

μPOL-AIR

Utilisation des tourbières à sphaignes
pour la quantification des dépôts de contaminants
atmosphériques à longue distance et
pour la mesure de leur impact sur l'environnement

Using Sphagnum peatlands
to quantify long-range atmospheric element depositions and
to evaluate their impact on environment

Programme **PRIMEQUAL**

Rapport de fin de contrat

Contributeurs : Armynot du Châtelet E., Binet P., Chiapusio G., Delaine M., Diaz de Quijano M., Franchi M., Gilbert D., Jassey V., Joly D., Jobard M., Jouffroy I., Karimi B., Meyer C., Mitchell E.A.D., Monna F., Sime-
Ngando T., Toussaint M.L.

Coordination : Nadine Bernard

CNRS-UFC/UMR 6249 Chrono-Environnement
Université de Franche-Comté
16 route de Gray
F-25030 Besançon cedex

Nadine Bernard, Professeur
nadine.bernard@univ-fcomte.fr

N° de contrat : 2010-Q.3-Chorus2100082984
Date du contrat : 10/06/2010

Date de rédaction : 12/06/2014

Sommaire

Résumé.....	5
Equipes partenaires	6
Note de synthèse destinée aux utilisateurs et gestionnaires publics	7
CONTEXTE GENERAL.....	8
OBJECTIFS GENERAUX DU PROJET	9
QUELQUES ELEMENTS DE METHODOLOGIE, DIFFICULTES RENCONTREES	10
RESULTATS OBTENUS ET RECOMMANDATIONS	11
IMPLICATIONS PRATIQUES, TRANSFERT POUR LES POLITIQUES PUBLIQUES, VALORISATION	13
PARTENARIATS MIS EN PLACE, PROJETS, ENVISAGES.....	14
Rapport scientifique	16
Introduction générale	17
Question 1	20
Les tourbières à sphaignes sont-elles des modèles pertinents pour évaluer les dépôts de contaminants à longue distance ?	20
1.1. Contexte et Objectifs	21
1.2. Choix de l'espèce de sphaigne et échantillonnage.....	21
1.3. Choix des sites d'étude	25
1.4. Choix des méthodes d'analyse des éléments chimiques, calcul des facteurs d'enrichissement.....	27
1.5. Evaluation des concentrations en ETM dans la partie vivante des sphaignes à l'échelle supra-régionale (Etude <i>in situ</i> 1)	29
1.6. Evaluation des concentrations en HAP dans la partie vivante des sphaignes dans les Vosges (Etude <i>in situ</i> 1).....	34
1.7. Evaluation des concentrations en ions majeurs et en éléments nutritifs dans la partie vivante des sphaignes à l'échelle supra-régionale.....	38
Question 2	41
Est-il possible d'évaluer l'origine des polluants (sources, distances) présents à la surface des tourbières à sphaignes et de modéliser ces dépôts ?	41
2.1. Contexte et Objectifs	42
2.2. Calibration et validation de la méthode géomatique pour modéliser la dispersion des PM ₁₀ à l'échelle de l'Europe	43
2.3. Utilisation des dépôts en ETM dans 54 tourbières pour modéliser les dépôts à longue distance à l'échelle supra-régionale (Etude <i>in situ</i> 1)	48

Question 3	54
Quels impacts les dépôts de contaminants à longue distance ont-ils sur le fonctionnement des microsystemes sphaignes-microorganismes ?	54
3.1. Contexte et Objectifs	55
3.2. Réflexions sur les notions de bioindication et de biointégration	56
3.3. Impact de la contamination en ETM et en HAP sur le complexe sphaignes-microorganismes associés (Etude <i>In situ</i> 1)	58
3.4. Impact de la contamination en ETM, en HAP et en N sur le complexe sphaignes-microorganismes associés (Etude en conditions contrôlées)	65
3.5. Influence d'un apport de Pb sur les parasites microbiens	70
3.6. Influence des dépôts d'origine atmosphérique sur la composition des thèques d'amibe en relation avec le contexte minéral	75
Question 4	79
Quelle est l'importance des pollutions historiques dans la tourbe ? Est-il possible de reconstruire leurs impacts sur les organismes des tourbières ?	79
4.1. Contexte et Objectifs	80
4.2. Evaluation de l'évolution des concentrations en ETM dans une carotte de tourbe et recherche de microorganismes indicateurs	81
4.3. Recherche de microorganismes indicateurs des pollutions historiques	86
5. Discussion générale et principales conclusions	90
5.1. Rappel des objectifs et de la démarche	90
5.2. Les tourbières à sphaignes sont-elles des modèles pertinents pour évaluer les dépôts de contaminants à longue distance ?	90
5.3. Est-il possible d'évaluer l'origine des polluants (sources, distances) présents à la surface des tourbières à sphaignes et de modéliser ces dépôts ?	92
5.4. Quels impacts les dépôts de contaminants à longue distance ont-ils sur le fonctionnement des microsystemes sphaignes-microorganismes ?	94
5.5. Quelle est l'importance des pollutions historiques dans la tourbe ? Est-il possible de reconstruire leurs impacts sur les organismes des tourbières ?	96
6. Valorisation scientifique	97
7. Remerciements	98
8. Bibliographie	102
Annexe I	107

Résumé

54 tourbières à sphaignes du grand est de la France ont été étudiées simultanément pour évaluer la pollution atmosphérique à longue distance et ses effets sur le complexe sphaignes-microorganismes. La quantification de polluants à la surface des tourbières a permis la modélisation de ces dépôts d'origine atmosphérique à une échelle supra-régionale. Parallèlement, une étude a été réalisée en conditions contrôlées pour déterminer l'impact des polluants sur les microorganismes. Enfin, une étude paléoenvironnementale a permis de décrire la pollution au cours du dernier millénaire ainsi que ses effets sur certains microorganismes. Cette étude a conduit à 4 principales conclusions : (1) les sphaignes sont faiblement contaminées par les éléments traces métalliques (ETM) et par les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP). Cependant, il existe une variabilité spatiale selon les régions étudiées ; (2) les modèles de dépôts construits à partir d'une méthode géomatique montrent que les aéro-contaminants déposés sont issus de transport de distances variables (intermédiaires et longues distances). Les agglomérations et les zones industrielles sont les sources principales ; (3) la pollution atmosphérique engendrée par ces sources entraîne une modification du fonctionnement des microsystèmes sphaignes-microorganismes. Il s'agit d'une réponse complexe, qui se produit à l'échelle systémique et (4) la pollution des tourbières a été plus importante au 19ème et au 20ème siècle et s'est affaiblie les 20 dernières années. Les effets de ces pollutions historiques sur les communautés microbiennes peuvent être mis en évidence en étudiant les restes microbiens fossiles, qui semblent être de bons indicateurs des paléopollutions.

Mots clés

Pollution atmosphérique longue distance, tourbière à sphaignes, éléments traces métalliques, hydrocarbures aromatiques polycycliques, microsystème sphaignes-microorganismes, amibes à thèque, bioaccumulation, biointégrateur, paléoindicateur, modélisation, cartographie.

Summary

54 sphagnum peatlands in the greater east of France were studied simultaneously to evaluate long-distance atmospheric pollution and its effects on the sphagnum-microorganism compound. Quantification of pollutants at the surface of the peatlands permitted modelisation of these atmospheric deposits outside the greater region. At the same time, a study was conducted under controlled conditions to determine the impact of the pollutants on microorganisms. Finally, a paleoenvironmental study permitted the description of pollution over the last millennium and its effects on certain microorganisms. This study led to 4 conclusions: (1) sphagnum moss is only slightly contaminated by metal trace elements (MTE) and by polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH). However, there is spatial variability according to the regions studied; (2) the deposits models constructed using a geometrics method show that the air contaminant deposits come from variable distances (medium- and long-range. Cities and industrial zones are the main sources; (3) the atmospheric pollution produced by these sources modifies the functioning of the sphagnum-microorganism microsystems. The response is complex on a systemic scale and (4) pollution of peatlands was greater in the 19th and 20th centuries and has decreased over the last 20 years. The effects of this historic pollution on microbial communities can be brought to light by studying microbial fossils, which seem to be good indicators of paleopollution.

Key words

Long-range atmospheric pollution, Sphagnum peatlands Metal Trace Element (MTE) and Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH), Sphagnum/microbial community microsystem, testate amoebae, bioaccumulation, biointegrator, paleoindicator, modelisation, cartography

Equipes partenaires

- Laboratoire Chrono-Environnement (LCE), UMR 6249 UFC/CNRS UsC INRA, Université de Franche-Comté, 16 route de Gray – 25030 Besançon Cedex.
- Laboratoire Théma, UMR CNRS 6049, Université de Franche-Comté, 32 rue Mégevand – 25030 Besançon Cedex.
- Laboratoire ARTéHIS, UMR CNRS 5594, Université de Bourgogne, 6 boulevard Gabriel, 21000 Dijon.
- Laboratoire Microorganismes : Génome & Environnement, UMR CNRS 6023, Université Blaise Pascal, 24 avenue des Landais, BP 80026, 63171 Aubière Cedex.
- Laboratoire de **Biologie du Sol de l'Université de** Neuchâtel, 11 rue Emile-Argand, Case postale 158, 2009 Neuchâtel, Suisse.
- Géosystèmes FRE 3298, Université de Lille 1, Avenue Paul Langevin, 59655 Villeneuve d'Ascq

Note de synthèse destinée aux utilisateurs et gestionnaires publics

μPOL-AIR

Utilisation des tourbières à sphaignes pour la quantification des dépôts de contaminants atmosphériques à longue distance et pour la mesure de leur impact sur l'environnement

Using Sphagnum peatlands to quantify long-range atmospheric element depositions and to evaluate their impact on environment

Programme PRIMEQUAL

Responsable scientifique du projet : Nadine BERNARD

CNRS-UFC/UMR 6249 Chrono-Environnement
Université de Franche-Comté
UFR des Sciences et Techniques
16 route de Gray
F-25030 Besançon cedex

Nadine Bernard
Professeur
Université de Franche-Comté
nadine.bernard@univ-fcomte.fr

CONTEXTE GENERAL

Quelle situation, quels enjeux motivent ce projet ?

La qualité de l'**atmosphère peut** être altérée par des émissions naturelles et/ou anthropiques. Cette altération, qualifiée de pollution, est un phénomène complexe qui ne connaît pas de frontière et qui doit être considéré à de multiples échelles géographiques. Les phénomènes de pollution atmosphérique, caractérisés par une grande diversité spatiale et temporelle, sont étroitement couplés entre eux, en raison de la nature des aérocontaminants, de leurs temps de présence et **des processus chimiques et dynamiques liés à l'évolution des polluants dans l'air**. Les polluants primaires sont émis, coexistent, interagissent et se dispersent. Ces polluants primaires, ainsi que les produits formés secondairement, sont ensuite entraînés **dans les mouvements des masses d'air**. Ils peuvent parcourir des distances très variables. Lorsque les polluants atteignent le sol, parfois à des milliers de kilomètres de leurs sources **d'émission, ils sont susceptibles d'affecter la santé des organismes** (Saintot *et al.*, 1999, Bernard *et al.*, 1997, 1999) **et plus globalement d'altérer le fonctionnement normal des écosystèmes y compris ceux qui pourraient sembler les plus isolés de ces pollutions**. La prise en compte des effets des contaminations **à l'échelle des écosystèmes constitue aujourd'hui un enjeu majeur en écologie des perturbations**. Cependant, cette approche, qui considère **l'effet d'une pollution complexe sur un système lui aussi complexe** est particulièrement **difficile à mettre en œuvre, bien que ce soit elle qui reflète le mieux la réalité de l'impact** des perturbations, directes (effets toxiques) ou indirectes (effets liés aux interactions), sur le monde vivant. Le cas de la pollution atmosphérique à longue distance est particulièrement **emblématique. En effet, il s'agit d'une pollution diffuse, impliquant de nombreux types de contaminants mais le plus souvent à de faibles concentrations, qui affecte des écosystèmes isolés. Il est donc nécessaire pour évaluer son impact de mettre en œuvre des techniques** particulièrement innovantes.

En résumé, il s'agit :

- (1) **de pouvoir disposer d'outils permettant de comparer à différentes échelles spatiale et temporelle l'intégration des polluants atmosphériques dans les milieux naturels,**
- (2) **de pouvoir distinguer la contribution des apports à longue distance vis à vis des pollutions locales**
- (3) **de pouvoir évaluer l'impact de ces dépôts d'origine atmosphérique sur le fonctionnement même des écosystèmes.**

Pour cela, il est nécessaire de disposer de milieux naturels, homogènes dans leur biodiversité **et leur fonctionnement, régulièrement présents à l'échelle du territoire, peu dépendants des conditions naturelles locales** (nature des sols, taille des bassins versants) et éloignés des sources primaires de polluants atmosphériques. Par ailleurs, le suivi des effets des aérocontaminants sur les écosystèmes impose de pouvoir disposer de modèles biologiques suffisamment **simplifiés et dont l'évolution dans le temps soit assez rapide**, pour pouvoir **disposer d'informations dans des délais raisonnables**.

Parmi les écosystèmes pouvant répondre à ces différents critères, **les tourbières à sphaignes** semblent constituer un modèle particulièrement **adapté à l'étude des contaminations atmosphériques à longue distance**. En effet, ce sont des zones humides relativement répandues dans les régions **boréales de l'hémisphère nord**, mais aussi présentes en Europe centrale et du sud, dans les zones froides et humides. **Pour l'essentiel il s'agit** des milieux de moyenne montagne, qui sont justement des zones la plupart du temps situées

hors des grandes zones d'émissions de polluants atmosphériques. Les tourbières sont des **écosystèmes d'une très grande** valeur patrimoniale et écologique en raison de leur biodiversité unique, de leur rôle dans le cycle du carbone et **de leur fonction d'archives naturelles des modifications de l'environnement sur des périodes de plusieurs millénaires.**

Comme pour tout écosystème, **l'étude du fonctionnement des tourbières est particulièrement complexe à mettre en œuvre, dans la mesure où il inclut des compartiments biologiques très différents** notamment au niveau de leur rythme et de leur durée de vie. Pour remédier à cette difficulté, tout en conservant la possibilité de prendre en compte des réseaux trophiques suffisamment complexes, il est possible de travailler sur des microcosmes naturels tels que les microsystemes « Bryophytes/microorganismes associés » (Nguyen *et al.*, 2007a, 2007b, 2008, 2010 ; Meyer *et al.*, 2010a, 2010b, 2012). Dans le cas de **l'évaluation de l'impact des aérocontaminants, l'avantage de l'utilisation de ces microsystemes est double.** D'une part les Bryophytes sont utilisées depuis plusieurs années comme intégrateurs des contaminants métalliques **d'origine** atmosphérique en raison de **leurs propriétés morphologiques et physiologiques, d'autre part ces Bryophytes abritent des communautés microbiennes diversifiées et abondantes, qui sont des indicateurs pertinents de perturbations anthropiques** (Meyer *et al.*, 2013 ; Jassey *et al.*, 2013).

Au final l'enjeu est de pouvoir proposer un outil biologique performant qui permette :

- de disposer **de marqueurs précoces d'exposition exploitables pour la surveillance de la qualité de l'air** (mesure de la bio-accumulation des contaminants),
- **de prendre en compte simultanément un grand nombre d'organismes vivants** pour pouvoir mieux caractériser les risques pour les écosystèmes (mesure des effets des contaminants),
- **de s'intégrer dans la démarche d'évaluation des risques environnementaux** (mise en place de méthodes de suivi qui soient reproductibles),
- **d'aider à la réflexion concernant la détermination de seuils réglementaires** (mise en œuvre de nouveaux dispositifs biologiques plus sensibles et donc plus performants).

OBJECTIFS GENERAUX DU PROJET

L'objectif général de cette étude a été d'utiliser les tourbières à sphaignes pour le suivi de la contamination par la pollution atmosphérique à longue distance et pour l'évaluation de son impact sur les milieux naturels.

Plus précisément, les objectifs de ce projet étaient de :

- Quantifier et qualifier les dépôts de contaminants à longue distance et proposer des hypothèses quant à leur origine.
- **Evaluer l'impact de ces dépôts atmosphériques de contaminants à l'échelle d'un écosystème** et déterminer les bioindicateurs les plus pertinents pour la biosurveillance de la pollution à longue distance.

→ Evaluer la **dynamique d'accumulation** en quantifiant l'évolution des concentrations en contaminants dans les tourbières au cours du 20^{ème} siècle et tester la pertinence de paléoindicateurs d'effet de la contamination issue de la pollution atmosphérique.

La stratégie scientifique de ce projet a consisté à étudier un écosystème miniature simplifié constitué par des Bryophytes spécifiques (les sphaignes) et les microorganismes qui leur sont associés.

En effet :

- Les Bryophytes sont déjà utilisées pour la quantification des dépôts de contaminants atmosphériques car ce sont des plantes sans racines qui sont fortement tributaires des apports aériens et relativement indépendantes du substrat sur lequel elles se développent,

- Les Bryophytes, et en particulier les sphaignes, abritent et interagissent avec un grand **nombre d'espèces de microorganismes qui eux même forment des réseaux d'interactions** très complexes. Ces communautés microbiennes sont très sensibles aux perturbations naturelles (variations climatiques) ou anthropiques (pollutions).

- Certains des microorganismes des sphaignes possèdent un squelette interne ou externe qui **persiste après la mort de l'organisme et qui s'accumule dans la tourbe en même temps** que certains contaminants. En ce sens, les tourbières à sphaignes sont de véritables archives naturelles qui permettent de connaître les niveaux de pollutions qui se sont produites dans le passé mais aussi **l'effet que les polluants** ont eu sur les communautés microbiennes.

QUELQUES ELEMENTS DE METHODOLOGIE, DIFFICULTES RENCONTREES

Ces travaux de recherche se sont déroulés selon trois étapes.

- **L'étude *in situ* 1** a été réalisée sur 54 tourbières du centre-est de la France où trente-trois éléments traces et 16 hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) ont été dosés dans **l'espèce *Sphagnum capillifolium***. Le microsysteme « sphaignes/microorganismes associés » a été étudié afin de définir des bioindicateurs pertinents de la pollution longue distance **et d'analyser les réponses de ces systèmes biointégrateurs de perturbations.**

- Parallèlement, des expérimentations en conditions contrôlées ont été mises en place **afin d'étudier l'impact de l'azote et de contaminants (ETM, HAP) sur les biomasses et la diversité** des microorganismes, les concentrations en phénols totaux, ainsi que sur les activités phénol-oxydases.

- **L'étude *in situ* 2** a porté sur l'évaluation de l'évolution des concentrations en éléments traces métalliques (ETM) et HAP dans une carotte de tourbe et la recherche de microorganismes paléoindicateurs de pollutions historiques.

Des difficultés jalonnent tous travaux de recherche mais des soucis particuliers ont été rencontrés, car beaucoup des expérimentations et des analyses réalisées dans le cadre de ce programme étaient originales. En particulier, nous avons dû consacrer beaucoup de temps et d'énergie pour :

- **l'obtention, dans des délais compatibles avec les objectifs de l'étude, des autorisations de prélèvements des échantillons biologiques** dans des tourbières à haut statut de protection. En effet, les tourbières à sphaignes constituent des habitats prioritaires au titre de la Directive Habitat du programme européen Natura 2000. Ces milieux font souvent l'objet d'arrêtés de protection ou sont classés en tant que réserves naturelles.
- **la réalisation en simultanée des prélèvements des échantillons de sphaignes au sein des 54 tourbières** réparties sur un espace total de près de 100 000 km². Le regroupement de l'intégralité des prélèvements en un temps court (quelques jours) était nécessaire pour obtenir des données comparables et être ainsi en accord avec les objectifs de l'étude.
- **la mise au point des dosages des éléments traces métalliques et surtout des hydrocarbures aromatiques polycycliques** dans les échantillons (sphaignes, carottes de tourbe), qui a nécessité l'élaboration de protocoles analytiques avec des étapes systématiques de comparaison avec des échantillons de références. En effet, les concentrations en contaminants étaient souvent faibles et les analyses devaient donc être très performantes pour que les résultats soient fiables.
- **le management des équipes de chercheurs et de personnels techniques.** Il a fallu faire travailler ensemble des chercheurs de disciplines assez différentes (écologie, microbiologie, chimie, géochimie, écophysiologie, paléoenvironnement, géologie) en veillant à ce qu'au final, tous les jeux de données soient compatibles.

RESULTATS OBTENUS ET RECOMMANDATIONS

A l'issue de ce programme de recherche, quatre éléments peuvent être soulignés.

1 – L'analyse des contaminants présents dans les sphaignes, du Centre-Est de la France, montre une contamination faible à modérée par les éléments traces métalliques suivants : Cadmium, Zinc, Plomb, Cuivre. Les HAPs, tels que : Fluoranthène, Phénanthrène, Pyrène, Chrysène et Benzo(b)Fluoranthène ont été mesurés en faibles concentrations dans les tourbières vosgiennes. Par ailleurs, nous avons établi un indicateur synthétique des dépôts atmosphériques en éléments traces métalliques dans le Centre-Est de la France montrant que les Vosges et certaines zones de la Savoie, du Morvan du Pilat et du Massif Central sont plus exposées que d'autres aires géographiques comme le massif du Jura. Du point de vue méthodologique, nous avons montré que les sphaignes sont des marqueurs efficaces qui permettent de quantifier les dépôts de contaminants dans les écosystèmes éloignés des sources fixes et mobiles de polluants atmosphériques.

Perspectives : *La mesure annuelle des dépôts de contaminants (ETM, HAP) à la surface d'un réseau de tourbières bien identifiées pourrait permettre de quantifier la pollution diffuse dans l'environnement.*

2- La pollution présente dans les sphaignes provient de sources d'émission situées à des distances intermédiaires et longues allant de quelques dizaines à quelques centaines de kilomètres (selon Zanetti P., 1990). La pollution est notamment expliquée par la proximité des zones industrielles et des zones urbaines. Le traitement des données des éléments déposés et bioaccumulés au sein des sphaignes à l'aide d'une méthode d'interpolation géomatique a permis d'obtenir une modélisation de la pollution atmosphérique à longue distance relativement fiable, avec une fiabilité proche de ce qui peut être réalisé avec des méthodes de la physique atmosphérique, beaucoup plus coûteuses. Néanmoins, ce modèle doit être amélioré notamment par la recherche d'autres formes d'expression des gradients (introduction de logarithme, d'exponentielle), par l'intégration des flux atmosphériques dominants.

Perspectives : *La méthode d'interpolation géomatique pourrait permettre de valoriser les quantités très importantes de mesures acquises par les réseaux de mesure en France et en Europe pour construire des modèles de dépôt à moindre coûts.*

3- La structure et le fonctionnement du microsysteme « Bryophytes-microorganismes associés » est modifié par les dépôts atmosphériques en éléments nutritifs et en contaminants, même à faibles concentrations. La réponse se produit à l'échelle systémique et pas seulement au niveau des espèces, et varie selon le type de pollution. Les prédateurs, tels que les amibes à thèque, sont les plus sensibles aux perturbations. L'utilisation d'écosystèmes miniatures reste complexe à mettre en œuvre car il nécessite des compétences spécifiques. Cependant, les microsystemes apportent de nombreux avantages par rapport aux méthodes plus classiques : ils permettent de disposer de réponses à des phénomènes de multi-expositions à des niveaux de sensibilité élevée, dans des temps courts et à moindre coût. Il est nécessaire de poursuivre ces recherches afin de créer de nouveaux outils permettant de fournir des indicateurs simples utilisables par des gestionnaires.

Perspectives : *L'association des compétences entre écologues et biomathématiciens devrait permettre de fournir des indicateurs écosystémiques simplifiés pour quantifier l'impact de la pollution sur les milieux naturels. Ces indicateurs permettront de répondre à des questions simples : Est-ce que la complexité des écosystèmes a été affectée par une perturbation ? Quels types d'organismes sont les plus touchés ?*

4- Les dépôts atmosphériques ont varié au cours du temps, en quantité et en qualité. Des dépôts de éléments traces métalliques (Pb, Cd, Zn, ...) ont eu lieu au cours des deux derniers siècles et tendent à diminuer depuis une vingtaine d'années. Ces dépôts de contaminants ont participé, avec les variations climatiques, à modifier le fonctionnement de l'écosystème étudié. L'avantage majeur des archives naturelles que constituent les tourbières est qu'il est possible de reconstruire les dépôts au cours des derniers millénaires. Même si le rythme de dépôt des polluants est faible, il est

probable qu'il y ait un effet d'accumulation avec le temps, susceptible d'altérer la qualité des écosystèmes (forêts, prairies, sols cultivés ...). En faisant la somme de ce qui est observé dans les tourbières, on peut évaluer les quantités totales de éléments traces métalliques qui se sont déposés dans ces écosystèmes.

Perspectives : Il pourrait être intéressant de comparer nos résultats avec les données issues d'autres écosystèmes ou provenant d'autres types d'archives naturelles (sédiments lacustres...) pour mieux comprendre le cycle des éléments traces métalliques dans l'environnement (effet de concentration ou dilution des polluants ?)

Ces résultats pourront donner lieu à des développements utiles pour les organismes chargés de la protection de l'environnement, notamment ceux en charge du suivi de la qualité de l'air, et plus généralement pour les décideurs dont les responsabilités portent sur la surveillance et la réduction de la pollution atmosphérique.

IMPLICATIONS PRATIQUES, TRANSFERT POUR LES POLITIQUES PUBLIQUES, VALORISATION

- Le premier acquis de ce programme est qu'il a permis de quantifier les dépôts de contaminants de différentes natures (ETM, HAP) dans les écosystèmes isolés en utilisant les sphaignes, qui sont de bons bioaccumulateurs des polluants. Nos données ont permis de construire un modèle de dépôt de contaminants atmosphériques qui, après quelques développements méthodologiques, pourrait permettre d'établir des cartes de pollution à longue distance à l'échelle nationale.

- Ce programme a par ailleurs permis de confirmer l'intérêt de l'utilisation du microécosystème « sphaignes-microorganismes associés » en tant qu'intégrateur de la pollution atmosphérique à longue distance. Nos travaux réalisés dans le cadre d'un précédent projet soutenu lors de l'Appel à Propositions de Recherche PRIMEQUAL « Aérosols et Particules », nous avait amené à déposer un brevet (dispositif breveté n°10/58517) concernant un « dispositif et son utilisation pour la mise en œuvre du suivi d'un écosystème » (propriétaire : UFC/CNRS/Société VIGICELL). Les résultats obtenus dans le cadre de ce présent programme μ POL-AIR confirme l'intérêt de développer un outil issu de ce brevet pour évaluer la qualité de l'air par des méthodes écosystémiques. Dans ce cadre un partenariat avec la SATT Grand-Est est en cours d'élaboration afin de créer un prototype et faire des essais, dans un premier temps en milieu aquatique, puis dans un second temps en milieu aérien.

- Enfin, la capacité des tourbières à accumuler les dépôts aériens de façon régulière ouvre des perspectives pour la rétro-observation des pollutions atmosphériques anciennes. Les résultats que nous avons obtenus montrent qu'il est possible de déterminer *a posteriori* l'effet des politiques publiques en matière de réduction des pollutions atmosphériques sur la qualité des écosystèmes isolés.

Les données obtenues dans le cadre de ce programme, ont déjà été valorisées sous la forme d'articles soumis pour publication, ont fait l'objet de nombreuses communications à congrès et ont été présentées lors d'interventions universitaires en cours magistraux et travaux dirigés. Cependant, seuls 30 % des résultats ont pour l'instant été valorisés par la rédaction d'articles scientifiques et les données non encore exploitées devront faire l'objet de nouvelles publications au cours des mois et années prochaines. Par ailleurs, nous avons constitué une banque d'échantillons issus de chacune des 54 tourbières (conservation par fixation, congélation et lyophilisation) ce qui permettra des études complémentaires dans le futur.

PARTENARIATS MIS EN PLACE, PROJETS, ENVISAGES

Des collaborations ont été mises en œuvre avec les acteurs locaux dans le cadre de ce projet pour faciliter le choix des 54 tourbières étudiées et des prélèvements. Il s'agit notamment du **Pôle Relais Tourbières**, pôle de coordination nationale des gestionnaires, naturalistes et scientifiques des tourbières en France (Maison de l'environnement de Franche-Comté, 7 rue Voirin, F-25000 Besançon, francis.muller@pole-tourbieres.org), du **Conservatoire Rhône-Alpes des Espaces naturels** (La maison forte, 2 rue des Vallières, F-69390 Vourles, delphine.danacher@espaces-naturels.fr), du **Conservatoire des Sites Lorrains** (Conservatoire des Sites Lorrains – Antenne des Vosges, 58, Bd de Granges – Kichompré, F-88400 Gérardmer), du **PNR des Ballons des Vosges**, (Bureau des Espaces Naturels, 2 place des Verriers, F-68820 Wildenstein), du **Conservatoire Régional des espaces naturels de Franche-Comté** (Maison de l'Environnement de Franche-Comté, 7 rue Voirin, F-25000 Besançon), du **Parc Naturel Régional Livradois-Forez** (63880 Saint-Gervais-sous-Meymont, foret@parc-livradois-forez.org), du **Parc Naturel Régional des Volcans d'Auvergne** (Château Montlosier, F-63970 Aydat), du **Conservatoire d'Espaces naturels d'Auvergne** (Le bourg, F-43160 Saint-Pal-de-Senouire), du **Conservatoire des Espaces et des Paysages d'Auvergne** (CEPA, Moulin de la Croûte, rue Léon Versepuy, F-63200 Riom), du **Parc Naturel Régional du Pilat** (Maison du Parc, Moulin de Virieu, F-42410 Pelussin), du **Parc Naturel Régional du Morvan** (Maison du parc, F-58230 Saint-Brissou)... Cette liste n'est pas exhaustive.

Des collaborations ont été privilégiées avec le **réseau national de mesure de la qualité de l'air** pour renforcer la connaissance des sources d'émission de contaminants atmosphériques (types et quantité) à l'échelle supra-régionale de la zone d'étude et pour aider au choix des polluants suivis dans les 54 sites de mesure retenus. Ce type de partenariat entre l'Université de Franche-Comté (laboratoire Chrono-Environnement) et des **associations agréées de mesure de la qualité de l'air** (notamment ATMO Franche-Comté) a déjà été fructueux lors de précédents travaux menés dans le cadre du programme PRIMEQUAL 2 - PREDIT (*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 (bioindicateurs)*).

Des partenariats avec des équipes de recherche, à des échelles nationales et internationales, ont été soit mis en place soit renforcés. Ainsi, un partenariat a été créé avec des chercheurs

de l'équipe **Géosystèmes FRE 3298**, de l'Université de Lille 1. Cette collaboration fructueuse a permis d'intégrer cette équipe, non associée initialement, aux équipes partenaires de ce projet. Les travaux entrepris dans le cadre de ce projet μ POL-AIR ont porté sur la composition des thèques d'amibe en relation avec le contexte minéral et ont initié une recherche doctorale en co-tutelle (Université de France Comté et Université de Lille) débutée en septembre 2013. Cette thèse bénéficie d'une bourse ministérielle d'une durée de trois années et elle est intitulée « **Structure et construction des thèques d'amibes, étude de leur utilisation potentielle pour caractériser les dépôts de particules atmosphériques d'origine naturelle et anthropique** ». Une autre collaboration doctorale a été réalisée avec le laboratoire d'Ecologie Fonctionnelle (**EcoLab**) **UMR 5245** CNRS/UPS/INPT de Toulouse. Les travaux collaboratifs ont porté sur le comportement d'un bioindicateur soumis à des polluants atmosphériques lors d'expérimentations en conditions contrôlées.

Le projet μ POL-AIR a permis de renforcer des collaborations franco-suisse au sein de la thématique actuelle « **Impacts sur l'environnement des changements globaux, notamment ceux liés à l'urbanisation, à la mobilité et aux transports** ». Les partenaires français (Universités de Franche-Comté, de Bourgogne et de Savoie) et suisses (Université de Neuchâtel, EPFL de Lausanne) ont pu disposer de sites d'étude au sein de la Zone Atelier Arc Jurassien et notamment de tourbières à sphaignes. Parmi ces dernières, la tourbière de Frasne concentre des recherches scientifiques menées par des équipes internationales. Cette tourbière est définie comme un site pilote et est incluse au Service National d'Observation (**SNO**) « **Tourbières** » et au Réseau européen de sites expérimentaux. Les collaborations scientifiques initiées au niveau international vont se poursuivre. Ainsi des membres du projet μ POL-AIR organisent actuellement un colloque international programmé en octobre 2014 qui a pour but de renforcer les échanges sur cette thématique. D'autres collaborations à l'échelle internationale ont été fructueuses dans le cadre de ce projet μ POL-AIR. Ainsi des séjours invités en République Tchèque ont été réalisées par des chercheurs du programme μ POL-AIR, séjours financés par l'Ambassade de France en ce pays. Les missions ont permis de créer et/ou renforcer des collaborations dans le domaine de l'écologie des tourbières avec notamment l'Institut de Botanique à Pruhonice, le laboratoire RECETOX, le laboratoire de botanique et zoologie de Brno, le département de Biologie des écosystèmes de l'Université de Bohême du sud. Plus largement ces missions ont dynamisé un réseau européen de recherche sur l'étude ces écosystèmes « tourbières à sphaignes ». Dans ce cadre, un Workshop international sur invitation intitulé « *Sphagnum* Peatlands and long-range transboundary atmospheric pollutions » a été organisé par des membres du laboratoire Chrono-Environnement et porteurs du projet μ POL-AIR. Ce Workshop comportait quatre sessions: (S1) metrology of atmospheric pollutants in sphagnum moss and in peat ; (S2) biology, physiology, ecology of sphagnum ; (S3) microbial ecology ; (S4) paleo-environment et il a permis d'inviter, en juin 2011, des chercheurs issus de 15 nationalités différentes.

Ces échanges initiés dans ce programme μ POL-AIR ont également renforcé d'autres collaborations et plus spécifiquement celles avec le Laboratory of Wetland Ecology and Monitoring de l'Université de Poznan et la Xiamen University of Technology avec lesquels des échanges d'étudiants post-doctoraux sont actuellement envisagés et discutés (étudiants ayant participé au présent programme).

Rapport scientifique

μPOL-AIR

Utilisation des tourbières à sphaignes
pour la quantification des dépôts de contaminants
atmosphériques à longue distance et
pour la mesure de leur impact sur l'environnement

Use of Sphagnum peatlands
to quantify the deposition of long-range air pollutants and
to evaluate their impact on environment

Programme PRIMEQUAL

Responsable scientifique du projet : Nadine BERNARD

Introduction générale

L'objectif général de cette étude était d'utiliser les tourbières à sphaignes pour le suivi de la contamination par la pollution atmosphérique à longue distance et de ses impacts sur les milieux naturels. En effet, les tourbières peuvent constituer des écosystèmes modèles pour le **suivi de l'altération de l'environnement, dans la mesure où :**

(1) ce sont des milieux naturels largement distribués à l'échelle européenne, qui sont éloignés des sources de pollutions atmosphériques, **et sont donc pour l'essentiel soumis à des flux de contaminants provenant de transport à plus ou moins longue distance.**

(2) ce sont des zones humides dont la protection est un enjeu prioritaire au niveau mondial **en raison de l'originalité des espèces qu'elles abritent et parce qu'elles constituent des stocks majeurs de carbone organique.**

(3) ce sont des archives naturelles des dépôts atmosphériques et les tourbières peuvent **donc être utilisées comme des témoins de l'évolution naturelle des milieux comme des contaminations historiques.**

Plus précisément, les objectifs de ce projet étaient de :

→ Quantifier et qualifier les dépôts de contaminants à longue distance et proposer des hypothèses quant à leur origine.

→ Evaluer l'impact des dépôts atmosphériques de contaminants sur le microsysteme « sphaignes/microorganismes associés » et déterminer les bioindicateurs les plus pertinents pour la biosurveillance de la pollution issue **d'un transport à longue distance.**

→ Evaluer la dynamique d'accumulation en quantifiant l'évolution temporelle des concentrations en contaminants dans les tourbières au cours du 20ème siècle et tester la pertinence de **paléoindicateurs microbiens d'effet** de la contamination issue de dépôts d'origine atmosphérique.

Ce programme de recherche a été conçu sous la forme de 3 séquences expérimentales :

- Etude *in situ* 1 : Evaluation des concentrations en azote, éléments traces métalliques (ETM) et hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) dans la partie vivante des sphaignes à l'échelle supra-régionale

Cinquante-quatre tourbières réparties dans le centre-est de la France ont été sélectionnées et trois prélèvements de sphaignes (*Sphagnum capillifolium*) ont été effectués dans chacune d'elle en fin de période de croissance de la végétation. Les concentrations en éléments nutritifs, Eléments Traces Métalliques (ETM), Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP), ont été évaluées dans la partie métaboliquement active des sphaignes (0-3 cm), puis les résultats obtenus ont été cartographiés puis intégrés dans une analyse spatiale tenant compte de deux variables expliquées (PM10 mesurées en 532 stations de surveillance de la **qualité de l'air en Europe** et ETM quantifiés en 54 tourbières du Nord-Est de la France) et de **cinq variables explicatives (émissions cadastrales des PM10 à l'échelle de l'Europe** provenant des secteurs industriel, résidentiel, transport routier, agriculture et taches urbaines issues de Corine Land Cover). Le « microécosystème sphaignes-microorganismes associés » a été étudié dans le cadre de cette étude *in situ* 1 bien que cela **n'était pas proposé à l'analyse** lors du dépôt du projet. Cet élargissement, réalisé en collaboration avec des post-doctorants (financés par Pays de Montbéliard Agglomération) a été décidé afin de renforcer nos

recherches qui portent sur l'impact des dépôts atmosphériques sur ce microsysteme et la recherche de bioindicateurs les plus pertinents pour la biosurveillance de la pollution à longue distance.

- Etude en conditions contrôlées : impact de l'azote et de contaminants (ETM, HAP) sur le complexe sphaignes / communautés microbiennes associées

Selon les résultats des données obtenues lors de l'étude *in situ* 1, un site peu contaminé a été identifié. Des sphaignes issues de ce site ont été prélevées en incluant la litière sous-jacente et ont été mises en culture en conditions contrôlées (température, lumière, hauteur de la nappe d'eau). Les différents « microcosmes sphaignes-microorganismes associés » ont ensuite été soumis à des expositions croisées (Témoin, Azote seul, Azote/ETM, Azote/ETM/HAP). Le plomb (Pb) et le Phénanthrène ont été choisis en fonction des résultats obtenus dans l'étude réalisée *in situ* 1. Les biomasses et la diversité des microorganismes, les concentrations en phénols totaux dans les sphaignes ont été déterminées en début et en fin d'expérimentation. La quantification des activités phénol-oxydases a été réalisée en parallèle.

- Etude *in situ* 2 : Evaluation de l'évolution des concentrations en ETM dans une carotte de tourbe et recherche de microorganismes indicateurs

Des carottes de tourbe ont été prélevées dans trois tourbières de trois régions différentes échantillonnées lors de l'étude *in situ* 1. Les carottes ont été découpées en sous échantillons. Des chronologies couvrant le dernier siècle ont été établies à partir de la mesure du ^{210}Pb et du ^{137}Cs (Dominik *et al.*, 1981). Cette chronologie a été extrapolée en profondeur à l'aide des mesures au radiocarbone. Pour chaque échantillon, les concentrations en éléments traces ont été déterminées afin d'estimer la composante métallique naturelle et d'isoler la contribution due aux apports anthropiques. Dans la tourbe, les restes d'amibes à thèque ont été analysés pour déterminer l'impact des dépôts historiques de contaminants.

Des difficultés particulières sont apparues à différentes étapes de ce programme, à savoir lors de :

- l'obtention des autorisations de prélèvements dans des milieux protégés,
- la réalisation des prélèvements de sphaignes aux 54 sites sur une période restreinte (5 jours),
- l'adaptation de protocoles d'analyse pour la mesure des ETMs dans les mousses et dans la tourbe,
- la mise au point de protocoles pour la quantification des 16 HAPs de la liste US EPA dans la fraction (0-3 cm) des sphaignes (avec des concentrations à détecter très proches des limites de détection).

Ces difficultés ont pu être traitées grâce à l'aide précieuse des personnels de collectivités locales, Réserves Naturelles de France ou Conservatoires des Espaces Naturels, et grâce à des collaborations efficaces entre chercheurs et ingénieurs. Il a cependant été nécessaire d'augmenter significativement le temps d'embauche en personnels techniques durant le programme. Par ailleurs, des mises au point analytiques ont nécessité d'augmenter la durée initiale du projet.

Dans un souci de lisibilité, nous avons segmenté ce rapport sous la forme de quatre grands chapitres correspondant aux quatre grandes questions scientifiques auxquelles nous avons voulu répondre dans le cadre de ce projet de recherche.

La première question « **Les tourbières à sphaignes sont-elles des modèles pertinents pour évaluer les dépôts de contaminants à longue distance ?** » a nécessité de mettre en place des études préliminaires pour déterminer les conditions optimales de prélèvements, puis d'optimiser les méthodes d'analyse chimique pour obtenir des résultats les plus fiables possibles. Ces études ont occupé les équipes de recherche impliquées pendant plus de trois années et ont nécessité d'augmenter la part du budget consacré au salaire des techniciens, en raison des nombreuses difficultés techniques rencontrées.

