

Analyse dendrochimique par spectrométrie de rayonnement X: application à l'étude de la nutrition des arbres et des variations spatiales et temporelles de l'environnement

Anny Weitner

▶ To cite this version:

Anny Weitner. Analyse dendrochimique par spectrométrie de rayonnement X : application à l'étude de la nutrition des arbres et des variations spatiales et temporelles de l'environnement. Biologie végétale. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 2007. Français. NNT : 2007NAN10099 . tel-01748230

HAL Id: tel-01748230 https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01748230

Submitted on 29 Mar 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers. L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact: ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm







FACULTE DES SCIENCES & TECHNIQUES

U.F.R Sciences & Techniques Biologiques Ecole Doctorale Ressource Procédés, Produits, Environnement D.F.D Sciences Agronomiques et Forestières, Biologie et Ecologie, Biotechnologies

Thèse

présentée pour l'obtention du titre de

Docteur de l'Université Henri Poincaré, Nancy 1 en Biologie Végétale et Forestière

par Anny WEITNER

Analyse dendrochimique par spectrométrie de rayonnement X : application à l'étude de la nutrition des arbres et des variations spatiales et temporelles de l'environnement.

Soutenance publique le 6 Novembre 2007

Membres du Jury:

Rapporteurs: Beeckman Hans Senior Scientist, KMMA-Tervuren

Cherubini Paolo Senior Scientist, WSL-Birmensdorf

Examinateurs: Dambrine Etienne Directeur de Recherche, INRA-Champenoux

Hallegot Philippe Responsable de Laboratoire, L'Oréal-Aulnay sous bois

Hebrant Marc Professeur, UHP-Nancy I

Directeur de thèse : Dupouey Jean-Luc Directeur de Recherche, INRA-Champenoux

Remerciements

Merci à la Région Lorraine ainsi qu'à l'INRA d'avoir accepté de financer cette thèse. Un grand merci à l'UMR EEF de m'avoir accueillie. Ces années ont été un vrai plaisir!!

Merci Jean-Luc de m'avoir fait confiance. Ta rigueur scientifique et ton savoir faire sont des plus appréciables. Merci pour ta franchise ... (un peu rude parfois ©) et bien que j'ai souvent chanté Brel en t'attendant (hein Lu!!) tu as fortement influencé et contribué à ma formation de chercheur!!

Merci aux membres du jury d'avoir accepté de juger la qualité de ce travail.

Un énorme merci à toute l'équipe de Phytoécologie que je connais maintenant depuis 5 années. Tout thésard rêve de faire sa thèse dans de telles conditions.... Humour, bonne humeur, joie de vivre sont au programme...merci pour votre énorme savoir faire ... Je n'oublierai jamais ce temps passé avec vous... ©

Tout d'abord merci à BB'R pour son aide précieuse sur le terrain. A 2N Y sera toujours admirative de ton aptitude à carotter les arbres ... Lucky Core celui qui carotte plus vite que le flash de l'appareil photo!!!

Roger, tu as été mon mentor au début de mon stage en Maurienne, merci pour la patience dont tu as fait preuve lors de mes premiers relevés floristiques ... tes fameuses barres de céréales me feront toujours rire... et dès que je vois un arbre marqué du réseau HNE je ne peux que penser à toi © n'est-ce pas BB'R, Raph et Lu!!! Ton savoir vivre, ta gentillesse, ta vivacité font de toi une personne que la phyto regrettera longtemps...

Merci aussi à François avec qui je ne n'ai malheureusement pas eu l'occasion de travailler sur le terrain ... merci d'être aussi soucieux du bien-être des thésards ...

Merci à Jeanne Bodin surnommée à tort « la morue », tu es une personne à part entière et j'ai eu beaucoup de plaisir à passer du temps avec toi ...!!!

Un grand merci à Sliman qui m'a initiée à l'art de l'extraction de cellulose et aux mesures de 15N dans le bois...

Merci à Nathalie, Vincent et Yves pour leurs connaissances et leur savoir faire!

