des impacts des particules atmosphériques dans des écosystèmes diversement pollués**

Beaucoup d'autres éléments ont des valeurs de  $V_i$  intermédiaires ( $500 < V_i < 1500$ ) : Co, terres rares, Hf, Fe, Sr, Nb, Ti, Al, Sc. Ils sont ainsi peu différenciés quant à leur comportement d'arrivée et de rétention par la bryophyte.

*Tableau 3 : Vitesses de bio-accumulation d'éléments chez Scleropodium purum*

	MONTAGNEY		SACLAY		DUNKERQUE	
	$\mu\text{g}\cdot\text{month}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ dry weight	r	$\mu\text{g}\cdot\text{month}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ dry weight	r	$\mu\text{g}\cdot\text{month}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ dry weight	r
Al			<b>118</b>	<b>0.86</b>	<b>300</b>	<b>0.82</b>
Ca	449	0.67	626	0.69	<b>1860</b>	<b>0.83</b>
Ti			<b>9.3</b>	<b>0.79</b>	18	0.66
V			<b>0.31</b>	<b>0.77</b>	<b>1.6</b>	<b>0.82</b>
Sc			<b>0.028</b>	<b>0.90</b>	<b>0.064</b>	<b>0.79</b>
Cr	0.14	0.48	<b>0.67</b>	<b>0.87</b>	<b>2.5</b>	<b>0.77</b>
Mn					<b>83</b>	<b>0.71</b>
Fe	26	0.43	<b>125</b>	<b>0.87</b>	2530	0.65
Co	0.028	0.61	<b>0.077</b>	<b>0.82</b>	<b>0.18</b>	<b>0.82</b>
Cu			<b>2.7</b>	<b>0.81</b>	<b>2.4</b>	<b>0.79</b>
Zn	5.8	0.59	<b>9.7</b>	<b>0.82</b>	<b>18</b>	<b>0.72</b>
As	<b>0.21</b>	<b>0.91</b>	<b>0.23</b>	<b>0.87</b>		
Se	0.020	0.58	0.023	0.60	0.12	0.59
Br	3.5	0.56	6.7	0.65	6.0	0.48
Rb	<b>3.0</b>	<b>0.78</b>	<b>3.0</b>	<b>0.73</b>		
Sr	<b>1.22</b>	<b>0.78</b>	1.2	0.62	<b>3.5</b>	<b>0.80</b>
Y					<b>0.16</b>	<b>0.75</b>
Zr	0.77	0.68	0.50	0.65	<b>0.96</b>	<b>0.85</b>
Nb			<b>0.039</b>	<b>0.72</b>	0.23	0.64
Ag	0.012	0.50			<b>0.016</b>	<b>0.73</b>
Cd					0.083	0.65
Sn			0.29	0.68	<b>0.14</b>	<b>0.76</b>
Sb	0.093	0.70	<b>0.33</b>	<b>0.78</b>	<b>0.23</b>	<b>0.96</b>
Cs	<b>0.16</b>	<b>0.85</b>	0.084	0.65	0.078	0.51
La			<b>0.11</b>	<b>0.73</b>	<b>1.5</b>	<b>0.80</b>
Ce			0.18	0.52	<b>0.44</b>	<b>0.86</b>
Pr			<b>0.016</b>	<b>0.77</b>	<b>0.064</b>	<b>0.75</b>
Nd			0.055	0.70	<b>0.19</b>	<b>0.71</b>
Sm			0.012	0.70	<b>0.038</b>	<b>0.75</b>
Hf	0.022	0.51	<b>0.039</b>	<b>0.91</b>	0.031	0.39
Pb	0.43	0.40	<b>1.1</b>	<b>0.77</b>	<b>3.7</b>	<b>0.85</b>
Th	<b>0.036</b>	<b>0.86</b>	<b>0.028</b>	<b>0.90</b>	<b>0.054</b>	<b>0.83</b>

Pour Na, Cl, Hf, Li, Zr, le modèle d'une croissance linéaire n'était pas adapté. Ces éléments sont présents dans l'eau de Volvic qui a servi pour l'arrosage. Leurs présences seraient liées à l'alimentation en eau et non au dépôt atmosphérique.

## Développement d'outils biologiques d'évaluation des impacts des particules atmosphériques dans des écosystèmes diversement pollués

### 3.2.4. Corrélations entre éléments atmosphériques inorganiques et éléments au sein des bryophytes exposées aux sites trafic/industriel/rural

Les corrélations de Spearman, entre les éléments traces métalliques retrouvés sur les filtres et les teneurs mesurées chez *Scleropodium purum* et *Ceratodon purpureus*, sont présentées en Figure 6. Ces résultats indiquent que les concentrations des contaminants accumulés par ces deux espèces de bryophytes lors de leur exposition sur site concordent bien avec celles obtenues sur les filtres des pompes partisol.

Figure 6 : Corrélations de Spearman des principaux éléments traces métalliques retrouvés à la fois sur les filtres (F), chez *Scleropodium purum* (Sp) et *Ceratodon purpureus* (Ce) ( $p < 0,05$ ).

	Sp/Ce	Sp/F	Ce/F
Cr	0,787	0,9373	0,737
Cu	0,791	NS	NS
Fe	0,920	0,9779	0,955
Mn	0,937	0,9729	0,983
Mo	0,725	0,8714	0,608
Pb	0,881	0,9717	0,891
Sb	NS	0,8703	NS
Sn	NS	0,9158	NS
Zn	NS	NS	NS
Cd	0,849	0,8747	0,845
As	0,657	0,6725	0,936
Co	0,903	0,9236	0,862

### 3.2.5. Comparaison des capacités accumulatrices de particules inorganiques des 2 espèces bryophytiques : *Scleropodium.purum* et *Ceratodon purpureus*

L'étude de l'accumulation des métaux chez les mousses a mis en évidence des différences en fonction des sites et des durées d'exposition. Le calcul d'un ratio entre les teneurs en métaux à l'issue des expositions par rapport aux teneurs initiales chez les mousses, a permis de comparer les capacités d'accumulation des particules métalliques chez les deux espèces. Il apparaît (Tableau 4) que *C. purpureus* présente une capacité accumulatrice supérieure à *S. purum* pour le Mn sur le site industriel, pour le Ti et le La sur le site rural et pour le Mo sur tous les sites. De plus, cette espèce présente une accumulation plus importante pour le Ti, La et Pb sur tous les sites. En revanche, *S.purum* semble avoir accumulé davantage Al, Cu, Zn, As and Bi que *C. purpureus* au niveau du site urbain. Enfin, quels que soient les sites

## Développement d'outils biologiques d'évaluation des impacts des particules atmosphériques dans des écosystèmes diversement pollués

d'exposition, l'accumulation du Cd n'est pas significativement plus élevée chez *S. purum* que chez *C. purpureus*.

*Tableau 4 : Corrélation entre les éléments traces métalliques contenus dans les PM<sub>10</sub> et ceux mesurés dans les mousses (corrélation de Pearson; n=9; NS: non significatif; \*: p<0.05; \*\*: p<0.01; \*\*\*: p<0.001) et taux entre facteurs d'enrichissement (EF) de Ceratodon purpureus (Cp) et de Pseudoscleropodium purum (Pp)*

<i>Correlation between the means of metal particles PM<sub>10</sub> contents collected on filters at the three sites and metal accumulated in mosses (T3-T0)</i>																		
N=9	Al	Ti	V	Cr	Mn	Fe	Co	Cu	Zn	As	Mo	Cd	Sn	Sb	Ba	La	Pb	Bi
Correlation coefficient Cp	0,57 NS	0,82 **	0,90 **	0,70 *	0,99 ***	0,97 ***	0,75 *	0,30 NS	0,85 **	0,94 ***	0,67 *	0,95 ***	0,90 **	0,85 **	0,48 NS	0,91 **	0,98 ***	0,67 *
Correlation coefficient Pp	0,94 ***	0,90 **	0,99 **	0,94 ***	0,97 ***	0,98 ***	0,92 ***	0,89 **	0,72 *	0,91 **	0,54 NS	0,88 **	0,89 **	0,70 *	0,12 NS	0,82 **	0,97 ***	0,87 **
EF Cp / Pp																		
Rural site		2.8	2.3	1.5	1.0	1.3	1.1		0.4	1.8		0.5	1.7	0.6		3.9	1.4	0.9
Urban site		2.3	1.2	1.2	1.0	0.9	0.7		0.7	1.4		1.0	3.4	1.9		2.3	1.8	1.0
Industrial site		2.0	1.3	0.6	6.5	0.5	0.7		0.5	1.6		0.9	1.9	0.6		1.9	2.0	0.8

### 3.3. Utilisation des bryophytes : intérêt et choix des biomarqueurs les plus pertinents

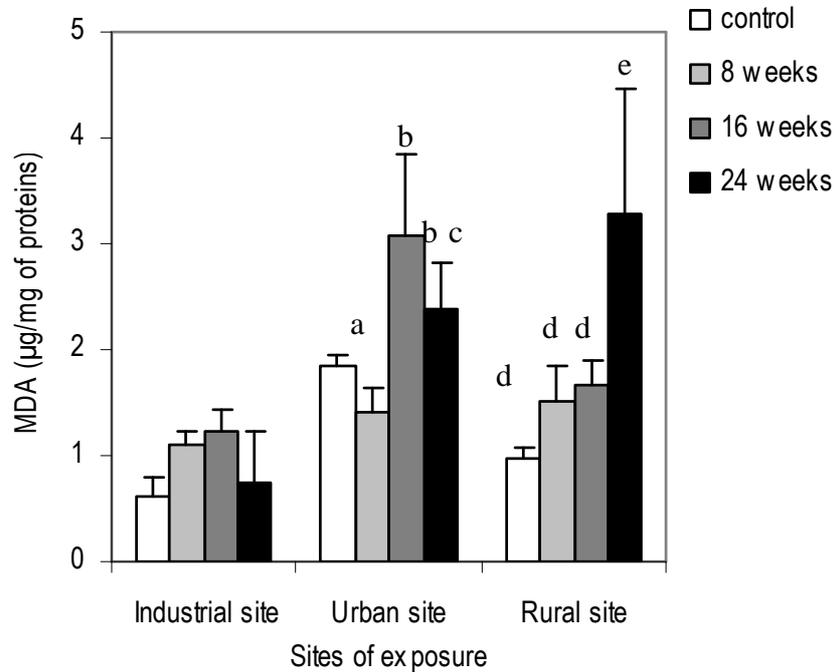
#### 3.3.1. Réponses biochimiques : atteintes membranaires chez *Ceratodon purpureus* et *Scleropodium purum*

La lipoperoxydation des membranes a été évaluée par le dosage du malondialdéhyde (MDA) rapporté à la quantité de protéines extraites des mousses exposées *in situ*.