La deuxième question « **Est-il possible d'évaluer l'origine des polluants (sources, distances) présents à la surface des tourbières à sphaignes et de modéliser ces dépôts ?** » a mobilisé les équipes de géographes et d'écotoxicologues du projet. Là encore, il nous a fallu développer une nouvelle approche et de nouveaux outils spécifiquement adaptés aux données récoltées (Au total, 54 tourbières ont été échantillonnées par quatre équipes et près de 10 000 données ont été obtenues pour la partie analyse chimique).

La troisième question « **Quels impacts les dépôts de contaminants à longue distance ont-ils sur le fonctionnement des microsystèmes sphaignes-microorganismes ?** » a fait l'objet de collaborations multiples entre écotoxicologues, microbiologistes, écophysio-logistes et géochimistes. Elle a été traitée par différentes approches et a nécessité la mise en place d'expérimentations en conditions contrôlées associant contaminations croisées par nébulisation et par expositions gazeuses.

La quatrième question « **Quelle est l'importance des pollutions historiques dans la tourbe ? Est-il possible de reconstruire leurs impacts sur les organismes des tourbières ?** » a été l'occasion de réaliser des travaux originaux associant écologues, paléoécologues et paléogéochimistes qui ont permis pour la première fois de reconstruire les paléopollutions et leurs effets sur les microorganismes des tourbières.

Ce rapport scientifique s'achève par une synthèse des principales conclusions et par un bilan de la valorisation scientifique issue de ce projet μ POL-AIR soutenu financièrement par le programme PRIMEQUAL.

Question 1

Les tourbières à sphaignes sont-elles des modèles pertinents pour évaluer les dépôts de contaminants à longue distance ?

1.1. Contexte et Objectifs

Les Bryophytes terrestres sont régulièrement utilisées pour le suivi des dépôts de contaminants atmosphériques en raison de leur morphologie, notamment l'absence de racines, et de leur distribution géographique relativement large. Jusqu'à présent, les Bryophytes de zones humides, telles que les sphaignes, étaient très peu utilisées pour ce type de suivis. Pourtant, les sphaignes comportent l'avantage de vivre dans des milieux très homogènes dans leur nature et leur fonctionnement et qui sont donc très peu affectés par le type de sol environnant. En effet, les sphaignes se développent essentiellement dans les tourbières, où l'alimentation en eau et en nutriments dépend essentiellement des apports atmosphériques, c'est la raison pour laquelle ces écosystèmes sont très sensibles aux modifications en qualité et en quantité de ces apports. Ces zones humides sont présentes, sous nos latitudes, dans les milieux de moyenne montagne et ont par conséquent une distribution limitée. Cependant, les tourbières sont des écosystèmes souvent isolés et généralement éloignés des sources fixes et mobiles de pollution. C'est pourquoi, les sphaignes pouvaient constituer d'excellents bioindicateurs de contaminants. Le premier objectif de ce programme de recherche était donc de valider l'utilisation des sphaignes comme bioindicateur des contaminants d'origine atmosphérique puis de cartographier leurs dépôts à l'échelle supra-régionale.

Plus précisément, les questions auxquelles il était nécessaire de répondre au cours de cette étude étaient les suivantes :

- Quelle est l'espèce de sphaigne la plus adéquate pour la caractérisation des dépôts de polluants atmosphériques ?
- Quelle est la variabilité des dépôts de contaminants bio-accumulés par les sphaignes aux échelles intra- et inter-tourbières et quelle est la meilleure stratégie pour prélever ces Bryophytes de zones humides au sein d'une tourbière?
- Quelle sont les meilleures méthodes pour doser les contaminants (ETM, HAP) dans les sphaignes ?
- Peut-on établir une cartographie des dépôts de contaminants issus de transports à longues distances (ETM, HAP) à l'échelle supra-régionale ?

1.2. Choix de l'espèce de sphaigne et échantillonnage

Sélection de l'espèce de sphaigne la plus adaptée

Afin de mettre en place les protocoles d'étude et d'échantillonnage intra- et inter- tourbières à l'échelle supra-régionale, des études préalables étaient nécessaires. Les objectifs de celles-ci étaient de déterminer quelle était l'espèce de sphaigne la plus adéquate, puis de définir le meilleur protocole d'échantillonnage des sphaignes au sein des tourbières.

Pré-observation nationale

Le choix de l'espèce de sphaigne à prélever a été réalisé en plusieurs étapes. Dans un premier temps, leur abondance et leur large distribution ont été observées sur la totalité de

la zone d'étude (grand quart centre-est de la France). Puis, sur un total de 98 tourbières pré-sélectionnées, **l'abondance des sphaignes à une échelle plus fine a été précisée**. Enfin, leur répartition micro-topographique au sein de chaque tourbière a été observée.

Plusieurs espèces de sphaigne ont été retenues comme des candidates potentielles pour ces **campagnes d'analyse** :

- *Sphagnum fallax*, espèce turfigène largement répandue dans les tourbières en phase de transition entre bas-marais et haut-marais,
- *Sphagnum magellanicum*, espèce turfigène répandue dans les tourbières de haut-marais
- *Sphagnum capillifolium*, espèce peu turfigène mais répandue dans les tourbières non perturbées, mais aussi dans les milieux en cours de restauration (Figure 1).

Finalement, deux espèces de sphaignes, observées dans des milieux de tourbières bombées (donc peu affectées par le ruissellement) ont été retenues pour des études préliminaires : *Sphagnum magellanicum* (Brid) et *Sphagnum capillifolium* (Ehrh.) Hedw.

Pré-étude dans le massif des Vosges

Trois tourbières ombrotrophes dans le massif des Vosges (sites distants de sources fixes et mobiles de pollution) ont été échantillonnées en mai 2010, où *Sphagnum magellanicum* et *Sphagnum capillifolium* ont été prélevés. Les concentrations en Pb, Cd, Cr, Cu ont été quantifiées dans la partie métaboliquement active des sphaignes (0-3 cm). Les concentrations mesurées indiquaient que ces deux espèces ont accumulé ces éléments même dans des sites éloignés de sources directes de pollution. Les concentrations moyennes \pm les écarts types en Pb, Cd, Cr et Cu pour respectivement *Sphagnum capillifolium* et *Sphagnum magellanicum* étaient de : (Pb) $1,96 \pm 0,16 \mu\text{g.g}^{-1}$ MS, $2,07 \pm 0,20 \mu\text{g.g}^{-1}$ MS ; (Cd) $0,05 \pm 0,00 \mu\text{g.g}^{-1}$ MS, $0,06 \pm 0,00 \mu\text{g.g}^{-1}$ MS ; (Cr) $0,38 \pm 0,05 \mu\text{g.g}^{-1}$ MS, $0,41 \pm 0,07 \mu\text{g.g}^{-1}$ MS ; (Cu) $2,39 \pm 0,32 \mu\text{g.g}^{-1}$ MS, $2,48 \pm 0,21 \mu\text{g.g}^{-1}$ MS. Pour chaque élément dosé, les résultats ne montraient pas de différence significative entre les deux espèces.



Figure 1 : *Sphagnum capillifolium*, tourbière du Marais (Puy de Dôme) (photo Daniel Gilbert)

Le choix définitif de l'espèce à étudier s'est finalement porté sur *Sphagnum capillifolium* (Figure 1) en fonction de divers critères : résultats des concentrations mesurées lors des études préliminaires, présence de l'espèce essentiellement sur des micro-buttes (ce qui permet de limiter les apports d'éléments minéraux par ruissellement), distribution confirmée sur l'ensemble des 54 tourbières proposées par les partenaires régionaux (y compris dans des tourbières anciennement exploitées) et présence sur un large gradient altitudinal.

Stratégie d'échantillonnage intra tourbière

Méthodologie utilisée

Afin de réaliser une comparaison des dépôts de contaminants et d'éléments inter tourbières, une étude de la variabilité des éléments à l'échelle intra-tourbière a été réalisée au préalable dans des tourbières des Vosges où l'espèce *Sphagnum capillifolium* est particulièrement abondante. Les concentrations en Pb, Cd, Cr, Cu, N, C, S et en 16 HAPs (Naphtalène, Acénaphtylène, Acénaphène, Fluorène, Phénanthrène, Anthracène, Fluoranthène, Pyrène, Benzo(a)anthracène, Chrysène, Benzo(b)fluoranthène, Benzo(k)fluoranthène, Benzo(a)pyrène, Indeno(1,2,3-cd)pyrène, Dibenzo(a,h)anthracène, Benzo(ghi)pérylène) ont été mesurées dans la fraction 0-3 cm chez *Sphagnum capillifolium*. Puis, des analyses de la variabilité des concentrations de chaque élément ont été réalisées à l'aide de tests statistiques (Kruskal-Wallis). Cette étude préliminaire était destinée également à déterminer la localisation des futurs points de prélèvement au sein de chacune des tourbières de l'étude à l'échelle supra-régionale.

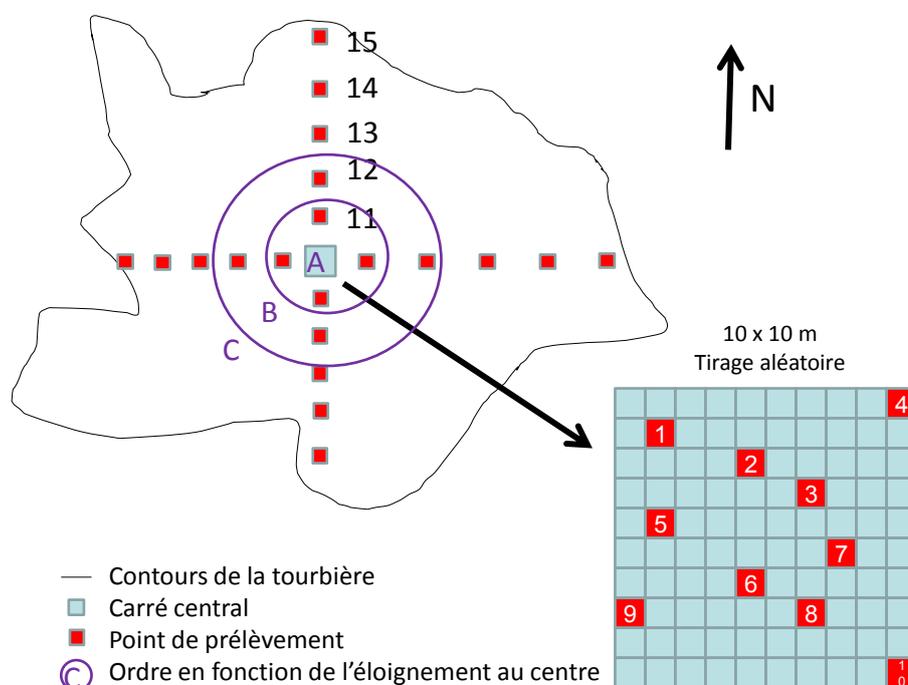


Figure 2 : Schéma théorique symbolisant la stratégie d'échantillonnage intra-tourbière

Pour cela, le protocole d'échantillonnage suivant a été mis en place (Figure 2) :

- au centre de chaque tourbière un espace de 10 m x 10 m a été tracé délimitant cent carrés d'un mètre de côté. Dix carrés ont ensuite été déterminés par tirage aléatoire et un prélèvement a été réalisé dans chacun d'eux.
- à partir du carré central quatre lignes imaginaires ont été définies en direction des quatre points cardinaux. Cinq points de prélèvements ont été également répartis sur chaque ligne en évitant de prélever à la périphérie (effet de bord) et à proximité d'arbre (effet de couvert),
- la localisation de chaque point de prélèvement a été géoréférencée.

La tourbière du Tanet (Vosges) ombrotrophe, classée réserve naturelle nationale, située à **1218 m d'altitude et d'une superficie de 14 ha** a été choisie en collaboration avec le Conservatoire des espaces Naturels de Lorraine pour une étude préliminaire afin de déterminer la distribution de C, N, S, Pb, Cd, Cr et Cu au sein de la tourbière. Lors de l'échantillonnage de Juin 2010, 30 échantillons ont été prélevés dans la tourbière selon deux coupes transversales suivant les axes cardinaux (Figure 3).

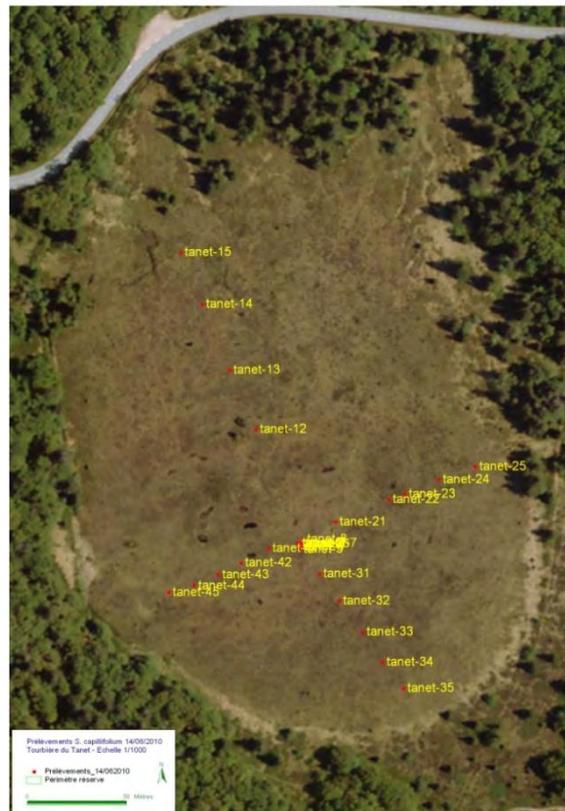


Figure 3 : Ortho-photographie de la tourbière du Tanet avec la localisation des points de prélèvements géoréférencés

Les prélèvements de sphaigne ont été standardisés de la façon suivante :

- des anneaux en PVC de 14 cm de diamètre et de 6 cm de hauteur ont été disposés à chaque point de prélèvement,

- le matériel végétal compris dans ce volume a été prélevé en découpant la base des **sphaignes à l'aide de ciseaux en plastique ou en céramique pour éviter les contaminations métalliques**,
- les échantillons ont été triés au laboratoire, pour ne conserver que la partie supérieure des sphaignes (0 à 3 cm du capitulum) (tous les autres végétaux ont été éliminés).

Résultats de l'étude préalable

Les valeurs moyennes de C, N, S, au sein du carré central, étaient respectivement de $0,88 \pm 0,11$ %, $46,26 \pm 0,19$ % et $0,11 \pm 0,01$ %. Les concentrations moyennes pour Pb, Cd, Cr et Cu au sein du carré central étaient respectivement de $3,39 \pm 0,44$ mg.kg⁻¹, $0,05 \pm 0,02$ mg.kg⁻¹, $0,51 \pm 0,27$ mg.kg⁻¹, $3,19 \pm 0,44$ mg.kg⁻¹.

Parmi les 16 HAPs recherchés, seuls trois ont été détectés. Les concentrations en **phénanthrène, fluoranthène et pyrène pour l'ensemble des points de prélèvement de la tourbière du Tanet** étaient comprises respectivement entre 25 et 150 µg.kg⁻¹ MS, 5 et 20 µg.kg⁻¹ MS, et 13 et 65 µg.kg⁻¹ MS, avec pour valeurs moyennes : 67, 10 et 30 µg.kg⁻¹ MS.

La normalité des données ainsi que l'homoscédasticité de la variance ont été testées par un test de Kolmogorov-Smirnov. Les différences de concentrations en ces éléments en fonction de la localisation des échantillons ont été testées par des tests d'analyse de variance suivis de test de comparaisons multiples.

Pour **l'intégralité des éléments quantifiés, la comparaison des concentrations pour chaque élément ne mettent pas en évidence de différence significative entre les différentes zones de la tourbière (centre, est, nord, ouest) et en fonction de l'éloignement au centre de la tourbière. Il n'y a pas d'influence** ni de la direction (selon les axes cardinaux), ni de **l'éloignement** au centre (ordre des cercles concentriques).

Ce travail préliminaire a conduit à un futur échantillonnage de trois répliqués dans la partie centrale de chacune des 54 tourbières sélectionnées **de l'étude in situ** 1.

1.3. Choix des sites d'étude

Méthodologie

Le choix de l'aire d'étude et la localisation des sites de mesure devaient faciliter l'analyse spatiale. L'aire d'étude devait donc comporter un grand nombre de tourbières à sphaignes (pour satisfaire aux contraintes de la statistique) réparti de manière à peu près homogène. La présence en son sein d'une topographie variée, de climats différenciés, **de l'éloignement** varié de centres urbains et industriels et de voies routières à grand gabarit étaient souhaitables. L'aire englobant le massif central, les Alpes, le Jura et les Vosges répondait **parfaitement aux critères souhaités. Il s'agit** en effet de zones particulièrement riches en **tourbières à sphaignes susceptibles d'être affectées par la pollution produite par de grands centres urbains et industriels et par d'importants réseaux routiers**. La localisation des sites de mesure à l'intérieur de cette aire d'étude a été réalisée en fonction de leur répartition et en prenant en compte des critères sélectifs (tourbières à sphaignes peu perturbées, éloignées de sources fixes et mobiles de pollution atmosphérique).

Choix des sites

Cinquante-quatre sites d'étude ont été sélectionnés (53 tourbières françaises et 1 tourbière suisse) à l'échelle supra-régionale (Figure 4). Ces sites ont été choisis en fonction de leur statut foncier et juridique (propriété ou gestion publiques ou associatives) et de leur localisation géographique, en tenant compte des sources potentielles fixes et mobiles de contamination atmosphérique et du gradient altitudinal. Des tourbières dites ombrotrophes, où l'alimentation en eau est d'origine atmosphérique, ont été choisies. La sélection de tourbières non perturbées aux époques présentes et passées (selon les informations disponibles) étaient indispensables pour atteindre les objectifs visés par cette étude. C'est pourquoi, des sites ayant des statuts à haute protection environnementale (Réserve Naturelle Nationale, Natura 2000, Arrêté de Protection de Biotope, ...) ont été sélectionnés et des demandes d'autorisation de prélèvement ont été soumises aux instances compétentes en ce domaine. La localisation des tourbières sélectionnées est présentée en figure 4 selon six zones géographiques. Le gradient d'altitude des tourbières appartenant au réseau μ POL-AIR est compris entre 200 m et 2035 m.

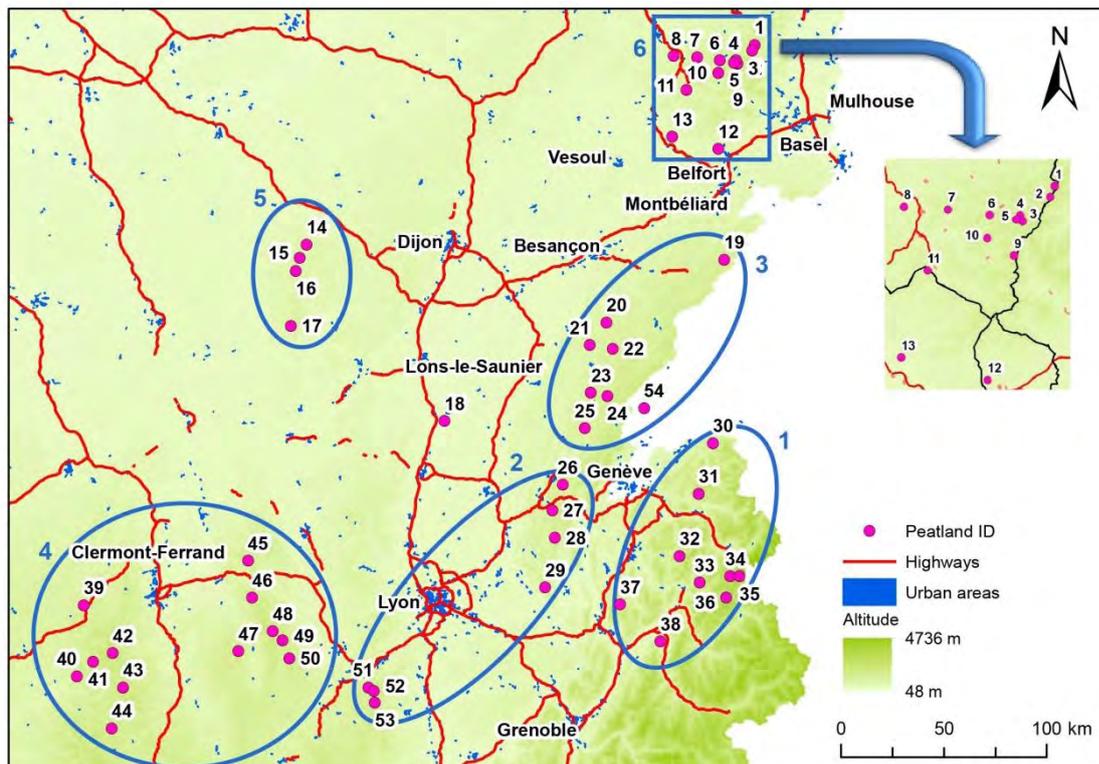


Figure 4 : Localisation des tourbières du Centre-Est de la France appartenant au réseau de l'étude μ POL-AIR. Les secteurs sont entourés par des cercles bleus : 1) Alpes : 31-38 ; 2) Couloir rhodanien : 26-29, 51-53 ; 3) Jura : 19-25, 54 ; 4) Massif central : 39-50 ; 5) Morvan : 14-18 ; 6) Vosges : 1-13.

1.4. Choix des méthodes d'analyse des éléments chimiques, calcul des facteurs d'enrichissement

Méthodes d'analyse

Lors du dépôt du programme μ POL-AIR, l'analyse de cinq éléments métalliques (Cd, Pb, Cu, Ni et Zn) avait été proposée. Finalement, grâce à une collaboration avec le laboratoire QUALIO Analyses et Environnement (accrédité COFRAC N°1-1499 et agréé par le Ministère des Affaires sociales et de la Santé ainsi que par le Ministère de l'Ecologie, du Développement durable et de l'Energie) **et d'autres collaborations internes**, les coûts d'analyse ont été considérablement abaissés, permettant l'analyse de 33 éléments dans les sphaignes ou la tourbe : Al, As, Ba, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hf, Hg, K, La, Li, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, P, Pb, S, Sb, Sn, Sr, Ti, Tl, V, Y, Zn, Zr, N, C. Le carbone (C), le soufre (S) et le phosphore (P) ont été ajoutés à la liste des éléments suivis en plus de l'azote (N) qui avait été prévu initialement.

Les analyses des contaminants et des autres éléments ont été effectuées après **minéralisation totale de l'échantillon** (séché et broyé) par HNO₃ (solution à 65%), HCl (solution à 37%) et HF (solution à 48%). Les matériaux de référence suivants ont été utilisés : NIST 1547 Peach Leave ; Commission of the European Communities - BCR reference material n°482 lichen (*Pseudevernia furfuracea*) ; NCS Certified references material - NCS DC73349 BUSH branches and leaves. Ces matériaux de référence ont été systématiquement utilisés pour optimiser chacune des méthodes de mesure.

Les analyses élémentaires de l'azote et du carbone ont été évaluées à l'aide d'un détecteur Thermal Conductivity Detector). Les concentrations en éléments traces ont été déterminées par ICP-MS (Perkin Elmer NexION 300X) et ICP-OES (Varian 720 ES). Le Mercure a été **analysé par spectrophotométrie d'absorption atomique (SAA)-(AMA 254)**.

Les HAP ont été extraits des échantillons sur un système ASE (Accelerated Solvent Extraction, Dionex), **à l'aide d'un mélange de solvant hexane / acétone (120°C, 100 Bar)**. **Les extraits ont été concentrés sous flux d'azote** sur un système Biotage Turbo Vap II puis purifiés sur colonne silicagel (Dreyer A., 2005). Les **16 HAPs classés prioritaires par l'US-EPA** (Naphtalène, Acénaphthylène, Acénaphthène, Fluorène, Phénanthrène, Anthracène, Fluoranthène, Pyrène, Benzo(a)anthracène, Chrysène, Benzo(b)fluoranthène, Benzo(k)fluoranthène, Benzo(a)pyrène, Indeno(1,2,3-cd)pyrène, Dibenz(a,h)anthracène, Benzo(ghi)pérylène) ont été analysés conjointement par les laboratoires QUALIO Analyses et Environnement (GC-MS Thermo Electron Finnigan, Trace DSQ) et Chrono-Environnement (GC-MS SHIMADZU QP-5050A).

Calculs des facteurs d'enrichissement

Les facteurs d'enrichissements (EF) ont été calculés afin de connaître l'origine des éléments traces (anthropique, naturel ou mixte). Les facteurs d'enrichissements sont communément définis comme :

$$EF_X = (X/Ti)_{sample} / (X/Ti)_{ref}$$

où X est la concentration de l'élément X normalisé par la concentration d'un élément d'origine non anthropique (ici le titane, Ti). Le numérateur correspond au ratio dans l'échantillon et le dénominateur correspond au ratio issu d'un matériel supposé non affecté par les activités humaines (c'est-à-dire le fond géochimique). Les valeurs de références choisies sont donc issues des valeurs de Wedepohl (1995) concernant la composition de la croûte terrestre supérieure. Il est généralement admis que des EFs inférieur à 2 indiquent une origine naturelle, des EFs compris entre 2 et 5 indique une influence notablement anthropique, des EFs compris entre 5 et 10 indique un fort enrichissement et les EFs supérieurs à 10 indiquent une origine anthropique prédominante (Dragovic and Mihailovic, 2009; Zarazua-Ortega *et al.*, 2013).

1.5. Evaluation des concentrations en ETM dans la partie vivante des sphaignes à l'échelle supra-régionale (Etude *in situ* 1)

Caractérisation des dépôts atmosphériques

Les valeurs moyennes des éléments fortement enrichis dans les tourbières du Nord-Est de la France sont les suivantes : Cd=0.13±0.06 mg·kg⁻¹ MS, Cu=3.90±0.86 mg·kg⁻¹ MS, Pb=4.64±2.23 mg·kg⁻¹ MS and Zn=26.11±7.86 mg·kg⁻¹ MS. Il existe cependant des variations selon les régions géographiques (Tableau 1).

Tableau 1 : Moyenne, écart-type, minimum et maximum de chaque élément trace analysé pour chaque secteur et pour toutes les tourbières (mg·kg⁻¹MS).

		Al	Cd	Cr	Cu	Fe	Pb	Ti	V	Zn
Ensemble N=54	Mean	407	0.13	0.96	3.90	260	4.64	26.51	0.85	26.11
	SD	146	0.06	0.73	0.86	90	2.23	9.24	0.31	7.86
	Min	201	0.05	0.33	2.77	90	1.63	12.61	0.24	11.85
	Max	838	0.28	5.60	7.65	516	11.22	52.61	1.77	53.50
Alpes N=9	Mean	471	0.16	1.24	4.12	287	5.63	27.82	0.84	30.99
	SD	214	0.05	0.58	0.41	127	2.61	12.64	0.45	11.58
	Min	207	0.09	0.59	3.54	129	2.19	13.32	0.29	17.65
	Max	838	0.27	2.46	4.92	516	9.03	52.61	1.77	53.50
Corridor N=7	Mean	420	0.15	1.65	4.31	246	4.81	26.20	0.84	27.66
	SD	122	0.06	1.75	1.67	69	1.09	7.17	0.22	7.90
	Min	280	0.11	0.76	2.92	148	2.70	17.37	0.46	17.86
	Max	585	0.28	5.60	7.65	331	6.18	36.64	1.13	40.46
Jura N=8	Mean	536	0.10	0.92	3.57	310	3.04	32.91	1.08	22.39
	SD	114	0.02	0.18	0.54	58	1.20	6.30	0.22	5.38
	Min	348	0.07	0.70	2.91	222	1.64	23.74	0.86	16.65
	Max	691	0.12	1.18	4.34	395	4.88	41.96	1.48	31.21
Massif Central N=12	Mean	379	0.09	0.69	3.56	224	3.90	29.37	0.74	22.28
	SD	121	0.04	0.22	1.05	85	1.86	9.67	0.26	5.73
	Min	218	0.05	0.33	2.77	90	1.63	14.85	0.31	11.85
	Max	650	0.15	1.13	6.64	370	7.95	47.48	1.22	34.80
Morvan N=5	Mean	319	0.14	0.70	3.89	222	3.20	18.97	0.61	26.98
	SD	81	0.08	0.25	0.35	105	2.04	4.47	0.24	7.88
	Min	220	0.07	0.38	3.45	91	1.65	12.61	0.24	17.26
	Max	443	0.27	1.05	4.34	384	6.66	24.64	0.78	37.44
Vosges N=13	Mean	335	0.14	0.79	4.04	267	6.10	22.09	0.90	27.39
	SD	97	0.05	0.21	0.40	77	2.28	6.86	0.28	6.30
	Min	201	0.09	0.50	3.44	186	3.23	12.87	0.60	21.58
	Max	559	0.25	1.26	4.63	438	11.22	37.22	1.56	42.81

Les tourbières avec les plus fortes concentrations en Pb et Cd sont localisées le long de la frontière Est de la France tandis que celles avec les plus fortes concentrations en Cu sont localisées dans le Massif Central (Figure 5).

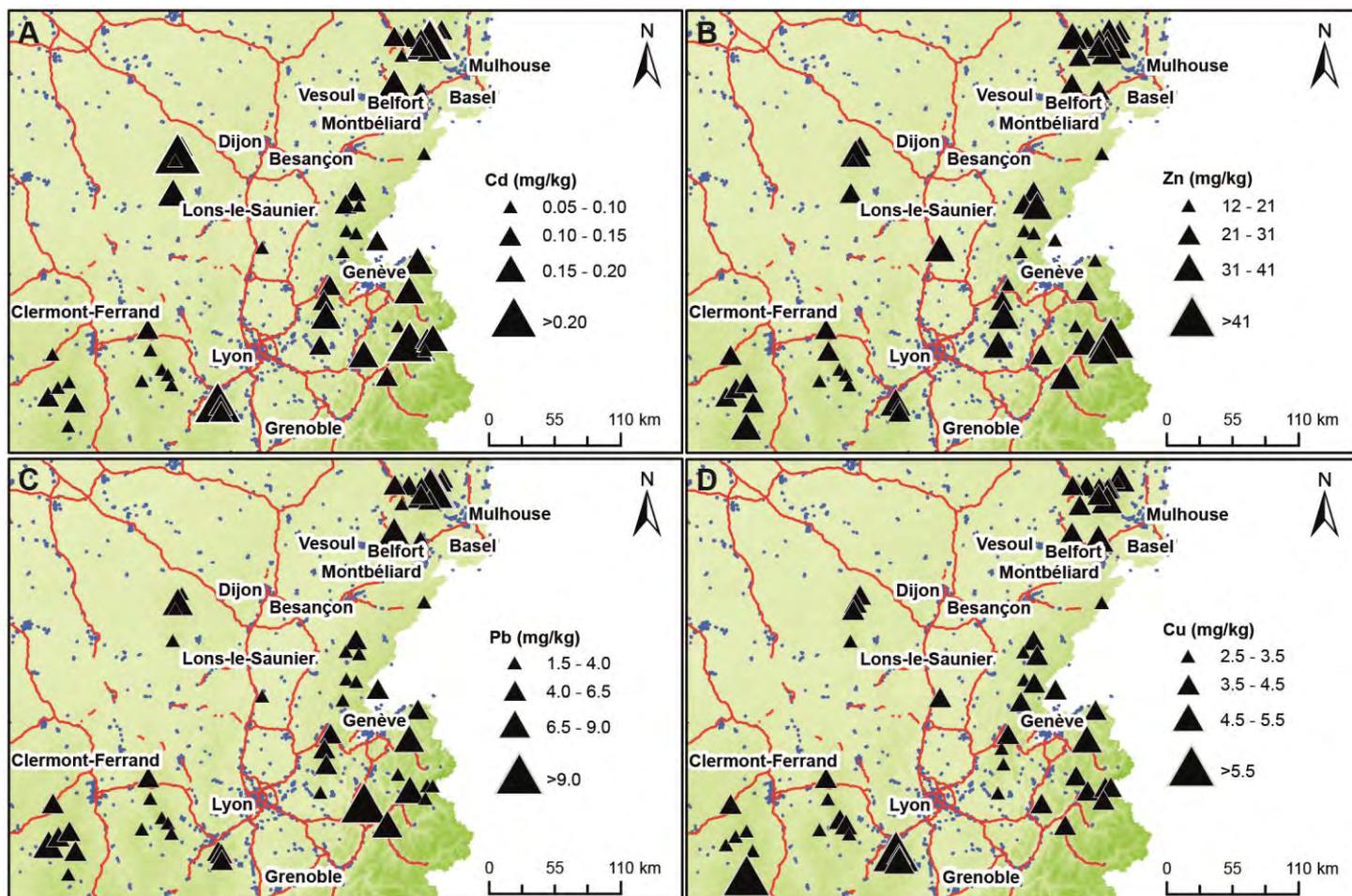


Figure 5 : Concentrations des éléments traces hautement enrichis dans chaque tourbière : A) Cd, B) Zn, C) Pb et D) Cu, mg.kg^{-1} de mousse sèche.

Les éléments traces mesurés dans *Sphagnum capillifolium* ont différentes origines. Al, Fe et V sont d'origine naturelle ($\text{EF} = 0.63 \pm 0.09$, 1.04 ± 0.38 and 1.90 ± 0.43 , respectivement), Cr est notablement enrichi par des sources anthropiques ($\text{EF} = 3.48 \pm 2.85$) tandis que Cd, Cu, Pb et Zn sont fortement enrichis par des sources anthropiques ($\text{EF} = 176.4 \pm 108.8$, 38.2 ± 17 , 38.5 ± 23.6 and 72.3 ± 40.8 , respectivement) (Figure 6). En détail, les facteurs d'enrichissement des éléments anthropiques sont globalement plus importants dans le Morvan et les Vosges que dans le Jura où les valeurs sont les plus faibles. Ceci est probablement dû à de faibles concentrations en Ti (en particulier dans le Morvan et les Vosges) (Reinmann et de Caritat, 2000) combiné avec de fortes concentrations en éléments anthropiques. Bien que les tourbières étudiées soient distantes des sources de pollution (49 km et 18 km des sources fixes et mobiles, respectivement), les valeurs des facteurs d'enrichissements montrent clairement une origine anthropique du Cd, Zn, Pb et Cu. Cela suggère donc un transport à moyenne et longue distance depuis les sources d'émission primaire.

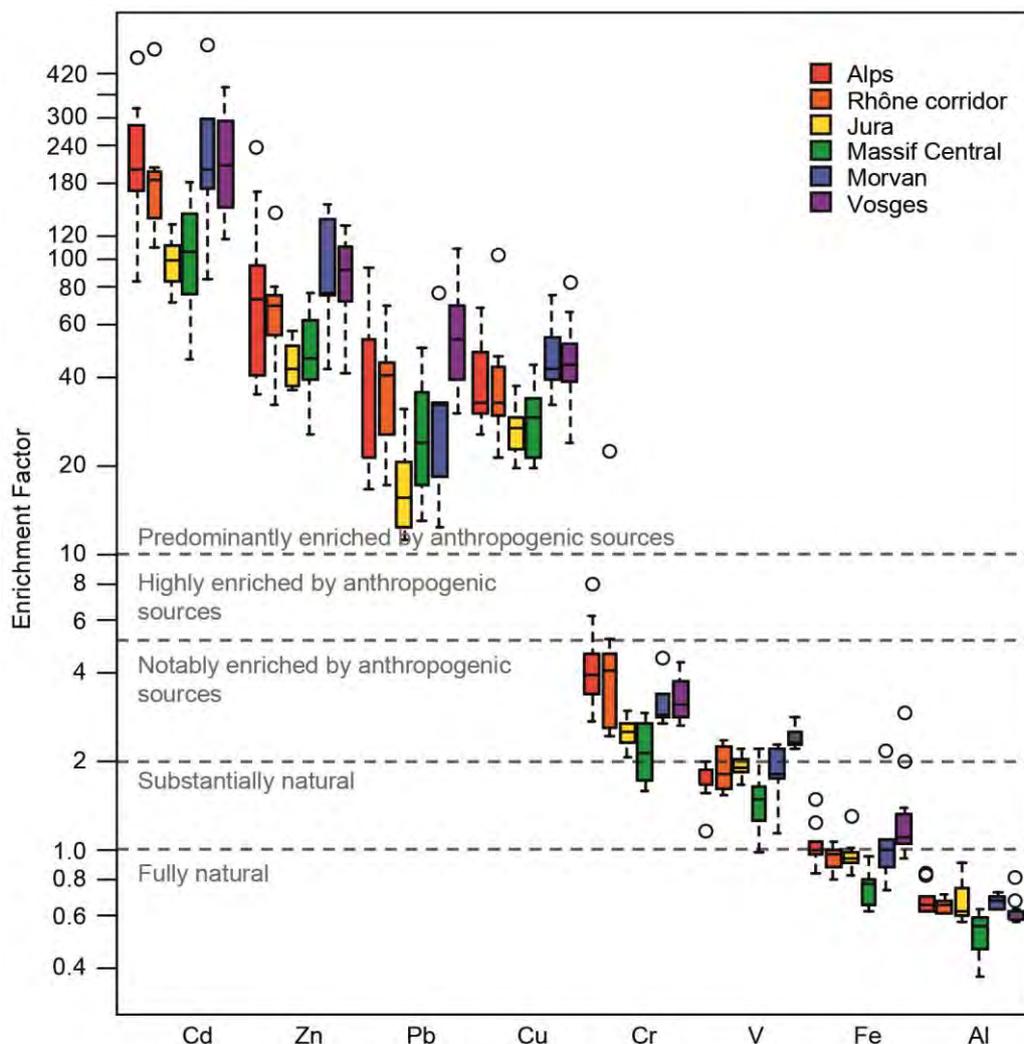


Figure 6 : Boxplots des facteurs d'enrichissement d'éléments traces en utilisant Ti comme élément de référence pour chaque secteur.

Les concentrations des éléments traces accumulés par *Sphagnum capillifolium* sont, en général, assez faibles mais légèrement supérieures aux concentrations trouvées dans des tourbières ombrotrophes dans le Nord de la Finlande et considérées comme peu affectées par les pollutions (Pakarinen, 1978). Même si les comparaisons sont peu adéquates entre différentes espèces de bryophyte. Les tourbières françaises étudiées ici sont moins contaminées que les mousses terrestres (récoltées dans des forêts) et analysées dans le cadre du Programme Européen de surveillance des retombées atmosphériques (Gombert *et al.*, 2004). Néanmoins, dans notre étude, les sites sont plus éloignés des sources de pollution que dans ce programme Européen (18 ± 10 km dans notre étude versus 300 m pour le programme Européen).

Origine possible des dépôts atmosphériques dans le Nord-Est de la France

La composante 1 du biplot de covariance présente la plus forte contribution des log-ratios. De ce fait, le biplot est capable de séparer deux groupes en fonction des log-ratios Pb/Al et Cd/Al : les sites provenant des Vosges avec des valeurs de log-ratios fortes (sites fortement pollués) et les sites provenant du Jura (sites relativement moins pollués), tandis que les sites

provenant des autres régions présentent une grande variabilité de ces valeurs de log-ratios (Figure 7).

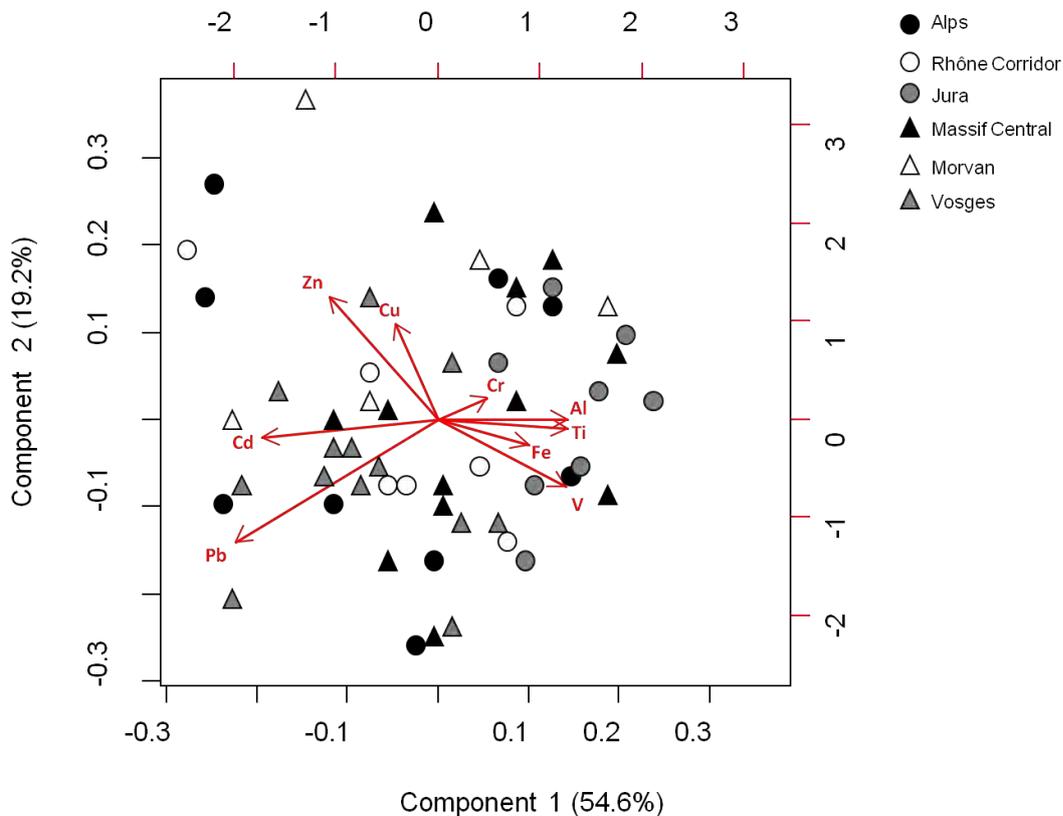


Figure 7 : Covariance biplot. Les pourcentages de variance expliqués par les deux premiers axes sont respectivement de 54,6% et 19,2%

Les tests de Hotelling ont montré que les Vosges étaient significativement différentes du Jura, du Massif Central, du Morvan et des Alpes tandis que le Massif Central était significativement différent du couloir Rhodanien et des Alpes. Les différences observées sont différentes de celles observées après l'analyse du biplot car elles sont essentiellement liées à la nature du fond géochimique et non à la contamination anthropique. Les différences entre le Massif Central et le reste des secteurs pourraient être dues à la prédominance de la nature volcanique du substrat géologique de cette région.