Merci aussi à Myriam et Hélène que je n'ai connues que plus tard mais avec qui j'ai passé de bons moments dans la salle café ©

Un grand merci à Stéphane qui est le petit dernier de la phyto mais pas des moindres... c'est avec plaisir que je te passe le flambeau de la dendrochimie; je sais que tu sauras amplement être à la hauteur!!

Que serait la phyto sans Papy Picard!!! Vous êtes un personnage à part qui a fortement contribué à la bonne humeur de la phyto certains jours!! ... et que serait monsieur Picard sans Riton © merci à toi Christian pour toutes ces histoires d'animaux, de voyages que tu m'as racontées!!

Et merci aussi à une part non négligeable de la phyto ... La pollu : un grand merci au grand LU sans qui jamais je n'aurai su maîtriser l'art de manœuvrer le microscope ... Merci pour ta bonne humeur et ta joie de vivre ... continue à faire rire tes stagiaires et surtout ne perd pas la licence IV!! Merci aussi à Jean-Pierre pour les « séances de thérapie » lors des pots!!!

Merci à Rosine, Laurence et Audrey qui ont toujours été là pour faciliter mes démarches administratives, les déplacements de dernière minutes ... merci pour votre patience et votre gentillesse.

Merci à tous les stagiaires thésards ou non que j'ai rencontrés au cours de mon séjour à Nancy:

Merci à Xavier et Rania pour tous ces moments de rigolades, de soutiens mutuels... bon courage à vous!

Merci à Marion et Magali pour les balades, les rigolades, les titigazous, les gros titous, et ce merveilleux air du sud....

Blandine, Pascal, Jérome, Julien et Raph je n'oublierai jamais nos soirées barbeucs, nos départs improvisés, les bons moments de fou-rires à l'inra et ailleurs!! Merci pour tout!!

Raph merci d'avoir été un stagiaire aussi agréable avec qui j'ai passé de mémorables moments avec plein d'histoires de grenouilles taureau, de cerf et autres animaux. Merci aussi à Luis, Ana, Juan, Noémie et à tous les autres stagiaires que j'ai rencontrés au cours de ces années.

Merci aussi à Alain, André, Anne, Claude, Didier, Etienne, Erwin, Fabrice, Jean-Marc, Jean-Marie, Marianne, Marie-Béa, Nanar, Oliver, Pascale, Patrick, Pierre, Pierrot, Roland, Thierry, ...

Merci à Nathalie pour les bons moments au microscope et surtout l'école d'été de Grenoble...!!! ©

Merci Jacqueline pour ta bonne humeur et la qualité de ton travail ...

Merci au « groupe des brésiliens » Ana, Flora, Gleisse, Leonardo, Paola et Tiago qui m'ont fait découvrir le truco, la peteca, le churrasco, la cerveja et bien-sûr les havaianas ... Merci de m'avoir apporté autant, l'esprit brésilien devrait être contagieux : ... Saudade de vocês : Beijos

Daniel, je sais que tu fais partie de la phyto mais j'ai choisi de t'intégrer à ce groupe car c'est dans celui-ci que je te connais le mieux; ta gentillesse, ton attention, ta compréhension font de toi un être exceptionnel... change rien!!! Beijos

Merci aussi aux 'ENSTIB_{iens}' Floran et surtout Martin avec qui j'ai passé d'agréables moments cette année ...

Merci à la famille Venner qui a toujours été là pour moi : Gaby, Jessica, Sébastien, Blandine, André et Titoune ...

Et enfin un grand merci à Maeva, Fabien, Guillaume et famille et bien sur Josette!!!

Table des matières

Introduction1
Partie 1
Chapitre I.
Anatomie du bois. Composition chimique globale des arbres. Absorption, transport et fixation des ions dans la plante
1. Anatomie du bois7
1.1. Formation des cellules du bois
1.1.1. Le xylème et les tissus de soutien 1.1.2. Le phloème 1.1.3. Les rayons ligneux 1.1.4. L'écorce
1.2. La paroi des cellules du bois
2. Absorption des éléments minéraux par la plante14
2.1. Composition chimique des plantes
2.2. Quelles sont les sources nutritives des arbres ?
2.3. Influence des conditions du sol sur la solubilité des éléments minéraux
2.4. Absorption racinaire et transferts d'éléments entre cellules
3. Ascension des éléments minéraux 18
3.1. Apoplasme/symplasme
3.2. Transport dans le phloème et le xylème
3.3. Fixation des éléments minéraux le long des tissus conducteurs du xylème21
4. Transformation du bois au cours du vieillissement de l'arbre22
4.1. Aubier et cœur
4.2. Passage du bois d'aubier en bois de cœur
4.3. Remobilisation et modifications des éléments chimiques fixés