Chez *Scleropodium purum*, les variations des concentrations en MDA ne sont pas significatives et aucune tendance ne se dégage. Chez *Ceratodon purpureus*, les concentrations en MDA varient de manière significative en fonction des sites (sites urbain et rural) et des durées d'exposition ( $p < 0,001$ ). Pour le site rural, plus cet organisme est exposé longtemps, plus les membranes lipidiques semblent subir des dommages (Figure 7). Toutefois, les teneurs en MDA chez les échantillons exposés sur le site industriel (le site le plus contaminé) augmentent de façon continue jusqu'à 16 semaines d'exposition, mais ces variations sont moins significatives ( $p < 0,1$ ) que pour les autres sites étudiés. Enfin, il est à noter que les concentrations de MDA sont les plus faibles sur le site industriel contrairement à ce que nous aurions pu attendre. Ainsi, les organismes exposés à une contamination très importante en particules métalliques ne présentent pas de lipopéroxydation accrue par rapport aux deux autres sites étudiés. Ce biomarqueur ne semble donc pas adapté pour marquer l'exposition aux ETM.

## Développement d'outils biologiques d'évaluation des impacts des particules atmosphériques dans des écosystèmes diversement pollués

Figure 7 : Concentrations en malondialdéhyde (valeurs moyennes et écarts types) chez *Ceratodon purpureus* exposée sur les 3 sites pendant 24 semaines (control : mousses non exposées; 8 weeks, 16 weeks, 24 weeks: mousses exposées 8, 16 et 24 semaines; n=3). Différences significatives : a,b p<0,01 ; a,c p<0,001 ; b,c p<0,05 ; d,e p<0,001.



### 3.3.2. Réponses génotoxiques : atteintes nucléaires chez *Ceratodon purpureus* et *Scleropodium purum*

#### 3.3.2.1. Adduit au DNA : 8OHdG

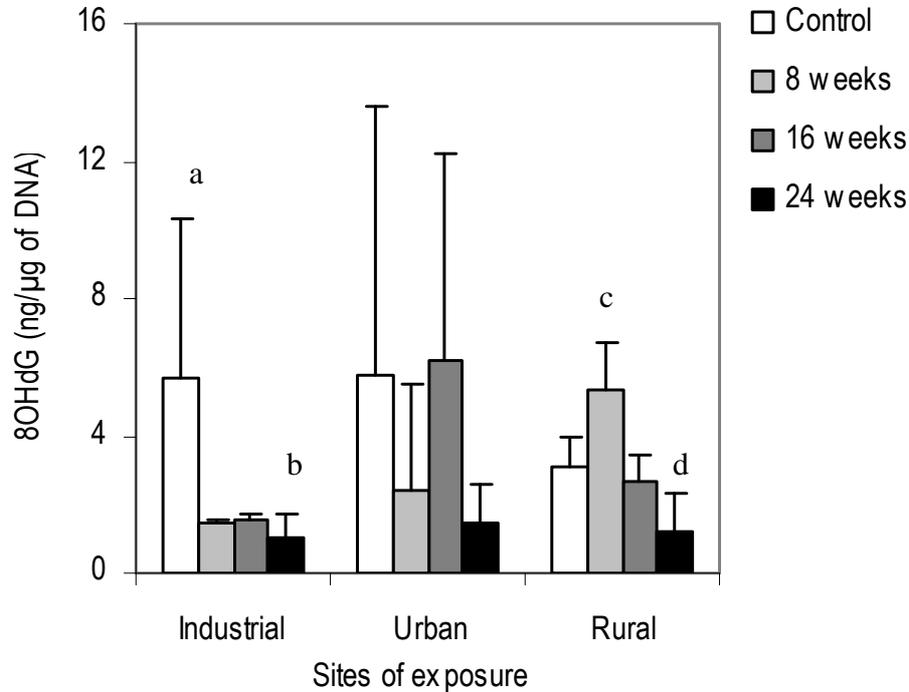
Afin d'estimer les effets génotoxiques des particules métalliques de type PM<sub>10</sub>, l'adduit hydroxyle à la guanine (8OHdG) a été recherché et il a été utilisé comme biomarqueur d'exposition du DNA chez les bryophytes.

Chez *S.purum*, la forte variabilité des concentrations dosées en 8OHdG ne permet pas de mettre en évidence de correspondance significative entre les sites ou/et les durées d'exposition et la formation d'adduits au DNA.

Chez *C.purpureus*, en tenant compte de l'ensemble des sites d'exposition, l'analyse statistique des dosages des concentrations en 8OHdG met en évidence une diminution significative de ces teneurs en fonction de la durée d'exposition (Figure 8). Ainsi, les expositions des organismes bryophytiques dans des atmosphères contaminées en particules métalliques ne semblent pas engendrer de dommages oxydatifs au DNA dans les conditions de l'expérimentation.

## Développement d'outils biologiques d'évaluation des impacts des particules atmosphériques dans des écosystèmes diversement pollués

Figure 8 : Concentrations en 8OHdG (valeurs moyennes et écarts types) chez *Ceratodon purpureus* exposée sur les 3 sites (control: mousses non exposées ; 8 weeks, 16 weeks, 24 weeks : mousses exposées 8, 16 et 24 semaines ; n=3), différences significatives pour a,b et c,d  $p < 0,05$ .



### 3.3.2.2. Test du DNA ladder

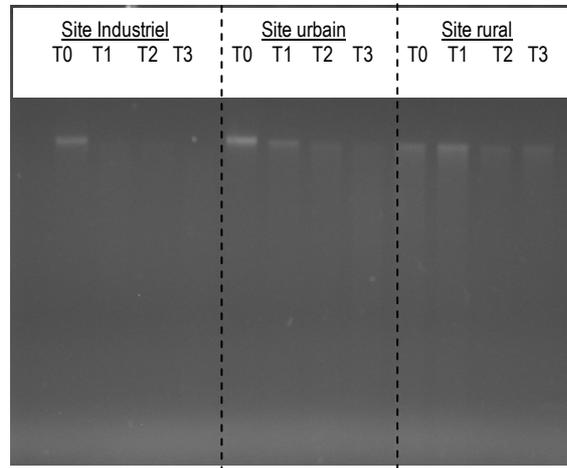
Pour affiner l'analyse des dosages en adduits de radicaux hydroxyles au DNA (8OHdG), une observation qualitative de l'endommagement global du DNA a été réalisée grâce au test du DNA ladder. Celui-ci a été réalisé sur les échantillons de *C.purpureus* exposés sur le site industriel, urbain et sur le site rural. Ce test révèle la formation de « smears » (traînées) grandissantes en fonction de la durée de l'exposition sur le site rural (Figure 9).

Ces « smears » (traînées) correspondent à la fragmentation du DNA ; ainsi, plus les mousses sont exposées longtemps à une forte aérocontamination, plus leur DNA est endommagé.

Sur le site industriel, le DNA des échantillons exposés ne présentent pas de « smear » facilement observable mais semblent toutefois avoir été fortement endommagés compte tenu de la faible révélation du DNA de ces échantillons dès les 8 premières semaines d'exposition.

## Développement d'outils biologiques d'évaluation des impacts des particules atmosphériques dans des écosystèmes diversement pollués

Figure 9 : Test du DNA ladder ; photographie du gel d'agarose révélé par rayons UV (T0=mousses non exposées ; T1: 8 semaines d'exposition (nov-dec); T2 : 16 semaines d'exposition (jan-fev) ; T3 : 24 semaines d'exposition (mar-avr)).