Les fortes concentrations en Pb dans les Vosges sont probablement dues à une érosion du sol à l'échelle régionale mais également dues à une possible contamination provenant de l'Allemagne (Harmens *et al.*, 2008). La production de métal dans les Vosges a été mise en évidence dès le 10^{ème} Siècle (Fluck, 2000), avec une augmentation des activités minières et sidérurgiques pendant le 15^{ème} et 16^{ème} Siècle (Fluck et Weil, 1975). Bien que les activités minières soient arrêtées depuis le milieu du 20^{ème} Siècle, les siècles d'activités ont introduit de grandes quantités de Pb dans l'environnement des mines (Forel *et al.*, 2010).

Les différences observées entre le Jura et la région des Alpes pourraient être dues à plusieurs effets combinés : distances entre la localisation des tourbières et des sources d'émissions (routes, industries), la quantité de pollution émise par ces sources, et la fréquence et la vitesse des vents dominants en provenance des sources d'émission. En effet, les tourbières dans les Alpes pourraient être sous l'influence de villes ayant une atmosphère

polluée comme Grenoble, où les vents provenant du Sud de la vallée du Rhône entraînent les **masses d'air polluées** vers les Alpes (Chemel et Chaxel, 2007). Les tourbières du Jura sont quant à elles plus éloignées des routes principales à forte circulation et des grandes agglomérations.

Mise en place d'un indicateur synthétique des dépôts atmosphériques dans le Nord-Est de la France

La figure 8 montre les scores provenant de la composante 1 pour chaque site. Les plus faibles scores (valeurs négatives) correspondent à de fortes valeurs de log-ratios de Pb/Al, Cd/Al, Pb/Ti et Cd/Ti, c'est à dire à des sites fortement contaminés par des sources anthropiques. Un test de comparaison (test du Tukey) a mis en évidence des différences significatives entre le Jura (peu contaminé) et les Alpes, le Couloir Rhodanien et les Vosges ($p < 0.05$). Il est possible d'utiliser le score de chaque tourbière sur l'axe 1 de ce biplot en tant qu'indicateur synthétique de l'origine de dépôt et le degré de contamination de chaque tourbière. Cet indicateur synthétique est plus facile à obtenir et plus facile à utiliser dans le cadre de la gestion et de la protection des milieux naturels que les autres scores (par exemple, celui développé par Schroeder et Pesch, 2007), car il n'est pas nécessaire de disposer d'informations sur les paramètres environnementaux (texture du sol, précipitations, évaporation, ..) pour définir des écorégions.

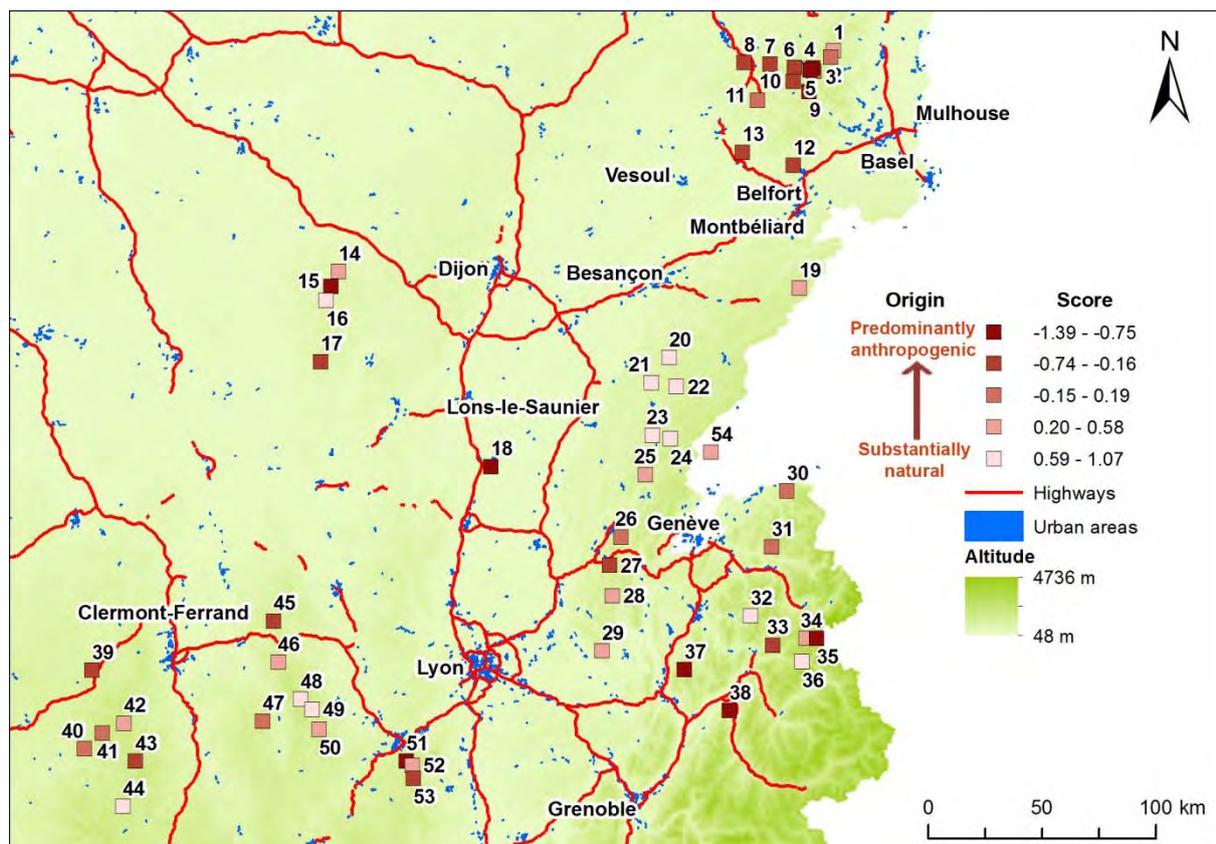


Figure 8 : Scores de l'axe 1 du biplot de chaque tourbière.

1.6. Evaluation des concentrations en HAP dans la partie vivante des sphaignes dans les Vosges (Etude *in situ* 1)

Caractérisation des dépôts atmosphériques

Seize hydrocarbures aromatiques polycycliques ont été mesurés dans les sphaignes provenant de 13 tourbières du massif des Vosges, situées à des altitudes variables. Parmi ces HAPs dosés, seuls cinq ont présenté des teneurs supérieures au seuil de détection : le Phénanthrène, le Fluoranthène, le Pyrène, le Chrysène et le Benzo(b)fluoranthrène. Les teneurs moyennes ($\mu\text{g.kg}^{-1}\text{MS}$) sont présentées dans le tableau 2.

Tableau 2 : Moyenne ($\mu\text{g.kg}^{-1}\text{MS}$), écart-type, minimum et maximum de 5 HAP analysés dans le secteur des Vosges.

		Fluoranthène	Phénanthrène	Pyrène	Chrysène	Benzo(b) fluoranthène
Vosges	Mean	3,34	45,25	80,23	13,46	13,04
N=13	SD	2,04	11,97	27,92	11,04	12,25
	Min	2,00	11,64	9,01	2,00	3,62
	Max	13,65	114,21	225,60	112,38	119,06

Les concentrations mesurées en Fluoranthène, Phénanthrène, Pyrène, Chrysène et Benzo(b)fluoranthrène sont faibles. Cependant, aucune comparaison de ces résultats avec **d'autres publiés dans la littérature n'est possible. En effet, l'étude $\mu\text{POL-AIR}$ est à notre connaissance précurseur dans la détermination des hydrocarbures aromatiques polycycliques bioaccumulés dans les sphaignes.** La littérature disponible en ce domaine fournit des informations sur des concentrations en HAP mesurées dans des mousses terrestres et non dans des Bryophytes de zones humides. Ainsi, des études antérieures ont utilisé différentes espèces de mousses terrestres pour des campagnes de surveillance biologique aux HAPs (Wegener *et al.*, 1992 ; Otvös *et al.*, 2004) dans des sites urbains et ruraux (Gerdol *et al.*, 2002) et pour des comparaisons inter-spécifiques et inter-régional (Migaszewski *et al.*, 2009). Même si les comparaisons entre différentes espèces de bryophyte sont peu adéquates, certaines **concentrations relevées lors de recherches antérieures à l'aide de bryophytes terrestres** sont indiquées à titre informatif.

Les travaux de Krommer et collaborateurs en 2007 ont utilisé des bryophytes terrestres dans la réserve de biosphère Wienerwald (Autriche) **qui s'étend à l'ouest et au sud-ouest de Vienne.** Les points de prélèvements étaient soit à proximité de sites pollués, soit éloignés de toute source de pollution. Les concentrations mesurées étaient influencées par la distance à la source. **Les concentrations de fond de l'ensemble des sites pour les éléments suivants :** fluoranthène, phénanthrène, pyrène, chrysène et benzo(b)fluoranthène étaient respectivement de 14, 55, 12, 4 et $4,3 \mu\text{g.kg}^{-1}$ de poids sec (Krommer *et al.*, 2007). Dans la zone de Kielce (sud-central de la Pologne) où de nombreux sites de combustion de charbon et de pétrole étaient présents, quarante-huit échantillons de mousses des espèces *Hylocomium splendens* et *Pleurozium schreberi* ont été prélevés par Dolegowska et ses collaborateurs en 2011. Dans les deux espèces de mousse les taux obtenus étaient élevés.

Le phénanthrène (75 à 732 $\mu\text{g.kg}^{-1}$), le fluoranthène (101 à 577 $\mu\text{g.kg}^{-1}$) et le pyrène (68 à 568 $\mu\text{g.kg}^{-1}$) étaient prédominants (Dolegowska *et al.*, 2011).

Distribution des HAP selon un profil altitudinal

Une analyse multivariée a été effectuée afin d'étudier les relations entre ces HAP. Celle-ci a mise en évidence que les concentrations en Fluoranthène, en Pyrène et en Phénanthrène étaient corrélés, et étaient indépendantes des concentrations en Chrysène et Benzo-b-Fluoranthrène elles-mêmes corrélées (Figure 9).

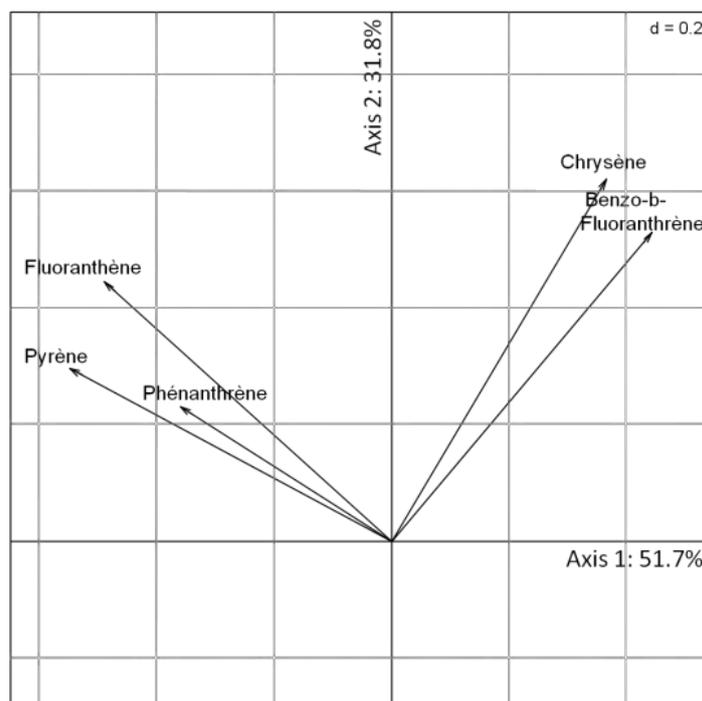


Figure 9 : ACP des concentrations en 5 HAP majeurs dans les Vosges. La proportion d'inertie expliquée par chaque axe est indiquée le long de l'axe correspondant.

Etant donné la qualité des données, des modèles de régression linéaire simple ont pu être testés avec les concentrations en HAP pour variable dépendante et l'altitude en variable indépendante. Les résultats issus de ces modèles indiquent que les concentrations en phénanthrène ne sont pas expliquées par l'altitude, c'est à dire que ce contaminant est présent de façon homogène au sein des tourbières des Vosges suivies (Figure 10). En revanche, le Fluoranthène et le Pyrène sont liés négativement de façon significative à l'altitude tandis que le Chrysène et le Benzo(b)fluoranthrène sont corrélés de façon positive avec l'altitude.

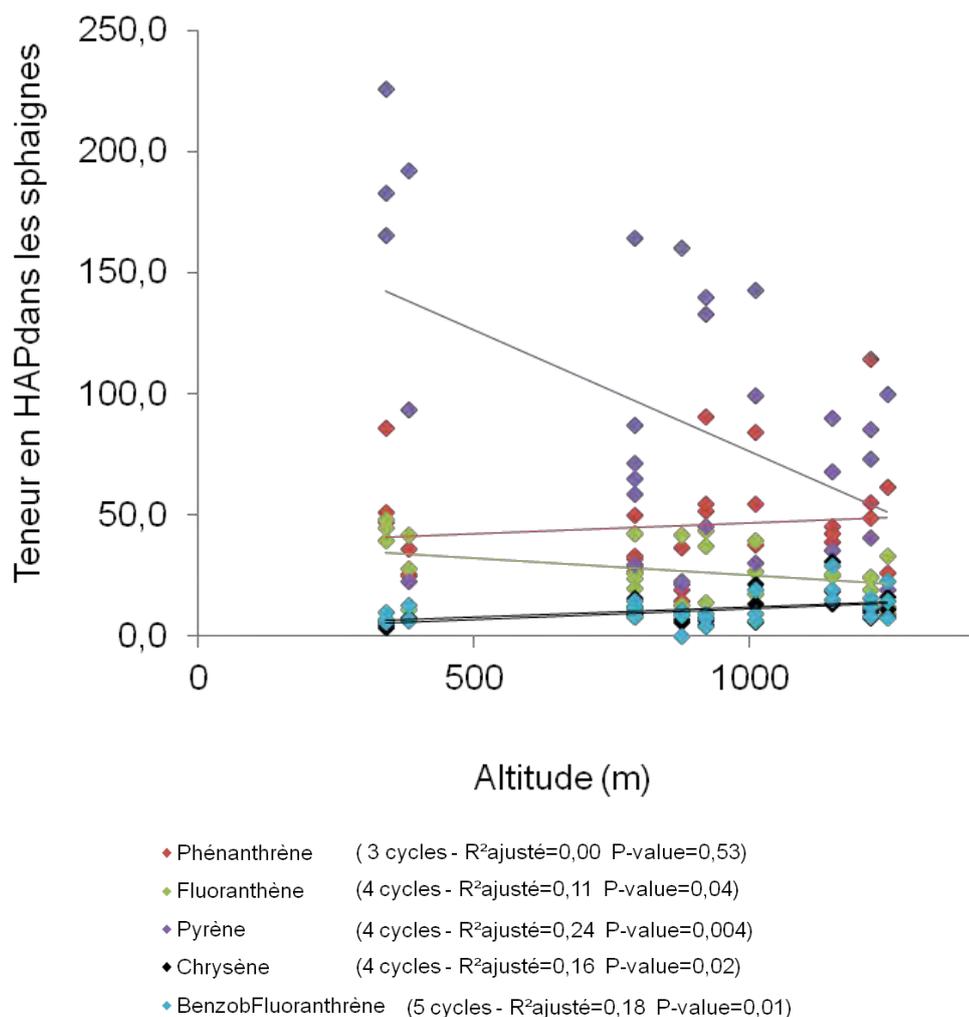


Figure 10 : Relation linéaire entre la teneur en HAP et l'altitude. Pour chaque HAP, sont indiqués le nombre de cycle ainsi que le R² ajusté et la P-value du modèle. Les droites de régression pour le Chrysène et pour le Benzo-b-Fluoranthrène sont superposées.

Il est intéressant de constater que les deux HAPs les plus légers, le Fluoranthène et le Pyrène ont des teneurs plus fortes en basse altitude alors que les deux éléments ayant une masse moléculaire plus élevée, le Chrysène et le Benzo(b)fluoranthrène, sont majoritairement présents en haute altitude. Plusieurs hypothèses peuvent être émises pour expliquer ces différences. Il est possible que des sources d'émission puissent être essentiellement localisées au niveau des tourbières de basse altitude pour le Fluoranthène et le Pyrène et au niveau des tourbières de haute altitude pour le Chrysène et le Benzo(b)fluoranthrène. Une autre hypothèse pourrait être que des sources ponctuelles pourraient avoir un rôle majeur, comme par exemple pour le Chrysène qui montre une concentration significativement plus élevée au niveau de la tourbière située à 1150 m d'altitude. Ces deux hypothèses semblent cependant difficiles à valider étant donné la localisation des tourbières étudiées qui se répartissent sur une zone relativement vaste des Vosges. De plus, les conditions physico-chimiques de l'atmosphère et notamment la température pourrait influencer sur les concentrations des composés organiques. Ce phénomène a déjà été observé pour les composés organochlorés dans les mousses de montagnes andines qui sont fonction de la

température (Grimalt *et al.*, 2004). Des combinaisons de piégeage des particules et de la condensation à froid pourraient être aussi proposées comme des mécanismes de fractionnement de la composition des HAPs le long du profil d'altitude.

A notre connaissance, cette étude est pionnière pour le dosage de HAP au sein de **sphaignes. C'est pourquoi, aucune comparaison avec** des travaux menés dans les tourbières ne pourra être effectuée. Cependant, il est intéressant de noter que des recherches ont été réalisées sur la composition des HAPs dans les mousses terrestres (*Hypnum plumaeformae* WILS.) du versant nord des montagnes Nanling, au sud de la Chine. Liu et ses collaborateurs ont mesuré la concentration totale en HAP dans les mousses, comprise entre 310 et 1210 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ de poids sec. Sur les 16 HAP dosés, le phénanthrène était le plus abondant (moyenne de 120 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ MS) (Liu *et al.*, 2005). Les teneurs relevées étaient équivalentes à celles mesurées dans les mousses terrestres de zones rurales de Kosetice (Holoubek *et al.*, 2000), mais inférieures aux taux relevés dans des centres urbains de Pologne chez *Hylocomium splendens* (Orlinski *et al.*, 2002).

Aucune comparaison n'est possible essentiellement en raison des différentes espèces de bryophyte étudiées. Cependant, il est néanmoins intéressant de noter que **dans l'étude de** Liu et collaborateurs publiée en 2005, les concentrations de la plupart des HAPs dans les mousses avaient généralement diminué avec l'augmentation de l'altitude. En outre, un changement dans le modèle de composé avait été observé avec une variation altitudinale de la proportion des HAPs en relation avec leur masse moléculaire (donc en fonction du nombre de cycles).

1.7. Evaluation des concentrations en ions majeurs et en éléments nutritifs dans la partie vivante des sphaignes à l'échelle supra-régionale

Concentrations en éléments nutritifs et en ions majeurs

Les concentrations moyennes en ions majeurs et en éléments nutritifs sont présentées dans le tableau 3. Les données obtenues sont d'autant plus intéressantes à valoriser que l'ensemble des analyses a été mené avec la même espèce de sphaigne, ce qui n'a à notre connaissance jamais été réalisé pour un nombre aussi important de tourbières.

Tableau 3 : Moyenne, écart-type de chaque élément nutritif et ion majeur analysé pour chaque secteur étudié (en mg.Kg⁻¹MS de sphaignes).

		Ca	K	Mg	Na	P	S	N
Ain	Mean	2627	4514	751	258	457	803	8124
	SD	741	683	283	55	112	74	904
Savoie	Mean	3651	6193	1052	124	677	961	8852
	SD	1851	1271	423	38	125	187	1554
Haute-Savoie	Mean	2435	4929	1064	204	541	803	8116
	SD	691	1236	805	84	165	157	2607
Pilat	Mean	2242	5032	740	223	600	767	7925
	SD	498	1473	143	64	108	86	1675
Jura	Mean	2904	4049	925	277	478	799	7262
	SD	1112	979	363	89	88	99	1024
Volcans	Mean	3223	5632	1088	295	798	905	8683
	SD	1027	1604	455	159	429	175	1845
Livradois	Min	2154	4333	757	322	565	743	7412
	Max	755	1374	371	120	116	91	1015
Morvan	Mean	2016	5820	1043	296	728	836	8490
	SD	547	1915	337	90	397	114	1695
Vosges	Mean	2148	4205	646	301	419	782	8064
	SD	564	1183	165	103	131	125	1240

Pour caractériser les différentes régions étudiées, une ACP a été réalisée avec les éléments suivants : Ca, Na, Mg, K, P, N, C, S puis la variabilité des échantillons a été expliquée par le site (22% d'inertie expliquée ; p=0,001) (Figure 11). Les résultats obtenus montrent que les régions se distribuent notamment selon la richesse en éléments majeurs présents dans leur substrat géologique et selon les apports en éléments nutritifs (phosphore). La teneur en Calcium s'explique évidemment par le type de roches présentes (roches siliceuses des massifs des Vosges et du Livradois et roches calcaires en Savoie). Par ailleurs, les concentrations en éléments nutritifs, notamment en phosphore, sont sensiblement plus élevées dans les massifs des Volcans d'Auvergne et du Morvan. Il est probable que les activités locales (développement important de l'élevage et de l'agriculture) jouent un rôle prépondérant dans l'enrichissement en éléments nutritifs à la surface des tourbières.

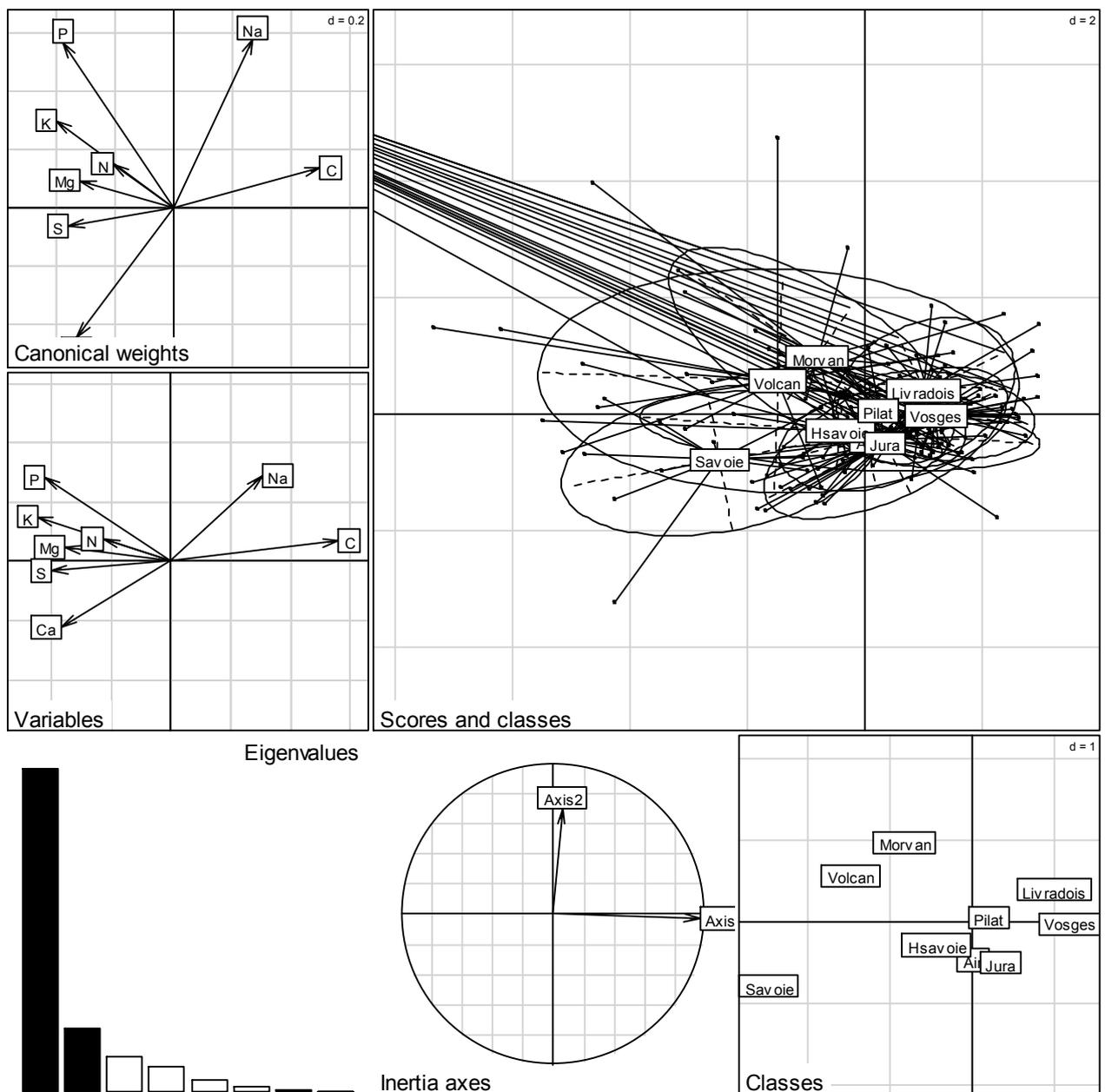


Figure 11 : Cercle des corrélations et carte factorielle de l'ACP dont les variables sont les régions et [Ca], [Na], [Mg], [K], [P], [N], [C], [S]

Jirousek et ses collaborateurs en 2011, ont **montré l'intérêt d'étudier** les rapports N/P et N/K pour comparer le statut trophique des tourbières à sphaignes ombrotrophes (Jirousek *et al.*, 2011). Les variations observées par ces auteurs sont notamment expliquées par la différence des apports atmosphériques en azote dans les différentes régions étudiées. Les rapports C/N, N/P et N/K ont été comparés en réalisant une ANOVA. Le rapport N/P est celui qui montre les variations les plus significatives (Figure 12). Le rapport N/P peut être aussi **modifié en fonction des apports en phosphore lorsque les variations en apports d'azote atmosphérique sont faibles** (par exemple, sur une échelle spatiale réduite).

Dans ces conditions, ces apports sont susceptibles d'affecter sensiblement le fonctionnement des tourbières (l'azote ou le phosphore pouvant être tour à tour limitant).

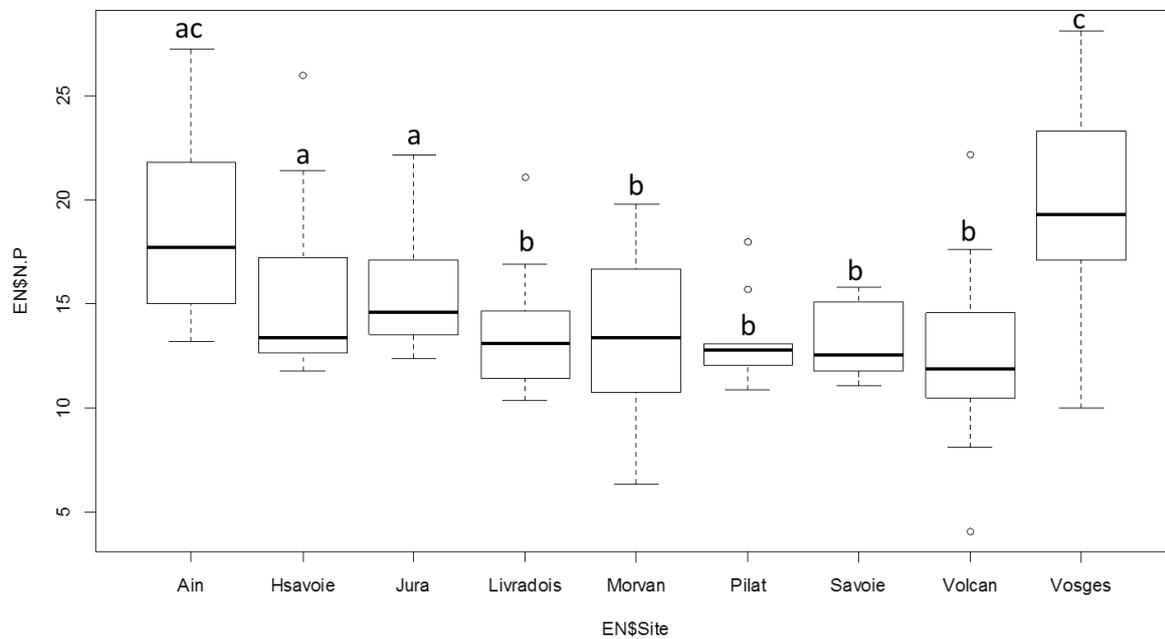


Figure 12 : Comparaison du rapport N/P pour les différents sites étudiés (ANOVA, $p=7.89e-14$). a, b, c : comparaison des sites 2 à 2 par un test de Tukey HSD.

Question 2

Est-il possible d'évaluer l'origine des polluants (sources, distances) présents à la surface des tourbières à sphaignes et de modéliser ces dépôts ?

2.1. Contexte et Objectifs

La modélisation des données de pollution atmosphérique en général et celle des ETMs en particulier est délicate à réaliser car la dispersion des polluants est soumise aux flux atmosphériques et **ne s'effectue pas selon des gradients réguliers**. Ces éléments polluants, associés ou non aux particules atmosphériques (Gaudry *et al.*, 2008), peuvent être transportées sur des distances longues, intermédiaires et courtes (définies respectivement comme >100 km, de 10 à 100 km et <10 km des sources (Zanetti, 1990)). **La diffusion d'un jour à l'autre** de ces aéro-contaminants peut être modélisée par des outils qui, tels que le logiciel Chimère, rendent bien compte de la trajectoire des panaches. Mais cet exercice est difficile car il requiert de puissants moyens de calcul basés sur un grand nombre de données et des compétences qui relèvent de la physique atmosphérique. **Il n'est guère possible de conduire de tels travaux dans de petits laboratoires s'ils doivent être répétés de multiples fois** pour simuler les trajectoires des polluants sur plusieurs années.

Dans ces conditions, nous avons choisi de mettre en œuvre une méthode alternative à une telle démarche pour pouvoir **dépasser ces limites**. **Nous sommes partis de l'hypothèse** que la **diffusion de la pollution sur une longue période s'organise** selon des schémas analogues répétitifs. De la sorte, la somme de pollution observée sur un territoire donné reflètera des tendances que des modélisations spatiales, appuyées par la géomatique, pourront mettre en évidence. Les méthodes géomatiques mises au point pour analyser et interpoler la dispersion des polluants à longue distance sont de fait moins coûteuses, plus simples et plus rapides à utiliser que les méthodes de la physique atmosphérique (Solazzo E. *et al.*, 2012). Elle repose sur des corrélations entre un polluant et cinq variables explicatives choisies dans les bases de données environnementales européennes, European Pollutant Release and Transfer Register (E-PRTR) (cadastres d'émission par secteur **d'activité** : industriel, route, résidentiel et agriculture) et de la base de données Corine Land Cover, dans laquelle on a identifié les taches urbaines dont la taille fonctionne comme un proxy des émissions de polluants. **L'influence théorique que les cadastres d'émission ont sur leur voisinage est simulée par l'application d'un modèle de dispersion qui tient compte de la distance euclidienne isotrope pondérée par l'importance des rejets.**

- La première étape de ce travail a donc consisté à calibrer et valider une méthode **permettant d'apprécier** la dispersion des aéro-contaminants transfrontaliers. Pour ce faire, nous nous sommes appuyés sur les données mesurées des particules microscopiques en **suspension dans l'air de taille inférieure ou égale à 10µm (PM₁₀)** en Europe, territoire **suffisamment vaste pour permettre l'obtention d'un grand nombre de stations d'observation** de la pollution à longue distance.
- Dans un deuxième temps, cette méthode a été **appliquée à l'analyse et à la cartographie** des dépôts atmosphériques bioaccumulés par les sphaignes analysés dans les 54 tourbières de ce programme.

2.2. Calibration et validation de la méthode géomatique pour modéliser la dispersion des PM₁₀ à l'échelle de l'Europe

La méthode que nous avons mise en place a été testée et calibrée en prenant comme exemple la dispersion en Europe des **particules microscopiques en suspension dans l'air** de taille inférieure ou égale à 10µm (PM₁₀). Ce choix est justifié par l'abondante documentation disponible :

- les émissions de PM₁₀ ont été obtenues des bases de données environnementales européennes, European Pollutant Release and Transfer Register (E-PRTR) carroyées à 5 km pour les principaux secteurs d'activité : industriel, résidentiel, route et l'agriculture (Figure 13). La base Corine Land Cover (200 m de résolution spatiale) a également été mise à contribution pour identifier les taches urbaines (ULZ) dont leurs tailles et la pollution qui y est émise étaient, par hypothèse, fortement dépendantes. Un rééchantillonnage à 200 m a été effectué pour que toutes les informations soient **spatialement compatibles et superposées**. Ces cinq couches d'information ont été considérées comme explicatives.
- Les valeurs de PM₁₀ **ont été enregistrées en 532 stations dispersées sur toute l'aire d'étude** (Figure 13). Les concentrations moyennes calculées pour l'année 2008 ont été utilisées dans le cadre de ce travail.

L'aire d'étude (Figure 13), suffisamment extensive pour intégrer tous les éventuels apports de polluants à longue distance, inclut :

- la France à l'est de l'estuaire de la Seine,
- l'Allemagne à l'ouest de Munich et au sud de Cologne,
- la Belgique,
- la Suisse,
- l'Italie du Nord.

Un **premier traitement de l'information a consisté à dériver des données initiales d'émission**. Ainsi, onze couches nouvelles ont été obtenues **grâce à l'application d'un modèle spatial** qui consiste à simuler la dispersion des polluants autour de leur source d'émission. La dispersion des PM₁₀ est basée sur la formule suivante :

$$PM10_{k,l} = (\sqrt{P_{i,j}} \times F) - D \quad (1),$$

où $PM10_{k,l}$ est le total des PM₁₀ reçues en ligne k et colonne l , $P_{i,j}$ est le total des PM₁₀ émises par le pixel localisé en ligne i et colonne j , F est le facteur de dilatation, et D est la distance euclidienne entre le pixel k,l et le pixel i,j , qui est défini par la formule :

$$D = \sqrt{(i - k)^2 + (j - l)^2} \quad (2)$$

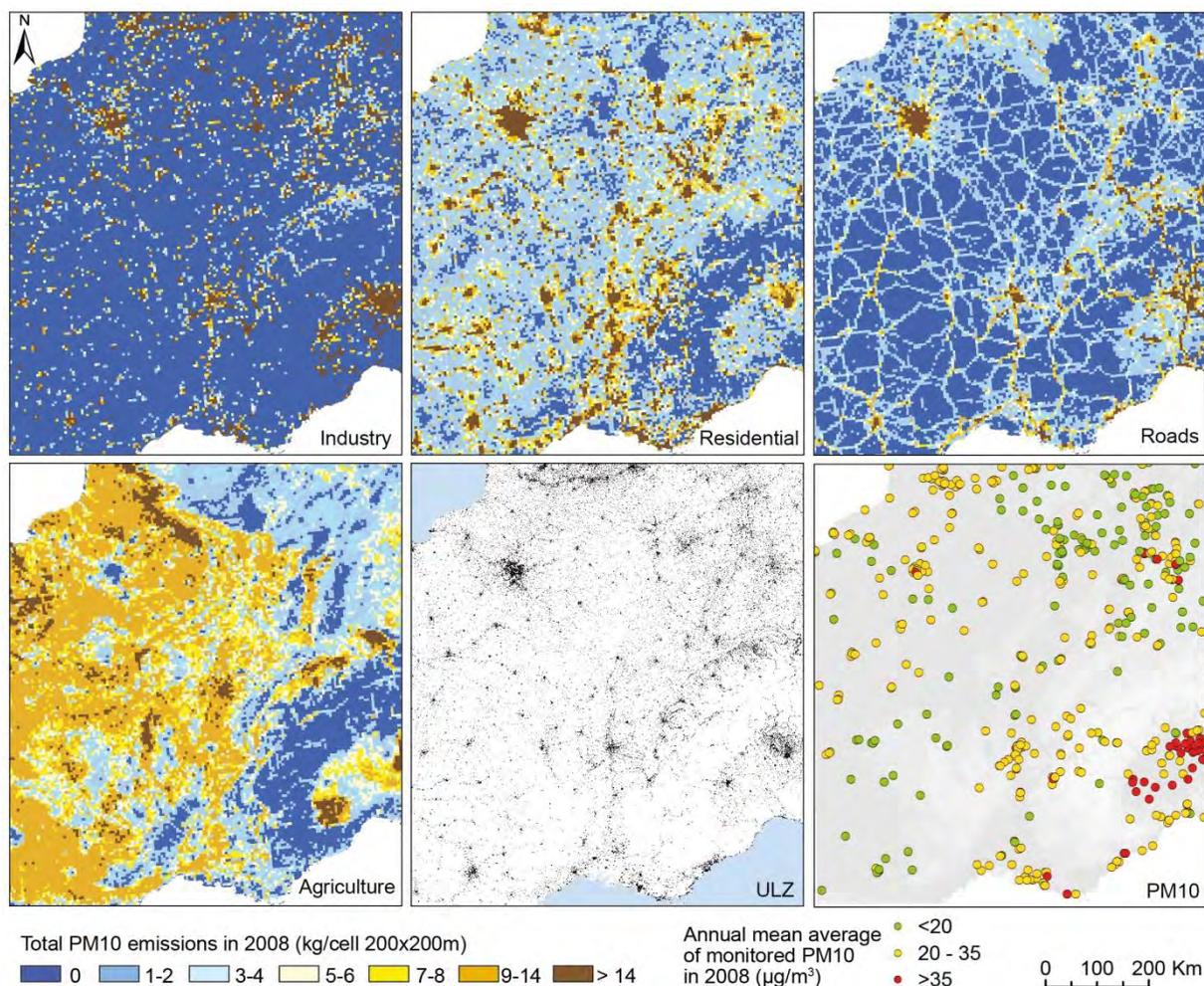


Figure 13. Données initiales : les émissions moyennes de PM_{10} en 2008 (résolution 200m) pour l'industrie, les secteurs résidentiel, transport routier et de l'agriculture; zones urbaines tirées de Corine Land Cover 2000/06 (ULZ), et localisation des 532 stations de surveillance de la qualité de l'air (PM_{10}).

Les PM_{10} émises à partir de tout pixel ont été ainsi virtuellement exportés à l'intérieur d'une aire circulaire concentrique dont le rayon est fonction de la valeur de onze facteurs de dilatation (F) successifs (de 1 [pas de dilatation] à 1500 [dilatation maximale]) pondérée par la valeur des émissions (Figure 14). Dans le cas d'une valeur moyenne de diffusion, une dilatation par $F=1500$ exporte le polluant à une distance supérieure à 150 km pour l'industrie (moyenne= $16 \mu\text{g}/\text{m}^3$) et voisine de 100 km pour les autres secteurs de diffusion (Figure 15). Avec des facteurs de dilatation (F) inférieurs, la portée de la dispersion est moindre, mais, pour des valeurs d'émission supérieures, elle est plus élevée.