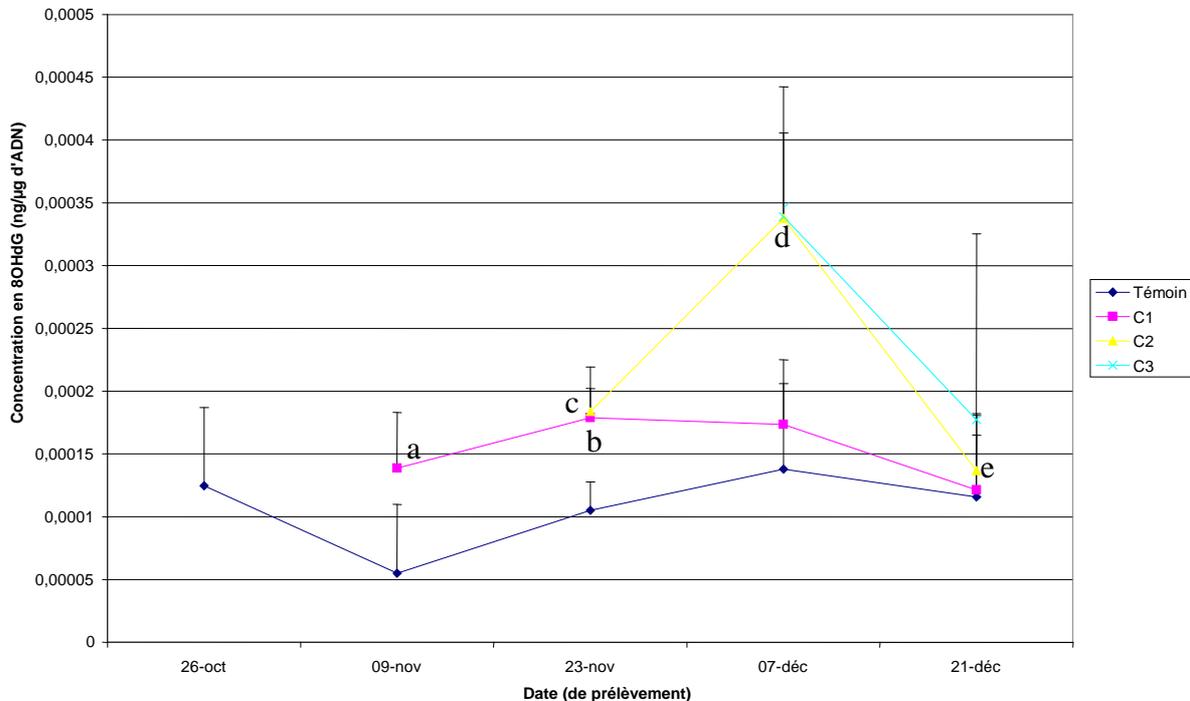
### 3.3.3. Variation des biomarqueurs d'exposition et d'effet chez *Scleropodium purum* exposée aux particules en conditions contrôlées

Chez *Scleropodium purum*, aucune variation significative de la concentration en MDA n'a été observée. Seules des tendances à l'augmentation de la concentration en MDA se dégagent en fin d'expérimentation. Ainsi, les augmentations visibles de dégradation de la membrane plasmique ne seraient observables, d'après les conditions de notre expérience, qu'au bout de trente jours.

Les réponses génotoxiques sont observées au travers de l'évolution des concentrations de 8OHdG dans les échantillons ayant reçu le même nombre de contamination. La figure 10 présente les concentrations en 8OHdG/[DNA] de chaque échantillon au cours du temps. Une comparaison des taux en 8OHdG dans les échantillons ayant reçu le même nombre de contamination a été réalisée ainsi que l'analyse de leur évolution au cours du temps.

## Développement d'outils biologiques d'évaluation des impacts des particules atmosphériques dans des écosystèmes diversement pollués

Figure 10 : Evolution de la concentration de la 8OHdG/[DNA] (ng/μg de DNA), a,b ; c,d ; d,e : différences significatives  $p < 0,05$  ; témoin  $n=25$ , C1  $n=18$ , C2  $n=14$ , C3  $n=10$  (le 26 oct C1, C2 et C3 ont reçu un traitement, le 9 nov C2 et C3 ont reçu un traitement, le 23 nov C3 a reçu un dernier traitement).

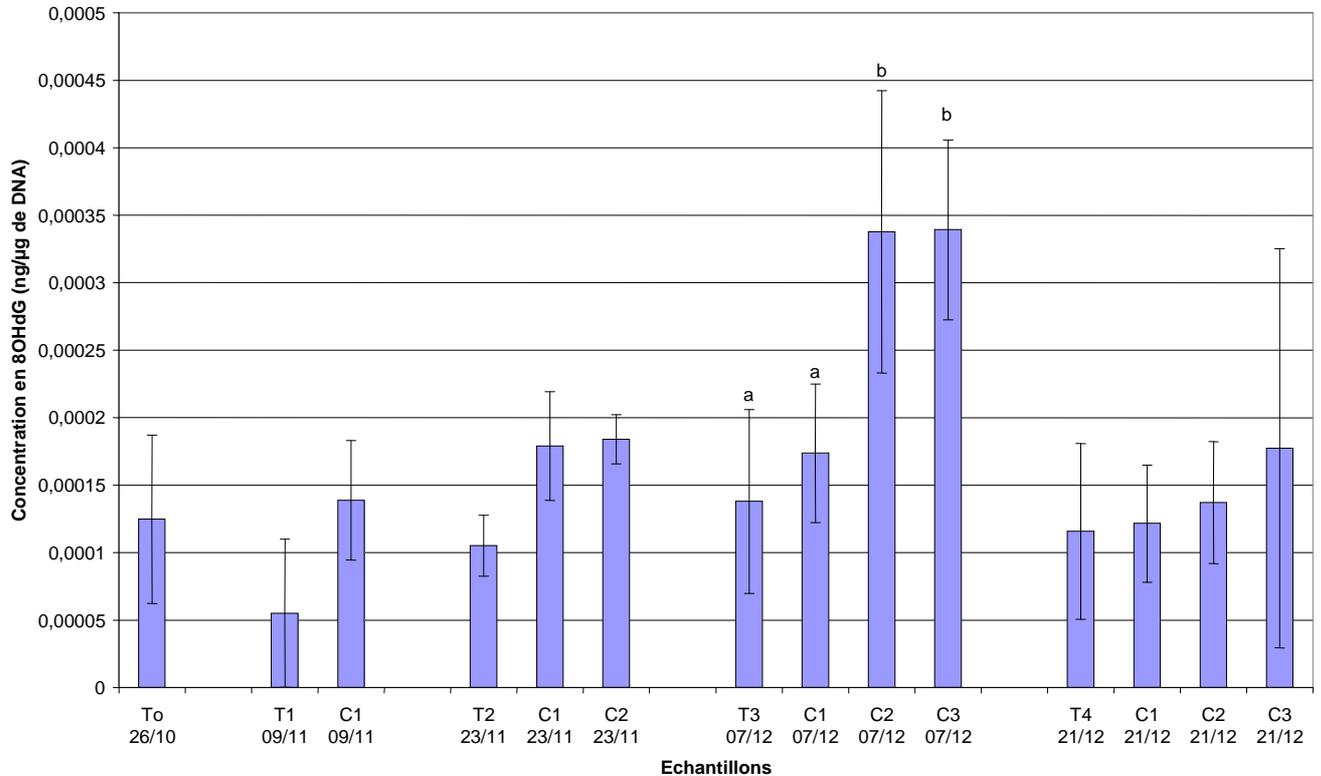


L'observation des échantillons témoins ne permet pas de mettre en évidence de différence significative au cours du temps d'exposition. Pour les échantillons ayant reçu une contamination (C1), l'augmentation de la quantité de 8OHdG entre les échantillons C1 prélevés le 9/11 et ceux prélevés le 23/11 est significative (a,b  $p < 0,05$ ). De même, parmi les échantillons ayant reçu deux contaminations (C2), une augmentation significative entre les individus C2 prélevés le 23/11 et ceux prélevés le 7/12 est observée (c,d  $p < 0,05$ ). Enfin, parmi les échantillons C2, entre les dates de prélèvement du 7/12 et du 21/12, une diminution significativement différente est observable (d,e  $p < 0,05$ ). Les échantillons ayant subi trois traitements (C3) présentent au niveau des concentrations en 8OHdG une diminution qui ne peut être interprété que comme une tendance. On peut également noter que sans être significative, une diminution entre les échantillons ayant subi trois traitements (C3) prélevés le 7/12 et le 21/12, a pu être observée.

L'évolution des concentrations en 8OHdG dans les échantillons prélevés à la même date et ayant reçu un nombre différent de traitement est présenté en figure 11, il est ainsi possible de mieux apprécier certains effets génotoxiques observés chez les mousses suite à une exposition aux éléments traces métalliques d'origine particulaire.

## Développement d'outils biologiques d'évaluation des impacts des particules atmosphériques dans des écosystèmes diversement pollués

Figure 11 : Concentration de la 8OHdG chez *Scleropodium purum* exposées aux éléments traces métalliques particulières en conditions contrôlées (le 26 oct C1, C2 et C3 ont reçu un traitement, le 9 nov C2 et C3 ont reçu un traitement, le 23 nov C3 a reçu un dernier traitement) ; (différence significative : a,b  $p < 0,05$ ) ; Témoin  $n=25$ , C1  $n=18$ , C2  $n=14$ , C3  $n=10$ .



Une tendance à l'augmentation du nombre d'adduits au DNA entre les témoins et les échantillons ayant reçu un traitement a été observée mais cette tendance n'est pas significative à cause de certaines valeurs aberrantes. D'après les conditions expérimentales, l'augmentation la plus importante de la formation d'adduits OH au DNA se fait 30 jours après la première contamination. Le second traitement, même si les niveaux de contamination n'ont pas augmenté, accentue de façon significative le nombre d'adduits au DNA détectés par la méthode. Les autres variations sont à prendre en considération sans pour autant leur apporter de significativité statistique. Les différences à la baisse obtenues chez les échantillons exposés à un, deux ou trois traitements, permettent de supposer qu'après un certain temps l'augmentation de la formation des adduits génotoxiques se stabilise et s'arrête probablement en raison de mécanismes de compensation et de réparation du matériel génétique altéré.

### 3.4. Utilisation des micro-organismes : biointégrateurs potentiels de la pollution particulaire

#### 3.4.1. Structure des communautés microbiennes dans les bryophytes

Les bryophytes terrestres constituent un écosystème dont l'humidité varie de façon importante au cours du temps. Pour ces raisons, les groupes microbiens les plus abondants sont ceux qui

## Développement d'outils biologiques d'évaluation des impacts des particules atmosphériques dans des écosystèmes diversement pollués

sont de petite taille et ceux qui sont adaptés à la dessiccation (enkystement, vie ralentie). Par ailleurs, les microorganismes dominant ont majoritairement un métabolisme hétérotrophe.