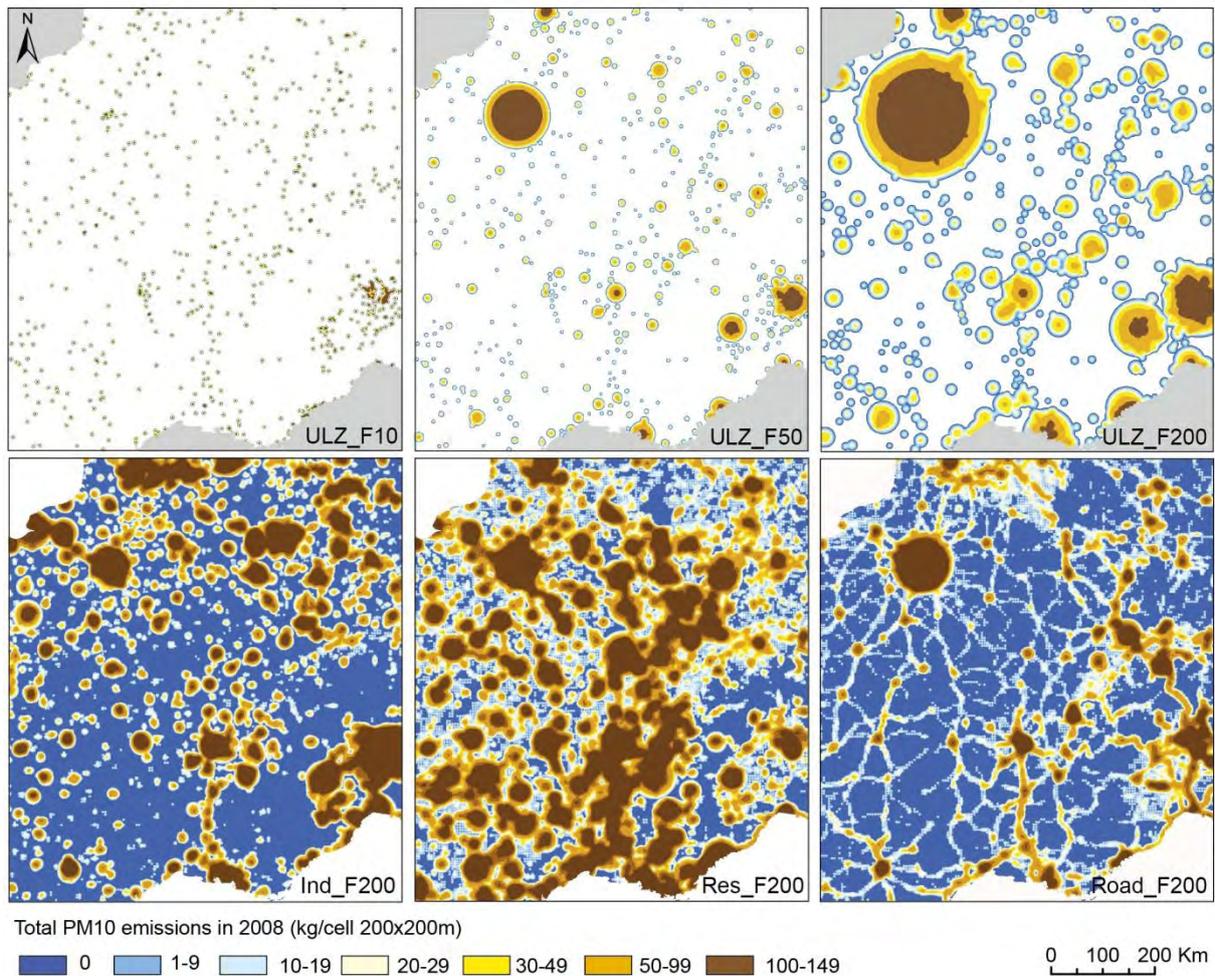


Figure 14. Modèles de dispersion des PM_{10} . ULZ_F10 , ULZ_F50 et ULZ_F200 montrent la dispersion des PM_{10} après l'application des valeurs de facteurs de dilatation (F), $F = 10, 50$ et 200 . Les surfaces de ULZs (km^2) sont considérées comme un proxy de PM_{10} et, dans ce cas, les valeurs sont également exprimées en kg par cellule de 200 m de côté. Ind_F200 , Res_F200 et $Road_F200$ montrent la dispersion des PM_{10} en kg / cellule après l'application d'un $F = 200$ appliqué aux données initiales.

Après cela, un processus de corrélation (Joly *et al.*, 2010, 2012) a été effectué pour mesurer la relation qui existe entre la variable expliquée - les valeurs de PM_{10} observées en 532 stations - et les variables explicatives - les modèles de dispersion spatiale de PM_{10} pour les onze facteurs de dilatation successifs appliqués aux quatre cadastres initiaux et aux taches urbaines. Enfin, l'estimation des concentrations de PM_{10} en moyenne annuelle en Europe, y compris dans les écosystèmes sensibles qui ne sont pas couverts par le réseau de stations de surveillance, a été calculée par régression multiple.

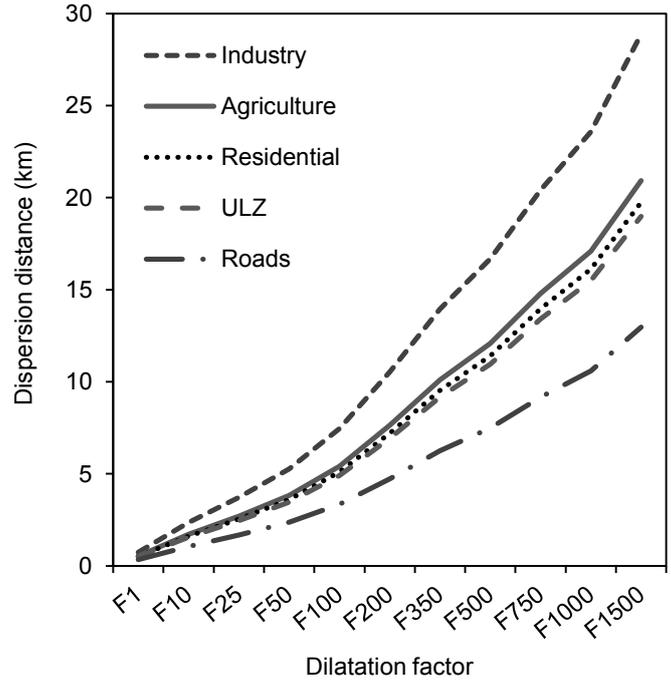


Figure 15. Distances de dispersion avec différents facteurs de dilatation. Distances de dispersion (km) sont calculés en appliquant 11 facteurs de dilatation différents, F, aux valeurs moyennes de chaque base de données initiales. Valeurs moyennes pour chaque base de données sont 13,9 ; 6,5 ; 2,8 et 7,3 kg/ 200x200m pour industrie, secteur résidentiel, transport routier et agriculture, respectivement.

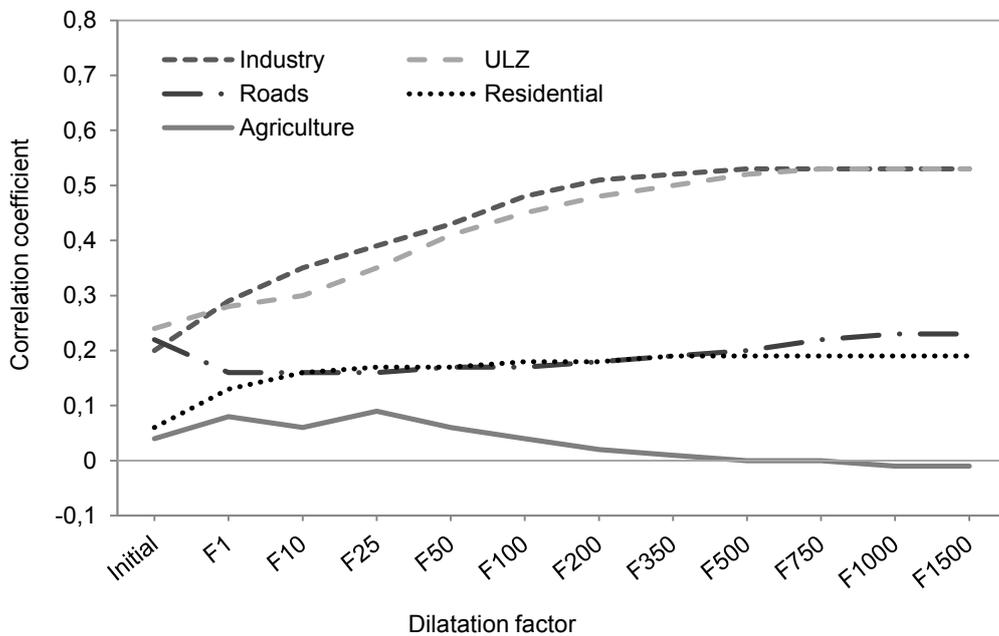


Figure 16. Coefficients de corrélation entre les 532 stations de mesure des PM_{10} et les variables d'émission (initiale) dilatées selon 11 facteurs (F1 à F1500)

Les coefficients de corrélation sont faibles pour les facteurs de dilatation peu élevés (Figure 16). Cela signifie que les PM_{10} émises ont une faible incidence sur les PM_{10} captées à distance faible. L'application de facteurs de dilatation croissant de 10 à 1500, qui amplifient la distance de dispersion théorique des PM_{10} émises, augmente les coefficients de corrélation entre les PM_{10} enregistrées et les variables explicatives. Les corrélations augmentent jusqu'à un maximum de 0,53 pour l'industrie et ULZ (pour $F = 500$ et $F = 750$, correspondant à des distances de dispersion de 16,7 km et 13,4 km, respectivement). Les secteurs résidentiels et le transport routier présentent une relation plus faible (r moins de 0,23), mais ils suivent la même tendance que l'ensemble des données précédentes. Cela indique que les stations de mesure des PM_{10} sont sensibles à une pollution émise à moyenne et longue distance. Au contraire, l'agriculture entraîne une très faible corrélation, ce qui indique que les particules, en majorité de grosse taille, retombent très vite autour des lieux où elles sont émises.

2.3. Utilisation des dépôts en ETM dans 54 tourbières pour modéliser les dépôts à longue distance à l'échelle supra-régionale (Etude *in situ* 1)

La même méthode a été appliquée aux tourbières du Centre-Est de la France. Les variables explicatives sont identiques à celles qui ont été présentées précédemment. Les variables expliquées sont les concentrations en Cu, Cd, Zn et Pb dans les 53 tourbières à sphaignes françaises (ETM dont l'origine est principalement anthropique). Les concentrations utilisées ont été normalisées par les concentrations en Ti pour ne conserver que la part anthropique. L'espace sur lequel ont été recueillies les variables explicatives, vaste d'environ 950 km de côté, englobe celui, beaucoup plus réduit, qui contient les tourbières, située en position centrale (Figure 17).

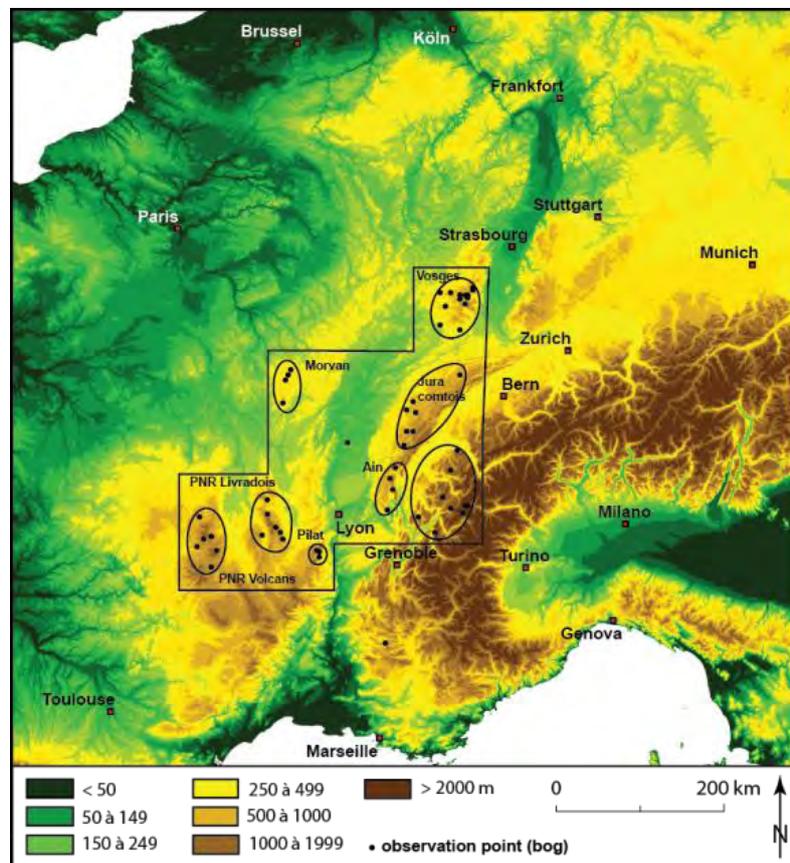


Figure 17 : L'aire englobant les 53 tourbières et l'aire d'étude

Un système de régressions linéaires a permis de calculer le coefficient de corrélation entre la variable estimée et les valeurs de polluant émis depuis les cinq secteurs de pollution dont la diffusion théorique a été modélisée selon onze différentes contraintes (facteurs de dilatation F). Ces dernières, visant à décrire le comportement spatial du polluant, seront d'autant plus conformes à la réalité que le « r » sera plus élevé. *In fine*, les options et le paramétrage les plus réalistes ont été retenus pour la spatialisation des rejets.

Résultat des régressions globales

L'interpolation globale, est fondée sur une seule régression à partir de l'ensemble des 53 tourbières. Chacun des quatre éléments traces métalliques répond de manière spécifique aux variables explicatives (Figure 18). Le cadmium est surtout sensible à la pollution issue des secteurs résidentiel et industriel et des aires urbaines. Le « r » maximum est atteint pour respectivement F=51 (r=0,36), F=201 (r=0,31) et F=25 (r=0,28).

Le cuivre est sensible à tous les types de pollution avec des « r » supérieurs à 0,4 pour le résidentiel (r=0,56 ; F=51), les routes (r=0,49 ; F=1001), l'industrie (r=0,47 ; F=201) et les aires urbaines (r=0,46 ; F=51-101). Seule l'agriculture, avec un « r » de 0,31 est un peu en retrait.

Le plomb et le zinc sont, comme le cadmium, réceptifs à la pollution diffusée par les secteurs résidentiel et industriel mais les routes remplacent les aires urbaines. Le « r » atteint par le plomb est plus élevé que celui du zinc. La pollution issue du résidentiel provient de plus loin (F=501) pour le plomb tandis qu'elle semble être plus locale pour le zinc (F51, comme le cadmium).

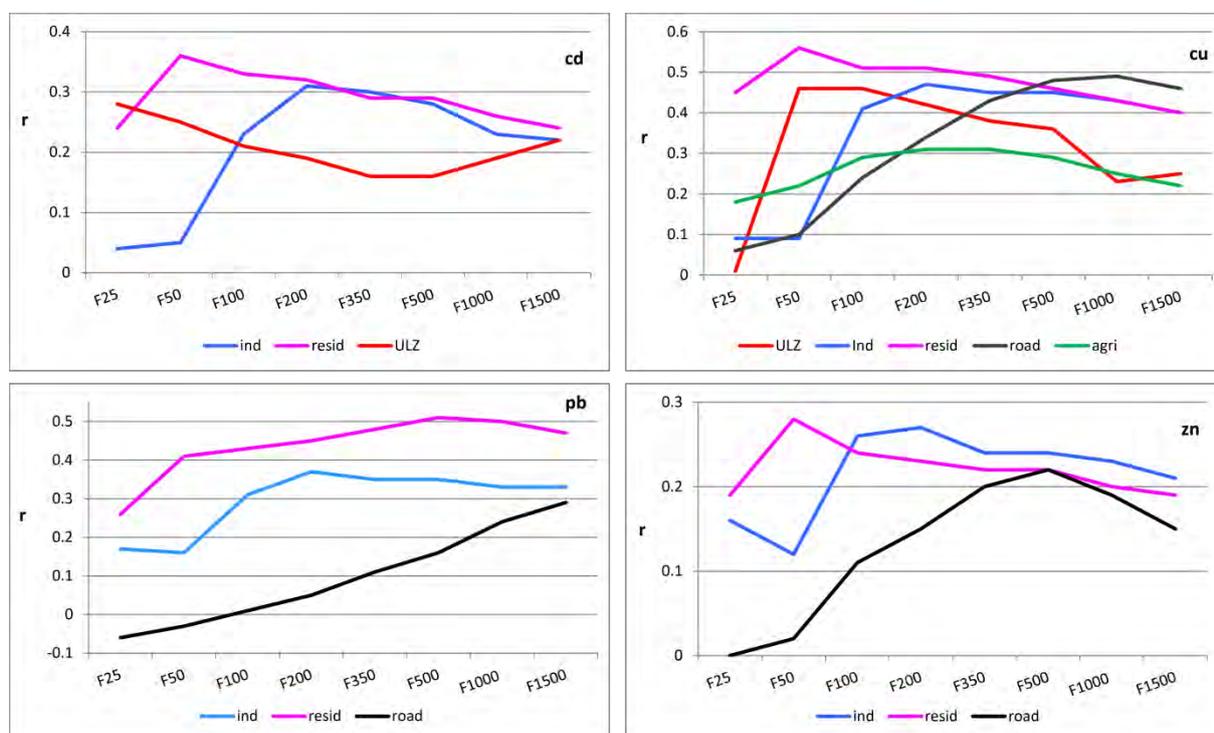


Figure 18 : coefficients de corrélation entre les quatre éléments traces métalliques d'origine anthropique et huit modèles de dispersion théorique (F25 à F1500) de cinq secteurs d'émission de PM_{10} (industrie, résidentiel, route, agriculture ; zone urbaine [ULZ]) ; seuls les secteurs d'émission dotés d'un $r > 0.25$ ont été retenus.

L'étape suivante a consisté à identifier le « r » le plus élevé et significatif de chaque secteur d'émission puis de les croiser dans le cadre d'une régression multiple. On a procédé de la sorte car il existe une forte autocorrélation statistique entre les variables dotées d'un facteur de dilatation voisin. Pour le cadmium, la formule testée a été la suivante :

$$Cd = f(\text{resid}50, \text{ind}200, \text{ULZ}25)$$

Il est aussi possible qu'il y ait une forte colinéarité entre les variables sélectionnées. La méthode que nous avons utilisée pour neutraliser ce risque est la régression multiple pas-à-pas ascendante. Ainsi, dans l'exemple du cadmium, la formule de régression finale est la suivantes :

$$Cd = 0,050 + (0,0059 * Resid50) + (0,0076 * Ind200)$$

Tableau 4 : valeur de l'intercept et des paramètres associés à chacune des variables explicatives sélectionnées par la régression pas à pas ; régression globale

	Intercept	Industrie	Résidentiel	Routes	Agriculture	R²
Cd	0,05	0,0076 (F200)	0,0522 (F50)			0,04
Cu	1,34		0,17 (F50)	0,0072 (F1000)	0,026 (F200)	0,17
Pb	1,28	0,66 (F200)	0,066 (F500)	0,015 (F1500)		0,20
Zn	1,1	0,25 (F200)	0,068 (F50)			0,02

On constate que seuls le cuivre et le plomb présentent un « r² » distinct de zéro.

Résultat des régressions locales

L'interpolation locale (Joly *et al.*, 2008a ; 2008b, 2009) consiste à interpoler l'information issue d'un jeu de n (ici n=20) stations (tourbières) locales les plus proches de la tourbière étudiée. Cette méthode nécessite plusieurs étapes successives : (i) reconnaissance des n stations les plus proches du point d'estimation, (ii) partition du territoire en (20745) polygones définis selon une règle de voisinage, (iii) analyse par régression multiple dans le cadre de chaque polygone, (iv) application des coefficients aux cellules afin d'obtenir une valeur d'estimation (Joly *et al.*, 2010, 2011).

Tableau 5 : comparaison du r² obtenu des régressions globale et locale

	Cd	Cu	Pb	Zn
Régr. globale	0,04	0,17	0,20	0,02
Régr. locales	0,37	0,56	0,38	0,45

Les régressions locales améliorent considérablement la qualité des estimations obtenues avec la régression globale puisque aucun métal ne présente un « r^2 » inférieur à 0,37 et que le cuivre atteint 0,56 (tableau 5).

La figure 19 confirme cela en précisant l'importance de certaines tourbières qui, présentant des valeurs élevées de contaminant, tirent la droite de régression vers le haut (cas du zinc avec la tourbière des Houches en Haute-Savoie).

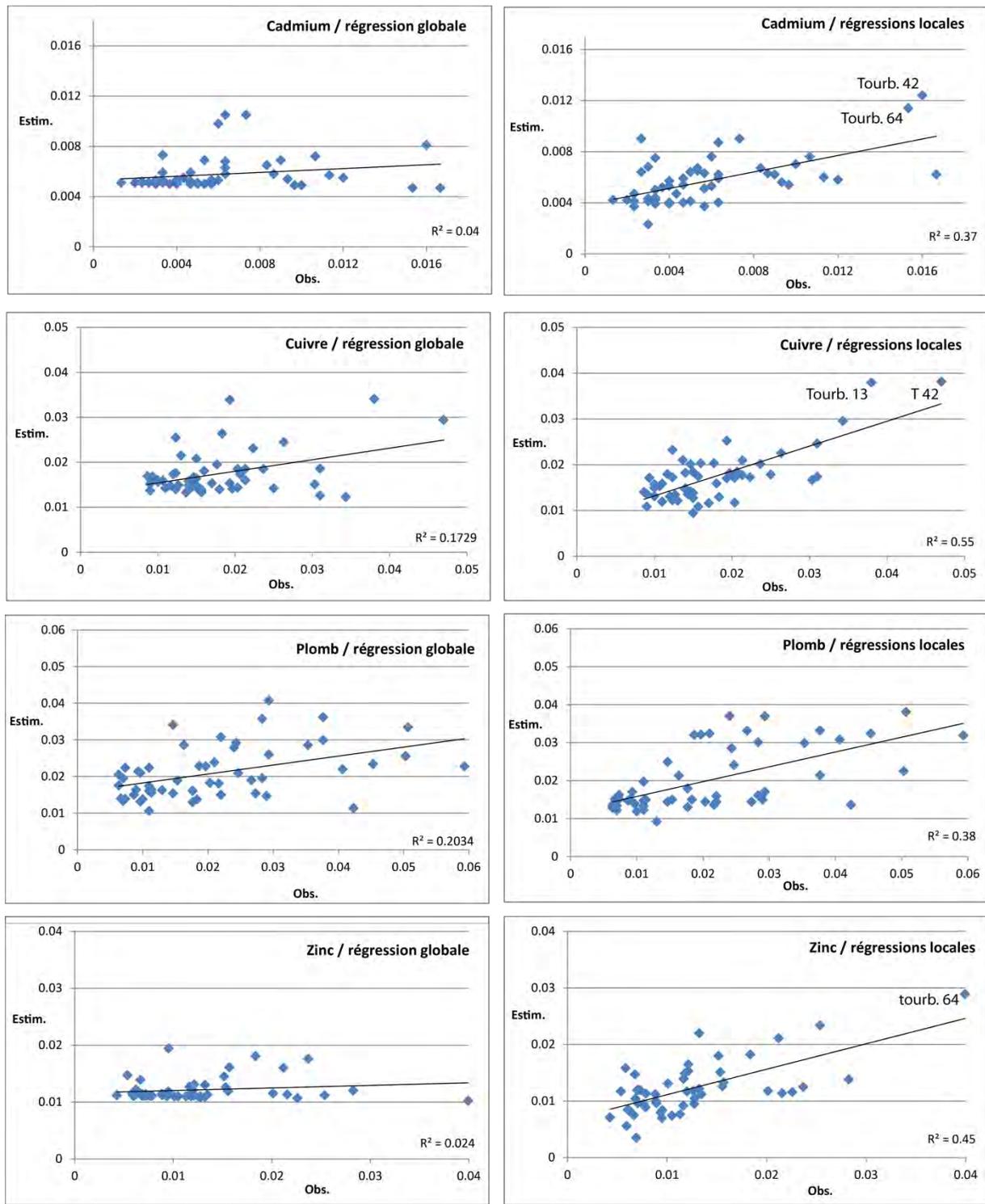


Figure 19 : Diagramme de dispersion entre les valeurs observées (abscisse) et valeurs estimées (ordonnée)

A partir de ces résultats, il est possible de réaliser des représentations spatiales qui se présentent sous la forme de cartes constituées **d'aires circulaires** plus ou moins larges, **parfois jointives lorsqu'elles sont proches les unes des autres, reflétant ainsi l'influence des** zones où la diffusion des polluants se manifeste à des degrés divers (Figure 20). Ces aires circulaires sont positionnées sur des espaces beaucoup plus larges là où le fond de pollution est faible (couleur bleue) ou élevé (couleur brune).

Ces modèles spatiaux peuvent être considérés comme des représentations des dépôts **atmosphériques à longue distance en tout point de l'espace. En d'autres termes, la couleur de la carte indique quel serait le dépôt de tel ou tel type de contaminant métallique si ce point ne recevait que les contaminants issus d'un transport** à longue distance.

Ainsi, les espaces où le cadmium et le cuivre présentent un fond de pollution élevé apparaissent sur et au voisinage des Vosges et des Alpes. La Bourgogne est également affectée, mais à un degré moindre. En revanche, le Jura, la plaine de la Saône, le Massif Central et son extension vers le Bourbonnais sont peu impactés. On a un schéma analogue pour le plomb, la Bourgogne étant peu affectée et **le Massif central l'étant** beaucoup plus. Enfin, les concentrations élevées de zinc concernent surtout les Alpes et dans une moindre mesure la Bourgogne ; le reste du territoire est préservé.

Ces cartes résultant des interpolations globales se ressemblent car les estimations portent toutes sur un jeu de variables explicatives analogue. En revanche, avec les régressions locales, chaque élément contaminant présente une situation originale car les variables explicatives intégrées dans les 20745 régressions sont précisément adaptées aux conditions locales des dépôts.

Ce modèle doit être amélioré par :

- **la recherche d'autres formes d'expression des gradients (introduction de logarithme, d'exponentielle),**
- **l'intégration des flux atmosphériques dominants,**
- la localisation des **principales sources mobiles et fixes d'aéro-contaminants,**
- la prise en compte de la valeur des rejets et de la taille des taches urbaines.

Ces prolongements méthodologiques sont du plus grand intérêt pour la connaissance des modalités de dispersion des aéro-contaminants à courte et moyenne distance. A ce titre ils sont très innovants car **l'amélioration du modèle permettra de mesurer l'influence de la** météorologie et de la taille des villes sur les quantités des aéro-contaminants dispersés puis déposés sur les écosystèmes.

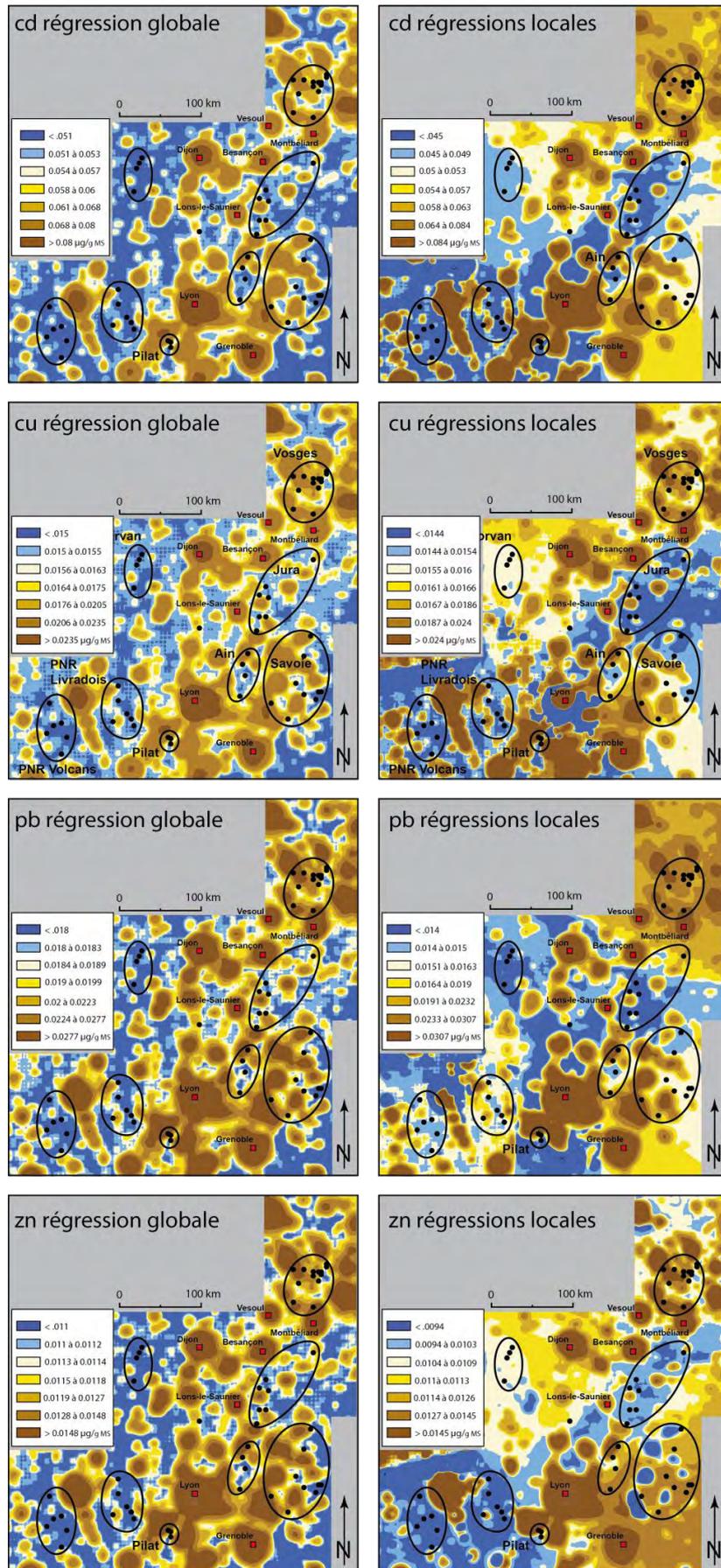


Figure 20 : cartes résultant de l'interpolation des quatre éléments traces métalliques d'origine anthropique selon les deux types de régression

Question 3

**Quels impacts les dépôts de contaminants à
longue distance ont-ils sur le
fonctionnement des microsystemes
sphaignes-microorganismes ?**

3.1. Contexte et Objectifs

L'évaluation de l'impact des perturbations telles que celles engendrées par les dépôts d'éléments nutritifs et de contaminants est une question récurrente en écologie. La problématique de l'évaluation environnementale pose notamment la question du type de stress à considérer, du niveau d'organisation biologique à étudier, ainsi que des échelles spatiales et temporelles à prendre en compte. Du point de vue théorique, la situation idéale consisterait à étudier les situations les plus proches de la réalité, c'est à dire le plus généralement à suivre l'impact croisé d'une multitude de stress à l'échelle d'un écosystème complexe. Le problème est qu'un tel suivi nécessiterait de mettre en œuvre des moyens financiers très importants sur de longues périodes. Pour cette raison, la plupart des travaux en écotoxicologie se limitent à l'étude d'un ou de quelques modèles biologiques soumis à un nombre restreint de contaminants. De fait, ces recherches peuvent être qualifiées de peu réalistes dans la mesure où elles n'étudient pas les synergies entre les stress et où elles ne tiennent pas compte des interactions entre les organismes vivants.

Dans le cas des pollutions diffuses et de faible intensité, la problématique de l'évaluation de l'impact des stress est encore plus difficile à appréhender. En effet, les niveaux de pollutions sont très faibles et leurs effets sont souvent considérés individuellement. En conséquence, le plus souvent, les études aboutissent à la conclusion que cette pollution de faible intensité n'a pas d'effet mesurable sur l'environnement. En réalité, l'impact de ces pollutions reste encore très méconnu. Le cas de la pollution à longue distance est tout à fait emblématique de cette question. En effet, il s'agit le plus souvent de pollutions chroniques, multiples, de faible intensité, qui sont susceptibles d'affecter le fonctionnement d'écosystèmes isolés, y compris de milieux naturels protégés et considérés comme non perturbés, mais qui n'ont jusqu'à présent quasiment pas fait l'objet d'étude.

Une solution, développée depuis plusieurs années par notre équipe, pour prendre en compte la complexité des systèmes et des contaminations, tout en limitant les difficultés liées à la prise en compte des échelles spatiales et temporelles consiste à étudier des micro-écosystèmes miniatures tels que ceux formés par les Bryophytes et leurs micro-organismes associés. L'avantage principal de ces micro-écosystèmes, outre que les bryophytes sont des bio-indicateurs reconnus (Onianwa P., 2001 ; Harmens *et al.*, 2010 ; Fabure *et al.*, 2010), est que les communautés microbiennes des mousses sont constituées de plusieurs dizaines d'espèces de microorganismes appartenant à des niveaux trophiques différents (Meyer *et al.*, 2010a, 2013 ; Jasey *et al.*, 2013). De plus, la vitesse de reproduction très élevée des microorganismes permet d'évaluer les effets générationnels au cours de période de temps relativement courts, de l'ordre de la semaine ou du mois. En ce sens, ces communautés microbiennes doivent pouvoir fournir des informations permettant de mieux comprendre le fonctionnement des écosystèmes de plus grande taille, mais aussi de pouvoir améliorer la qualité d'évaluation des effets des contaminations complexes et multiples sur les milieux naturels.

Les questions auxquelles nous avons cherché à répondre ont été les suivantes :

- Peut-on utiliser les interactions complexes entre organismes pour évaluer l'impact des perturbations ? Dans ces conditions, comment redéfinir la notion de bioindication ?
- Quel est l'impact des dépôts de contaminations de faible intensité sur le complexe sphaignes-microorganismes *in situ* et en conditions contrôlées ? Quels sont les meilleurs bioindicateurs microbiens ?

- Les contaminations modifient-elles la relation hôte-parasite à l'échelle microbienne ?

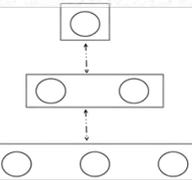
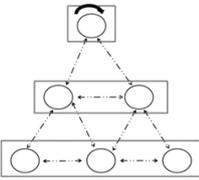
Par ailleurs, nous avons utilisé le large panel d'échantillons prélevés dans le cadre de ce programme de recherche pour étudier la capacité des amibes à thèque, un groupe de prédateurs microbiens dominant dans les sphaignes, à utiliser les particules (naturelles et anthropiques) d'origine atmosphérique pour construire leur enveloppe minérale (collaboration avec l'université de Lille 1). L'intérêt de ce travail est notamment de pouvoir ensuite utiliser les amibes à thèque en tant qu'indicateurs des paléopollutions.

3.2. Réflexions sur les notions de bioindication et de biointégration

Les écosystèmes sont soumis à de multiples contaminations chimiques et physiques qui agissent en interactions sur les systèmes biologiques. L'identification d'indicateurs du fonctionnement et de la stabilité des écosystèmes est un enjeu essentiel à la fois pour les scientifiques et les utilisateurs finaux (gestionnaires,...). Depuis plusieurs années, les écologues ont élaboré des indicateurs fondés sur différents niveaux d'organisation du monde vivant : organismes, populations ou communautés (essentiellement végétales) (Tableau 6). Des travaux plus récents ont porté sur des indicateurs plus complexes basés sur les interactions entre groupes fonctionnels ou entre espèces afin d'obtenir des indicateurs plus proches de la réalité du fonctionnement de l'écosystème et de l'impact de la multi-exposition (Tableau 6).

Cependant, si la notion de bioindication ne varie pas selon les auteurs ("utilisation des réponses des organismes vivants lorsqu'ils sont exposés à des contaminants, dans le but de prédire les effets nocifs dus à ce type d'exposition"), le terme de bioindicateur varie selon les objets d'études. Ainsi pour Markert (2007), qui base sa définition sur le modèle animal, un bioindicateur est un organisme ou une part d'un organisme ou une partie d'une communauté qui contient des informations sur la qualité de l'environnement. Pour Fränzle (2006), les bioindicateurs peuvent être divisés en deux groupes : les organismes qui ont une réponse rapide aux polluants ("effect indicators") et les organismes accumulateurs ("accumulation indicators"). Pour Garrec et Van Haluwyn (2002), qui ont essentiellement travaillé sur des végétaux, un bioindicateur est un organisme qui présente des altérations visibles au niveau physiologique ou morphologique. La notion de biointégration varie elle aussi selon les auteurs et leurs objets d'études. Ainsi Garrec et Van Haluwyn (2002) définissent la biointégration comme un changement caractérisé par une apparition/disparition d'espèces ou par des variations de densité d'une population ou d'une communauté. Pour Fränzle (2006), la biointégration désigne l'intégration d'un polluant dans une biocénose ou un écosystème, mesurée par un changement dans la structure des communautés. Ainsi selon ces deux définitions, le terme de biointégré ne va pas représenter le même paramètre (apparition/disparition d'espèces végétales dans une communauté ou mesure des dynamiques trophiques dans les écosystèmes). Ces quelques exemples prouvent que ces notions de bioindication, bioindicateurs, biointégration et biointégré sont complexes, adaptables aux objets d'études (végétaux, animaux) et que les limites entre ces notions sont floues et variables selon les auteurs.

Tableau 6 : Définition des concepts de bioindicateur et biointégrateur (adapté de Thompson et al., 2012)

Biomonitoring	BIOINDICATORS			BIOINTEGRATORS	
Units of study	Organism X	Population  Sp.x	Community 	Functional groups 	Biocenosis 
Ecological Sciences	Eco-physiology	Population ecology	Community Ecology	Interaction ecology	Ecosystem ecology
Primary interest	Intra-individual and individual variations	Spatial and temporal variability of species or populations		Stocks, flows, and dynamics of energy, biomass, and chemical elements	Structure and dynamics of species' relationship and abundance.
Usual approach	Analyse of genomic, molecular, physiologic and anatomy	Analyse patterns of individuals or populations across relatively few of many co-occurring species in time and space		Analyse fluxes of energy and material within ecosystems containing few functional groups or communities and their environment	Analyse biomass distributions and energetic flows within systems containing many species and their environment
Underlying processes	Allometry Mutation	Individuals behaviour, population growth	Appearance, extinction Resistance, sensitivity Adaptative process	Chemical processes, thermodynamics, mass conservation, ecological stoichiometry, Productivity Evolutionary process	Feeding behaviour and metabolism, consumer-resource interactions, communities assembly and disassembly, diversity, complexity and productivity

Nous proposons de redéfinir ces concepts en se basant sur des concepts écologiques et sur l'approche utilisée pour définir ces indicateurs (Tableau 6) :

- **Bioindication** : utilisation de la réponse d'un organisme, d'une population ou d'une communauté, mesurée à l'aide de différents outils (biomarqueurs, bioessais, bioaccumulation, PICT,...), afin de mettre en évidence une perturbation dans un écosystème.
- **Biointégration** : utilisation de la réponse de la structure de la biocénose, à travers des modifications d'interactions entre organismes ou groupes fonctionnels, mesurée à l'aide de différents outils écotoxicologiques ou mathématiques (biomagnification, les indices de réseaux, les indices trophiques...), afin de mettre en évidence une perturbation dans un écosystème.

Au cours de ce programme de recherche, nous avons cherché à mettre en évidence l'intérêt de l'utilisation du microécosystème « Sphaignes-microorganismes associés » comme bioindicateur mais également biointégrateur de dépôt de contaminants inorganiques (ETM) et organiques (HAP) à longue distance (Meyer *et al.*, 2013).

3.3. Impact de la contamination en ETM et en HAP sur le complexe sphaignes-microorganismes associés (Etude *In situ* 1)

Introduction

L'impact des contaminants sur le microécosystème « sphaignes-microorganismes associés » ne devait être étudié que dans le cadre de l'étude en conditions contrôlées. Cependant, lors de l'échantillonnage, le choix a été fait de réaliser tous les prélèvements de microorganismes pour d'éventuelles études complémentaires. L'implication d'un chercheur ayant un poste d'ATER durant l'année 2012 a permis d'ajouter des analyses supplémentaires dans le programme de recherche. Pour des raisons de temps, nous avons choisi de nous focaliser sur les communautés microbiennes des tourbières des Vosges. En effet, le secteur des Vosges présentait de nombreux avantages, à savoir :

- le plus grand nombre de tourbières échantillonnées (13),
- une zone géographique relativement homogène du point de vue de la géologie,
- le plus fort gradient altitudinal (340m à 1249m) pour les tourbières échantillonnées,
- des taux de contaminations en éléments traces métalliques plus élevés dans certaines tourbières vosgiennes par rapports aux autres sites étudiés.

L'objectif de cette étude a été d'évaluer l'impact des ETMs et des HAPs sur le complexe sphaignes-microorganismes. Cette étude est la première à prendre en compte les interactions sphaignes/microorganismes/éléments-nutritifs/contaminants le long d'un gradient altitudinal marqué.

Méthodes d'analyse

- Dosage Phénols totaux /phénoloxidasés

Les métabolites secondaires sont impliqués dans de nombreuses interactions des plantes avec leur environnement notamment dans leurs mécanismes de défense. Parmi ceux-ci, les polyphénols constituent l'une des familles les plus importantes, tant par leur diversité que par leur ubiquité dans le règne végétal. Des études précédentes ont montré pour la première fois l'importance de la production des polyphénols par les sphaignes dans la régulation des communautés de microorganismes associés et de l'importance de doser simultanément leurs enzymes dégradantes, les phénol-oxydases (Jassey *et al.*, 2011a). Les phénol-oxydases regroupent plusieurs familles d'enzymes (Laccases, peroxydases, cathecol oxydases, tyrosinases...) impliquées dans la dégradation des polyphénols mais aussi dans leur transformation en composés humiques. Au niveau environnemental les phénol-oxydases sont également impliquées dans la dégradation de polluants organiques et en particulier les hydrocarbures aromatiques polycycliques. Nos précédents travaux sur l'ensemble des activités phénol-oxydases des sphaignes ont montré que les activités de type peroxydases sont les plus sensibles aux modifications de l'environnement et donc constituent un marqueur biochimique pertinent. Le choix a donc été de réaliser un dosage « global » des polyphénols et des peroxydases pour prendre en compte l'ensemble des composés et tester l'hypothèse d'une stimulation du métabolisme secondaire des sphaignes lors d'un changement environnemental (d'altitude ou de polluants).