En effet, le fonctionnement des micro-systèmes bryophytes/microorganismes associés est principalement basé sur la production primaire des bryophytes dont les tissus sont ensuite décomposés par les bactéries (52,8% de la biomasse microbienne totale) et les champignons (10,7%). Inversement, les micro-organismes photosynthétiques tels que les algues microscopiques (2,7%) et les cyanobactéries (0,4%) ne représentent qu'une faible part de la biomasse. Secondairement les prédateurs microbiens, tels que les protozoaires amibes à thèque (23,4%), ciliés (0,9%), métazoaires rotifères (8,7%) et nématodes (0,3%) consomment l'ensemble de ces micro-organismes.

### 3.4.2. Etudes des réponses des communautés microbiennes aux polluants d'origine atmosphérique (PM<sub>10</sub>, NO<sub>2</sub>, O<sub>3</sub>) chez *Scleropodium purum* en trois sites différemment pollués

L'effet des polluants d'origine atmosphérique a été évalué en estimant l'abondance et la biomasse des différents groupes microbiens (bactéries hétérotrophes, cyanobactéries, microalgues, ciliés, amibes à thèque, rotifères et nématodes) chez *Scleropodium purum*. Les résultats obtenus lors des deux expérimentations montrent que cette perturbation a un effet négatif significatif sur la biomasse totale microbienne. Il faut noter que les dénombrements de microorganismes n'ont pas été possibles chez *C. purpureus* car la morphologie de cette espèce est peu favorable à leur développement.

Les résultats obtenus confirment ce qui avait pu être observé auparavant dans d'autres études. Les groupes microbiens les plus affectés par la pollution particulaire sont les bactéries hétérotrophes et les protistes (microalgues et protozoaires). Inversement, les cyanobactéries, les champignons et les petits métazoaires semblent peu sensibles à ce type de perturbation (Figure 12). L'analyse de redondance montre que les concentrations de NO<sub>2</sub> expliquent 9% de la variance de la communauté microbienne, et plus particulièrement, 18% de la variance de la communauté des amibes à thèque.

Figure 12 : Corrélations de Spearman entre les variables environnementales et la biomasse des différents groupes de micro-organismes après 8 mois d'exposition in situ dans les trois sites (HR : Humidité relative). (Meyer et al., soumis)

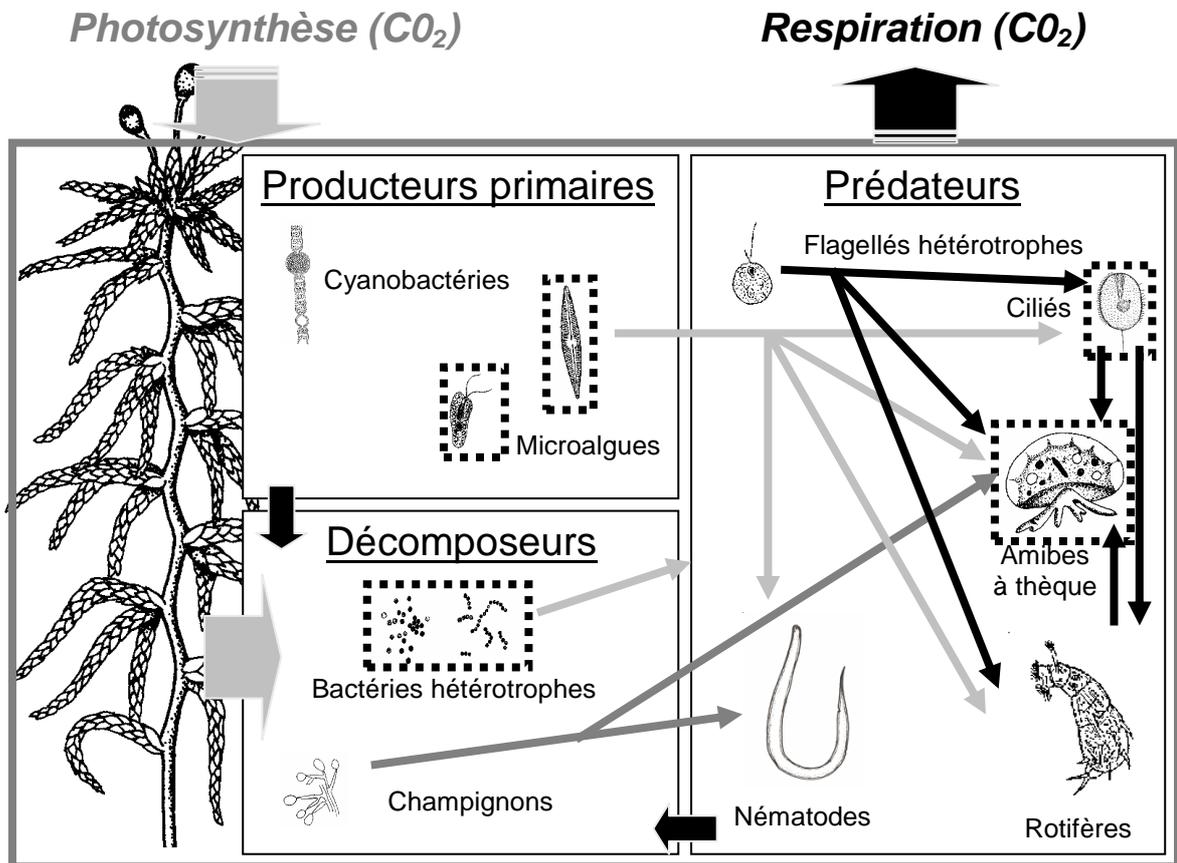
groupes variable enviro	Cyanobact.		Micro-algues		Bactéries		Champignons		Ciliés		Thécamoebiens		Rotifères		Nématodes	
	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p
temperature	0.255	n.s	0.616	<0.0001	0.573	0.0003	0.563	0.0004	-0.053	n.s	0.100	n.s	-0.160	n.s	0.140	n.s
H	-0.370	0.02	-0.658	<0.0001	-0.455	0.006	-0.563	0.0008	0.210	n.s	0.056	n.s	0.137	n.s	-0.070	n.s
[NO <sub>2</sub> ]	0.138	n.s	-0.064	n.s	-0.219	n.s	0.050	n.s	0.161	n.s	-0.618	<0.0001	0.193	n.s	-0.450	0.006
[Na]	0.549	0.001	-0.124	n.s	-0.239	n.s	0.060	n.s	-0.048	n.s	-0.356	0.04	-0.053	n.s	-0.375	0.03
[Al]	0.543	0.001	-0.09	n.s	-0.148	n.s	0.050	n.s	-0.059	n.s	-0.262	n.s	-0.125	n.s	-0.282	n.s
[Cl]	0.349	0.05	-0.284	n.s	-0.397	0.02	-0.050	n.s	0.080	n.s	-0.286	n.s	0.185	n.s	-0.303	n.s
[Cr]	0.132	n.s	-0.283	n.s	-0.316	n.s	0.138	n.s	0.106	n.s	-0.373	0.03	0.164	n.s	-0.332	0.06
[Mn]	0.322	n.s	-0.255	n.s	-0.256	n.s	0.070	n.s	0.060	n.s	-0.272	n.s	-0.012	n.s	-0.307	n.s
[Fe]	0.255	n.s	-0.243	n.s	-0.228	n.s	0.117	n.s	0.067	n.s	-0.305	n.s	-0.012	n.s	-0.313	n.s
[Cu]	0.197	n.s	-0.119	n.s	-0.046	n.s	0.025	n.s	-0.162	n.s	-0.393	0.02	-0.308	n.s	-0.291	n.s
[Zn]	0.171	n.s	-0.341	0.05	-0.352	0.04	0.064	n.s	0.090	n.s	-0.298	n.s	0.107	n.s	-0.314	n.s
[Sr]	0.474	0.006	-0.171	n.s	-0.238	n.s	0.015	n.s	-0.040	n.s	-0.313	n.s	-0.056	n.s	-0.319	n.s
[Br]	0.075	n.s	-0.442	0.01	-0.494	0.004	-0.040	n.s	0.108	n.s	-0.309	n.s	0.248	n.s	-0.304	n.s
[Ni]	0.193	n.s	-0.261	n.s	-0.241	n.s	0.030	n.s	0.112	n.s	-0.280	n.s	-0.213	n.s	-0.325	0.06
[Pb]	0.379	0.03	-0.395	0.02	-0.362	0.04	-0.042	n.s	0.030	n.s	-0.323	n.s	0.017	n.s	-0.321	n.s

n.s : non significatif

## Développement d'outils biologiques d'évaluation des impacts des particules atmosphériques dans des écosystèmes diversement pollués

Les résultats que nous avons obtenus reflètent les effets directs de la pollution sur les micro-organismes. Il est aussi probable qu'il existe des effets indirects qui expliquent certaines variations des différentes espèces présentes au cours du temps. Schématiquement, lorsque des proies disparaissent, l'abondance de leurs prédateurs diminue également. Dans ces conditions, les communautés de protozoaires semblent être des bio-intégrateurs particulièrement intéressants. En effet, ces micro-organismes sont affectés directement par la pollution en raison de leur état unicellulaire et indirectement au travers de la prédation qu'ils exercent sur les bactéries notamment (Figure 13).

Figure 13 : Schéma de synthèse des relations trophiques existant entre les différents compartiments microbiens vivants dans les bryophytes. Les groupes entourés en pointillés sont ceux qui ont été significativement affectés par la pollution particulaire.