Les composés phénoliques totaux hydrosolubles des sphaignes ont été dosés par la méthode globale de Folin-Ciocalteu avec l'acide gallique comme composé phénolique standard (Jassey *et al.*, 2011a). Les phénols contenus dans 0,05g de MS de sphaignes lyophilisées ont été extraits dans 10 ml d'eau pendant 3 heures et dosés à 760 nm. Les concentrations obtenus sont exprimés en mg de composés phénoliques équivalent acide gallique par gramme de matière sèche de sphaignes.

Les activités enzymatiques ont été mesurées en utilisant la méthode mise au point par Jassey *et al.*, (2012). Les enzymes sont extraites à partir de 3 g de sphaignes fraîches et purifiées par dialyse dans un tampon phosphate. L'activité peroxydase est ensuite mesurée en utilisant le diaminofluorène (DAF) comme substrat et l'eau oxygénée comme catalyseur de la réaction. L'activité enzymatique est exprimée en unité enzymatique (1UE = 1 μmol de DAF oxydée par minute) par gramme de matière sèche.

- Dénombrement des microorganismes

Au centre de chaque tourbière, trois réplicats de dix capitula de sphaignes ont été prélevés et fixés dans une solution de glutaraldéhyde à 2% en concentration finale pour l'extraction et l'analyse des communautés microbiennes.

Les communautés microbiennes ont été extraites de *Sphagnum capillifolium* par la méthode utilisée par Jassey *et al.*, (2012). Les microalgues, cyanobactéries, protozoaires, rotifères, nématodes et champignons ont été identifiés and quantifiés par microscopie inversée (Olympus IX71) selon la méthode d'Uthermöhl's (1958). La densité bactérienne a été estimée par cytométrie de flux (FACSCalibur flow cytometer, Becton Dickinson) après coloration par du SYBR Green I (1/10,000 en concentration finale). Les biovolumes de chaque espèce ont été déterminés par assimilation de la forme des espèces à une forme géométrique. Ces biovolumes ont ensuite été convertis en μg de carbone (μgC) en utilisant les facteurs de conversions suivant : bactéries, $1\mu\text{m}^3 = 5.6 \times 10^{-7} \mu\text{gC}$ (Bratback, 1985); cyanobactéries et algues, $1\mu\text{m}^3 = 1.2 \times 10^{-7} \mu\text{gC}$; ciliés et amibes à thèque, $1\mu\text{m}^3 = 1.1 \times 10^{-7} \mu\text{gC}$ (Weisse *et al.*, 1990); champignons, $1\mu\text{m}^3 = 2.5 \times 10^{-7} \mu\text{gC}$; nématodes et rotifères, $1\mu\text{m}^3 = 1.25 \times 10^{-7} \mu\text{gC}$ (Gilbert *et al.*, 1998). Les données sont exprimées en μgC par gramme de *S. capillifolium* sec ($\mu\text{gC.gMS}^{-1}$).

Résultats obtenus

- Concentrations en ETMs et HAPs le long d'un gradient altitudinal

Le fonctionnement du microécosystème « sphaigne –microorganismes associés » a été étudié, le long du gradient altitudinal rencontré dans les Vosges (340 m à 1249 m) (résultats issus de l'étude *in situ* 1).

Afin de pouvoir construire les réseaux d'interactions au sein des communautés microbiennes, un nombre suffisant de réplicats était nécessaire. Les tourbières échantillonnées ont donc été regroupées par deux en fonction de leur altitude (alt), avec l'hypothèse que les contraintes environnementales sont les plus similaires à des altitudes proches. Ainsi cinq groupes de tourbières ont été constitués et notés : alt1 (340 et 380m), alt 2 (790 et 791m), alt3 (876 et 920m), alt 4 (1010 et 1150m) et alt 5 (1218 et 1249m).

Les éléments suivants ont été pris en compte dans l'analyse, à savoir :

- neuf ETMs (Fe, Pb, Cd, Cu, Zn, Ti, Cr, V, Al) utilisés dans l'analyse du patron de dépôts des éléments traces métalliques dans le Nord-Est de la France,
- cinq HAPs (Phénanthrène, Fluoranthène, Pyrène, Chrysène et le Benzo (b)fluoranthène) dont les concentrations ont été supérieures aux limites de quantification, et
- quatre nutriments (C, N, S, P).

Les tourbières ainsi agrégées ont été caractérisées en fonction des dépôts de chaque classe de contaminants à l'aide d'une ACP sous contrainte afin de mettre en évidence les contaminants remarquables dans les tourbières pour chaque altitude (Figure 21 et 22).

L'ACP sous contrainte concernant les éléments nutritifs (C, N, S, P) ne montrait pas de différence de concentrations significative entre les différentes altitudes (résultats non présentés).

La figure 21 représente la corrélation entre les variables ETM ainsi que la carte factorielle de l'ACP sous contrainte selon les 2 premiers axes de l'analyse (représentant respectivement 87% et 11% de l'inertie totale). Dans l'analyse contrainte par l'altitude, les deux premiers axes expliquent 35,95% de la variance ($p=0,031$) au sein des données agrégées comme précédemment expliquées. L'axe 1 ségrège les éléments d'origine terrigène et certains éléments d'origine anthropique (Pb, Cd) (Figure 21) tandis que l'axe 2 est principalement tiré par le cuivre et le zinc, deux éléments d'origine essentiellement anthropique. Les tourbières alt1 et alt 3 sont ainsi caractérisées par des teneurs élevées en Pb, Cd, Cu, Zn, Inversement, les autres tourbières du gradient (alt 2, alt 4 et alt 5) sont essentiellement caractérisées par un dépôt d'origine naturelle. Néanmoins étant donné la variabilité au sein des tourbières d'altitude 3, une différence significative peut seulement être établie entre les teneurs en métaux à l'altitude 1 et aux altitudes 2, 4 et 5.

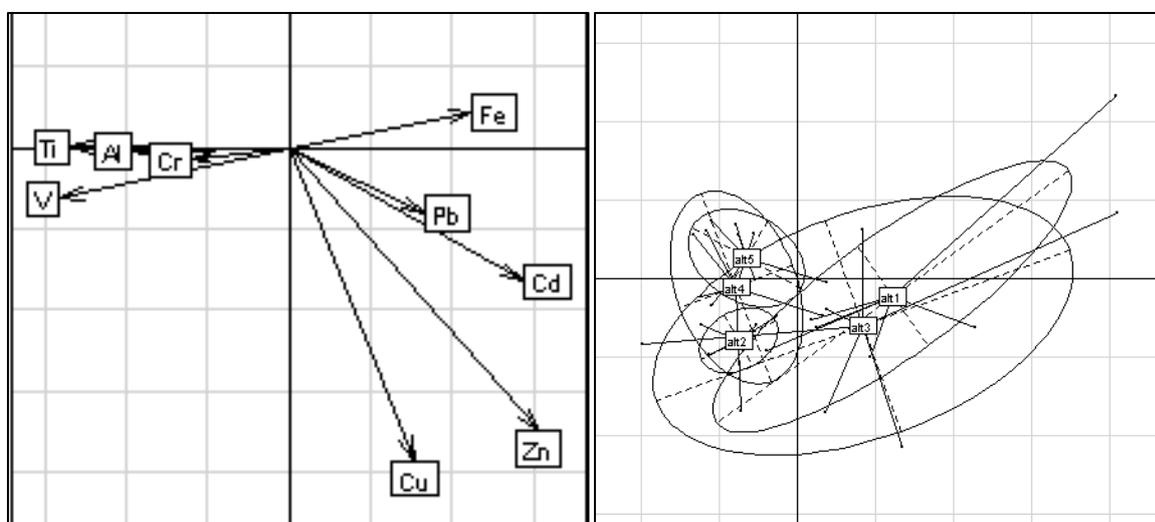


Figure 21 : Corrélation des vecteurs variables [Fe], [Pb], [Cd], [Cu], [Zn], [Ti], [Cr], [V] et [Al] et carte factorielle de l'ACP inter basée sur l'altitude.

La figure 22 représente la corrélation entre les variables HAP ainsi que la carte factorielle de l'AFC sous contrainte selon les 2 premiers axes de l'analyse (représentant respectivement 88% et 10% de l'inertie totale). Dans l'analyse contrainte par l'altitude, ces deux axes expliquent 31,66% de la variance ($p=0,019$). La figure 22 montre que les tourbières de plus basses altitudes (3 groupes) sont plutôt caractérisées par leur teneur en Fluoranthène et Pyrène tandis que les tourbières d'altitudes plus élevées sont caractérisées par des dépôts de

Chrysène, Phénanthrène et Benzo (b)fluoranthène. Cependant, étant donné la variabilité au sein de chaque groupe, seules les tourbières des altitudes 1 et 5 sont clairement discriminées.

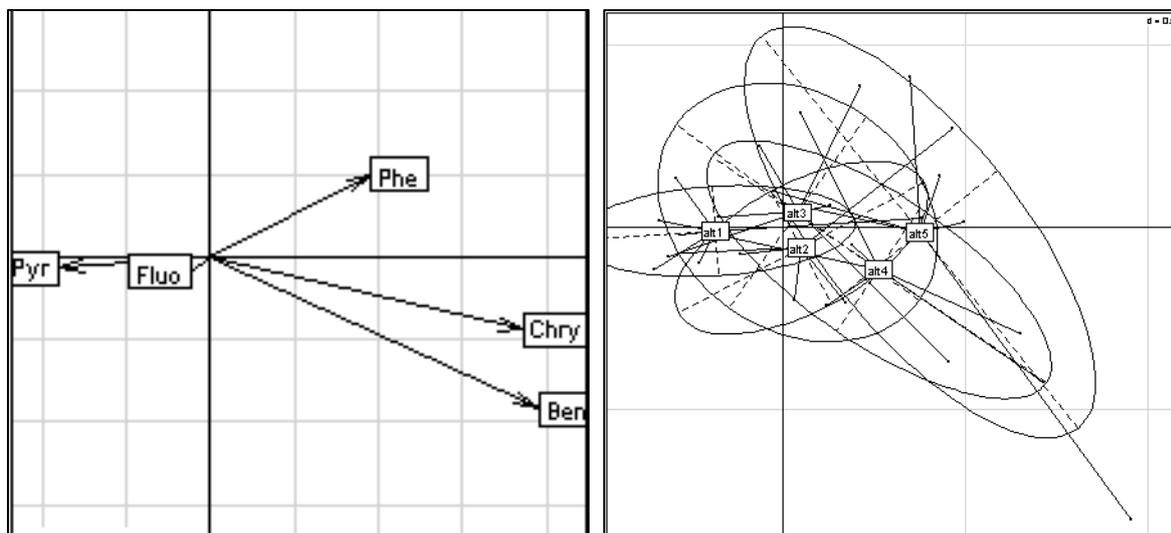


Figure 22 : Corrélation des vecteurs variables [Phénanthrène], [Fluoranthène], [Pyrène], [Chrysène] et [Benzo (b)fluoranthène] et carte factorielle de l'AFC inter basée sur l'altitude.

- Relations composés phénoliques des sphaignes et dépôts atmosphériques

Les concentrations en composés phénoliques sont **négativement corrélées avec l'altitude** et passent de 0,9 à 1,9 mg.g⁻¹ MS selon l'**altitude** ($r = -0,56$, $p = 0,001$). De plus, des corrélations de Pearson montrent que les teneurs en composés phénoliques dans les sphaignes sont positivement corrélées aux concentrations de certains nutriments : azote ($r = 0,51$, $p = 0,004$) et phosphore ($r = 0,48$, $p = 0,007$) (Figure 23).

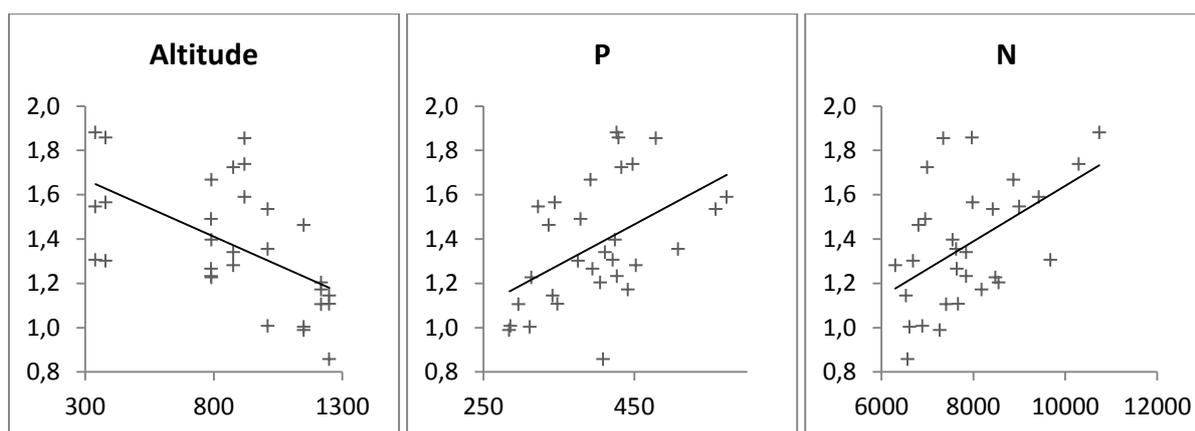


Figure 23 : Corrélation entre les concentrations en composés phénoliques et les variables environnementales altitude (m), Phosphore (mg.g⁻¹MS) et Azote (mg.g⁻¹MS).

Les dépôts atmosphériques étant nombreux et de différents types, une analyse en composante principale (ACP) a été effectuée comprenant les mesures de phénols et les scores des deux premiers axes des AFC, précédemment présentées, relatives aux teneurs en

ETMs et HAPs. Ces scores représentent des valeurs synthétiques de la contamination pour les groupes de tourbières. **L'étude des corrélations entre variables issues de cette ACP (les deux premiers axes expliquent respectivement 41% et 17% de l'inertie totale des données)** montre une relation positive entre les scores de l'axe 2 « ETM » (caractéristique des éléments anthropiques) ainsi que les scores de l'axe 1 « HAP » et une relation négative entre ces indices de contamination et la concentration en composés phénoliques. Par ailleurs, la teneur en composés phénoliques est expliquée par un modèle linéaire avec pour variables indépendantes l'axe 2 « ETM » et l'axe 1 « HAP », prenant en compte les interactions entre les ETMs d'origine anthropique et les 4 HAPs (Fluoranthène, Pyrène, Chrysène, Benzo(b)fluoranthène).

- Relation composés phénoliques des sphaignes, dépôt atmosphérique et structure de la communauté microbienne

Une analyse de redondance (RDA) sur les matrices contaminants (variables ETM, HAP, Phénol) et communauté microbienne a montré que le meilleur modèle expliquant la variabilité de la structure de la communauté dans les Vosges est constitué de 3 variables : la concentration en composés phénoliques et les concentrations en Zn et Cu (éléments d'origine anthropique). **Ces 3 variables expliquent 41% de la variance de la communauté microbienne** ($p=0,001$, test de permutation de Monte-Carlo). La figure 24 illustre les corrélations entre ces 3 variables et les différents groupes microbiens selon les deux premiers axes canoniques (expliquant respectivement 31% et 6%). L'axe 1 est expliqué par les concentrations en phénols tandis que l'axe 2 est expliqué par les concentrations en Zn et Cu. La RDA montre que les communautés d'algues (producteur primaire), d'amibes à thèque et de ciliés (prédateurs) sont positivement corrélées avec les concentrations en phénols tandis que les communautés de cyanobactéries (producteurs primaires) et de champignon (décomposeurs) sont positivement corrélées avec le Zn et négativement avec le Cu.

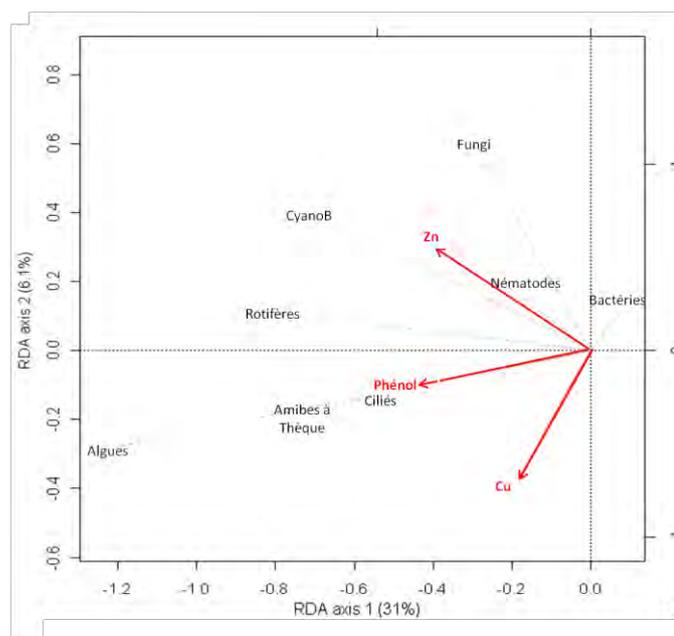


Figure 24 : Analyse de redondance (axes 1 et 2) entre la structure de la communauté microbienne et les contaminants (ETM, HAP, Phénol) après sélection des variables explicatives

- Relations entre composés phénoliques de la sphaigne et producteurs primaires microbiens

Le lien entre composés phénoliques et structure de la communauté microbienne photosynthétique a été plus particulièrement étudié. La structure des **communautés d'algues étant également dépendante de la disponibilité en nutriments dans le milieu, l'azote et le phosphore ont été conservé dans l'analyse** bien que ceux-ci ne soient pas limitant dans cette étude. Le modèle linéaire algues~[Phenol] + [N] + [P] est celui qui explique le mieux la variation de biomasse relative des microorganismes photosynthétiques (52,34%).

De plus, il existe une modification de dominance des espèces d'algues et de cyanobactéries en relation avec les concentrations en phénols et nutriments. Alors que les tourbières situées entre 340 et 920m sont dominées par *Cylindrocystis brebissonni* (83%) en termes de biomasse, au-delà de cette altitude, la biomasse de cette espèce diminue et celles de *Gloecystis gigas* et *Chlamydomonas sp* augmentent. A partir de 920m, ces trois espèces co-dominent dans le milieu : *Cylindrocystis brebissonni* (30%), *Gloecystis gigas* (23%) et *Chlamydomonas sp* (29%) (Figure 25).

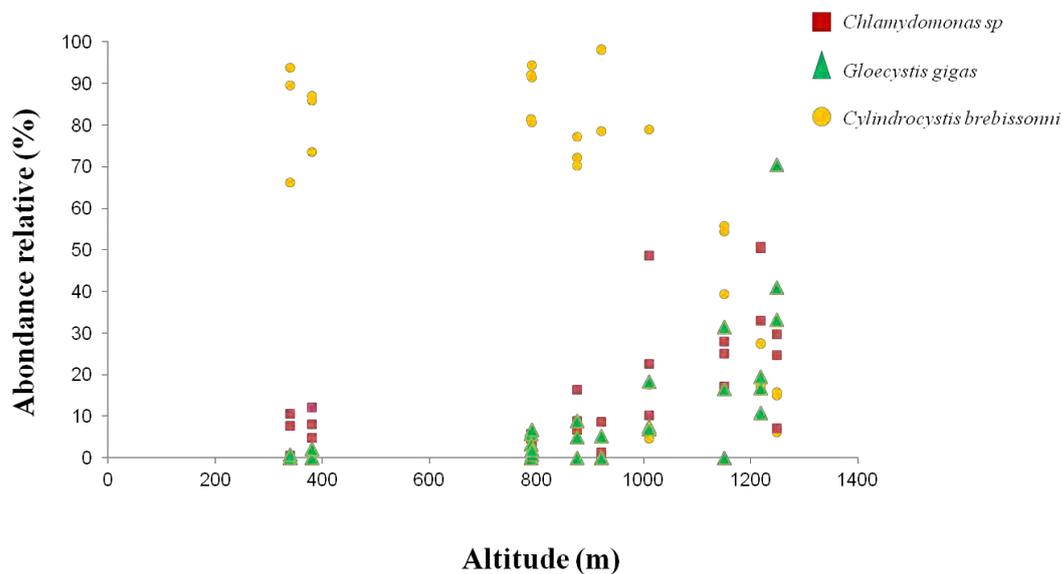


Figure 25 : Evolution de l'abondance relative (%) des trois espèces principales d'algues le long du gradient altitudinal

Ainsi le gradient altitudinal met en évidence un changement de dominance dans la communauté algale lié à une modification des niches écologiques des espèces en relation avec les concentrations en composés phénoliques et en nutriments. Ces résultats suggèrent que les phénols exercent une régulation de type « bottom-up » **sur l'écosystème. Ce changement de fonctionnement de l'écosystème est également mis en évidence par la diminution du rapport Autotrophes/Hétérotrophes microbiens qui est significativement corrélés avec l'altitude (p=0,04).**

- Changement dans les patrons d'interactions écologiques au sein de la communauté d'amibes à thèque

Pour compléter l'analyse précédente, nous avons utilisé des méthodes d'analyse des réseaux sur les données de production de phénols par les sphaignes et sur la **communauté d'amibes**

à thèque. Les réseaux d'interaction des amibes ont donc été construits pour chaque niveau d'altitude le long du gradient. Ces réseaux, basés sur les corrélations significativement différentes de ce qui pourrait être obtenu de façon aléatoire, reflètent la résultante des interactions (positive, négative ou neutre) prenant place entre chaque couple d'espèces au sein de la communauté. En d'autres termes, ce type d'analyse permet de déterminer l'existence d'un lien significatif (co-occurrence ou co-exclusion) entre deux espèces, ou l'absence de lien (pas de corrélation positive ou négative). Il est ensuite possible de calculer des indicateurs de fonctionnement (nombre total de lien positifs ou négatifs, nombre de liens réalisés/nombre de liens possibles, etc ...).

Ainsi, alors que sur le gradient d'altitude, les réseaux d'interactions des amibes à thèque ne montrent pas d'évolution conjointe, la confrontation aux différents proxy caractérisant la pollution à longue distance (ETM et HAP) a permis de mettre en évidence une relation positive significative entre la concentration en Cuivre et la connectance des réseaux ($R^2 = 0,95$; p-value: 0,003), paramètre qui reflète leur niveau de complexité (Figure 26).

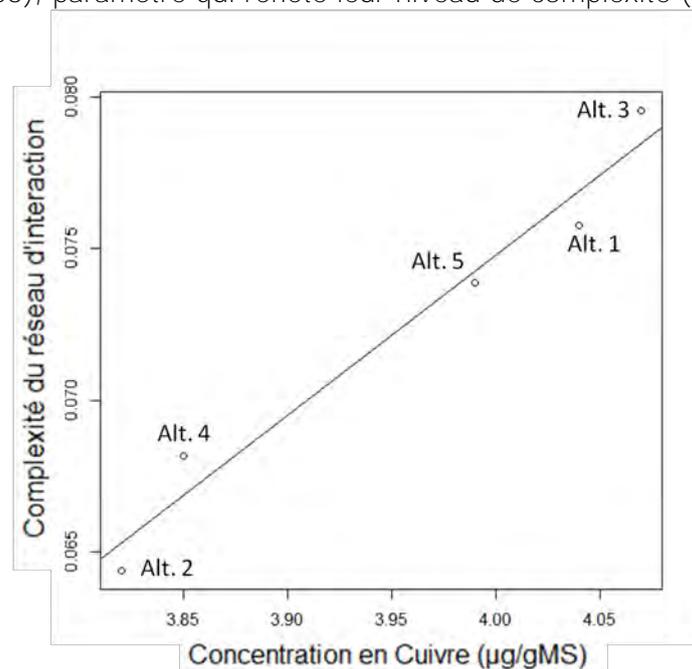


Figure 26 : Relation entre la complexité du réseau d'interaction au sein de la communauté d'amibes à thèque et la concentration en cuivre dans les tourbières.

La relation positive observée entre le cuivre et les algues est contre-intuitive, cet élément étant plutôt considéré comme toxique. Cependant, il est important de prendre en compte le fait que la relation Cuivre / complexité du réseau d'interaction des amibes à thèque est indirecte, car les amibes sont des microprédateurs qui intègrent les modifications de l'ensemble des communautés microbiennes. Par exemple, le cuivre lorsqu'il se trouve à des concentrations faibles peut être utilisé comme oligo-élément par les microorganismes photosynthétiques et peut donc favoriser la production de biomasse algale. Comme cette production est une ressource alimentaire pour la communauté d'amibes à thèque, celle-ci pourrait se développer et voir la structure du réseau d'interaction se complexifier.

Ces résultats préliminaires qui font actuellement l'objet d'une thèse au laboratoire Chrono-Environnement semblent confirmer l'hypothèse selon laquelle les contaminations de faible intensité modifient le fonctionnement des systèmes écologiques. Les méthodes utilisées sont très novatrices et ces travaux doivent donc être confirmés par l'analyse de données déjà acquises lors de nos précédentes études ainsi que par des recherches complémentaires.

3.4. Impact de la contamination en ETM, en HAP et en N sur le complexe sphaignes-microorganismes associés (Etude en conditions contrôlées)

Dispositif expérimental

Des colonnes de *Sphagnum capillifolium* et leur litière sous-jacente (20cm de haut et 12cm de diamètre) ont été prélevées dans une tourbière peu affectée par les dépôts atmosphériques (en accord avec les résultats de l'étude *in situ* 1). Les prélèvements ont eu lieu dans la tourbière du Forbonnet incluse de la zone jurassienne (Frasne , coordonnées : 46°49'35"N, 6°10'20"E) en novembre 2011. Après acclimatation, les différents microcosmes sphaignes-microorganismes ont été soumis à des expositions simples et croisées. Un dispositif d'expositions expérimentales a été mis au point pour simuler les expositions *in situ* (Figure 27).

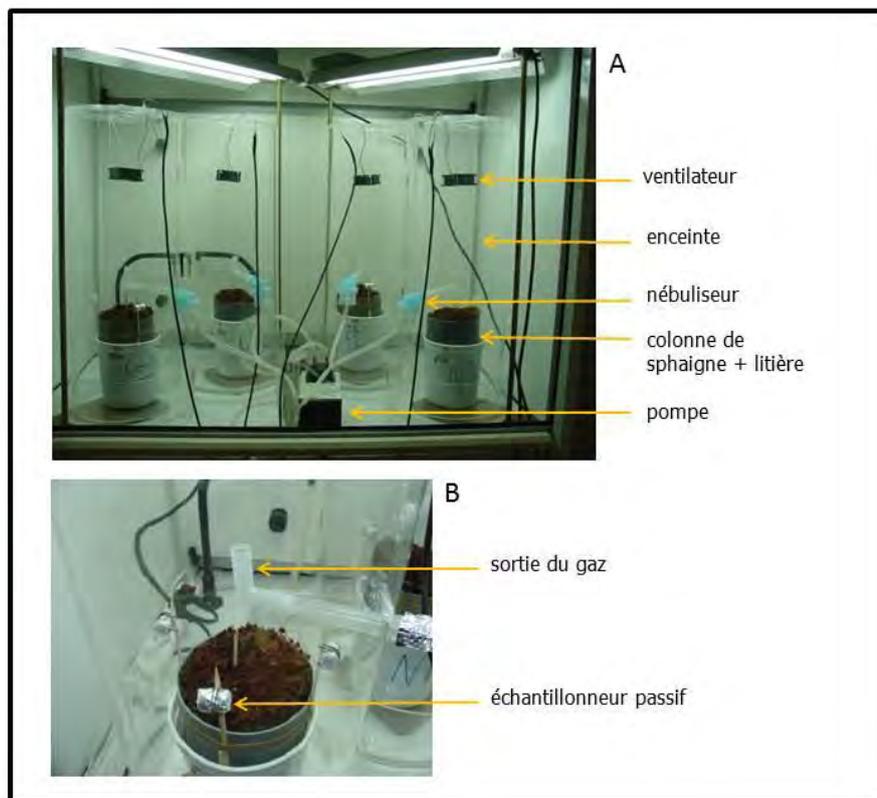


Figure 27 : A) Dispositif expérimental de contamination atmosphérique au phénanthrène B) Détails de l'intérieur de l'enceinte avec un microcosme sphaignes-microorganismes

Sept modalités de traitements ont été appliquées pendant une période de deux mois : témoin (eau), apport d'azote (N); contamination au plomb (Pb); contamination au Phénanthrène (PHE); traitement N/Pb; traitement N/Phe; traitement N/Pb/Phe), avec trois répétitions pour chaque modalité.

La contamination atmosphérique au phénanthrène a été simulée en utilisant un dispositif **d'enceinte de contamination par expositions gazeuses** (Figure 27) validé lors de précédents travaux (Desalme *et al.*, 2013). Une quantification du phénanthrène dans chaque enceinte de contamination a été réalisée par l'utilisation d'échantillonneurs passifs qui ont été mis au point et validés pour ces dispositifs d'exposition en conditions contrôlées (Desalme *et al.*, 2013). Le niveau de contamination appliqué, $11 \mu\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$ correspond à ce qui est mesuré dans des centres urbains avec un important trafic routier (Haffner *et al.*, 2005). Les apports en plomb et en azote ont été réalisés sous forme aérosol par nébulisation au rythme **d'une fois par semaine**. **Le plomb a été amené sous forme de nitrate de plomb afin d'obtenir un apport total de Pb sur la partie (0-3cm) des sphaignes de $15 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MS à l'issue des deux mois d'expérimentation. L'azote a été apporté sous forme de nitrate d'ammonium NH_4NO_3 afin d'obtenir un apport total de $1,15 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ MS à l'issue des deux mois d'expérimentation. Les conditions de température, humidité et luminosité ont été suivies en continu.**

Des échantillons de sphaignes ont ensuite été prélevés pour les analyses d'azote, de Pb et de phénanthrène. Pour la détermination des microorganismes (biomasse, diversité), dix capitula de sphaignes ont été fixés dans une solution de glutaraldéhyde à 2% en concentration finale.

Les biomasses et la diversité des microorganismes ainsi que les concentrations en phénols **dans les sphaignes ont été déterminées en début et en fin d'expérimentation.**

Les concentrations en phénols et les activités phénol-oxydases des sphaignes ont été mesurées sur trois profondeurs :

- 0 – 3 cm correspondants au capitulum et à la litière immédiatement sous-jacente
- 3 – 6 cm correspondants à la litière
- 6 – 9 cm correspondants au début de la zone de décomposition de la litière

Concentrations des sphaignes en plomb, phénanthrène et azote après contamination

- Contamination par le plomb

L'objectif de contamination en plomb ($15 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MS de sphaignes après deux mois d'expérimentation) avait été calculé en fonction des concentrations mesurées à la surface des sphaignes avant le début de l'expérimentation ($0,6 \pm 0,2 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MS). Or, après deux mois d'incubation, les colonnes de *Sphagnum capillifolium* et leur litière sous-jacente dans lesquels aucun apport en plomb n'avait été réalisé présentaient des concentrations en plomb très élevées, du même ordre de grandeur que celles dosées dans les colonnes contaminées en plomb. Une analyse détaillée des résultats montre que le plomb historique contenu dans la partie supérieure de la tourbe (en moyenne $12 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MS à 9 cm de profondeur) a diffusé vers la surface, probablement parce que les mouvements **d'eau, essentiellement horizontaux** en conditions naturelles, sont devenus verticaux dans les colonnes soumises aux expérimentations. Plus précisément, en moyenne 86 % du plomb présent dans la partie 6-9 cm a diffusé vers la couche 6-3 cm, et 46 % vers la couche 0-3 cm, et ce quelle que soit la concentration initiale présente dans la couche 6-9 cm. Ainsi, avec cette diffusion du bas vers le haut, les concentrations initiales présentes en surface au moment du prélèvement ont été multipliées par un facteur 10 dans tous les pots (en moyenne, les échantillons sont passés de $0,6$ à $8,1 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MS entre le prélèvement et la fin de la mise en culture). Les concentrations en plomb dans la tourbe sont relativement proches entre les différents échantillons (teneur moyenne : $8,1 \pm 5,5 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MS). Ces faibles variations pourraient être liées aux conditions antérieures de dépôts et notamment à la microtopographie (zones de

buttes ou zones inondées). Cependant l'une des colonnes présentait une concentration en plomb très élevée ($149 \mu\text{g.g}^{-1}$ MS dans la partie 6-9 cm) probablement liée à une contamination accidentelle (proximité avec un plomb de chasse, par exemple). Si on exclut temporairement cette donnée pour les calculs, les quantités de plomb mesurées en moyenne étaient de : 6,0 ; 5,2 ; 6,0 et 4,7 $\mu\text{g.g}^{-1}$ MS respectivement dans les traitements témoin, N, N/Phe et Phe, contre 10,6 ; 7,2 et 7,1 $\mu\text{g.g}^{-1}$ MS respectivement dans les traitements Pb, N/Pb et N/Pb/Phe. Les colonnes contaminées au plomb ont donc bien accumulé du plomb, mais dans les conditions de contaminations internes via la tourbe, la différence entre colonnes reste très faible, et la colonne la plus contaminée est celle **qui n'a pas reçu de plomb**.

- Contamination par le Phénanthrène

Nous avons fait le choix de réaliser un apport faible en HAP, proche de conditions *in situ* sur un **temps d'expérimentation** qui pouvait apparaître court (deux mois). En effet, ce protocole comportait le risque de ne pas faire apparaître **d'effet**, mais il était crucial que le niveau de contamination gazeuse appliqué corresponde à ce qui est réellement mesuré dans des centres urbains. En résumé, dans les colonnes non contaminées par le phénanthrène, les concentrations en cet élément sont similaires avant contamination ($17,7 \mu\text{g.kg}^{-1}$ MS) et après contamination ($21,5 \mu\text{g.kg}^{-1}$ MS). En revanche, les colonnes contaminées présentent des concentrations beaucoup plus élevées après deux mois de traitement ($630,8 \mu\text{g.kg}^{-1}$ MS). Il **n'existe pas de différence significative** de concentrations en phénanthrène entre les traitements Phe, N/Phe, N/Phe/Pb.

- Contamination par l'azote

Avant traitement, la moyenne des concentrations en azote dans les sphaignes était de $0,74 \text{ mg.kg}^{-1}$ MS. Après traitement, les concentrations étaient de 0,80 ; 0,88 ; 0,86 et 0,92 mg.kg^{-1} MS respectivement dans les traitements sans azote et sans phénanthrène, sans azote avec phénanthrène, avec azote et sans phénanthrène, avec azote et avec phénanthrène. Il **semble donc que l'apport de phénanthrène entraîne une augmentation des concentrations** en azote dans les sphaignes. Une hypothèse possible pour expliquer ce phénomène serait que **l'effet toxique de ce HAP pourrait provoquer la mort des microorganismes présents à la surface des sphaignes et libérer de l'azote microbien utilisé par les sphaignes**.

Réponse phénolique des sphaignes à la contamination

- Pré-analyse des profils enzymatiques et phénoliques des sphaignes

Les analyses des activités enzymatiques et des phénols totaux réalisées sur 3 colonnes avant **le début de l'expérience** (Figure 28) **ont montré que l'essentiel des** activités biologique et métabolique se produit au niveau du capitulum. Les variations quantitatives des peroxydases produites par les sphaignes sont en moyenne de 13 UE.g^{-1} MS et les phénols totaux de $1,5 \text{ mg.g}^{-1}$ MS. Ces résultats sont conformes à des dosages précédemment réalisés *in situ* sur *S fallax* (Jassey *et al.*, 2012). Pour cette raison, les capitulum ont été utilisés pour évaluer **l'impact des traitements de contamination atmosphérique sur le métabolisme des sphaignes**.

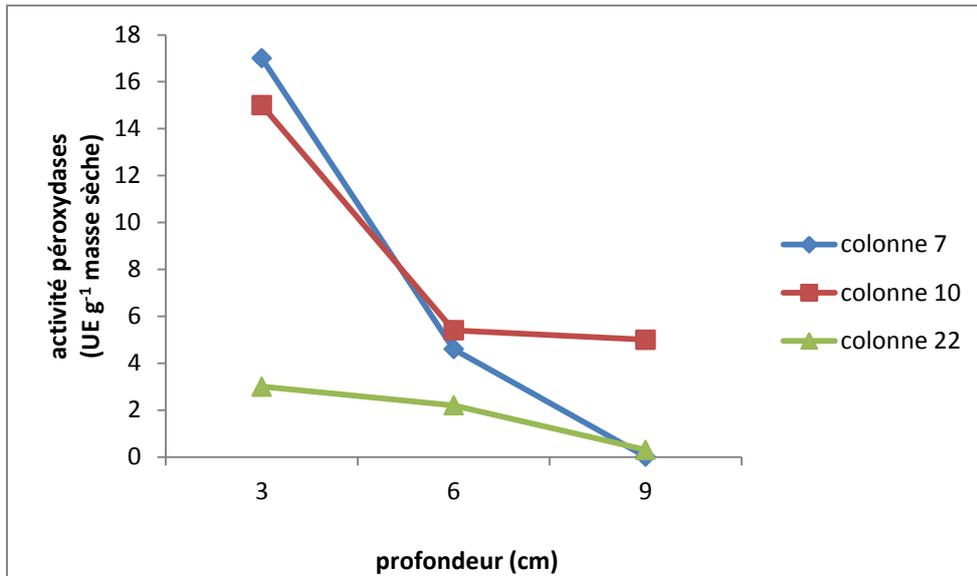


Figure 28: Activité peroxydase dans trois colonnes de sphaigne (pré-analyse avant mise en œuvre du protocole de contamination).

- Analyse de l'expérience de contamination en conditions contrôlées

L'analyse en composante principale montre que les colonnes de sphaignes se distinguent en fonction du traitement appliqué. Les traitements en pollutions organiques (HAP) et N se regroupent et se distinguent des traitements en Pb. Cependant, les résultats ne montrent pas de relations significatives entre les activités biologiques (Phénols et phénol-oxydases) et les traitements (figures 29 et 30).

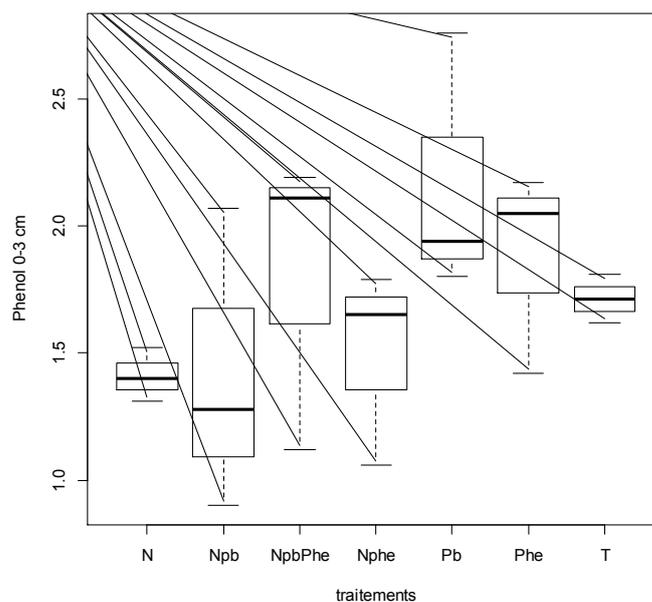


Figure 29 : Concentrations en Phénol dans la partie 0-3 cm des sphaignes pour les différents traitements ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ MS).

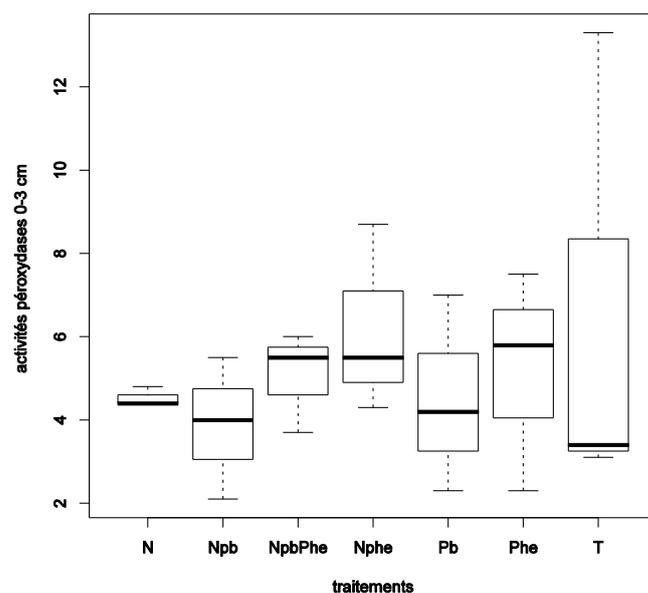


Figure 30 : Activités phénol-oxydase dans la partie 0-3 cm des sphaignes pour les différents traitements (UE.g⁻¹ masse sèche).

Relation phénol, production des phénol-oxydases et communautés microbiennes en réponse aux contaminants

Les résultats obtenus avec les communautés microbiennes montrent une grande variabilité **probablement liée à l'hétérogénéité très forte des échantillons dans la partie 0-3 cm**. Deux échantillons comportent des densités **très élevées d'une espèce qui a pullulé pendant l'expérimentation, rendant** les comparaisons entre traitements non-significatives. Nous avons donc fait le choix de retirer ces échantillons et de ne conserver que deux répliquats par traitement pour effectuer des corrélations. Les résultats obtenus montrent un effet positif du phénanthrène sur la biomasse des amibes à thèque et des champignons ($P < 0,03$) et un effet **néгатif des apports d'azote sur la biomasse des rotifères et des nématodes (respectivement $P < 0,01$ et $p < 0,04$)**. **Aucun effet du plomb n'a pu être mis en évidence** compte tenu des concentrations du même ordre de grandeur observées dans toutes les colonnes (problème déjà évoqué). Cependant, ces résultats doivent être considérés avec précautions compte tenu des difficultés rencontrées au cours de ces expérimentations en conditions contrôlées.