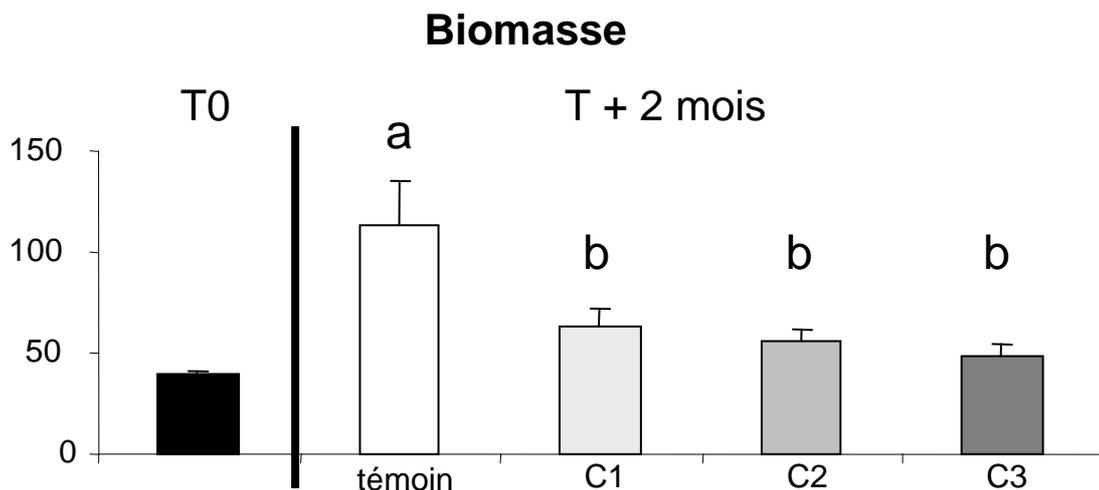
### 3.4.3. Etude des réponses des communautés microbiennes aux dépôts humides particulaires en conditions contrôlées

La réalisation d'exposition en conditions contrôlées avait pour objectif de compléter les résultats obtenus *in situ* et d'étudier l'effet d'une pollution particulaire sur les communautés microbiennes de *Scleropodium purum*.

Les particules, échantillonnées et collectées en site « trafic » aux centres villes de Besançon, Dijon, Strasbourg, ont été injectées dans des enceintes à nébulisation afin de simuler un dépôt humide de faible concentration sur les bryophytes et leurs micro-organismes associés. Les mousses ont été placées dans des enceintes à nébulisation en quatre lots : 1 lot témoin, 3 lots recevant respectivement 1, 2 et 3 expositions successives (C1, C2, C3).

Les résultats acquis lors des expérimentations montrent que cette perturbation a un effet négatif sur la biomasse totale microbienne. Les résultats obtenus en laboratoire recourent largement ceux trouvés *in situ* et confirment ce qui avait pu être observé dans les autres études (Figure 14). Les groupes microbiens les plus affectés par la pollution particulaire sont les bactéries hétérotrophes et les protistes (microalgues et protozoaires). Inversement, les cyanobactéries, les champignons et les petits métazoaires semblent peu sensibles à ce type de perturbation.

Figure 14 : Biomasse microbienne totale à T0 et après deux mois de culture pour le témoin et les micro-systèmes soumis à apports croissants en particules issues de sites trafic urbain (C1, C2 et C3) (Tests de Kruskal-Wallis,  $p < 0,05$ ).



## IV. DISCUSSION

### Particules atmosphériques aux sites trafic/industriel/rural

Les particules PM<sub>10</sub> collectées dans le site rural de Montagney présentent des concentrations multi-élémentaires avec des facteurs d'enrichissement en étroite corrélations pour Cu, Zn, As, Se, Cd, Sn, Sb, Pb, Tl et Bi, avec un maximum hivernal. Cette période correspond en Europe de latitude moyenne à du chauffage intense au moyen de la combustion d'énergies fossiles et aussi de bois.

Une périodicité similaire du maximum hivernal est retrouvée à Saclay pour les mêmes éléments sauf Tl, ainsi que Ag, La, Ce. En période printanière (avec un effet de chauffage minimisé), le rapport des concentrations collectées à Saclay et à Montagney est proche de 1 pour Se, Br, Ag. Par contre le rapport croît de 1,5 à 2 pour As, Tl, Zn et Pb et les concentrations sont plus fortes à Saclay. Trois éléments (Sn, Sb et Cu) présentent également des rapports notoirement plus forts à Saclay (5 à 7). Parmi lesquels Sb et Cu sont bien connus pour être liés au trafic routier, notamment dans les PM<sub>10</sub>. Sn est peut-être un élément associé à ces sources.

En comparant les concentrations à Dunkerque et Montagney, seuls les rapports sont proches de 1 pour Hf, W, K, Ir, Ta et I. Pour tous les autres éléments les rapports sont supérieurs à 1 témoignant de sources à Dunkerque, comme attendu. Les rapports sont supérieurs à 5 pour les éléments : Cd, Zn, Na, Ni, Cs, Co, Cl, Nb, Tl, La, V, Fe et Mn. Le fer et le manganèse, émis par la sidérurgie présentent les facteurs de multiplication les plus élevés : respectivement 13 et 19 fois plus concentrés qu'à Montagney. Par contre, bien qu'il existe une industrie de l'aluminium importante à Dunkerque, le rapport mesuré entre Dunkerque et Montagney, est proche de 1. On peut supposer que l'aluminium à Dunkerque doit exister dans des particules plus grosses que les PM<sub>10</sub>, non collectées par notre système.

### Exposition de *Ceratodon purpureus* et *Scleropodium purum* aux aérosols et particules inorganiques

Des accumulations significatives ( $p < 0,05$  ; ANOVA) en Eléments Traces Métalliques (ETM) ont été mises en évidence chez les deux espèces étudiées, en particulier pour les deux sites les plus contaminés : le site industriel et le site exposé au trafic routier. Les concentrations en ETM retrouvées chez les mousses sont en concordance avec celles retrouvées dans l'air. Et, l'espèce cultivée (*C. purpureus*) présente le plus souvent de meilleures capacités accumulatrices d'ETM que *S. purum* (par exemple chez *C. purpureus*, pour Fe et Cd  $r=0,82$   $p < 0,05$ ). Le fait d'avoir une espèce indemne de contamination, dont les individus présentent une variabilité génomique et phénotypique peu importante, voire nulle, permet d'utiliser ces organismes comme modèle biologique de choix pour des études d'exposition à la pollution (Couto *et al.*, 2004). Cependant dans notre étude, le substrat minéral de *C. purpureus*, de part sa proximité avec cette espèce rase, a perturbé par des phénomènes de contamination l'analyse de certains dépôts particuliers et a rendu impossible le dénombrement des micro-organismes.

En ce qui concerne les transplants de *Scleropodium purum*, il a été observé un accroissement de concentrations pour de nombreux éléments à Dunkerque, puis de moins en moins à Saclay et à Montagney, reflétant ainsi l'ordre des concentrations observées dans les PM<sub>10</sub>. Il a été établi un ajustement linéaire d'accroissement de concentration en fonction du temps

## Développement d'outils biologiques d'évaluation des impacts des particules atmosphériques dans des écosystèmes diversement pollués

d'exposition, dont la pente est une mesure de la vitesse de bio-accumulation par la bryophyte pour chaque élément. Ainsi à Dunkerque, les vitesses de bioaccumulation pour les métaux de la sidérurgie (Fe, Mn, Cr, V), de l'industrie pétrolière (V, La), de la production d'aluminium (Al) ont été mesurées. Les éléments Sn, terres rares, Pb et Zn sont des accompagnants d'une ou plusieurs de ces activités, auxquelles il faut ajouter la pollution due au trafic routier intense dans la ville, un port de marchandise très important.

A Saclay, les vitesses d'accroissement de Sb, Co, Fe, Cr, Sc sont les plus élevées par rapport à celles obtenus à Montagney. Les éléments Sn, I, Zr, As, Cu, V, Ti et Al sont aussi bioaccumulés à Saclay, ce qui n'est pas mesurable à Montagney. Ainsi, *S. purum* a la propriété de bioaccumuler près d'un axe routier les éléments, Sb, Fe, Cr, Cu, V, Ti et Al connus pour être liés au trafic routier.

A, Montagney, une bioaccumulation a pu être observée seulement pour les éléments Ca, Sc, Cr, Fe, Co, Cu, Rb, Nb, Sb, Cs et Th, qui sont tous crustaux. Les éléments plus volatils ne sont pas ou peu bio-accumulés par *S. purum*.

### Effets de la pollution particulaire en ETM sur *C. purpureus* et *S. purum*

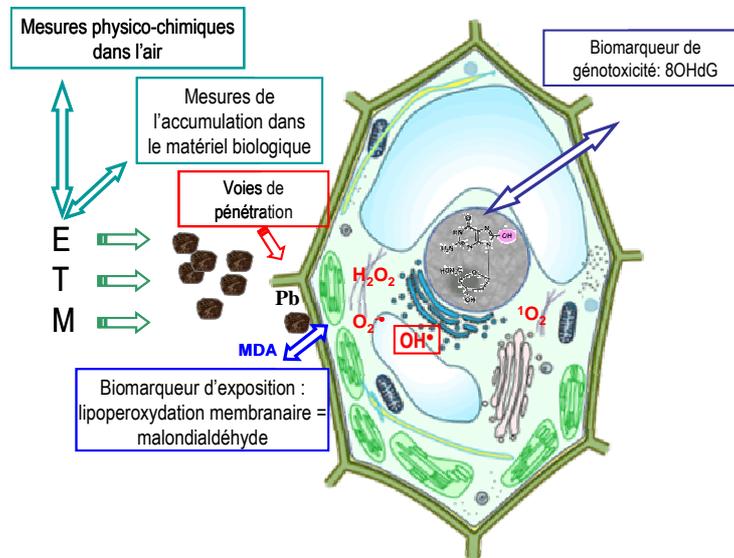
Les expositions des bryophytes aux ETM se manifestent tout d'abord par la production au niveau cellulaire d'espèces réactives de l'oxygène (ERO), capables d'induire à court terme un stress oxydant, dû aux réactions de Fenton initiées par les métaux (Denayer, 2000). Les membranes plasmiques des cellules de bryophytes sont tout particulièrement exposées aux ERO et subissent une lipopéroxydation dont le composé majeur est le MDA. Ce biomarqueur d'exposition a significativement augmenté chez *Ceratodon* tout au long de l'expérimentation sur les sites de Montagney et Saclay. En revanche, aucune variation significative n'a pu être mise en évidence chez *Scleropodium*, probablement à cause d'une trop grande variabilité intra-espèce et d'un effet « barquette ». En effet, cette espèce pleurocarpe rampante n'est pratiquement pas accrochée à un substrat et peut donc facilement se retrouver imbriquée avec d'autres brins ce qui pourrait modifier les surfaces d'échanges avec les dépôts atmosphériques.