3.5. Influence d'un apport de Pb sur les parasites microbiens

Introduction

Les parasites constituent un groupe fonctionnel de plus en plus étudiés dans les écosystèmes aquatiques et terrestres, cependant il **n'existe pas**, à notre connaissance, **d'études sur l'importance du parasitisme microbien dans les sphaignes, sur son rôle dans la régulation des populations et sur l'effet des contaminants sur la relation prédateurs-proie**. Les études antérieures de diversité des microorganismes présents dans les tourbières (Lara *et al.*, 2010, 2011) ont simplement permis la détection de séquences affiliées à des champignons chytridiomycètes (rhizophydiales) et un clade frère appelé cryptomycota (ou Rozellida). Ces clades regroupent des espèces microbiennes parasites (Lefèvre *et al.*, 2007 ; Letcher *et al.*, 2013) et notamment des parasites affiliées aux Cryptomycota décrites comme endoparasites (Letcher *et al.*, 2013). **Cependant, aucune étude n'a jamais été réalisée directement au microscope pour évaluer l'importance du parasitisme au niveau des microorganismes eucaryotes des sphaignes**. Pour cette raison nous avons élaboré une étude complémentaire focalisée principalement sur les clades de champignons déjà identifiés par Lara *et al.* (2010, 2011). Dans la mesure où il **n'existait pas d'étude sur l'impact des contaminants sur le parasitisme microbien en tourbières**, nous avons mis en place une expérience de contamination au plomb en utilisant des concentrations très **élevées pour essayer d'obtenir des résultats marqués**.

Les deux principaux objectifs étaient (i) **d'identifier** et (ii) de quantifier des espèces parasites des microorganismes présents dans les tourbières. Pour cela, des études de diversité ont été envisagées pour identifier des espèces parasites et évaluer la richesse spécifique de ces **clades mais aussi de définir des hôtes microbiens potentiels**. **D'autre part des observations** microscopiques ont été réalisées afin de détecter et quantifier les parasites associés à leur hôte.

Méthodologie

- Mise en place du dispositif expérimental

Quinze colonnes de tourbe (10 cm de diamètre, 20 cm de profondeur) ont été extraites en octobre 2012 dans un tapis homogènes de sphaigne dans une tourbière ombrotrophe des montagnes Jurassiennes (tourbière du Forbonnet, Frasne, coordonnées : 46°49'35"N, 6°10'20"E). Les échantillons ont ensuite été placés en conditions contrôlées dans un phytotron régulé (température moyenne = 22,1°C). **Le niveau d'eau dans les colonnes a été maintenu constant par l'ajout d'une solution d'eau standardisée (eau de Volvic) dont les concentrations de tous les minéraux sont connues**. Pendant cinq semaines, les colonnes de sphaignes ont été contaminées par **nébulisation d'une solution de nitrate de Pb**. Ainsi, 3,5ml de la solution de $Pb(NO_3)_2$ ont été nébulisés quatre fois par semaine.

L'expérience comprenait 4 traitements : témoin (T1-C0), contamination au plomb à 3,2mg/L (T1-Pb1), 32mg/L (T1-Pb10) et 160mg/L (T1-Pb50). Afin que les apports d'azote soient identiques dans tous les échantillons, un apport d'azote complémentaire a été effectué dans les colonnes témoin sous la forme d'un nébulisat de nitrate d'ammonium NH_4NO_3 .

Après 5 semaines d'exposition, la partie vivante des sphaignes (capitulum) a été prélevée (0 à 3 cm de profondeur) à l'exception du centimètre le plus proche du bord pour éviter un possible biais. Pour chaque échantillon, 15 capitula ont été conservés dans 20 ml de

formaldéhyde à 2% pour de futures analyses biomoléculaires, 10 autres ont été conservés dans 20ml de glutaraldéhyde à 2% pour réaliser des dénombrements microbiens, 10 autres **ont été congelés pour l'identification des organismes parasites par analyse moléculaire et**, pour finir, 10 autres capitula ont été lyophilisés puis congelés pour doser le Pb.

- Détection et identification des espèces parasites par des approches de biologie moléculaire

Le clonage puis le séquençage du gène codant pour la petite sous unité des ribosomes a été initié **après extraction de l'ADN environnemental total. L'ADN total doit être extrait des brins de sphaigne afin de ne pas exclure les espèces endoparasites.** Une mise au point a été réalisée **afin d'obtenir de l'ADN matrice permettant l'amplification du gène cible. L'utilisation d'une lyse cellulaire mécanique à l'aide de billes suivie d'une purification sur colonne (kit NucleoSpin Plant, Macherey-Nagel) a permis d'obtenir une quantité suffisante d'ADN de qualité satisfaisante.** Trois couples amorces PCR ciblant principalement les champignons ont été testées (Tableau 7).

Tableau 7 : Couples d'amorce testées et résultats de l'amplification par PCR

Couple amorce	Résultat PCR	Références
ITS1F-ITS4	+++	Gardes and Bruns, 1993
Fchyt-Rchyt	-	Lefèvre et al., 2010
AU2-AU4	-	Vandenkoornhuyse et al., 2002

- Détection et évaluation de l'importance quantitative des espèces parasites présentes dans les tourbières par microscopie optique à épifluorescence

Les échantillons fixés au formaldéhyde ont été observés au microscope optique (Zeiss Axiovert 200M) afin de détecter des microorganismes potentiellement parasites. Pour cela, une coloration préalable des microorganismes fongiques (ceux principalement recherchés) a été réalisée selon le protocole de Rasconi *et al.* (2009) ; Les brins de sphaignes ont été **pressés et écrasés entre lame et lamelle afin de récupérer l'eau contenue à l'intérieur des brins** (minimum 150 µl), puis 1,5µl de solution stock de CFW (2.5% vol/vol) a été ajouté. Les échantillons ont été incubés à température ambiante et **à l'obscurité** pendant 10 min. La quantité de 10 µl a ensuite été placée **entre lame et lamelle afin d'observer les microorganismes colorés au Calcofluor White** sous lumière Ultra Violette (filtre 340-380 nm).

Résultats obtenus

Les observations montrent la présence de microorganismes potentiellement ectoparasites (Figure 31). En effet, la coloration au Calcofluor a permis de détecter la présence de microorganismes **fongiques accrochés à des hôtes potentiels variés mais l'identification des parasites et des hôtes reste à faire.** Les microorganismes détectés sont de petite taille ce qui **complique l'observation de caractéristiques morphologiques distinctifs. Les résultats de clonage séquençage pourraient permettre de détecter avec précision les microorganismes fongiques présents mais les manipulations initiées n'ont pas pu être finalisées.**

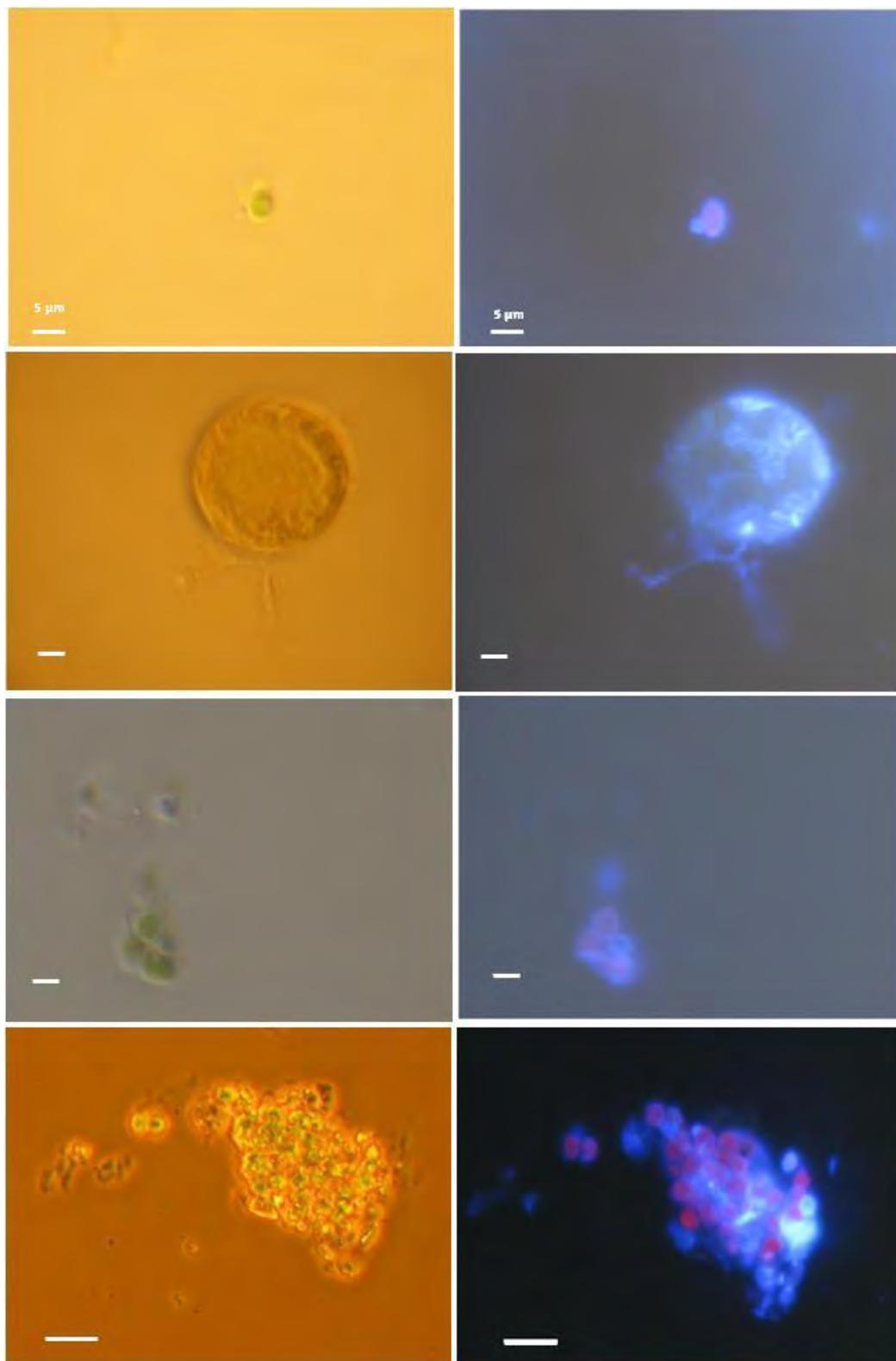


Figure 31 : Observations au microscope optique à épifluorescence de microorganismes fongiques potentiellement ectoparasites. La paroi chitineuse des champignons est colorée au Calcofluor white afin d'apparaître en bleu sous lumière UV. A gauche : lumière blanche. A droite : lumière UV. Echelle : 5 µm

Actuellement, les méthodes de coloration disponibles pour détecter, identifier et quantifier les microorganismes parasites ne s'appliquent qu'aux espèces ectoparasites. La recherche de

microorganismes endoparasites par ces méthodes microscopiques s'est donc révélée très difficile. Néanmoins, des structures ont été observées à l'intérieur des cellules chlorophylliennes de sphaignes prélevées au niveau du capitulum et pourraient révéler la présence de champignons endoparasite appartenant aux cryptomycota (Figure 32). Cependant, ces observations sont à considérer avec précaution car l'identification n'a pu être réalisée du fait de la taille ($<5\mu\text{m}$) et de l'absence de caractéristique morphologique distinctive.

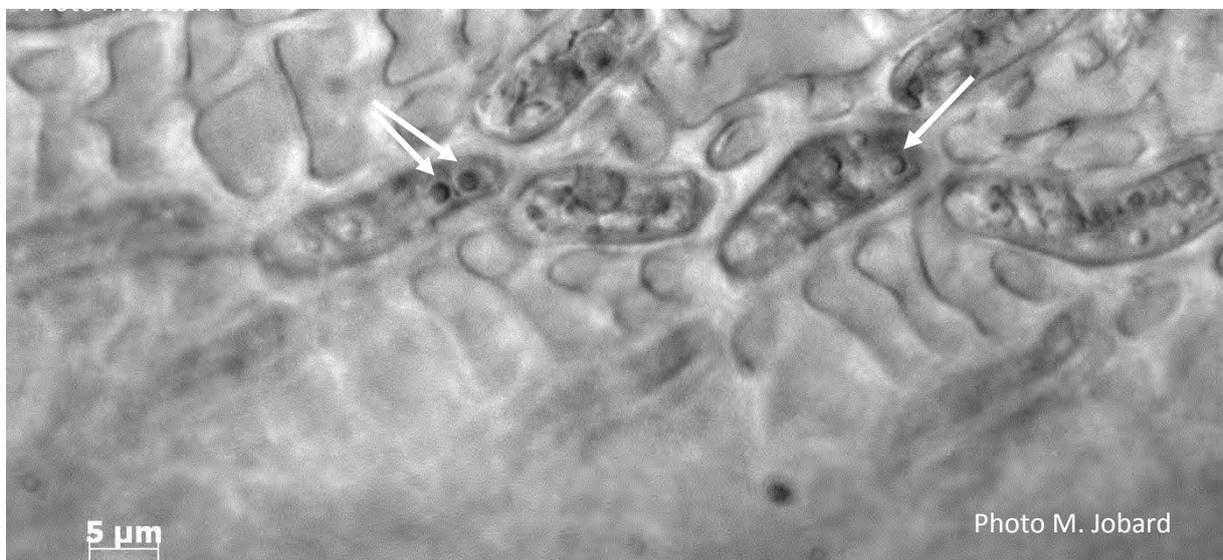
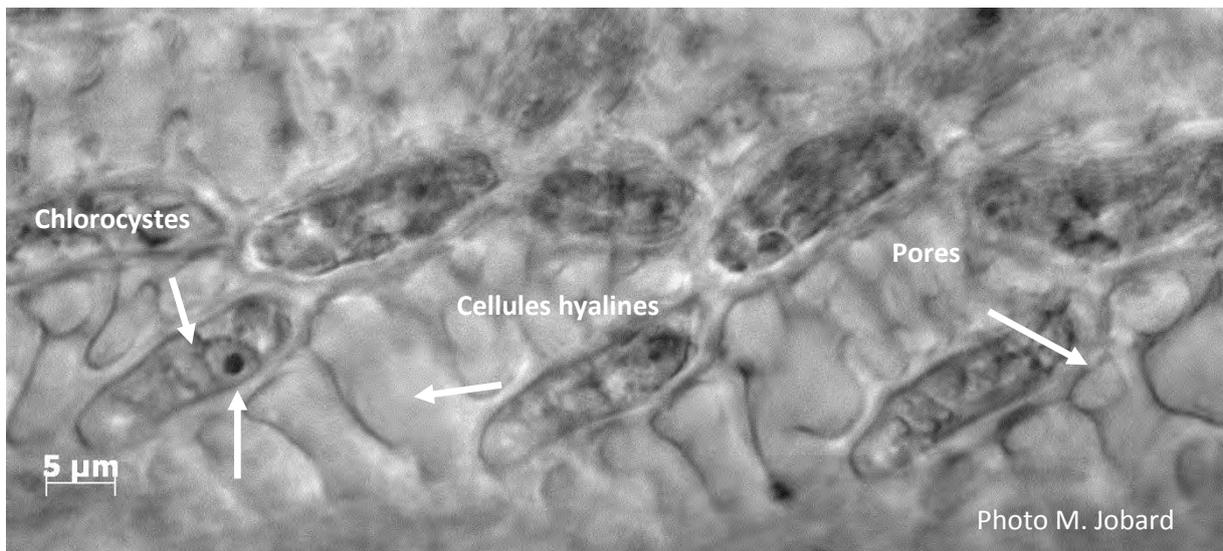


Figure 32: Observations microscopiques (lumière blanche) de fragment de capitulum de sphaigne (échantillon T0) (Crédit photo : Marlène Jobard)

Les microorganismes détectés comme potentiellement parasites se sont révélés peu nombreux dans les échantillons étudiés. Plusieurs raisons peuvent expliquer ces résultats.

D'une part, les microorganismes parasites détectés sont de très petite taille (autour de 5 μm). Ces observations sont cohérentes avec les données bibliographiques puisque la taille des champignons parasites appartenant aux clades chytridiomycètes et cryptomycètes sont en général compris entre 2 et 30 μm (Rasconi *et al.*, 2011 ; Gerphagnon *et al.*, 2013, Letcher *et al.*, 2013). De plus, ces champignons possèdent au cours de leur cycle de vie une phase **parasitaire attachée à l'hôte (celle observable au microscope optique et recherchée au cours de ce projet)** et une phase libre de dispersion plus petite encore et non observable en **microscopie classique**. D'autre part, **l'utilisation de la microscopie et des méthodes de colorations disponibles actuellement ne sont sans doute pas bien adaptées à l'étude des parasites endocellulaires**. En conséquence beaucoup de microorganismes pourraient ne pas être détectés par les méthodes utilisées au cours de ces travaux du fait de leur stade cryptique.

Bien que les premiers résultats acquis au cours de ces travaux suggèrent la présence de microorganismes potentiellement parasites (endoparasites et ectoparasites) dans les échantillons de sphaignes étudiés, les méthodes utilisées de détection et de quantification par microscopie optique disponibles actuellement ne sont probablement pas bien adaptées aux conditions des tourbières sphaignes et aux parasites qui présents dans les sphaignes. En **conséquence, les résultats obtenus restent très partiels et il n'a pas été possible d'obtenir des données en nombre suffisant pour comparer les différents échantillons ayant eu des apports en plomb**. Ces premières observations sont donc à considérer avec précaution et des efforts de développement méthodologique doivent être réalisés avant la poursuite des recherches sur ce sujet.

3.6. Influence des dépôts d'origine atmosphérique sur la composition des thèques d'amibe en relation avec le contexte minéral

Introduction

Les amibes à thèque ou thécamoebiens sont des microorganismes appartenant à plusieurs phylum d'eucaryotes unicellulaires qui ont la caractéristique commune de posséder une enveloppe externe appelée « thèque ». Cette enveloppe est constituée de deux types d'éléments :

- les idiosomes, sécrétés par les amibes
- les xénosomes, incorporées depuis le stock de particules présentes dans l'environnement

Ces microorganismes sont largement étudiés dans les tourbières car ce sont d'excellents indicateurs des conditions du milieu. De plus, leurs thèques sont préservées dans la tourbe après la mort de l'organisme et sont utilisées pour reconstruire les environnements passés. Dans ces conditions, nous avons émis l'hypothèse que la composition des thèques (nature des minéraux) pourrait être un indicateur des dépôts de particules d'origine naturelle et anthropique présents dans les tourbières au moment de la construction de la thèque.

Nous avons donc cherché à répondre aux deux questions suivantes :

- quelle est la diversité des minéraux présents, fixés sur les thèques des amibes se développant dans les tourbières sélectionnées par le programme μ POL-AIR
- quel est le lien entre ces particules et les particules potentiellement véhiculées par l'atmosphère.

Méthode d'analyse de la composition élémentaire des thèques d'amibe

La détermination de la nature des minéraux (idiosomes et xénosomes) a été effectuée à l'aide de cartographies chimiques réalisées par spectrométrie d'énergie (EDS) sur l'analyse des rayons-X émis par les minéraux suite à un bombardement d'électron (20 kV) dans la chambre d'un microscope électronique à balayage environnemental (ESEM-EDS FEI Quanta 200) (Figure 33). Les compositions élémentaires obtenues sont croisées avec les résultats d'analyses ponctuelles effectuées à la microsonde électronique (EPMA CAMECA SX100 à 15kV et 20nA). Ces analyses peuvent être réalisées sur des objets rugueux, non polissables telles que les amibes. La diversité minérale est ensuite déterminée puis quantifiée par analyses d'images.



Figure 33 : Synthèse des techniques analytiques utilisées

Diversité des minéraux

Des amibes ont été prélevées dans le capitulum de *Sphagnum capillifolium* de 9 des 54 tourbières (Cerin, Cormet de Roselend, Croix de Barras, La Seigne, Lac d'en Bas, Les Noires Faignes, Lioche la Truchère, Montagne de la Plate et Verny-des-Brûlons). Ces tourbières ont été sélectionnées en raison de leurs contextes géologiques variés et de la diversité minérale potentiellement élevée. Sur ces amibes la diversité minérale, la taille et la forme des minéraux ont été déterminées. Au total 24 minéraux différents ont pu être observés sur les amibes ce qui constitue le plus grand nombre jamais observé (Figure 34).

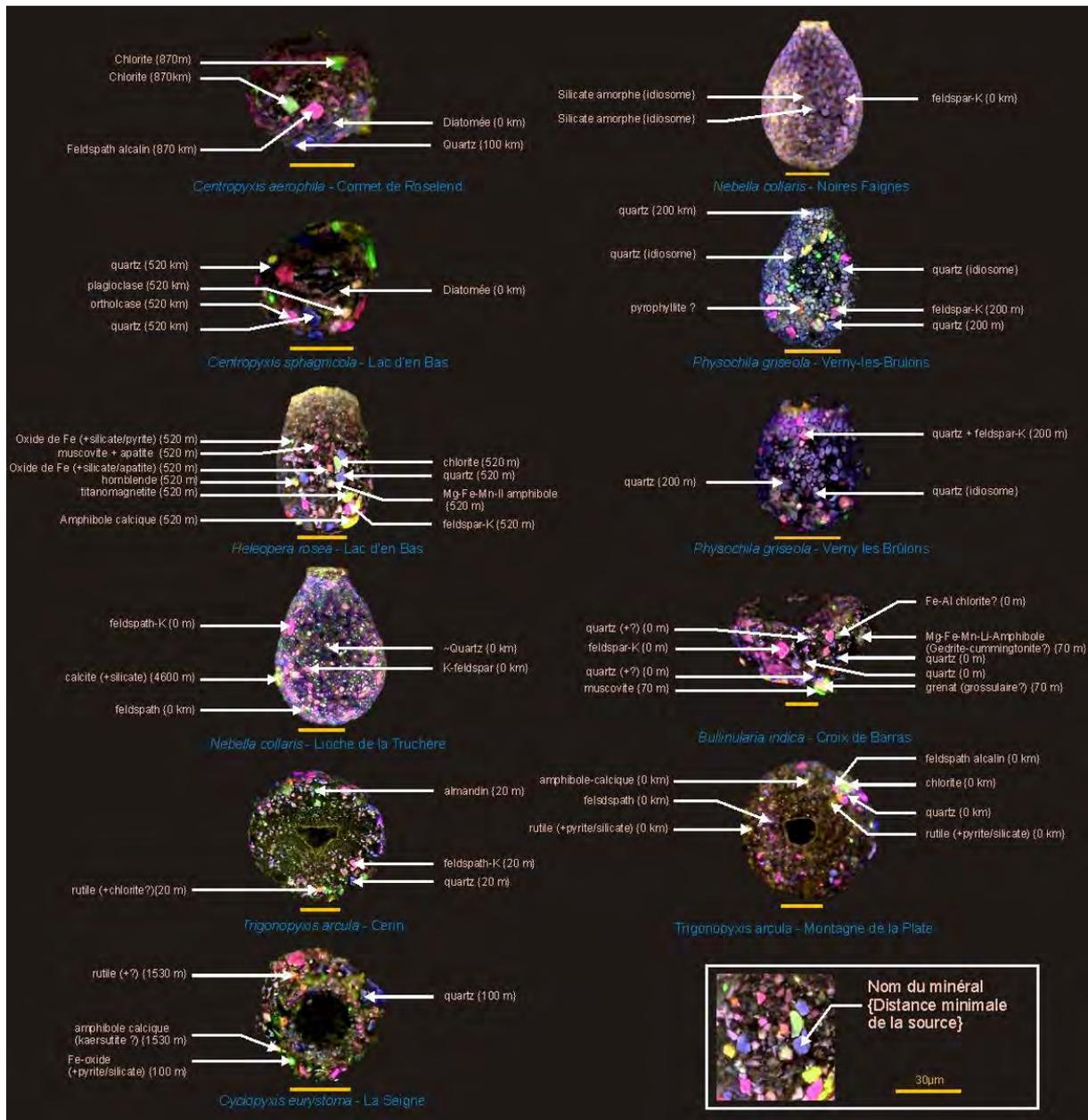


Figure 34 : Cartographies ESEM-EDS pour la détermination des différentes phases minérales agglutinées sur les thèques d'amibes.

Circulation des particules

A partir de la diversité des minéraux, une étude de l'environnement géologique a été menée pour chaque tourbière afin de définir la présence des minéraux environnants. La distance minimale à la source des minéraux a ainsi pu être établie **pour chaque espèce d'amibe** étudiée (Figure 35).

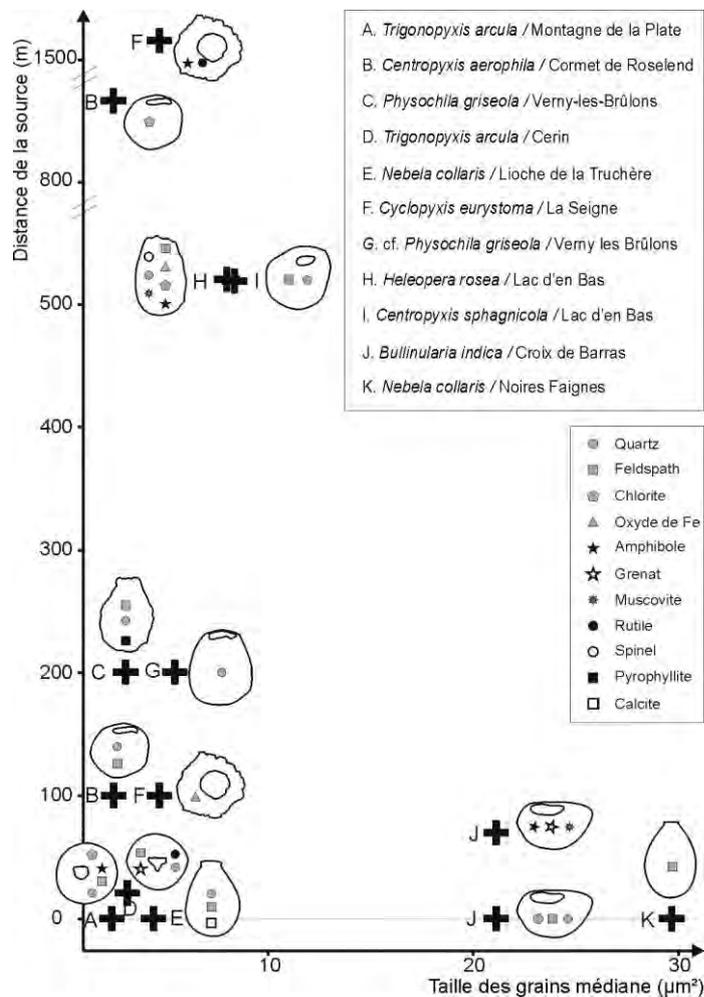
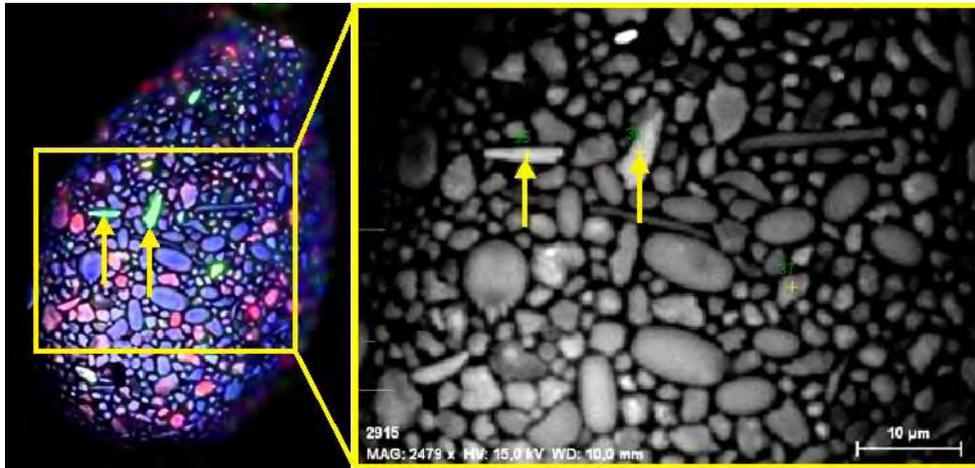


Figure 35 : Diversité minérale par espèce, par tourbière en fonction de la taille médiane de ces particules et de la distance minimale à leurs sources potentielles.

Dans la plupart des cas, les affleurements les plus probables sont proches. De manière non surprenante, les plus gros grains (jusqu'à une taille médiane de 30µm) sont probablement originaires des affleurements les plus proches, alors que les particules les plus petites (tailles médianes de quelques micromètres) peuvent être originaires des distances de plusieurs km au minimum. Dans le cas de *Centropyxis aerophila* (tourbière de Cormet de Roselend) et de *Diffflugia globulosa* (tourbière de La Seigne), les distances les plus courtes varient, dépendant de la nature minéralogique. Dans la tourbière de la Seigne les amphiboles et le rutile sont probablement hérités de dépôts glaciaires ayant érodé des terrains beaucoup plus éloignés, alors que les oxydes présents sont originaires de la proximité de la tourbière.

Une nouvelle expérience est actuellement conduite (avril à octobre 2014) au cours de laquelle est introduit dans le milieu des particules minérales non présentes dans

l'environnement d'origine. Ces expériences correspondent aux premiers travaux de Maxence Delaine, doctorant de l'université de Franche-Comté. Les premiers résultats montrent que ces particules exotiques peuvent être intégrées dans les thèques d'amibes un mois après l'ensemencement en particules (Figure 36). Les amibes à thèques semblent donc pouvoir être de bons intégrateurs de particules **d'origine atmosphérique**.



*Figure 36 : Particules de trémolite (flèches) sur une thèque de *Nebela collaris* prélevée dans la tourbière du Russey. La trémolite est non présente dans l'environnement géologique du Russey et est observée sur les thèques, 1 mois après l'ensemencement en particules exogènes.*

Question 4

Quelle est l'importance des pollutions historiques dans la tourbe ? Est-il possible de reconstruire leurs impacts sur les organismes des tourbières ?

4.1. Contexte et Objectifs

Les tourbières à sphaignes sont largement utilisées en paléoécologie, que ce soit pour **caractériser les conditions climatiques passées ou les paléopollutions**. En effet, **l'accumulation de tourbe se produit de façon relativement régulière en emprisonnant l'ensemble des dépôts naturels (grains de pollen, téphras, charbons ...) et anthropiques (éléments traces métalliques) au cours du temps**. Par ailleurs, la tourbe accumule aussi les restes des végétaux les plus résistants à la décomposition, ainsi que les squelettes et enveloppes rigides **des microorganismes (thèques d'amibes et de rotifères, frustules des diatomées, squelettes des Desmidiées ...)**. Dans ce contexte, les tourbières constituent, avec les sédiments lacustres, **des archives exceptionnelles par leur qualité et par l'étendue de la séquence temporelle qu'elles intègrent**. La particularité des tourbières est que leur caractère ombrotrophe permet de cibler préférentiellement les dépôts atmosphériques.

Dans le cadre de ce **programme, l'objectif était de reconstituer les paléopollutions au cours du temps et, pour la première fois, de reconstituer l'impact de ces paléopollutions sur le milieu naturel et plus spécifiquement sur certaines communautés microbiennes bioindicatrices**.

Les questions auxquelles il était nécessaire de répondre au cours de cette **phase de l'étude** étaient les suivantes :

- **Peut-on reconstituer la dynamique des dépôts d'éléments traces métalliques au cours du dernier millénaire dans le centre est de la France ?**
- **Comment les communautés d'amibes à thèque ont-elles évolué au cours de cette période ?**
- **Peut-on différencier l'impact des variations climatiques de l'impact de ces paléopollutions sur ces communautés microbiennes ?**

4.2. Evaluation de l'évolution des concentrations en ETM dans une carotte de tourbe et recherche de microorganismes indicateurs

Echantillonnage

Des carottes de tourbe ont été prélevées dans trois tourbières choisies selon des gradients de concentrations en contaminants à partir des données obtenues lors de l'étude *in situ* 1. Les tourbières de Cérin (Ain), Creusates (Haute Savoie), Ténine (Vosges) ont été sélectionnées et échantillonnées. Et, les carottes ont été découpées en sous échantillons. Pour chaque sous échantillon, les concentrations en ETM ainsi que celles d'un élément lithophile ont été déterminées afin d'estimer la composante métallique naturelle et d'isoler la contribution due aux apports anthropiques. Au regard de la quantité de tourbe nécessaire pour réaliser la totalité des analyses prévues par site, un carottier spécifique (30 cm de diamètre x 60 cm de longueur) a été mis au point en soudant une lame de scie flexible sur un tube en PVC (Figure 37).



Figure 37 : Carottier utilisé pour le prélèvement de tourbe. Tourbière de Creusates, Vosges, octobre 2011.

Réalisation des modèles d'âge

Afin d'obtenir une expression chronologique des données analytiques obtenues, des modèles âges/profondeurs des carottes de Cérin, Creusates et Ténine ont été réalisés. Ils sont basés sur les résultats des datations radioéléments, ^{210}Pb et ^{137}Cs (Dominik *et al.*, 1981), des parties supérieures des séquences, ainsi sur les datations ^{14}C réalisées sur les niveaux les plus profonds. Les modèles d'âge ont été calculés avec l'application CLAM, version 2.2,

développée par Blaauw (2010) avec l'application statistique libre R (R Development Core Team, 2013), après calibration des dates radiocarbone avec IntCal13 (Reimer *et al.*, 2013). Sur chacune des trois carottes, une date radiocarbone a été ignorée dans l'établissement du modèle d'âge. Sur les séquences Ténine et Cérin, les dates les plus profondes ont été considérées comme trop récentes (Figure 38). Concernant les Creusates, la date radiocarbone la plus haute dans la séquence a été écartée, car légèrement plus ancienne que le profil dessiné par la courbe des dates du ^{210}Pb (Figure 38).

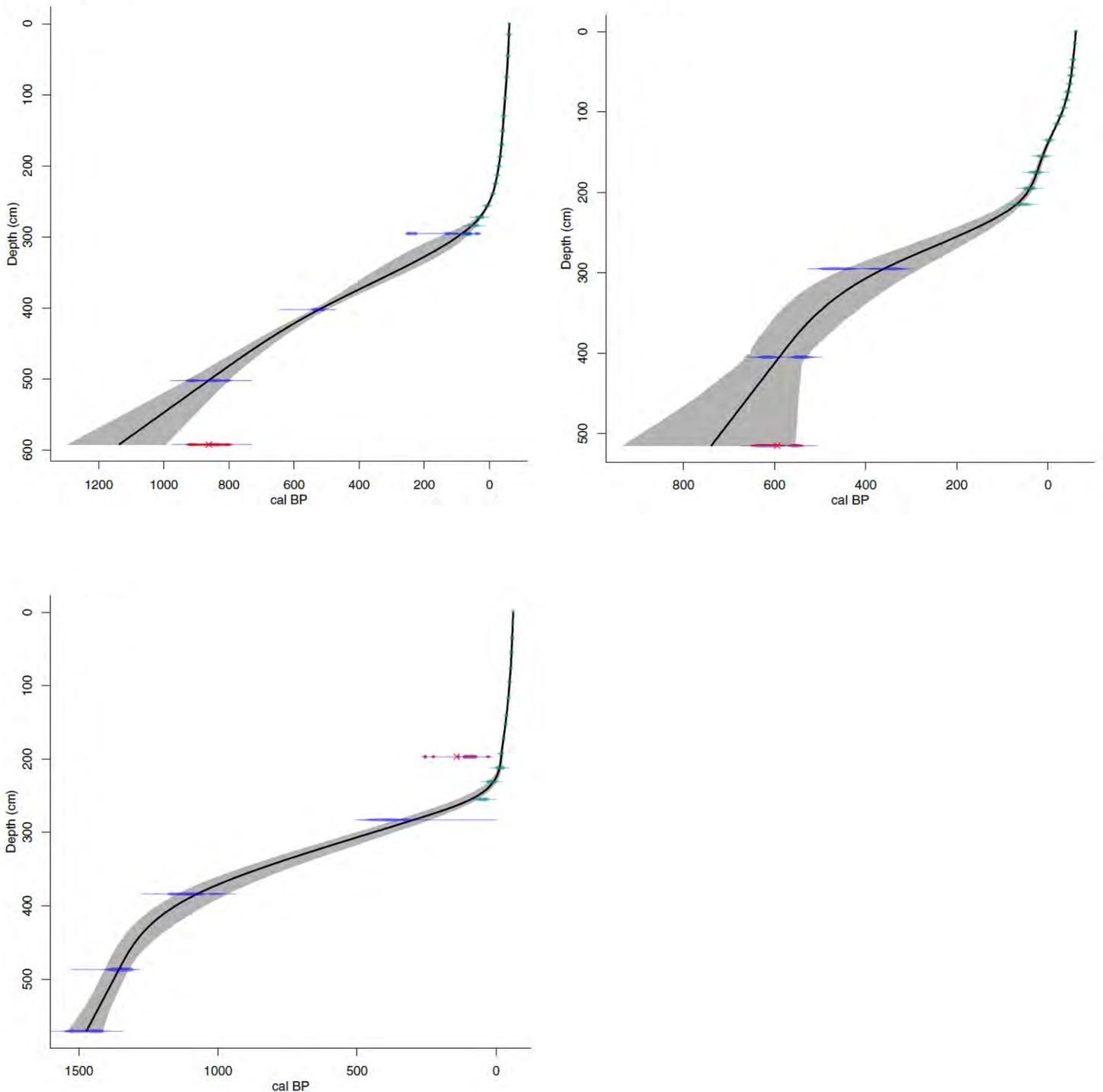


Figure 38 : Modèles d'âge pour les tourbières de Cérin, Ténine et Creusates.

Concentrations en éléments chimiques dans la tourbe

Les concentrations en divers éléments chimiques dans la tourbe des trois tourbières étudiées sont présentées en figure 39. De façon synthétique, l'analyse de ces données indique que différentes périodes sont significativement différentes pour chacune des tourbières.

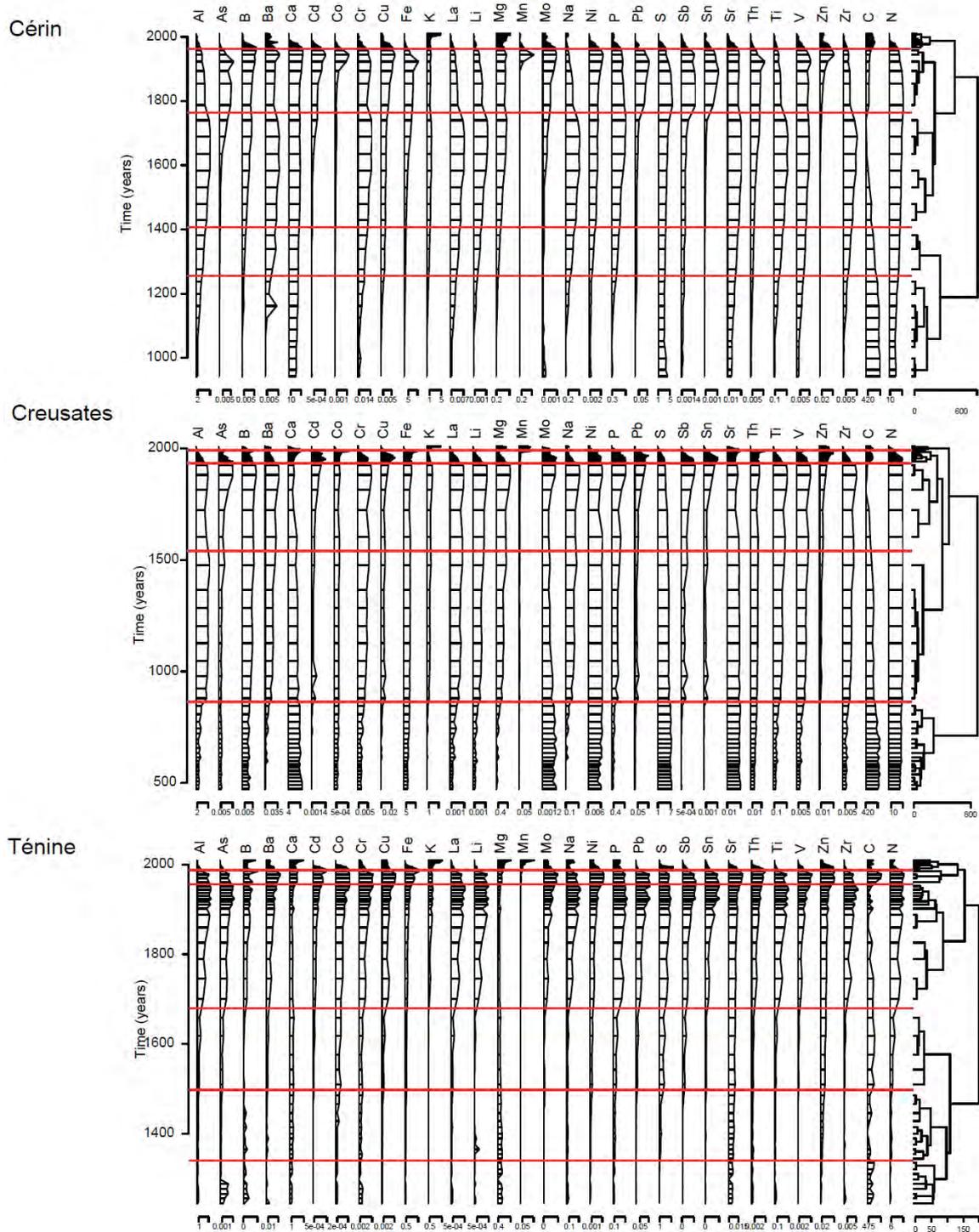


Figure 39: Concentrations en éléments chimiques au cours du temps dans la tourbe des trois tourbières échantillonnées

Pour le site de Cérin, la carotte peut-être divisé en 5 périodes temporelles (2000 à 2010, 1800 à 2000, + trois périodes entre 800 et 1800), pour celui des Creusates, la carotte peut-être divisé également en 5 périodes temporelles (2000 à 2010, 1900 à 2000, 1500 à 1900, et deux périodes entre 500 et 1500) et pour celui de Ténine, la carotte peut-être divisé en 6 périodes temporelles (2000 à 2010, 1970 à 2000, 1750 à 1970 et deux périodes entre 1200 et 1750). Ces séparations **tiennent compte de l'ensemble des éléments analysés et sont en partie liées** aux variations de concentrations en ions majeurs et en éléments nutritifs (notamment pour la période pré-industrielle). En revanche, les éléments traces métalliques expliquent la séparation des périodes les plus récentes (depuis 1800).

Afin de décrire plus précisément les pollutions historiques, **l'exemple de la tourbière** de la Ténine dans le massif des Vosges a été choisi. Cette tourbière montre une teneur en eau stable du sommet à la base de la colonne échantillonnée, avec des valeurs entre 85 et 95%, **typiques d'une tourbe ombrotrophe. La teneur en carbone organique**, également très stable aux alentours de 50%, confirme ce caractère. Les rapports C/N, supérieurs à 30, sont favorables à une bonne conservation du signal à travers le temps, car ils indiquent la **présence d'une matière organique peu dégradée. Les éléments terrigènes** titane (Ti), aluminium (Al), zirconium (Zr) et Lantane (La), sont tous très bien corrélés et traduisent **l'apport minéral à l'intérieur de la tourbière. Celui-ci est faible** sur toute la longueur de la carotte, avec cependant une augmentation à partir de 30 cm et un pic à 15 cm de profondeur. La contribution anthropique peut être extraite du signal total en considérant que la composition chimique du bruit de fond suit approximativement les valeurs publiées par Wedepohl (1995) pour la croûte continentale supérieure, soit :

$$PbA = PbT - Al * (Pb / Al) / BF$$

Où les abréviations PbA, PbT, BF désignent respectivement le Plomb Anthropique, le Plomb Total et le bruit de fond.

La correction obtenue demeure peu importante par rapport à la contribution naturelle qui est **faible. Les contributions en Pb anthropique évoluent fortement jusqu'à 200 ppm, des valeurs** extrêmement élevées pour un milieu tourbeux ombrotrophe. Les profils sont lisses gage de la **qualité analytique et d'absence de hiatus.**

Ces profils peuvent s'exprimer en termes de flux en multipliant les concentrations par les taux de sédimentation exprimés en $mg.cm^2.an^{-1}$, **c'est-à-dire en utilisant une échelle de poids cumulé. Les résultats ainsi exprimés vont pouvoir être analysés en termes d'historiques des** apports de micro-polluants atmosphériques. Différentes phases sont concordantes sur les courbes de Pb et du Ca anthropique : des valeurs basses du XII^e au XIV^e sont suivies **d'une** augmentation sensible **qui s'intensifie encore à la fin du XVII^e siècle.** Les courbes décroissent ensuite régulièrement à partir du début du XIX^e siècle. Ces résultats sont extrêmement **proches de ceux obtenus à l'occasion d'analyses réalisées sur deux** tourbières voisines : la Tourbière du Gazon-du-Faing, située à une dizaine de km au nord-est de la Ténine et la tourbière du Rossely, située à une trentaine de kilomètres vers le sud-ouest (Forel *et. al.*, 2010). Ils sont également en parfait accord avec les connaissances historiques. Dans cette région des Vosges, les ressources minières ont régulièrement été exploitées depuis au moins le X^e siècle après J.-C., notamment sur site de Saintes-Marie-aux-Mines (Fluck 2000). Les XIII^e et XIV^e correspondent à **une période de déclin de l'activité liée à une instabilité sociale** et politique, due notamment à des famines, aux épidémies de Peste Noire et à la guerre de Cent An. En revanche, les XV^e et XVI^e correspondent à des phases de reprise, puis **d'intensification** des exploitations. Les activités locales à Sainte-Marie-aux-Mines prennent définitivement fin au milieu du XX^e siècle.

L'intérêt de cette étude paléoenvironnementale est qu'elle permet de déterminer des flux de matière qu'il est possible de calculer grâce au modèle d'âge. A partir du taux d'accumulation, il est possible de préciser le rythme de dépôt pour chaque élément (en $\text{mg.cm}^{-2}.\text{an}^{-1}$), et de là, calculer les dépôts moyens par siècle. Les résultats que nous avons obtenus permettent de quantifier les dépôts qui se sont déposés au cours du dernier millénaire. Ainsi, en moyenne, pour les trois tourbières étudiés, la somme des dépôts atteint 0,5 ; 18,2 ; 12,3 ; 7,6 ; 54,1 et 16,6 mg.cm^{-2} respectivement pour le Cd, le Cr, le Cu, le Ni, le Pb et le Zn. Ces données varient localement (Tableau 8). Il est intéressant de noter que près de la moitié du Cd et du Zinc et 43 % du Pb se sont déposés depuis le 19ème siècle, contre environ 30 % pour le Cu, le Cr et le Ni. Par ailleurs les dépôts de Zn et de Cd ont été plus importants au 20ème siècle qu'au 19ème, et inversement pour les autres éléments présentés (Tableau 8). Enfin, les données obtenues entre 2001 à 2010 indiquent que les dépôts d'ETM ont largement diminué au cours de la période récente, avec des taux d'accumulation 10 à 100 fois plus faibles, selon les éléments, que ce qui a été observés au cours du 20ème siècle. Il faut cependant relativiser cette dernière conclusion, car les mesures de surface ont été réalisées sur les sphaignes ou la litière fraîche et il est possible qu'il existe un phénomène d'accumulation des particules les plus lourdes par lessivage dans la couche de tourbe sous-jacente. Dans ces conditions, le taux d'accumulation pourrait être sous-estimé lorsque la mesure est réalisée dans les sphaignes.

Tableau 8 : Reconstitution du total des dépôts (en mg.cm^{-2}) en Cd, Cr, Cu, Ni, Pb et Zn au cours du dernier millénaire (années 1000 à 2000) dans les tourbières de Cérin (CE), Creusates (CR) et Ténine (TE) et pourcentage de ce dépôt par période (20ème siècle, 19ème siècle, années 1000 à 1800).

	CE	CR	TE	CE	CR	TE	CE	CR	TE	CE	CR	TE	CE	CR	TE	CE	CR	TE
	Cd			Cr			Cu			Ni			Pb			Zn		
Total mg.cm^{-2} (1000 à 2000)	0,8	0,4	0,4	21,7	19,7	13,3	15,0	13,1	8,7	9,3	7,9	5,7	77,6	50,9	33,8	22,8	13,1	13,8
% 1901-2000	8,3	34,6	31,5	2,3	10,5	9,7	4,6	13,1	15,0	3,5	12,7	12,3	6,4	24,0	31,1	17,6	38,4	33,6
% 1801-1900	27,9	13,4	28,2	12,4	16,3	29,9	16,7	15,0	25,5	14,3	17,6	28,1	30,2	11,9	25,4	29,7	11,5	17,2
% 1000-1800	63,8	51,9	40,2	85,3	73,1	60,4	78,6	71,8	59,5	82,1	69,7	59,6	63,4	64,1	43,4	52,5	49,7	48,8

4.3. Recherche de microorganismes indicateurs des pollutions historiques

Introduction

Pour caractériser l'impact des paléopollutions, nous avons fait le choix d'étudier les thèques des thécamoebiens. En effet, différentes études indiquent que ces microorganismes prédateurs sont très sensibles aux variations de la qualité des milieux : température, niveau de la nappe, pH et contaminants (Jassey *et al.*, 2011b). De plus, les travaux réalisés dans le cadre de ce programme ont confirmé l'intérêt de prendre en compte ce groupe microbien. Enfin, les thèques d'amibes se conservent relativement bien dans la tourbe et leur détermination est relativement aisée. Les amibes ont été dénombrées tous les centimètres pour les 12 premiers cm puis tous les 5 cm ensuite.

Distribution des thèques d'amibes au cours du temps

La richesse spécifique observées dans les trois tourbières est comparable (respectivement 16, 19 et 17 espèces dans les tourbières de Cérin, Creusates et Ténine). Les espèces observées sont communes dans les sphaignes et sont globalement les mêmes dans les trois tourbières. En revanche, leur abondance au cours du temps varie sensiblement (Figure 40).

Sur le site de Cérin, la carotte peut-être divisé en cinq périodes :

- 2000 à 2010, avec notamment les espèces *Assulina muscorum*, *Euglypha strigosa*, *Assulina seminelum*
- **1990 à 2000, avec des pics d'abondance de** *Nebela militaris*, *N. tincta*, et *N. collaris*
- 1600 à 1990, forte présence de *Centropyxis platystoma* et *Hyalosphenia elegans*
- 1250 à 1600, développement de *Archerella flavum*
- 800 à 1250, développement de *Centropyxis aculeata*

Sur le site des Creusates, la carotte peut-être divisé en quatre périodes :

- 2000 à 2010, forte abondance de *Hyalosphenia papilio*, *Assulina muscorum* et *A. seminelum*
- 1990 à 2000, forte présence de *Nebela militaris*, *N. tincta*, *N. collaris* et *Trigonopyxis arcula*
- 1000 à 1990, communauté stable pendant une longue période de temps avec *Centropyxis platystoma*, *Heleopera rosea*, *Pseudodiffugia gracilis*, *Diffugia pulex*
- 600 à 1000, Forte abondance de *Centropyxis aerophila*, *Cyclopyxis minuta* et faible abondance de *Centropyxis platystoma*

Sur le site de Ténine, la carotte peut-être divisé en cinq périodes :

- **2000 à 1990, forte présence d'***Assulina muscorum* et *A. seminelum*, *Euglypha strigosa*, *E. compressa*, *Hyalosphenia papilio* et *H. elegans*
- 1950 à 1990, forte abondance des espèces de *Nebela*, *Trygonopyxis arcula* et *Cyclopyxis minuta*
- 1700 à 1950, forte présence d'*Assulina muscorum* et *A. seminelum*, *Pseudodiffugia gracilis* et *Trygonopyxis arcula*
- 1400 à 1700, mêmes espèces que précédemment avec présence de pics de développement de *Diffugia pulex*, *Nebela militaris* et *Cryptodiffugia voigti*
- 1100 à 1400, forte présence de *Archerella flavum* et *Hyalosphenia papilio*

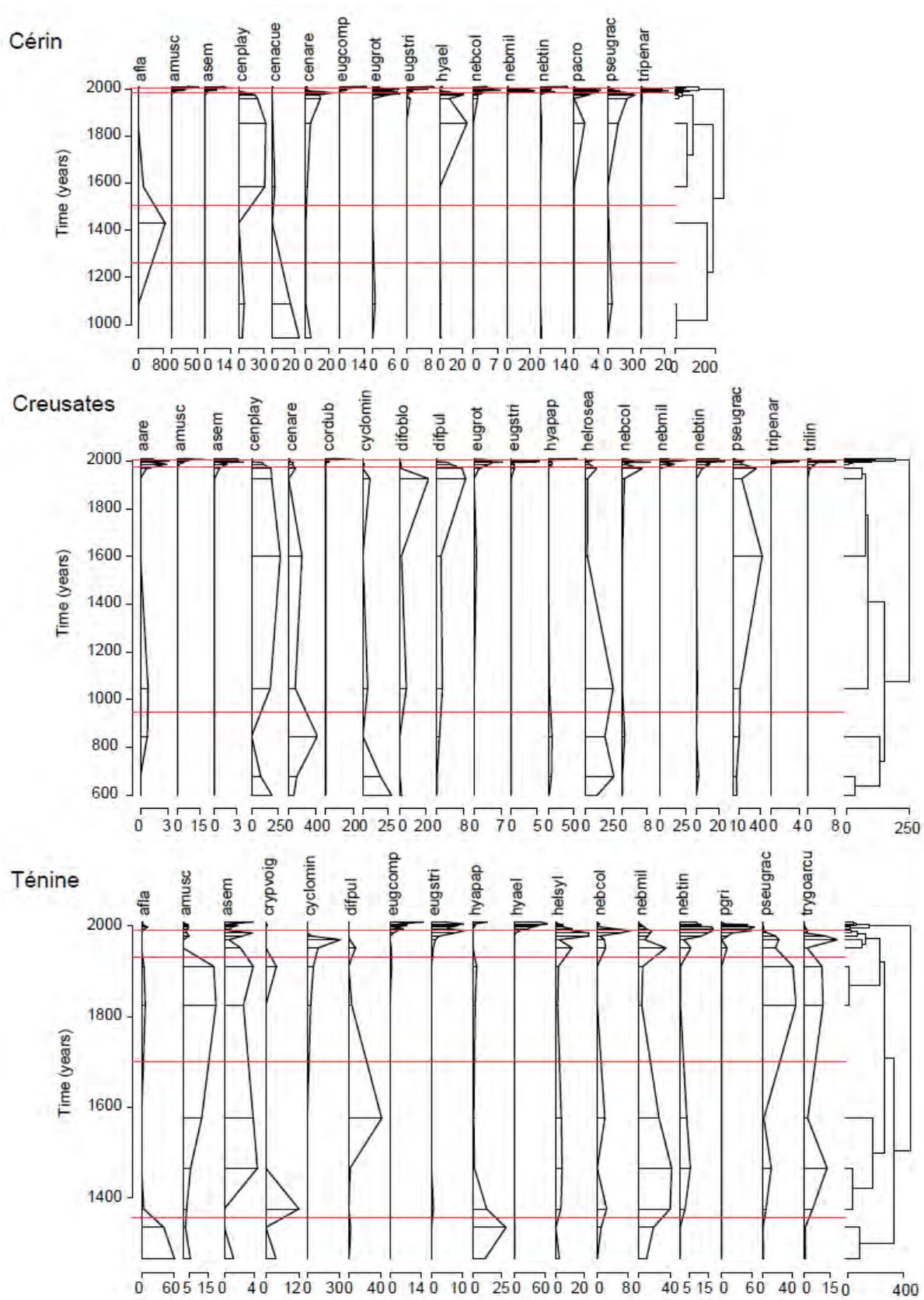


Figure 40 : Abondances des thèques d'amibes au cours du temps dans la tourbe des trois tourbières échantillonnées

Impact des éléments traces métalliques sur les communautés d'amibes à thèque

Il est difficile d'évaluer l'influence des variations climatiques sur la composition des communautés d'amibes à thèque. Il fait peu de doute que la température de l'air et l'humidité des sphaignes soient les facteurs qui expliquent la majeure partie des variations de cette composition. Il est cependant important de pouvoir préciser la part liée aux dépôts de contaminants. L'analyse par RDA de l'évolution de l'abondance des amibes à thèque indique que les sites des Creusates et de Cérin sont proches et différent de celui de Ténine (Figure 41). Des concentrations plus importantes en Ni, Ba et La expliquent cette différence entre sites pour le passé et des valeurs plus importantes en Mg, K, et Mn pour le présent. Au total, la chimie de la tourbe explique environ 50% des variations d'amibes pour les 3 sites. Cependant, il s'agit essentiellement d'éléments chimiques majeurs ou d'éléments nutritifs.

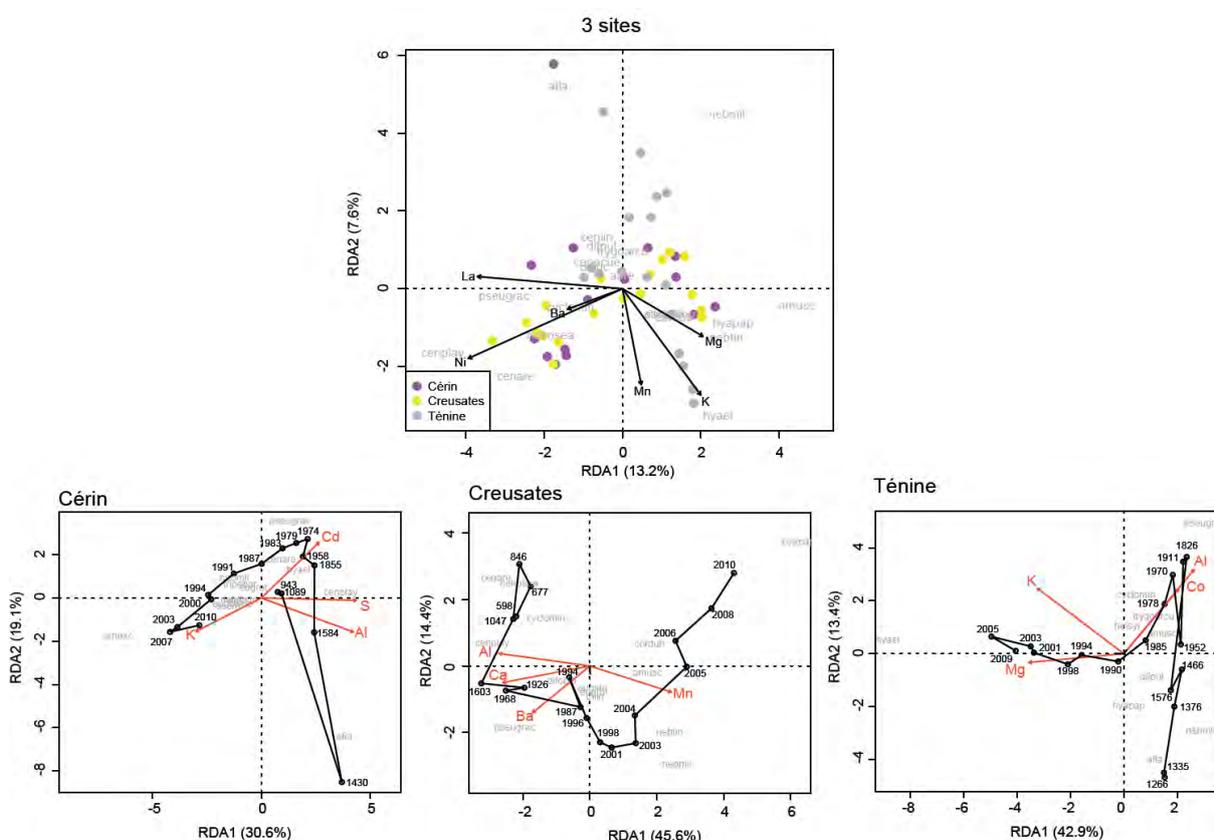


Figure 41: Evolution au cours du temps de la composition de la communauté d'amibes à thèque dans les trois tourbières (analyse par RDA) et influence des concentrations en éléments chimiques

Afin de préciser l'impact des éléments traces métalliques sur les communautés d'amibes, nous avons établi des corrélations entre l'ensemble des espèces observées et les différents éléments analysés. Quelques exemples de corrélations sont présentés dans la figure 42. Il apparaît que certaines espèces répondent soit positivement, soit négativement à la présence de contaminants, ce qui signifie que certaines espèces sont sensibles et d'autres tolérantes, voire favorisées par la présence de ces contaminants. Ces résultats sont cohérents avec ce qui a été observé dans nos études précédentes (Meyer *et al.*, 2012) et confirme l'intérêt du suivi des amibes à thèque comme bioindicateurs des contaminants.

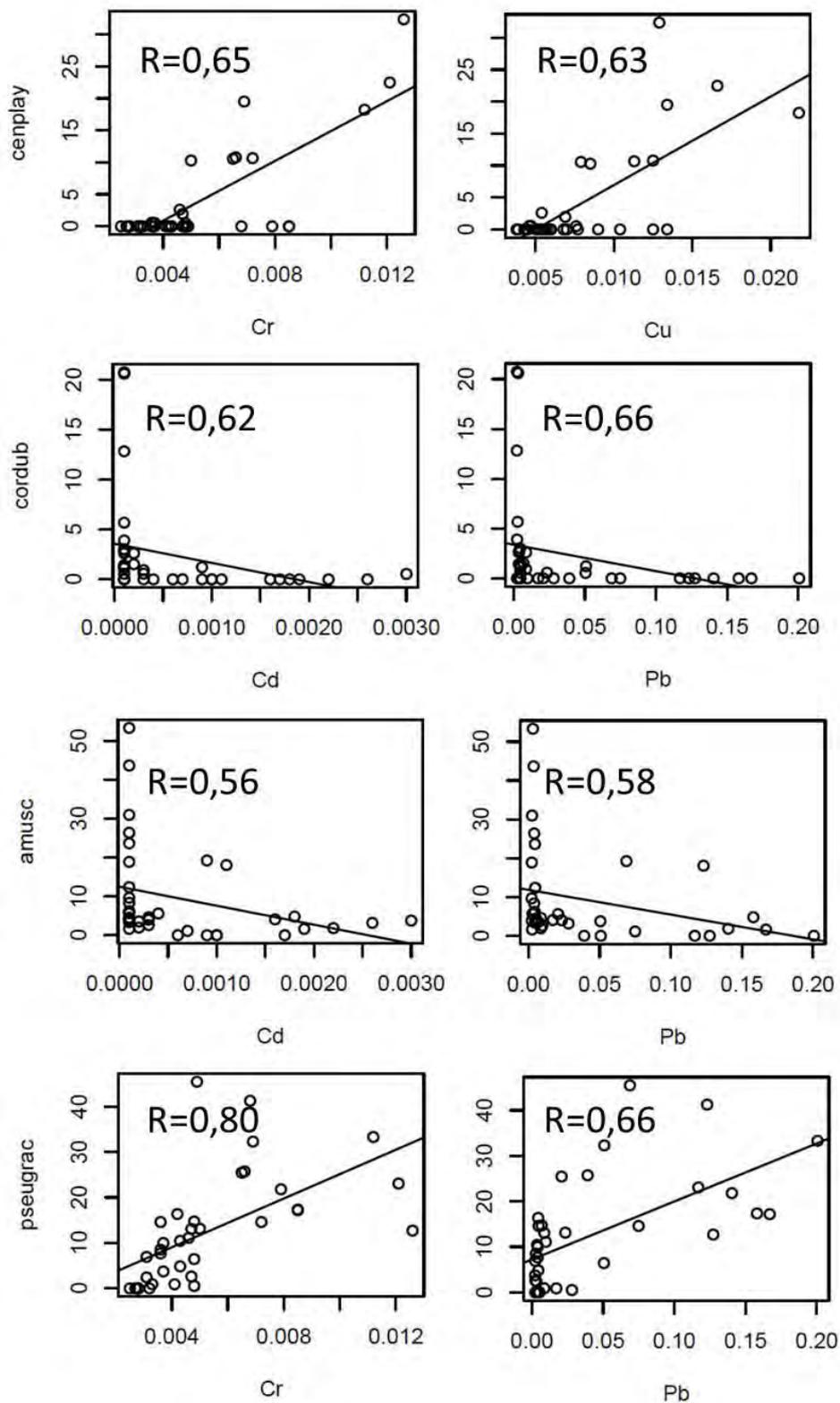


Figure 42 : Corrélation entre l'abondance (ind.g^{-1}) des amibes à thèque (*Centropyxis platystoma* (cenplay), *Corythion dubium* (cordub), *Assulina muscorum* (amusc) et *Pseudodifflugia gracilis* (pseugrac) et les concentrations en ETM ($\mu\text{g.g}^{-1}$ MS) dans la tourbe (données compilées pour les tourbières de Cérin, des Creusates et de Ténine). $P < 0,05$ pour $r = 0,3$.

5. Discussion générale et principales conclusions

5.1. Rappel des objectifs et de la démarche

Ce projet de recherche avait trois objectifs principaux :

- cartographier et modéliser à l'échelle supra-régionale la bioaccumulation des contaminants atmosphériques par les sphaignes en fonction de la dynamique atmosphérique et des principales sources de pollution,
- évaluer l'impact de cette contamination sur un microécosystème « sphaignes-microorganismes associés » et déterminer les bioindicateurs les plus pertinents pour la biosurveillance de la pollution à longue distance,
- évaluer la dynamique d'accumulation des polluants au cours du 20^{ème} siècle et tester la pertinence de paléobioindicateurs microbiens.

Ce chapitre synthétise les éléments que nous pouvons apporter en réponse aux quatre questions principales qui constituent l'architecture de ce rapport. Par ailleurs, il précise les limites de notre travail et formule des perspectives de recherche qui pourront permettre de faire progresser nos connaissances dans le domaine de la contamination atmosphérique à longue distance et de ses effets sur les milieux naturels.

Ce projet de recherche a permis l'acquisition d'un volume considérable de données chimiques et biologiques. Une partie de ces données a déjà fait l'objet de communication à congrès et de publications, l'autre partie sera soumise à publication au cours des années 2014 et 2015.

De manière synthétique, les éléments méthodologiques, les principales réponses aux quatre questions qui ont conduit notre démarche, les conclusions et perspectives de nos axes de recherche sont synthétisées dans les sous-parties numérotées de 5.2 à 5.5.

5.2. Les tourbières à sphaignes sont-elles des modèles pertinents pour évaluer les dépôts de contaminants à longue distance ?

Méthodologie

- Pour la première fois, 54 tourbières ont été échantillonnées de façon quasiment simultanée en partenariat avec le réseau des gestionnaires des milieux naturels. Des études préliminaires nous ont permis de déterminer l'espèce la mieux adaptée (*Sphagnum capillifolium*) et le protocole d'échantillonnage le plus efficace.
- Les protocoles d'analyses des ETMs quantifiés au sein des sphaignes ont eux aussi été améliorés et contrôlés par l'utilisation systématique d'échantillons de référence, afin de disposer de données très fiables.

- Les protocoles et méthodes analytiques des HAPs dans ces Bryophytes de zones humides ont été mises au point et validés avec des concentrations en HAPs proches des seuils de quantification.
- Les tourbières échantillonnées sont éloignées de sources fixes et mobiles de pollution. **Les dépôts d'origine atmosphérique qu'elles reçoivent ont donc pour origine des lieux d'émission situés à des distances intermédiaires ou éloignées (dizaines à centaines de kilomètres).**

Principaux résultats

- Les sphaignes prélevées dans 54 tourbières du Centre-Est de la France sont relativement faiblement contaminées par certains éléments métalliques (Cadmium, Zinc, Plomb, Cuivre). La contamination est du même ordre de grandeur dans **l'ensemble des régions. Cependant, certains éléments sont plus abondants dans certaines régions (Pb dans les Vosges ou en Savoie, par exemple).**
- Un indicateur synthétique est proposé, permettant de caractériser la sensibilité des différentes aires géographiques. Les Vosges, la Savoie et dans une moindre mesure le Morvan et les Volcans sont globalement les zones les plus contaminées.
- Les sphaignes échantillonnées dans les tourbières des Vosges sont faiblement contaminées par certains HAPs (Fluoranthène, Phénanthrène, Pyrène, Chrysène et Benzo(b)Fluoranthène).
- Il existe une relation significative entre **l'altitude et les concentrations en HAP. Les éléments ayant une masse moléculaire plus élevée, le Chrysène et le Benzo(b)fluoranthrène, sont majoritairement présents en haute altitude.**
- **L'analyse des sphaignes met aussi en évidence des variations au niveau des ions majeurs et des éléments nutritifs. Nos résultats indiquent qu'en plus des dépôts atmosphériques en N, les apports locaux en P sont aussi susceptibles de modifier le rapport N/P dans les sphaignes.**

Conclusions

- Les sphaignes sont des bioindicateurs efficaces qui permettent de quantifier les dépôts de contaminants de différentes natures (ETM, HAP) dans les écosystèmes éloignés des sources fixes et mobiles de polluants atmosphériques.
- **L'intérêt de ces Bryophytes est que ce sont des espèces ubiquistes, que l'on retrouve partout sur terre lorsque les conditions de leur développement sont réunies (climats frais et humides), c'est-à-dire dans la plupart des zones tempérées à boréales.** Leur croissance est plus régulière que celles des autres mousses terrestres, ce qui permet de quantifier plus précisément les dépôts annuels de contaminants.
- Les tourbières à sphaignes sont donc des modèles tout à fait pertinents pour qualifier la pollution atmosphérique à moyenne et longue distance.

Perspectives

- La **mesure annuelle des dépôts de contaminants (ETM, HAP) à la surface d'un réseau** de tourbières bien identifiées pourrait permettre de quantifier la pollution diffuse dans **l'environnement.**
- Cette perspective nécessiterait de mettre en place un réseau capable de réaliser annuellement des prélèvements de façon coordonnée. La mise en place de ce réseau

serait facilitée par l'existence de structures très organisées actuellement en charge de la gestion des tourbières

Limites

- La principale limite à l'utilisation des tourbières se situe au niveau de leur répartition inégale à l'échelle du territoire national. Elles sont cependant suffisamment fréquentes pour couvrir la majeure partie de ce territoire (Figure 43).

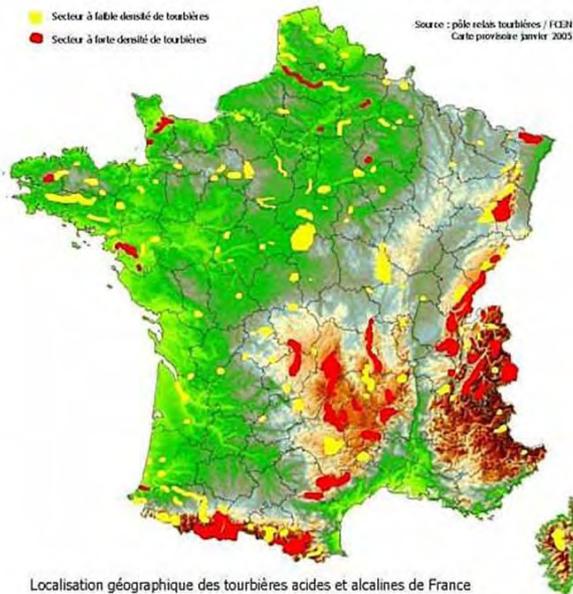


Figure 43 : Distribution des tourbières en France (en Jaune : faibles densités, en rouge, fortes densités).
Document Pôle Relais tourbières.

5.3. Est-il possible d'évaluer l'origine des polluants (sources, distances) présents à la surface des tourbières à sphaignes et de modéliser ces dépôts ?

Méthodologie

- Dans un premier temps, une méthode d'interpolation géomatique a été développée permettant d'apprécier la dispersion des aéro-contaminants transfrontaliers et à une échelle géographique européenne plus large que l'échelle supra-régionale où sont localisés les tourbières étudiées.
- Cette méthode d'interpolation géomatique repose sur des corrélations entre un polluant et cinq variables explicatives dont quatre ont été choisies dans les bases de données environnementales européennes European Pollutant Release and Transfer Register (E-PRTR) (cadastres d'émission par secteur d'activité : industriel, route, ...) et une provient de la base Corine Land Cover (200 m de résolution spatiale), mise à contribution pour identifier les taches urbaines (ULZ), dont leurs tailles et la pollution qui y est émise étaient fortement dépendantes.

- L'influence théorique que les cadastres d'émission ont sur leur voisinage est simulée par l'application d'un modèle de dispersion qui tient compte de la distance euclidienne isotrope pondérée par l'importance des rejets.
- Dans un deuxième temps, cette méthode d'interpolation géomatique a été appliquée à l'analyse et à la cartographie des dépôts atmosphériques bioaccumulés par les sphaignes analysées dans les 54 tourbières de ce présent programme.

Principaux résultats

- La méthode d'interpolation géomatique a été calibrée et validée, avec l'appui des données mesurées des PM₁₀ en Europe, territoire suffisamment vaste pour permettre l'obtention d'un grand nombre de stations d'observation de la pollution à longue distance. Cette méthode s'avère plus simple et plus rapide à utiliser que les méthodes de la physique atmosphérique qui nécessitent vraiment un investissement économique, logistique et informatique bien plus élevé et ceci pour des performances comparables (Gulliver *et al.*, 2011; Gulliver et Briggs, 2011, Mao *et al.*, 2012) voir supérieures (Solazzo *et al.*, 2012).
- Cette méthode a ensuite été appliquée à l'interpolation des quantités d'éléments traces métalliques liés à l'activité humaine (tels que : Cd, Cu, Pb et Zn) mesurées par dosage dans les sphaignes en 54 tourbières du Centre-Est de la France situées loin de tout centre industriel et station de mesure.
- La pollution présente dans les sphaignes provient de sources d'émission situées à des distances intermédiaires et longues allant de quelques dizaines à quelques centaines de kilomètres (Zanetti P., 1990). La pollution est notamment expliquée par la proximité des zones industrielles et des zones urbaines. Ce modèle permet de déterminer quelle est la part de pollution à longue distance y compris dans des zones très polluées.

Conclusions

- La quantification d'ETMs à la surface des tourbières à sphaigne a permis la modélisation de ces dépôts d'origine atmosphérique à une échelle supra-régionale.
- Les seize HAPs analysés présentent des concentrations faibles voir proches des niveaux de détection c'est pourquoi la modélisation de ces dépôts n'a pas pu être entreprise à ce stade. Des développements méthodologiques en cours doivent être terminés. Les modélisations seront alors menées prioritairement avec les éléments suivants : Fluoranthène, Phénanthrène, Pyrène, Chrysène et Benzo(b)Fluoranthène).

Perspectives

- Des prolongements méthodologiques destinés à l'amélioration de ce modèle sont envisagés par la recherche d'autres formes d'expression des gradients (introduction de logarithme, d'exponentielle) et par l'intégration des flux atmosphériques dominants.
- Ils sont du plus grand intérêt pour la connaissance des modalités de dispersion des aéro-contaminants à des distances variables (courte, intermédiaire et longue distances). A ce titre ils sont très innovants, car nous seront à même de mesurer

l'influence de la météorologie et de la taille des villes sur les quantités PM₁₀ dispersées puis déposées.

- La méthode d'interpolation géomatique devrait permettre de valoriser les quantités très importantes de mesures acquises par les réseaux de mesure en France et en Europe pour construire des modèles de dépôt à moindre coûts.

Limites

- Il est envisageable de cartographier et de modéliser spatialement la bioaccumulation par les sphaignes de contaminants issus de dépôts secs et humides à l'échelle supra-régionale et internationale (centre-est de la France, Suisse, nord de l'Italie et sud de l'Allemagne), en relation avec les flux atmosphériques dominants et les principales sources mobiles et fixes d'aéro-contaminants. La limite à ces études est la quantité de données acquises et leur disponibilité.
- Dans le cas des polluants atmosphériques présentant d'autres comportements (par exemple de la réactivité photochimique d'ozone, etc.), de nouvelles variables représentant ces phénomènes doivent être introduites dans le modèle ou, au moins, prises en compte lors de l'évaluation de la performance des résultats du modèle.

5.4. Quels impacts les dépôts de contaminants à longue distance ont-ils sur le fonctionnement des microsystèmes sphaignes-microorganismes ?

Méthodologie

- L'étude du microsysteme « sphaignes-microorganismes associés » est de pouvoir étudier en même temps et sur un même échantillon des données de concentrations en polluants organiques et inorganiques, des données de concentrations en composés chimiques émis par les plantes et des données d'abondance, de biomasse et de diversité microbiennes.
- La taille du microsysteme permet de conserver efficacement l'écosystème dans son ensemble par fixation ou congélation.
- Les taux de reproduction des microorganismes permettent d'évaluer l'effet des perturbations après quelques semaines seulement.
- L'utilisation d'une même espèce de sphaigne permet de réaliser des comparaisons pertinentes à l'échelle systémique.

Principaux résultats

- Les concentrations en composés phénoliques sont positivement corrélées aux concentrations en azote et phosphore et négativement corrélées avec les concentrations en éléments traces métalliques et en hydrocarbures aromatiques polycycliques.
- La structure des communautés microbiennes est expliquée par la concentration en composés phénoliques et les concentrations en Zn et Cu.
- Une première analyse des réseaux d'interactions microbiens (qui permettent d'obtenir des indicateurs synthétiques du fonctionnement des communautés) indique que les

concentrations en ETM peuvent influencer les communautés microbiennes au niveau systémique.

- **Les expérimentations en conditions contrôlées n'ont pas permis de confirmer clairement ces résultats, en raison de problèmes techniques rencontrés.**
- **Les premiers travaux portant sur l'impact du plomb sur le parasitisme microbien n'ont pas mis en évidence un effet de la contamination, en raison du faible nombre d'observations de couple hôte-parasite.**
- **L'analyse des thèques a permis de montrer que les amibes intègrent les particules provenant de l'environnement proche.**

Conclusions

- La prise en compte du complexe « sphaignes-microorganismes associés » permet de **disposer d'un système performant pour évaluer la qualité des milieux.**
- La réponse du microsysteme est globale et complexe à interpréter car elle ne peut se résumer à la somme des réactions individuelles

Perspectives

- **L'analyse dans le détail de la diversité des composés phénoliques pourrait permettre de mieux comprendre la relation végétal/microorganismes en relation avec les perturbations.**
- **Les techniques d'écologie moléculaire et l'abaissement de leurs coûts devraient permettre d'augmenter la vitesse d'analyse des dénombrements microbiens et faciliter le suivi des populations.**
- **Les travaux de recherche actuels sur la modélisation des réseaux d'interactions devraient pouvoir fournir des indicateurs plus facilement interprétables des perturbations.**
- **Les thèques d'amibes pourraient servir de marqueur des dépôts de particules atmosphériques, notamment pour des études paléoécologiques**

Limites

- La principale limite aux travaux de recherche portant sur le complexe Bryophytes-Microorganismes se situe dans le haut niveau de compétences requis pour l'analyse des échantillons et des données.
- **Cette limite ne pourra être dépassée qu'au travers de la mise en place d'outils d'analyse et d'interprétation simplifiés.**

5.5. Quelle est l'importance des pollutions historiques dans la tourbe ? Est-il possible de reconstruire leurs impacts sur les organismes des tourbières ?

Méthodologie

- Trois carottes ont été prélevées dans des zones géographiques différentes pour **établir une comparaison de l'histoire des dépôts en ETM depuis plus d'un millénaire**
- Pour la première fois, une analyse des concentrations en éléments traces métalliques dans la tourbe a été couplée à l'observation des thèques d'amibes fossiles.

Principaux résultats

- Les flux de dépôts en éléments traces métalliques ont été quantifiés au cours des mille dernières années, ce qui a permis de calculer la somme des dépôts qui se sont produits durant cette période.
- Ces données sont du même ordre de grandeur dans les trois tourbières étudiées, mais il existe des variations locales.
- Près de la moitié du Cd et du Zinc et 43 % du Pb se sont déposés depuis le 19^{ème} siècle, contre environ 30 % pour le Cu, le Cr et le Ni.
- Il semble que les flux des éléments suivis aient fortement diminué au cours des 10 à 20 dernières années.
- **L'abondance de nombreuses espèces d'amibes à thèque est très significativement** corrélée avec les concentrations en ETM, ce qui confirme que ces éléments ont un impact significatif sur ces communautés microbiennes de prédateurs.
- Il est probable que ces relations soient dues à des effets directs (effet toxique) et indirects (effet des interactions).

Conclusions

- **La tourbe est une archive naturelle d'une grande valeur**, car elle permet de retracer l'histoire des dépôts naturels et anthropiques
- **Les thèques qui persistent dans la tourbe après la mort de l'amibe sont connues pour être d'excellents** bioindicateurs des conditions physico-chimiques passées (pH, hauteur de nappe - Mitchell *et al.*, 2000). Nos résultats montrent que ce sont aussi de bons indicateurs des paléopollutions.

Perspectives

- **Les dénombrements de thèques d'amibes sont relativement faciles à mettre en œuvre et pourrait être généralisés** dans les études paléoécologiques
- **La simplification de l'analyse des données microbiennes (regroupement par genre, classe de taille ou autres traits de vie) pourrait permettre de créer une méthode accessible aux gestionnaires pour évaluer la qualité des milieux naturels actuels et passés.**

Limites

- La principale limite aux études paléoécologiques est le coût des datations et la **nécessité de constituer un modèle d'âge fiable.**

6. Valorisation scientifique

Outre le travail des partenaires initiaux du programme, une **équipe de Lille s'est jointe aux travaux de recherche** dès la phase de prélèvement. De plus, le programme PRIMEQUAL a **permis d'accueillir** trois post-doctorants et deux doctorants, essentiellement financés par des **bourses du MESR et par la communauté d'agglomération** du Pays de Montbéliard.

L'ensemble de ces partenaires (cf. liste P6) ont activement collaboré pour valoriser la somme très importante de données acquises. A ce stade, quatre publications ont été soumises, dont trois sont en révision après avis des reviewers. Deux autres publications sont en phase finale de rédaction et seront soumises en octobre et novembre 2014. Le traitement des expériences préliminaires, les expérimentations en conditions contrôlées et les résultats obtenus sur les 54 tourbières pour les données concernant les HAPs ainsi que la description des paléopollutions et de leurs effets sur les amibes à thèque devraient être valorisés au premier semestre 2015. Par ailleurs, 12 communications à congrès internationaux et 2 présentations à colloque national ont été réalisées.