Plus les mousses ont été exposées pendant une durée importante aux ETM plus elles ont pu accumuler de métaux et plus la lipoperoxydation des membranes a pu être observable. Cependant l'évolution des résultats concernant le site industriel de Dunkerque ne correspond pas aux hypothèses initiales. En effet, une très forte exposition aux ETM sur le site industriel aurait dû entraîner un impact plus important chez les organismes vivants étudiés. De nouvelles voies de recherche permettraient de déterminer si les pollutions importantes sur un site industriel, tel que celui étudié, ne pourraient pas induire des mécanismes de compensation et/ou de réparation des dommages cellulaires permettant ainsi à ces organismes de continuer de se développer dans les conditions les plus défavorables. Il s'agirait donc de vérifier si ces organismes sont capables de compenser et/ou de réparer des dommages plus particulièrement au niveau de leur membrane plasmique et au niveau du noyau. En effet, les bryophytes sont des espèces poikilohydriques qui ont la particularité de subir sans dommage apparent un stress hydrique régulier. Lors de travaux relativement anciens sur le stress hydrique et les bryophytes, il a été montré que certaines espèces de bryophytes avaient la particularité de protéger leurs tissus du stress hydrique et du stress oxydatif (Breuil-Sée, 1993, 1994). Lors d'expérimentations plus récentes, des informations scientifiques ont été fournies sur la modification de la métabolisation des lipides de bryophytes lorsqu'elles sont en présence de Cu ou de Pb (Gushina & Harwood, 2000, Gushina & Harwood, 2002). Une autre hypothèse de travail serait donc de rechercher, en conditions contrôlées, les produits résultant de la

## Développement d'outils biologiques d'évaluation des impacts des particules atmosphériques dans des écosystèmes diversement pollués

dégradation membranaire (aldéhydes et cétones) chez ces organismes ayant subis une peroxydation lipidique.

Figure 15 : Schéma de synthèse des mécanismes d'action des ETM particulaires sur le fonctionnement des cellules bryophytiques.



De plus, sur des sites industriels, tels que celui de Dunkerque, les polluants métalliques ne sont pas les seuls contaminants. Ces modèles biologiques sont exposés à une multitude de contaminants atmosphériques et l'intérêt de leur utilisation repose sur la recherche de biomarqueurs des expositions globales à la pollution atmosphérique.

Enfin, il existe une grande variabilité au niveau de la composition lipidique des membranes plasmiques des bryophytes et en particulier des mousses (Karunen & Aro, 2006). Et il est possible que lors des lipoperoxydations des membranes plasmiques des mousses, il se forme d'autres composés lipidiques que le MDA non détectable par la méthodologie employée lors de nos expérimentations.

Le stress oxydant peut induire également des dommages au niveau nucléaire. Des ERO comme les radicaux hydroxyles ( $\text{OH}^\bullet$ ) peuvent aller se fixer de façon durable sur le DNA et ainsi provoquer une génotoxicité. Nous avons, pour la première fois, mis en évidence chez ces bryophytes un biomarqueur de génotoxicité reflétant le niveau d'impact des ETM sur le DNA : la 8 hydroxy 2'déoxyguanosine (8OHdG) (Faburé et al., 2006a, 2006b). Une diminution significative de la quantité de 8OHdG a pu être observée chez *Ceratodon*. Or, ces résultats ne corroborent pas l'hypothèse de départ où le plus d'adduits génotoxiques sont observables sur les sites les plus contaminés par les métaux.

Afin de mieux comprendre le phénomène, le test DNA ladder a été réalisé pour la première fois chez les bryophytes. Ceci afin d'évaluer le niveau de dégradation de la molécule de DNA. Le test DNA ladder a révélé une forte fragmentation du DNA chez les individus exposés aux plus fortes concentrations en ETM notamment sur le site de Dunkerque. Pour Saclay et Montagney, la dégradation du matériel génétique a été plus lente et a formé des « smears » au test DNA Ladder. Cette forte détérioration du matériel nucléaire interfère avec la détection de la 8OHdG car la méthode employée ne permet pas de détecter des fragments de DNA trop

## Développement d'outils biologiques d'évaluation des impacts des particules atmosphériques dans des écosystèmes diversement pollués

petits. D'autres méthodologies plus lourdes (*e.g.* par HPLC) pourraient améliorer les seuils de détection mais demanderaient à être mises au point (Cadet *et al.* 1999). A ce jour, aucune expérimentation scientifique n'a permis de mettre en évidence que les polluants pouvaient chez les bryophytes interférer avec le génome et plus particulièrement avoir une action toxique chez ce dernier.

Les bryophytes les plus fortement exposées aux ETM ont présenté des concentrations en MDA significativement supérieures. De la même manière, pour la 8OHdG, les mousses les plus exposées aux ETM ont présenté les niveaux de concentration les plus élevés mais dans le cadre de notre expérimentation observable au bout de 30 jours d'exposition contrôlée. Généralement l'apparition d'ERO lors d'un stress est très rapide (de l'ordre de la milliseconde) mais les processus de compensation et éventuellement de réparation sont eux également très rapides. Notre observation se faisant sur un intervalle de temps relativement long pour la biologie de l'organisme (2 mois en exposition *in situ* et plusieurs semaines pour l'exposition en conditions contrôlées), il est possible que nous n'ayons pu apprécier lors de nos analyses qu'une partie globale de la situation.

Des processus de réparation, tels que l'excision-resynthèse, pourraient être activés au sein des cellules bryophytiques afin de permettre aux cellules de retrouver toute leur intégrité mais il faut désormais en apporter la preuve scientifique par l'expérimentation.

A l'issue des premiers résultats de ce travail, le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, a choisi de financer une thèse ayant pour objectifs de rechercher l'écotoxicité et plus particulièrement la génotoxicité des composés organiques particuliers et volatils chez les bryophytes cultivées de façon standardisée.

### Effets de la pollution particulaire en ETM sur les communautés microbiennes

Conformément aux résultats obtenus depuis plusieurs années (Nguyen-Viet *et al.* 2005, 2006a, 2006b, 2007, *in press*), les travaux réalisés dans le cadre de ce programme ont confirmé l'impact des contaminants sur les communautés microbiennes. L'intérêt de ce type d'approche est qu'il permet d'observer simultanément la réaction de plusieurs groupes microbiens et, pour certains de ces groupes, celle de plusieurs dizaines d'espèces. Dans le cas présent, la biomasse de certains groupes a diminué de façon très significative. Il s'agit des bactéries et des protistes autotrophes (microalgues) et hétérotrophes (ciliés et amibes à thèque) dont la caractéristique commune est d'être unicellulaire. En effet, les polluants pénètrent beaucoup plus facilement et beaucoup plus rapidement au travers de la membrane de ces organismes qu'à travers les téguments des invertébrés. De plus, l'unicellularité est généralement liée à des taux de croissance très élevés (avec des divisions cellulaires variant de quelques heures à quelques semaines). Dans ces conditions, les communautés de microorganismes semblent être les témoins les plus précoces des perturbations. Inversement d'autres groupes de microorganismes sont peu affectés ou même peuvent être favorisés par la présence de contaminants. Ceci peut être expliqué par la résistance naturelle de certains groupes (c'est le cas des cyanobactéries, réputées très résistantes aux pollutions métalliques) ou par le fait que le taux de reproduction de certains organismes est trop lent pour pouvoir observer une réaction significative durant l'expérimentation. Il est aussi possible que certains groupes microbiens profitent indirectement des effets négatifs sur les autres microorganismes. Cela peut par exemple être le cas lorsque la pollution entraîne la disparition d'un prédateur ou d'un compétiteur, ou lorsqu'elle est responsable d'une augmentation des concentrations en éléments nutritifs dans le milieu (apport d'un polluant riche en azote, modification des cycles biogéochimiques ...).

## Développement d'outils biologiques d'évaluation des impacts des particules atmosphériques dans des écosystèmes diversement pollués

En ce qui concerne le cas particulier de la pollution particulaire, nos résultats montrent que leur composition en métaux influe significativement sur la biomasse des communautés microbiennes. D'autres polluants (notamment organiques) présents dans les particules jouent probablement un rôle important dans leur toxicité mais n'ont pas pu être mesurés dans le cadre de cette étude. Par ailleurs, la taille et la morphologie des particules sont probablement des caractéristiques qui peuvent avoir une influence sur le fonctionnement des communautés microbiennes. En particulier il est probable que la toxicité des particules soit variable selon qu'elles agissent en diffusant des polluants dans le milieu ou selon qu'elles sont directement ingérées par les microorganismes prédateurs. Le fait que ces prédateurs constituent justement les groupes les plus sensibles aux contaminants indique que ce phénomène mériterait d'être détaillé au cours de recherches futures réalisées en conditions contrôlées.

Pour finir, les travaux réalisés dans le cadre de ce programme ouvrent une première porte pour l'utilisation de microsystemes Bryophytes/communautés microbiennes standardisés permettant de mieux évaluer l'impact réel de la pollution atmosphérique.

## **V. CONCLUSION ET PERSPECTIVES**

### Analyse des particules : intérêt de la caractérisation des particules *in situ*

L'analyse des teneurs multi-élémentaires en particules PM<sub>10</sub> des filtres collectés sur chacun des sites a permis de caractériser la provenance des particules, leur transport à l'échelle locale ou régionale, ainsi que l'influence potentielle des conditions climatiques sur les dépôts. En effet, un site éloigné de sources importantes de pollution sera surtout sensible aux transports de particules à longue distance. De plus, des conditions climatiques stables avec des vents faibles minimiseront les suspensions de poussières terrigènes locales par érosion éolienne.

Par ailleurs, les comparaisons inter-sites, ont permis de séparer les apports d'éléments crustaux (Ta, Rb, K, Cs, Tl, W, Sc, Tb, Al, Dy, Se, Ni, Nd, Sm, Tm, Y, Au et Th) de ceux liés au trafic routier (Zn, Pb, Sr, Ca, Mn, Cr, V, Mo, Fe, Ba, Sb, et Cu) et aux activités industrielles (Tl, La, V, Mn et Fe).

Les enrichissements observés résultent en général de l'influence de sources majeures d'émission, le plus souvent anthropogéniques. Ainsi, la présence de Fe et de Mn est liée aux activités de la sidérurgie à Dunkerque, tandis que la présence de La, employée comme catalyseur lors des opérations de cracking, est plutôt reliée à l'industrie pétrolière. La caractérisation fine des PM<sub>10</sub> *in situ* a permis de mieux prendre en compte les sources d'émission et d'estimer les distances de transport des PM<sub>10</sub>. Cette approche devrait être simplifiée (choix d'indicateurs les plus pertinents) lors des études de ce type. De plus, l'analyse détaillée de la composition élémentaire des particules permet d'établir des relations plus pertinentes entre la pollution atmosphérique et ses effets sur les biomarqueurs et les bioindicateurs utilisés.

La collaboration avec les associations de mesure de la qualité de l'air (ASQAB, ASPA, ATMOSF'AIR) lors de la mise au point des expérimentations en conditions contrôlées a permis de retrouver des conditions de pollutions représentatives des dépôts humides *in situ*. Les résultats obtenus lors de ce type d'expériences devraient permettre des développements pour des études toxicologiques en évitant (1) l'utilisation en conditions contrôlées de

## Développement d'outils biologiques d'évaluation des impacts des particules atmosphériques dans des écosystèmes diversement pollués

particules prélevées dans d'autres régions du monde (USA) et qui sont peu représentatives des pollutions urbaines européennes, ou (2) l'emploi de particules produites à l'aide de banc à moteur, dont la composition est essentiellement carbonée et donc peu représentative des pollutions réelles.

### Utilisation des bryophytes : intérêt des mousses et choix des biomarqueurs les plus pertinents

Nos résultats mettent en évidence des fortes corrélations entre la composition des particules PM<sub>10</sub> de l'air et les éléments inorganiques présents au sein des bryophytes. Cependant, l'accumulation des ETM particulaires chez les bryophytes diffère d'un élément à l'autre et varie en fonction des espèces utilisées. Il est probable que la morphologie des mousses et la manière dont l'organisme va se développer sur les supports servant à l'exposition jouent un rôle dans la rétention des particules. Les particules de petite taille, pouvant par des processus de coagulation en générer d'autres de plus grande taille, sont susceptibles d'être retenues par les bryophytes, mais pas par la pompe Partissol qui n'échantillonne que des particules de diamètre inférieur à 10 µm. La sensibilité de *Ceratodon purpureus* et sa faible variabilité génétique en font une espèce intéressante pour la biosurveillance de la qualité de l'air dans des conditions standardisées. En revanche, cette espèce n'abrite pas beaucoup de microorganismes. L'espèce *Scleropodium purum* est de ce point de vue plus intéressante.

Des biomarqueurs précoces d'exposition (MDA) et d'effet génotoxique (8OHdG) témoignent des impacts liés à l'exposition aux contaminants atmosphériques et plus particulièrement aux ETM particulaires. La mise au point du dosage de la 8OHdG, ainsi que le test du DNA Ladder, ont permis de mettre en évidence pour la première fois, chez les bryophytes, un effet génotoxique lié à une exposition à la pollution atmosphérique. Ce biomarqueur d'exposition pourrait donc constituer un biomarqueur pertinent pour des applications futures et une aide à la décision dans le cadre de l'évaluation des risques pour l'environnement.

Enfin, l'exposition en conditions contrôlées a permis de mieux comprendre et surtout de mieux appréhender (grâce à un temps d'exposition plus court) les variations des deux biomarqueurs étudiés, notamment les diminutions des concentrations de ces biomarqueurs pour les temps d'exposition les plus longs. Ces résultats permettant d'émettre l'hypothèse que ces organismes réussissent à supporter les impacts des polluants métalliques aux niveaux biologique et génomique. Les données scientifiques en écotoxicologie du compartiment aérien et en particulier de l'évaluation de la génotoxicité des contaminants atmosphériques sont encore trop peu développées et les résultats de ce travail contribuent à proposer de nouveaux modèles biologiques adaptés pour mener à bien ces recherches.

### Utilisation des communautés microbiennes : intérêt et choix des groupes les plus pertinents

#### *Indicateurs environnementaux*

Nos résultats mettent en évidence un effet de la pollution particulaire sur les microsystèmes bryophytes-microorganismes associés. Une réaction significative de la communauté microbienne a notamment été constatée (diminution de la biomasse totale microbienne) ; certains groupes microbiens, bactéries hétérotrophes et protistes, étant les plus affectés. Ces résultats ont donc permis de montrer que certains microorganismes peuvent constituer un biointégrateur précoce (c'est-à-dire présentant une réaction rapide) des particules d'origine

## Développement d'outils biologiques d'évaluation des impacts des particules atmosphériques dans des écosystèmes diversement pollués

atmosphérique, y compris lorsque leurs concentrations dans le milieu sont faibles. Les protozoaires, en particulier les amibes à thèque semblent constituer le groupe le plus pertinent pour ce type d'études.

### *Intervention pour l'aide à la décision au niveau régional et national*

A la suite du présent travail, la ville de Besançon a choisi de financer une thèse sur le même thème en continuité du programme Primequal 2. L'objectif de ce doctorat est de mettre au point des microsystèmes standardisés à Bryophytes, de faible encombrement, d'utilisation facile, utilisable par le réseau de mesure de la qualité de l'air. Au cours de cette étude, de tels systèmes seront disposés autour de zones affectées par des émissions de polluants atmosphériques (Incinérateurs d'ordures ménagères, trafic routier important ...).

### Perspectives

Les résultats que nous avons obtenus montrent que les réponses des biomarqueurs face à la pollution particulaire ne sont probablement pas seulement liées aux ETM, mais aussi à d'autres constituants. L'un des axes majeurs de développements futurs consistera à caractériser ces autres constituants (gaz, particules minérales, organiques, microbiologiques) présents *in situ* et d'étudier leurs effets synergiques sur les microsystèmes bryophytes-microorganismes associés. En effet, les bryophytes peuvent apporter une meilleure sensibilité et reproductibilité pour les études d'écotoxicité. Il semble donc intéressant de poursuivre ces travaux en recherchant un certain nombre de mécanismes d'action tels que les mécanismes de compensation et/ou réparation chez les bryophytes qui sont de bons modèles biologiques d'évaluation des risques pour l'environnement. Un autre axe d'étude en cours de développement consistera à mettre en évidence l'influence des composés émis par les bryophytes sur les microorganismes lorsqu'elles sont affectées par des polluants particuliers de fraction très fine (type nanoparticules). Enfin, d'autres travaux porteront sur l'influence des changements climatiques globaux sur le complexe bryophytes-microorganismes.

### **Remerciements**

Nous souhaitons remercier les membres du Conseil Scientifique du Programme PPRIMEQUAL 2-PREDIT pour leur soutien. En effet, grâce à l'aide du Programme PPRIMEQUAL 2-PREDIT, les trois partenaires de ce contrat ont pu établir des relations fructueuses et mener à bien ces recherches.

Nous remercions les associations de mesure de la qualité de l'air (ASQAB, ASPA, ATMOSF'AIR) qui nous ont transmis des filtres à particules servant à la réalisation des expositions en conditions contrôlées.

Nous remercions le Pr P. Shirali du laboratoire de Recherche en Toxicologie Industrielle de l'Université du Littoral Côte d'Opale à Dunkerque, qui nous a permis de travailler en collaboration avec le Dr. Guillaume Garçon et M. Anthony Verdin (Ingénieur de Recherches), ainsi que le réseau de mesures de la qualité de l'air ATMO Nord-Pas de Calais, pour son aide technique et documentaire concernant le site industrialo-portuaire de Dunkerque.