Par ailleurs, des enseignements universitaires ont présentés ces travaux aux étudiants de master des universités de Franche-Comté (pôles de Besançon et de Montbéliard) et de **Lorraine. D'autres présentations sont prévues en 2014 à l'université de Lille 1.**

Afin de renforcer et de dynamiser nos collaborations avec les gestionnaires **d'espaces naturels** ayant participé aux prélèvements *in situ*, une série de conférences sera organisée dans les zones géographiques des **sites d'étude**. Les futurs échanges seront à destination **spécifique des acteurs locaux en charge de l'aménagement du territoire et des gestionnaires d'écosystèmes sentinelles.**

Enfin, **des travaux que nous avons mené antérieurement dans le cadre d'un précédent projet soutenu lors de l'Appel à Propositions de Recherche PRIMEQUAL « Aérosols et Particules »**, nous avait amené à déposer un brevet (dispositif breveté n°10/58517) concernant un **« dispositif et son utilisation pour la mise en œuvre du suivi d'un écosystème »** (propriétaire : UFC/CNRS/Société VIGICELL). Les résultats obtenus dans le cadre de ce présent programme **μPOL-AIR confirme l'intérêt de développer un outil issu de ce brevet pour évaluer la qualité de l'air par des méthodes écosystémiques. Dans ce cadre un partenariat avec la SATT Grand-Est est en cours d'élaboration afin de créer un prototype et faire des essais, dans un premier temps en milieu aquatique, puis dans un second temps en milieu aérien.**

7. Remerciements

Nous souhaitons remercier les membres du Conseil Scientifique du Programme PRIMEQUAL **pour leur soutien. En effet, grâce à l'aide du Programme PPRIMEQUAL, les** six laboratoires partenaires de ce contrat ont pu établir des relations fructueuses, engager et enrichir des collaborations nationales et internationales et mener à bien ces recherches. Nos remerciements vont plus spécifiquement à Mme Anne PROBST, expert scientifique et membre du Conseil Scientifique de PRIMEQUAL avec qui nous avons pu avoir des échanges scientifiques riches lors de sa venue en Franche-Comté. Nous voulons adresser également nos remerciements aux personnels administratifs en charge des dossiers retenus par les instances PPRIMEQUAL car leurs aides ont renforcé la fluidité dans la gestion de notre projet. Nous remercions aussi les nombreux partenaires dont la présente énumération est non exhaustive, à savoir : Pôle Relais Tourbières, Conservatoire Rhône-Alpes des Espaces naturels, Conservatoire des Sites Lorrains, PNR des Ballons des Vosges, Conservatoire Régional des espaces naturels de Franche-Comté, Parc Naturel Régional Livradois-Forez, **Parc Naturel Régional des Volcans d'Auvergne, Conservatoire d'Espaces naturels d'Auvergne,** Conservatoire des Espaces et des Paysages d'Auvergne, Parc Naturel Régional du Pilat, Parc Naturel Régional du Morvan, Réserve naturelle de Frasne-Drugeon, Cabinet Pierre GOUBET... Ils ont facilité les **démarches administratives pour l'obtention des autorisations de** prélèvements des échantillons de sphaignes dans les tourbières sélectionnées. Ils ont permis nos prélèvements dans des sites protégés, ont facilité **l'accueil** de nos équipes lors des prélèvements et ont eu un rôle de conseil et de facilitation.

Nous remercions d'autres partenaires comme le réseau national des associations de mesure **de la qualité de l'air** et plus particulièrement des associations régionales telle que ATMO Franche-Comté où des liens étroits ont été tissés.

Liste des figures

Figure 1 : Sphagnum capillifolium, tourbière du Marais (Puy de Dôme) (photo Daniel Gilbert)	22
Figure 2 : Schéma théorique symbolisant la stratégie d'échantillonnage intra-tourbière	23
Figure 3 : Ortho-photographie de la tourbière du Tanet avec la localisation des points de prélèvements géoréférencés	24
Figure 4 : Localisation des tourbières du Centre-Est de la France appartenant au réseau de l'étude μ POL-AIR. Les secteurs sont entourés par des cercles bleus : 1) Alpes : 31-38 ; 2) Couloir rhodanien : 26-29, 51-53 ; 3) Jura : 19-25, 54 ; 4) Massif central : 39-50 ; 5) Morvan : 14-18 ; 6) Vosges : 1-13.	26
Figure 5 : Concentrations des éléments traces hautement enrichis dans chaque tourbière : A) Cd, B) Zn, C) Pb et D) Cu, mg.kg^{-1} de mousse sèche.	30
Figure 6 : Boxplots des facteurs d'enrichissement d'éléments traces en utilisant Ti comme élément de référence pour chaque secteur.	31
Figure 7 : Covariance biplot. Les pourcentages de variance expliqués par les deux premiers axes sont respectivement de 54,6% et 19,2%	32
Figure 8 : Scores de l'axe 1 du biplot de chaque tourbière.	33
Figure 9 : ACP des concentrations en 5 HAP majeurs dans les Vosges. La proportion d'inertie expliquée par chaque axe est indiquée le long de l'axe correspondant.	35
Figure 10 : Relation linéaire entre la teneur en HAP et l'altitude. Pour chaque HAP, sont indiqués le nombre de cycle ainsi que le R^2 ajusté et la P-value du modèle. Les droites de régression pour le Chrysène et pour le Benzo-b-Fluoranthrène sont superposées.	36
Figure 11 : Cercle des corrélations et carte factorielle de l'ACP dont les variables sont les régions et [Ca], [Na], [Mg], [K], [P], [N], [C], [S]	39
Figure 12 : Comparaison du rapport N/P pour les différents sites étudiés (ANOVA, $p= 7.89\text{e-}14$). a, b, c : comparaison des sites 2 à 2 par un test de Tukey HSD.	40
Figure 27 : A) Dispositif expérimental de contamination atmosphérique au phénanthrène B) Détails de l'intérieur de l'enceinte avec un microcosme sphaignes-microorganismes	65
Figure 28: Activité peroxydase dans trois colonnes de sphaigne (pré-analyse avant mise en œuvre du protocole de contamination).	68
Figure 31 : Observations au microscope optique à épifluorescence de microorganismes fongiques potentiellement ectoparasites. La paroi chitineuse des champignons est colorée au Calcofluor white afin d'apparaître en bleu sous lumière UV. A gauche : lumière blanche. A droite : lumière UV. Echelle : $5 \mu\text{m}$	72
Figure 32: Observations microscopiques (lumière blanche) de fragment de capitulum de sphaigne (échantillon T0) (Crédit photo : Marlène Jobard)	73
Figure 33 : Synthèse des techniques analytiques utilisées	75
Figure 34 : Cartographies ESEM-EDS pour la détermination des différentes phases minérales agglutinées sur les thèques d'amibes.	76
Figure 35 : Diversité minérale par espèce, par tourbière en fonction de la taille médiane de ces particules et de la distance minimale à leurs sources potentielles.	77
Figure 36 : Particules de trémolite (flèches) sur une thèque de Nebela collaris prélevée dans la tourbière du Russey. La trémolite est non présente dans l'environnement géologique du Russey et est observée sur les thèques, 1 mois après l'ensemencement en particules exogènes.	78
Figure 37 : Carottier utilisé pour le prélèvement de tourbe. Tourbière de Creusates, Vosges, octobre 2011.	81
Figure 38 : Modèles d'âge pour les tourbières de Cérin, Ténine et Creusates.	82

Figure 39: Concentrations en éléments chimiques au cours du temps dans la tourbe des trois tourbières échantillonnées.....	83
Figure 40 : Abondances des thèques d'amibes au cours du temps dans la tourbe des trois tourbières échantillonnées.....	87
Figure 41 : Evolution au cours du temps de la composition de la communauté d'amibes à thèque dans les trois tourbières (analyse par RDA) et influence des concentrations en éléments chimiques	88

Liste des tableaux

Tableau 1 : Moyenne, écart-type, minimum et maximum de chaque élément trace analysé pour chaque secteur et pour toutes les tourbières ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\text{MS}$).....	29
Tableau 2 : Moyenne ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\text{MS}$) , écart-type, minimum et maximum de 5 HAP analysés dans le secteur des Vosges.	34
Tableau 3 : Moyenne, écart-type de chaque élément nutritif et ion majeur analysé pour chaque secteur étudié (en $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\text{MS}$ de sphaignes).....	38
Tableau 4 : valeur de l'intercept et des paramètres associés à chacune des variables explicatives sélectionnées par la régression pas à pas ; régression globale	50
Tableau 5 : comparaison du r^2 obtenu des régressions globale et locale	50
Tableau 6 : Définition des concepts de bioindicateur et biointégrateur (adapté de Thompson et al., 2012).....	57
Tableau 7 : Couples d'amorce testées et résultats de l'amplification par PCR	71
Tableau 8 : Reconstitution du total des dépôts (en $\text{mg}\cdot\text{cm}^{-2}$) en Cd, Cr, Cu , Ni,Pb et Zn au cours du dernier millénaire (années 1000 à 2000) dans les tourbières de Cérin (CE), Creusates (CR) et Ténine (TE) et pourcentage de ce dépôt par période (20ème siècle, 19ème siècle, années 1000 à 1800).....	85

8. Bibliographie

Bernard N., Saintot M., Astre C., Gerber M. (1998). Personal exposure to NO₂ pollution and effect on plasma antioxidants. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, 53: 122-128.

Bernard N., Astre C., Vuillot B., Saintot M., Gerber M. (1997). 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., 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.

Blaauw M. (2010). Methods and code for 'classical' age-modelling of radiocarbon sequences. *Quaternary Geochronology* 5, 512-518.

Bratback G (1985) Bacterial biovolume and biomass estimations. *Appl Environ Microbiol* 46:491-498.

Chemel C., Chaxel E., 2007. On the role of the Grenoble valley topography in vertical transport of mass and pollutants. Presented at the International conference on Alpine meteorology (ICAM), Chambéry, France.

Desalme D, Roy J.C., Binet P, Chiapusio G, Gilbert D, Toussaint ML, Girardot L., Bernard N. (2013) Exposure chambers for studying the partitioning of atmospheric PAHs in environmental compartments : validation and calibration using experimental and computational approaches, *Environmental Science and Technology*, 47 (15) : 8399-8407.

Dolegowska S., Migaszewski Z.M. (2011) PAH concentrations in the moss species *Hylocomium splendens* (Hedw.) B.S.G. and *Pleurozium schreberi* (Brid.) Mitt. from the Kielce area (south-central Poland) *Ecotoxicology and Environmental Safety* 74 : 1636-1644.

Dominik J., Mangini A., Müller G. (1981). Determination of recent deposition rates in Lake Constance with radioisotopic methods. *Sedimentology* 28: 653-677.

Dragovic S., Mihailovic N. (2009). Analysis of mosses and topsoils for detecting sources of heavy metal pollution: multivariate and enrichment factor analysis. *Environmental Monitoring and Assessment* 157, 383-390. doi:10.1007/s10661-008-0543-8.

Dryer A., Radke M., Turunen J., Blodau C. (2005) Long-Term Change of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Deposition to Peatlands of Eastern Canada. *Environmental Science & Technology* 39 (11): 3918-3924.

European Pollutant Release and Transfer Register (E-PRTR) <http://www.eea.europa.eu/data-and-maps/data/european-pollutant-release-and-transfer-register-e-prtr-regulation-art-8-diffuse-air-data#tab-gis-data>

Fabure J., Meyer C., Denayer F., Gaudry A., Gilbert D., Bernard N. (2010) Accumulation Capacities of Particulate Matter in an Acrocarpous and a Pleurocarpous Moss Exposed at Three Differently Polluted Sites (Industrial, Urban and Rural). *Water Air and Soil Pollution* 212 (1-4): 205-217

Fluck P.C. (2000). Sainte-Marie-aux-Mines. Les mines du rêve. Éditions du patrimoine minier, 208 p.

Fluck P., Weil (1975). Géologie des gites minéraux dans les Vosges.

Forel B., Monna, F., Petit, C., Bruguier, O., Losno, R., Fluck, P., Bégeot, C., Richard, H., Bichet, V. and Chateau, C. (2010). Historical Mining and smelting in the Vosges Mountains (France) recorded in two ombrotropic peat bogs. *Journal of Geochemical Exploration* 107 : 9-20.

Fränzle O. 2006. Complex bioindication and environmental stress assessment. *Ecological Indicators* 6: 114-136.

Garrec J.P. and Van Haluwyn C. Biosurveillance végétale de la **qualité de l'air : concepts, méthodes et applications** (Tec et Doc, paris, 2002) pp 1-117.

- Gardes M., Bruns T.D. (1993) ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology* 2: 113-118.
- Gaudry A., Moskura M., Mariet C., Ayrault S., Denayer F., Bernard N. (2008). 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.
- Gerdol, R., Bragazza, L., Marchesini, R., Medici, A., Pedrine, P., Benedetti, S., Bovolenta, A., Coppi, S. (2002). Use of moss (*Tortula muralis* Hedw.) for monitoring organic and inorganic air pollution in urban and rural sites in Northern Italy. *Atmospheric Environment* 36, 4069–4075.
- Gerphagnon M., Latour D., Colombet J., Sime-Ngando T. (2013) Fungal parasitism : Life cycle, dynamics and impact on cyanobacterial blooms. *Plos one* april 2013. SOI: 10.1371/journal.pone.0060894.
- Gilbert D., Amblard C., Bourdier G., Francez A.J. (1998) Short effect of nitrogen enrichment on the microbial communities of a peatland. *Hydrobiologia*, 373/374: 111-119.
- Gombert S., De Traubenberg C.R., Losno R., Leblond S., Colin J.L., Cossa D. (2004). Biomonitoring of element deposition using mosses in the 2000 French Survey: Identifying sources and spatial trends. *Journal of Atmospheric Chemistry* 49, 479–502. doi:10.1007/s10874-004-1261-4.
- Grimalt, J.O., Borghini, F., Sanchez-Hernandez, J.C., Barra, R., Torres Garcia, C.J., Focardi, S. (2004). Temperature dependence of the distribution of organochlorine compounds in the mosses of the Andean Mountains. *Environmental Science and Technology* 38, 5386–5392.
- Gulliver, J., Briggs, D., 2011. STEMS-Air: A simple GIS-based air pollution dispersion model for city-wide exposure assessment. *Sci. Total Environ.* 409, 2419–2429. doi:10.1016/j.scitotenv.2011.03.004.
- Gulliver, J., Briggs, D., 2011. STEMS-Air: A simple GIS-based air pollution dispersion model for city-wide exposure assessment. *Sci. Total Environ.* 409, 2419–2429. doi:10.1016/j.scitotenv.2011.03.004
- Gulliver, J., Briggs, D., 2011. STEMS-Air: A simple GIS-based air pollution dispersion model for city-wide exposure assessment. *Sci. Total Environ.* 409, 2419–2429. doi:10.1016/j.scitotenv.2011.03.004
- Gulliver, J., de Hoogh, K., Fecht, D., Vienneau, D., Briggs, D., 2011. Comparative assessment of GIS-based methods and metrics for estimating long-term exposures to air pollution. *Atmos. Environ.* 45, 7072–7080. doi:10.1016/j.atmosenv.2011.09.042.
- Hafner, W.D., Carlson, D.L., Hites, R.A., (2005). Influence of local human population on atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbon concentrations. *Environmental Science & Technology* 39, 7374-7379.
- Harmens, H., Norris, D.A., Steinnes, E., Kubin, E., Piispanen, J., Alber, R., Aleksiyenak, Y., Blum, O., Coşkun, M., Dam, M., De Temmerman, L., Fernandez, J.A., Frolova, M., Frontasyeva, M., Gonzalez-Miqueo, L., Grodzińska, K., Jeran, Z., Korzekwa, S., Krmar, M., Kvietskus, K., Leblond, S., Liiv, S., Magnusson, S.H., Maňkowska, B., Pesch, R., Ruhling, A., Santamaria, J.M., Schroder, W., Spiric, Z., Suchara, I., Thoni, L., Urumov, V., Yurukova, L., Zechmeister, H.G., 2010. Mosses as biomonitors of atmospheric heavy metal deposition: Spatial patterns and temporal trends in Europe. *Environmental Pollution* 158, 3144–3156. doi:10.1016/j.envpol.2010.06.039
- Harmens H., Norris D.A., the participants of the moss survey (2008). *Spatial and Temporal Trends in Heavy Metal Accumulation in Mosses in Europe (1990-2005)*. ICP Vegetation Programme Coordination Centre, Centre for Ecology and Hydrology, Bangor, UK.
- Holoubek, I., Korinek, P., Seda, Z., Schneiderova, E., Holoubkova, I., Pacl, A., Triska, J., Cudlin, P., Cařslavsky, J.** (2000). The use of mosses and pine needles to detect persistent organic pollutants at local and regional scales. *Environmental Pollution* 109, 283–292.
- Jassey V.E.J., Meyer C., Dupuy C., Bernard N., Mitchell E.A.D., Toussaint M-L., Metian M., Chatelain A.P., Gilbert D. (2013) To what extent do food preferences explain the trophic position of heterotrophic and mixotrophic testate amoebae in a *Sphagnum*-peatland? *Microbial ecology* 66(3) : 571-580.
- Jassey V.E.J., Chiapusio G., Binet P., Buttler A., Laggoun-Defarge F., Delarue F., Bernard N., Mitchell E.A.D., Toussaint M.L., Francez A.J., Gilbert D. (2013) Above- and belowground linkages in

Sphagnum-peatland : climate warming affects plant-microbial interactions *Global Change Biology* 19: 3. 811-823.

Jassey V.E.J., Chiapusio G., Gilbert D., Toussaint M.L., Binet P. (2012) Phenoloxidase and peroxidase activities in Sphagnum-dominated peatland in a warming climate *Soil Biology and Biochemistry* 46: 49-52.

Jassey V.E.J. (2011a). **Impact d'un réchauffement climatique sur le fonctionnement de la sphagnosphère : relations polyphénols- communautés microbiennes.** Thèse de l'Université de Franche-Comté, 236p.

Jassey V.E.J., Gilbert D., Binet P., Toussaint M.L., Chiapusio G. (2011b). Effect of a temperature gradient on Sphagnum fallax and its associated living microbial communities: a study under controlled conditions. *Canadian Journal of Microbiology* 57 (3): 226-235.

Jirousek M., Hájek M., Bragazza L. (2011) Nutrient stoichiometry in Sphagnum along a nitrogen deposition gradient in highly polluted region of Central-East Europe. *Environmental Pollution* 159 : 585-590.

Joly D., Brossard T., Cardot H., Cavailhès J., Hilal M., Wawresky P. (2008a). Densité des points de **mesure, types et limite des modèles d'interpolation** ». Journées de climatologie, Grenoble, 22-23 mars 2007 : climat et société : mesures et modèles, publication dans les actes, pp. 49-65.

Joly D., Brossard T., Cardot H., Cavailhès J., Hilal M., Wawresky P. (2008b). Interpolation par recherche d'information locale. *Climatologie*, (5) : 27-48.

Joly D., Brossard T., Cardot H., Cavailhès J., Hilal M., Wawresky P. (2009). Interpolation par régressions locales : application aux précipitations en France. *L'Espace géographique*, 38(2) : 157-170.

Joly D., Brossard T., Cardot H., Cavailhès J., Hilal M., Wawresky P. (2010). Les types de climats en France, une construction spatiale (Types of climate on continental France, a spatial construction). *Cybergeo: European Journal of Geography*: 501 <http://cybergeo.revues.org/index23155.html>

Joly D., Brossard T., Cardot H., Cavailhès J., Hilal M., Wawresky P. (2011). Temperature Interpolation by local information; the example of France. *International Journal of Climatology*: 31(14), 2141-2153.

Joly D., Bois B., Zaksek K., 2012. Rank-ordering of topographic variables correlated with temperature. *Atmospheric and Climate Science*, 2(2): 139-147 DOI: 10.4236/acs.2012.22015

Krommer V., Zechmeister H.G., Roder I., Scharf S., Hanus-Ilmar A. 2007. Monitoring atmospheric pollutants in the biosphere reserve Wienerwald by a combined approach of biomonitoring methods and technical measurements *Chemosphere* 67- 1956-1966

Lara E., Moreira D., Lopez-Garcia P. (2010). The environmental Clade LKM11 and Rozella form the deepest Branching clade of fungi. *Protist*, 161 : 116-121.

Lara E., Mitchell E.A.D., Moreira D., Lopez-Garcia P. (2011). Highly diverse and seasonally dynamic protist community in a pristine peat bog. *Protist*, 162 : 14-32.

Lefevre E., Jobard M., Venisse J.S., Bec A., Kagami M., Amblard C., Sime-Ngando T. (2010). Development of a real-time PCR essay for quantitative assessment of uncultured freshwater zoosporic fungi. *Journal of Microbiological Methods*, 81 : 69-76

Letcher Peter M., Lopez S, Schmieder R, Lee P.A., Behnke C, Powell M.J., McBride R.C. (2013). Characterization of *Amoebophilidium protococcarum*, an Algal Parasite New to the Cryptomycota Isolated from an Outdoor Algal Pond Used for the Production of Biofuel. *PLoS One*: 8(2): e56232.

Liu X., Zhang G., Jones K.C., Li X., Peng X., Qi S. (2005). Compositional fractionation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in mosses (*Hypnum plumaeformae* WILS.) from the northern slope of Nanling Mountains, South China. *Atmospheric Environment* 39, 5490–5499.

Mao L., Qiu, Y., Kusano, C., Xu, X., 2012. Predicting regional space–time variation of PM2.5 with land-use regression model and MODIS data. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 19, 128–138. doi:10.1007/s11356-011-0546-9

- Markert B. (2007). Definitions and principles for bioindication and biomonitoring of trace metals in the environment. *J Trace Elements Med Biol* 21 (1) : 77-82.
- Meyer C., Desalme D., Bernard N., Binet P., Toussaint M.L., Gilbert D. (2013) Using Testate Amoeba as potential biointegrators of atmospheric deposition of Phenanthrene (Polycyclic Aromatic Hydrocarbon) on "moss/soil interface-Testate Amoeba community" microecosystems *Ecotoxicology* 22: 2. 287-294.
- Meyer C., Gilbert D., Gillet F., Moskura M., Franchi M., Bernard N. (2012) Using "bryophytes and their associated Testate amoeba" microsystems as indicators of atmospheric pollution. *Ecological Indicators* 13: 1. 144-151.
- Meyer C., Gilbert D., Gaudry A., Franchi M., Nguyen-Viet H., Fabure J., Bernard N. (2010a). Relationship of Atmospheric Pollution Characterized by gas (NO₂) and particles (PM10) to Microbial Communities Living in Bryophytes at Three Differently Polluted Sites (Rural, Urban and Industrial). *Microbial Ecology* 59 (2): 324-334.
- Meyer C., Bernard N., Moskura M., Toussaint M.L., Denayer F., Gilbert D. (2010b). Effect of urban particulate deposition on microbial communities living in bryophytes: an experimental study. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 73: 1776-1784
- Migaszewski Z.M., Gauszka A., Crock J.G., Lamothe P.J., Doegowska S., 2009. Interspecies and interregional comparison of the chemistry of PAH and trace elements in mosses *Hylocomium splendens* (Hedw.) B.S.G. and *Pleurozium schreberi* (Brid.) Mitt. From Poland and Alaska. *Atmospheric Environment* 43, 1464–1473.
- Mitchell E.A.D., Buttler A., Grosvernier P., Rydin H., Albinsson C., Greenup A., Heijmans M., Hoosbeek M., Saarinen T. (2000). Relationships among testate amoebae (Protozoa), vegetation and water chemistry in five Sphagnum-dominated peatlands in Europe. *New Phytologist* 145: 95-106.
- Mitchell E.A.D., Bragazza L., Gerdol R. (2004). Testate amoebae (Protista) communities in *Hylocomium splendens* (Hedw.) B.S.G. (Bryophyta): Relationship with altitude, and moss elemental chemistry. *Protist* 155: 423-436
- Nguyen-Viet H., Frontasyeva M.V., Trinh Thi T.M., Gilbert D., Bernard N. (2010) Atmospheric heavy metal deposition in Northern Vietnam: Hanoi and Thainguyen case study using the moss biomonitoring technique, INAA and AAS. *Environmental Science and Pollution Research* 17(5):1045-1052
- Nguyen-Viet H., Bernard N., Mitchell E.A.D., Badot P.M., Gilbert D. (2008). Effect of lead pollution on testate amoebae communities living in *Sphagnum fallax*: an experimental study. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 69: 130-138.
- Nguyen-Viet H., Gilbert D., Mitchell E.A.D., Badot P.-M., Bernard N. (2007a) 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., Cortet J., Badot P.-M., Gilbert D. (2007b) Relationship between testate amoebae (protist) communities and atmospheric heavy metals accumulated in *Barbula indica* (Bryophyta) in Vietnam. *Microbial ecology*, 53: 53-65.
- Onianwa P.C. (2001). Monitoring atmospheric metal pollution: A review of the use of mosses as indicators. *Environmental Monitoring and Assessment* 71 (1): 13-50.
- Otvös E., Kozak I.O., Fekete J., Sharma V.K., Tuba Z. (2004). Atmospheric deposition of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in mosses (*Hypnum cupressiforme*) in Hungary. *Science of the Total Environment* 330, 89–99.
- Orlinski R. (2002). Multipoint moss passive samplers assessment of urban airborne polycyclic aromatic hydrocarbons: concentrations profile and distribution along Warsaw main streets. *Chemosphere* 48, 181–186.
- Pakarinen, P., 1978. Distribution of heavy metals in the Sphagnum layer of bog hummocks and hollows. *Annales Botanici Fennici* 15, 287–292.

- Rasconi S., Jobard M., Jouve L., Sime-Ngando T. (2009). Use of calcofluor white for detection, identification and quantification of phytoplanktonic fungal parasites. *Applied & Environmental Microbiology* 75 : 2545-2553.
- Rasconi S., Jobard M., Sime-Ngando T. (2011). Parasitic fungi of phytoplankton: Ecological roles and implication for microbial food webs. *Aquatic Microbial Ecology* 62:123-137
- Reimann C., de Caritat P. (2000). Intrinsic Flaws of Element Enrichment Factors (EFs) in Environmental Geochemistry. *Environmental Science & Technology - ENVIRON SCI TECHNOL* 34. doi:10.1021/es001339o.
- Reimer P.J., Bard E., Bayliss A. *et al* 2013. IntCal13 and Marine13 radiocarbon age calibration curves, 0-50,000 years cal BP. *Radiocarbon* 55: 1869-1887.
- Saintot M., Bernard N., Astre C., Gerber M. (1999) Ozone exposure and blood antioxidants : a study in a periurban area in Southern France. *Archives of Environmental Health-International Archives of Occupational and Environmental Health*, 54: 34-39.
- Solazzo E., Bianconi R., Pirovano G., Matthias V., Vautard R., Moran M.D., Wyatt Appel K., Bessagnet B., Brandt J., Christensen J.H., Chemel C., Coll I., Ferreira J., Forkel R., Francis X.V., Grell G., Grossi P., Hansen A.B., Miranda A.I., Nopmongkol U., Prank M., Sartelet K.N., Schaap M., Silver J.D., Sokhi R.S., Vira J., Werhahn J., Wolke R., Yarwood G., Zhang J., Rao S.T., Galmarini S. (2012). Operational model evaluation for particulate matter in Europe and North America in the context of AQMEII. *Atmos. Environ.* 53, 75–92. doi:10.1016/j.atmosenv.2012.02.045.
- Schroeder W. Pesch, R. (2007). Synthesizing bioaccumulation data from the German metals in mosses surveys and relating them to ecoregions. *Science of The Total Environment* 374, 311–327. doi:10.1016/j.scitotenv.2006.09.015.
- Vandenkoornhuysen P., Baldauf S.L., Leyval C., Straczek J., Young J.P. (2002) Extensive fungal diversity in plant roots. *Science* 295 :2051.
- Van Drooge B.L., Pérez Ballestra P. (2009). Seasonal and daily source apportionment of polycyclic aromatic hydrocarbon concentration in PM₁₀ in a semirural European area. *Environmental Science and Technology* 43: 7310-7316.
- Wedepohl K.H. (1995). The composition of the continental crust. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 59 (7): 1217-1232.
- Wegener J.W.M., Van Schaik M.J.M., Aiking H. (1992) Active biomonitoring of polycyclic aromatic hydrocarbons by means of mosses. *Environmental Pollution* 76 : 15-18.
- Weisse T., Müller H., Pinto-Coelho R.M., Schweizer A., Springmann D. & Baldringer G. (1990) Response of the microbial loop to the phytoplankton spring bloom in a large prealpine lake. *Limnol Oceanogr*, 35:781-794.
- Yin J., Allen A.G., Harrison R.M., Jennings S.G., Wright E., Fitzpatrick M., Healy T., Barry E., Ceburnis D., McCusker D. (2005). Major component composition of urban PM₁₀ and PM_{2.5} in Ireland. *Atmospheric research* 78: 149-165.
- Yunker M., MacDonald R., Vingarzan R., Mitchell R., Goyette D., Sylvestre S. (2002). PAHs in the Fraser basin river : a critical appraisal of PAH Ratios as indicator of PAH source and composition. *Organic Geochemistry* 33: 489-515.
- Zanetti, P., 1990. *Air Pollution Modelling: Theories, Computational Methods and Available Software*. Van Nostrand Reinhold, New York, USA.
- Zarazua-Ortega G., Poblano-Bata J., Tejeda-Vega S., Avila-Perez, Zepeda-Gomez, Ortiz-Oliveros H., Macedo-Miranda G. (2013). Assessment of Spatial Variability of Heavy Metals in Metropolitan Zone of Toluca Valley, Mexico, Using the Biomonitoring Technique in Mosses and TXRF Analysis. *The Scientific World Journal* 2013. doi:10.1155/2013/426492

Annexe I

Liste des opérations de valorisation issues du contrat (articles de valorisation, participation à des colloques, enseignement et formation, communication, expertises...)

PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES

Publications scientifiques en révision auprès de revues internationales à comité de lecture

• ARMYNOT-DU-CHATELET E., BERNARD N., DELAINE M., POTDEVIN J.L., GILBERT D. Assessing mineral composition of testate amoebae from Sphagnum peatlands, using complementary physico-chemical and microscopic techniques: Does the grain characteristics and his potential origin matters? *European Journal of Protistology*.

• JOLY D. *, DIAZ-DE-QUIJANO M. *, GILBERT D., BERNARD N. A more cost-effective geomatic approach to modelling PM10 dispersion across Europe. *Applied Geography*.

• MEYER C. *, DIAZ-DE-QUIJANO M. *, MONNA F., FRANCHI M., TOUSSAINT M.L., GILBERT D., BERNARD N. Characterisation and distribution of deposited trace elements transported long and intermediate distances in northeastern France using Sphagnum peatlands as a sentinel ecosystem. *Atmospheric Environment*.

Publications scientifiques soumises à des revues internationales à comité de lecture

• MEYER C., GILBERT D., BERNARD N. Bio-indication and bio-integration for global change evaluation. Links between ecology and aquatic and terrestrial ecotoxicology concepts: towards a reconciliation of different fields of ecology? *Trends in Ecology & Evolution*.

Publications scientifiques en préparation

(soumission prévue octobre 2014)

• MEYER C., CHIPUSIO G., GILBERT D., BINET P., FRANCHI M., BERNARD N. Influence of availability of nutrients and phenolic compounds emitted by *Sphagnum* on the associated microbial ecosystem functioning along an altitudinal gradient.

(soumission prévue novembre 2014)

• JOLY D. *, DIAZ-DE-QUIJANO M. *, GILBERT D., BERNARD N. Spatial modelling trace elements deposition on peatlands at supra-regional scale in France.

* These authors contributed equally

COLLOQUES

Participations à des colloques internationaux

- MEYER C., KARIMI B., CHIAPUSIO G., GILBERT D., BERNARD N. Functioning of microbial ecosystem along an altitudinal gradient under the influence of elements deposition transported over long distances. (2014). 7th International Symposium on Testate Amoebae (ISTA7), Poznan, Pologne, 8-12 September 2013, Com. Orale
- DELAINE M., BERNARD N., GILBERT D., GUILLOT F., RECOURT P., ARMYNOT DU CHATELET E. Size and mineral diversity of particles constituting the shells of testate amoebae. (2014). 7th International Symposium on Testate Amoebae (ISTA7), Poznan, Pologne, 8-12 September 2013, Com. Orale
- DELAINE M., ARMYNOT DU CHATELET E., RECOURT P. Anaglyphic SEM pictures : a new method which improves presentation and description of **testate amoebae's shell morphology**. (2014). 7th International Symposium on Testate Amoebae (ISTA7), Poznan, Pologne, 8-12 September 2013, Poster
- DELAINE M., ARMYNOT DU CHATELET E., GILBERT D., GUILLOT F., RECOURT P., BERNARD N. Diversity of mineral and organic objects agglutinated by *Bellinularia indica* and *Nebela cf. collaris*. (2014). 7th International Symposium on Testate Amoebae (ISTA7), Poznan, Pologne, 8-12 September 2013, Poster
- KARIMI B., MEYER C., GILBERT D., BERNARD N. (2014) Co-occurrence patterns as a response of interaction network of terrestrial microbial communities to atmospheric pollution and seasonal variations. 24th SETAC Europe Annual Meeting, Bâle. 11-15 May 2014, Com. Orale
- MEYER C., GILBERT D., BERNARD N. (2013) Microecosystems "bryophyte-microorganisms": a good tool for ecosystemic ecotoxicology. 23rd SETAC Europe Annual Meeting, Glasgow. 12-16 May 2013, Com. Orale
- ARMYNOT DU CHATELET E., DELAINE M., MEYER C., GILBERT D., BERNARD N. (2012) Nature and origin of mineral grains agglutinated on testate amoebae. 6th International Symposium on Testate Amoebae (ISTA6), Xiamen, Chine, 15-18 October 2012. Poster

- MEYER C., JASSEY V., GILBERT D., BERNARD N. (2012) Microecosystem bryophyte-testate amoebae: a good tool of bioindication and biointegration of disturbances. 6th International Symposium on Testate Amoebae (ISTA6), Xiamen, Chine, 15-18 October 2012. Com. Orale
- MEYER C., DESALME D., BERNARD N., BINET P., **TOUSSAINT ML., GILBERT D. (2012) Using "moss/soil interface-Testate Amoeba community"** microecosystems as biointegrators of atmospheric deposition of Phenanthrene. 6th International Symposium on Testate Amoebae (ISTA6), Xiamen, Chine, 15-18 October 2012. Com. Orale
- JASSEY V.E.J., MEYER C., DUPUY C., BERNARD N., SHIMANO S., MITCHELL E.A.D., GILBERT D. (2012) Do testate amoebae occupy the same trophic position in microbial food webs? 6th International Symposium on Testate Amoebae (ISTA6), Xiamen, Chine, 15-18 October 2012. Com. Orale
- BERNARD N., GILBERT D. (2011) Using Sphagnum Peatlands for the quantification of transboundary atmospheric pollutant depositions: the μ POL-AIR project. International Workshop sphagnum peatlands and long-range transboundary atmospheric pollutions, Montbéliard, France. Com. Orale
- MEYER C., GILBERT D., BERNARD N. (2011) Impact of atmospheric pollutants on microbial communities living in bryophytes. International Workshop sphagnum peatlands and long-range transboundary atmospheric pollutions, Montbéliard, France. Com. Orale
- GILBERT D., MEYER C., BERNARD N. (2010) Toward a new tool to evaluate long-range atmospheric pollution impact on Ecosystems: Bryophyte/associated microorganism Microsystems. Air, Water, Soil Pollution 8-9 juin 2010, Imola, Italie. Com. Orale Conférence invitée.
- BERNARD N., GILBERT D., MEYER C., (2010) Using Bryophyte/associated microorganism Microsystems as a new tool to evaluate atmospheric pollution impact on Ecosystems. 18th International Conference on Modelling, Monitoring and Management of Air Pollution, Kos, Greece, 21-23 June 2010. Com. Orale
- DESALME D., CHIAPUSIO G., BINET P., TOUSSAINT M.-L., GILBERT D., BERNARD N. (2010) Simulating atmospheric PAH exposure on terrestrial ecosystems : an original experimental device. Air Pollution 2010, 18th International Conference on Modelling, Monitoring and Management of Air Pollution, Kos, Greece, 21-23 June 2010. Com. Orale

Participations passées à des colloques de dimension nationale

- DELAINE M., ARMYNOT-DU-CHATELET E., GILBERT D., RECOURT P., BERNARD N. (2014) Grain-size and mineral diversity of particles constituting the shells of xenogenous testate amoebae. Lab meeting, Neuchâtel, Suisse, 15 April 2014. Oral
- JASSEY V., MEYER C., DUPUY C., SHIMANO S., BERNARD N., MITCHELL EAD., TOUSSAINT M.L., CHATELAIN A., GILBERT D. (2011) Characterizing the Feeding Habits and the trophic position of Testate Amoebae in Sphagnum peatlands. Lab meeting, Neuchâtel, Suisse, 09 September 2011. Oral

POST-DOCTORAT

Stage post-doctoral portant sur l'analyse de données obtenues dans le cadre du projet μ POL-AIR

- DIAZ-DE-QUIJANO Maria (Stage Post-Doctoral) – septembre 2013 / mars 2014.
Sujet : Développement d'un modèle géomatique pour le couplage de données écologiques et géographiques.
Encadrants : D. JOLY., N. BERNARD - Université de Franche-Comté – UMR 6049 CNRS THéMA et UMR 6249 CNRS Chrono-Environnement.
Financement : Programme PRIMEQUAL et Pays de Montbéliard Agglomération
- MEYER caroline (Stage Post-Doctoral puis ATER UFC) – septembre 2012 / Aout 2014.
Sujet : Anlyses microbiennes dans les sphaignes
Encadrants : D. GILBERT., N. BERNARD - Université de Franche-Comté –UMR 6249 CNRS Chrono-Environnement.
Financement : Programme PRIMEQUAL et Pays de Montbéliard Agglomération
- JOBARD Marlène (stage post-doctoral 4mois, 2012)
Sujet : caractérisation des communautés de parasites microbiens dans les sphaignes.
Encadrants : D. GILBERT., N. BERNARD - Université de Franche-Comté –UMR 6249 CNRS Chrono-Environnement.
Financement : Pays de Montbéliard Agglomération

THESE

Thèse en cours

- DELAINE Maxence (Ecole doctorale Environnements-Santé – Université de Franche-Comté), thèse débutée en septembre 2013.

Sujet : Structure et construction des thèses **d'amibes, étude de leur utilisation potentielle pour** caractériser les dépôts de particules atmosphériques **d'origine naturelle et anthropique.**

Encadrants : E. ARMYNOT-DU-CHATELET (Université de Lille 1), N. BERNARD (Université de Franche-Comté)

Financement de thèse : Allocation recherche Ministère **de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche** (MESR)

- KARIMI Battle (Ecole doctorale Environnements-Santé – Université de Franche-Comté), thèse débutée en septembre 2012.

Sujet : Analyse multi-échelle de l'impact des changements globaux sur les micro-écosystèmes terrestres : **De l'étude des communautés fonctionnelles à la modélisation des réseaux d'interactions écologiques**

Encadrants : D. GILBERT (Université de Franche-Comté), N. NIQUIL (Université de Caen), N. BERNARD (Université de Franche-Comté)

Financement de thèse : Allocation recherche Ministère **de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche** (MESR)

ARTICLES DE VALORISATION-VULGARISATION

Articles de valorisation parus

- Les travaux de recherche réalisés dans le cadre de **ce programme ont fait l'objet d'articles dans les journaux internes des établissements**
- Une journée de restitution des données est prévue dans chacune des régions où les prélèvements ont été effectués. Ces journées auront lieu entre **l'automne et l'hiver 2015 et seront organisées par les chercheurs impliqués dans l'échantillonnage.** A cette occasion une synthèse des résultats sera distribuée à **l'ensemble des partenaires.**

ENSEIGNEMENT - FORMATION

Enseignements/formations dispensés

- Daniel GILBERT est intervenu en Master 2 « ECOS : Ecosystème Environnement Santé », site de Besançon, Université de Franche-Comté sur le thème : utilisation des microorganismes en surveillance environnementale et plus précisément **dans le domaine de la qualité de l'air (2010 à 2014). Cette présentation a aussi été réalisée à l'université de Lorraine.**
- Nadine BERNARD a dispensé des enseignements dans le cadre du Cours de Master en Ingénierie « Environnement-Territoires », site de Montbéliard, Université de Franche-Comté sur les thèmes : de la relation homme-milieu, **de l'écotoxicologie, de l'évaluation des risques environnementaux et sanitaires, des mécanismes d'action toxique des polluants sur les êtres vivants...**(depuis 2013).
- Philippe BINET et Geneviève CHIAPUSIO sont intervenus en Master 2 « Gestion des Territoires et de **l'environnement, site de Montbéliard**, Université de Franche-Comté sur le thème : Effets des contaminants sur les interactions plantes-microorganismes.
- Caroline MEYER a utilisé ces bases de données dans ses **interventions en unités d'enseignement en statistiques en Master GDE 1ere année (15 heures d'interventions).**

Enseignements/formations prévus

- Des interventions sur ces thèmes sont prévues pour **le prochain quadriennal à l'Université de Franche-Comté et à l'Université de Lille 1 en Licence 3, Master 1, Master 2 et Cours de Master en Ingénierie (CMI).**