## **Bibliographie**

- Bernard N. (1997a). *Mesure de l'exposition individuelle aux photo-oxydants atmosphériques et recherche de marqueurs biologiques*. PhD thesis. Université de Montpellier II.
- Bernard N., Astre C., Vuillot M., Saintot M., & Gerber M. (1997b). Measurement of background urban nitrogen dioxide pollution levels with passive samplers in Montpellier, France. *Journal of Exposure analysis and Environmental Epidemiology*, 7 (2): 165-178.
- Bernard N., M. Saintot, Astre C. & Gerber M. (1998). Personal exposure to NO<sub>2</sub> pollution and effect on plasma antioxidants. *Archives of Environmental Health* 53: 122-128.
- Bernard N., Gerber M. & Astre C. (1999). Ozone measurement with passive samplers: validation and use for ozone pollution assessment in Montpellier, France. *Environmental Science and Technology* 33: 217-222.
- Boutin A.C., Shirali P., Garçon G., Gosset P., Leleu B., Marez T., Bernard A. & Haguenoer J.M., (1998) Peripheral markers (Clara Cell Protein and  $\alpha$ -glutathione S-transferase) and lipoperoxidation (malondialdehyde) assessment in Sprague-Dawley rats instilled with haematite and benzo[a]pyrene. *Journal of applied toxicology*, 18 (1), 39-45.
- Breuil-Sée A. (1993) Recorded desiccation survival in bryophytes. *J. Bryol.*, 17, 679-680.
- Breuil-Sée A. (1994) Reviviscence d'une bryophyte en anhydrobiose depuis un quart de siècle : critères cytologiques d'aptitude à la reviviscence de thalles de *Riccia macrocarpa* Lev. *Compt. Rend. Hebd. Séances Acad. Sci. Sér. D*, 317, 245-252.
- Cadet, J., Delatour, T., Douki, T., Gasparutto, D., Pouget, J.-P., Ravanat, J.-L. & Sauvaigo, S. (1999) Hydroxyl radicals and DNA base damage. *Mutat. Res.* 424, 9-21.
- Couto, J.A., Aboal, J.R., Fernandez, J.A., Carballeira, A. (2004) A new method for testing the sensitivity of active biomonitoring: an example of its application to terrestrial moss. *Chemosphere*. 57. 303-308.
- Denayer. F-O. (2000) Ecotoxicité des éléments traces métalliques chez les bryophytes. Mise au point d'un bryocapteur des retombées atmosphériques à l'aide de *Ceratodon purpureus* (Hedw.) Brid. Thèse pour l'obtention du grade de docteur de l'Université de Metz. Metz. 238p.
- Denayer. F-O., Van Haluwyn C., Languereau F., Chiaffredo M. (2002). Biomonitoring system for atmospheric heavy metal assessment with *Ceratodon purpureus* (Hedw.) Brid controlled culture. Conference on urban air pollution bioindication and environmental awareness. University of Hohenheim (Germany), 5-6 november 2002, presentation orale et poster.
- Fabure J., Garçon G., Denayer F.-O., Shirali P., Deram A., Cuny D., Gaudry A., Van Haluwyn C., Bernard N. (2006a) Biomarkers of oxidative stress induced by airborne matter and associated heavy metals in two bryophyte species. 4th International Workshop on Biomonitoring of Atmospheric Pollution (with emphasis on trace elements). 17-21 september, Agios Nikalaos, Crête.
- Fabure J., Denayer F.-O., Garçon G., Van Haluwyn C., Gaudry A., Bernard N. (2006b) Biomarkers of oxidative stress induced by airborne matter and associated heavy metals in two bryophytes species: a new way for environmental risk assessment. 15th IUAPPA regional conference – 17th EFCA speciality conference. « Air pollution and environmental health, from science to action: the challenge of particulate matter ». 5-8 september, Lille, France, Qiagen DNA Plant Easy Kit <<http://www1.qiagen.com/literature/handbooks/literature.aspx?id=1000064>> Gentaur <[http://www.gentaur.com/nieuwe\\_pagina\\_8.htm](http://www.gentaur.com/nieuwe_pagina_8.htm)>

**Développement d'outils biologiques d'évaluation des impacts des particules atmosphériques dans des écosystèmes diversement pollués**

- Gaudry A, Moskura M., Mariet C., Ayrault S., Denayer F., Bernard N. (accepté) Inorganic pollution in PM10 particles collected over three French sites under various influences : rural conditions, traffic and industry. Water air and soil pollution.
- Garrec, J.-P. & Van Haluwyn C. (2002). *Biosurveillance végétale de la qualité de l'air*. Paris, TEC ET DOC. 117 p.
- Gilbert D. (1998a). *Les communautés microbiennes à la surface des tourbières à sphaignes: structure, fonctionnement et impact des apports de fertilisants*. Laboratoire de Biologie Comparée des Protistes. PhD thesis. University Blaise Pascal (Clermont II). 133.
- Gilbert D., Amblard C., Bourdier G., Francez A.-J. (1998b) The microbial loop at the surface of a peatland: structure, functioning and impact of nutrients inputs. *Microb. Ecol.* 35 : 83-93.
- Gushina I.A. & Harwood J.L., 2000. Effect of copper and lead on lipid metabolism in bryophytes and lichens. *Biochemical Society Transactions*, 28, part 6, 910-912.
- Gushina I.A. & Harwood J.L., 2002. Lipid metabolism in the moss *Rhytidiadelphus squarrosus* (Hedw.) Warnst. From lead-contaminated and non contaminated populations. *Journal of Experimental Botany*, 53(368), 455-463.
- Karunen P. & Aro E.-M., 2006. Fatty acid composition of polar lipids in *Ceratodon purpureus* and *Pleurozium schreberi*. *Physiologia Plantarum*, 45(2), 265-269.
- Meyer C. (2006). Relation entre polluants d'origine atmosphérique et communautés microbiennes chez *Scleropodium purum* (Bryophyte) dans trois sites différemment pollués. Mémoire de DEA, Université de Franche-Comté. 30p.
- Nguyen-Viet H. (2005). Utilisation potentielle des amibes à thèque et des autres micro-organismes des mousses pour la bioindication de la pollution d'origine atmosphérique (NO<sub>2</sub>, métaux lourds) : études in situ et en conditions contrôlées en France et au Vietnam. PhD thesis. Université de Franche-Comté 170 p.
- Nguyen-Viet H., Gilbert D., Bernard N., Mitchell E.A.D., Badot P.-M. (2006a) Relationship between atmospheric pollution characterized by NO<sub>2</sub> concentrations and testate amoebae density and diversity. *Acta Protozoologica* 43: 233-239.
- Nguyen-Viet H., Bernard N., Mitchell E.A.D., Cortet J., Badot P.-M., Gilbert D. (2006b) Relationship between testate amoebae (protist) communities and atmospheric heavy metals accumulated in *Barbula indica* (Bryophyta) in Vietnam. *Microbial ecology*, 53: 53-65
- Nguyen-Viet H., Gilbert D., Mitchell E.A.D., Badot P.-M., Bernard N. (2007) Effects of experimental lead pollution on the microbial communities associated with *Sphagnum fallax* (Bryophyta). *Microbial ecology*, 54: 232-241
- Nguyen-Viet H., Bernard N., Mitchell E.A.D., Badot P.-M., Gilbert D. Effect of lead on Testate Amoeba communities in *Sphagnum fallax* : an experimental study. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, in press.
- Palmes E.D., Gunnison A.F., Dimattio P.D.J. & Tomczyk C. (1976). Personal samplers for nitrogen dioxide. *American Industrial Hygiene Association Journal*, 37: 570-577.
- Saintot, M., Bernard N., Astre C., Geber M. (1999) Ozone exposure and blood antioxidants : a study in a periurban area in Southern France. *Archives of Environmental Health*, 54: 34-39
- Saintot, M., Bernard N., Astre C., Galan P., Hereberg S., Geber M. (2000). Nitrogen dioxide and ozone exposures in a population sample from Ile-de-France. *Epidemiology* 48: 54-61.
- Smith P.K., Krohn R.I., Hemranson G.T., Mallia A.K., Gartner F.H., Provenzana M.D., Fujimoto E.K., Goeke N.M., Olson B.J. & Klenk D.C. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analysis in biochemistry*, 150, 76-85.

**Développement d'outils biologiques d'évaluation des impacts des particules atmosphériques dans des écosystèmes diversement pollués**

- Taylor S.R., and McLennan S.M. (1985) The continental crust: its composition and evolution, Blacwell Scientific Publications, Oxford, 312 p.

## ANNEXE : TEXTES DES PUBLICATIONS

### PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES PARUES

A. GAUDRY<sup>3</sup>, M. MOSKURA<sup>3</sup>, C. MARIET<sup>3</sup>, S. AYRAULT<sup>6</sup>, F. DENAYER<sup>5</sup>, N. BERNARD<sup>1</sup>. Inorganic pollution in PM<sub>10</sub> particles collected over three French sites under various influences: rural conditions, traffic and industry. *Water air and soil pollution*, 193: 91-106

### PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES A PARAITRE

C. MEYER<sup>1</sup>, D.GILBERT<sup>2</sup>, A. GAUDRY<sup>3</sup>, M. FRANCHI<sup>2</sup>, H. NGUYEN-VIET<sup>4</sup>, J. FABURE<sup>5</sup>, N. BERNARD<sup>1</sup> Relationship of Atmospheric Pollution Characterized by gas (NO<sub>2</sub>) and particles (PM10) to Microbial Communities Living in Bryophytes at Three Differently Polluted Sites (Rural, Urban and Industrial). *Microbial Ecology*, soumis.

J. FABURE<sup>5</sup>, C. MEYER<sup>1</sup>, F. DENAYER<sup>5</sup>, A. GAUDRY<sup>3</sup>, D. GILBERT<sup>2</sup>, N. BERNARD<sup>1</sup> Atmospheric metal trace element deposition at three differently polluted sites (industrial, urban and rural): a comparison of accumulation capacity between an acrocarpous and a pleurocarpous moss. *Atmospheric Environment*, soumis.

<sup>1</sup> Laboratoire Chrono-Environnement, UMR 6249, Université de Franche-Comté, Place Leclerc F-25030 Besançon, France

<sup>2</sup> Laboratoire Chrono-Environnement, UMR 6249, Université de Franche-Comté, 4 place Tharradin, B.P. 71427, F-25 211 Montbéliard Cedex, France

<sup>3</sup> Groupe d'Analyses Élémentaires, Laboratoire Pierre Süe (cnrs/cea), CEA Saclay, F-91191 Gif-sur-Yvette, France

<sup>4</sup> Department of Public Health and Epidemiology, Swiss tropical Institute, Socinstrasse 57, P.O Box, CH-4002 Basel, Switzerland

<sup>5</sup> Département de Botanique et de Cryptogamie, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Lille, B.P. 83, F-59006 Lille Cedex, France

<sup>6</sup> Laboratoire des Sciences du Climat et de l'Environnement, CEA-CNRS-UVSQ/IPSL, F-91198 Gif sur Yvette cedex, France