Chapitre II.

s différentes méthodes de dosages chimiques utilisées en adrochimie	2
1. Quelques notions de physiques atomiques : la fluorescence des atomes	28
2. Les méthodes de dosage chimique destructives	29
2.1. Spectrométrie d'émission	29
 2.1.1. ICP-AES (Inductively Coupled Plasma – Atomic Emission Spectrometry) 2.1.2. ICP-MS (Inductively Coupled Plasma – Mass Spectrometer) 2.1.3. Limites et contraintes de l'analyse par ICP 2.1.4. LA-ICP-MS (Laser Ablation - Inductively Coupled Plasma – Mass Spectrometer) 	ı
2.2. LIBS (Laser Induced Breakdown Spectroscopy)	32
2.3. Spectrométrie d'absorption atomique: FAAS (Flame Atomic Absorption Spectrometry)33
2.4. SIMS (Secondary Ion Mass Spectrometry)	33
3. Les méthodes de dosage chimique non destructives	34
3.1. Faisceau d'électrons incidents	34
3.1.1. Les interactions électron/matière 3.1.2. EDS (Energy Dispersive Spectrometry) 3.1.3 WDS (Wavelenght Dispersive Spectrometry)	
3.2. Rayons X incidents	36
3.2.1 TXRF (Total X-Ray Fluorescence) 3.2.2 SXRF (Synchrotron X-Ray Fluoresence)	
3.3. Protons incidents : PIXE (Particule Induced X-Ray Emission)	38
4. Limites et contraintes de ces méthodes d'interaction rayonnement incident-atomes	38
4.1. Avantages	38
4.2. Limites méthodologiques	38
4.3. Corrections apportées aux mesures	40
4.3.1. EDS 4.3.2. SXRF	
5. Une autre méthode de dosage non destructive : NAA (Neutron Activation Analysis)	4

Chapitre III.

ne	omparaison de mesures de concentrations en éléments du bois par une éthode quantitative (ICP) et des méthodes semi-quantitatives (EDS, KRF)
	1. Introduction
	2. Matériel et méthodes45
	2.1. Analyse par ICP
	2.2. Analyse par SXRF
	2.3. Analyse par EDS
	3. Résultats
	3.1. Corrélations entre les différentes méthodes
	3.2. Comparaison des concentrations moyennes
	3.3. Répétabilité des mesures
	4. Discussion et conclusion 61

Chapitre IV.

•	es taux de bouclage et effets du conditionnement des échantillons les mesures par EDS
1 Anals	vse des taux de bouclage obtenus lors de 3 séries d'analyses
·	les
	s du conditionnement des échantillons de bois sur les mesures es
2.1. Maté	riel et méthodes70
2.1.1.	Site de prélèvement70
2.1.2.	Prélèvement des carottes de bois70
2.1.3.	Conditionnement des carottes de bois
	2.1.3.1. Séchage à l'air 2.1.3.2. Congélation 2.1.3.3. Lyophilisation
	Analyse chimique par EDS74 Analyse statistique
2.2. Résul	tats
2.2.1.	Taux de bouclage des mesures chimiques75
2.2.2.	Comparaison des concentrations moyennes mesurées par les 3 modalités de préparation
2.2.3.	Mise en évidence des différences intra- et inter-échantillons79
	2.2.3.1. Différences entre placettes 2.2.3.2. Différences entre périodes
2.3. Conc	lusion sur les effets de la modalité de conditionnement des échantillons de bois 82

Partie 2

Chapitre V84
Article 1:
Effects of the soil type (calcareous vs acidic) on Fagus sylvatica (L.) wood and bark chemical composition measured by EDS and on leaves nutrient content
Chapitre VI
Article 2:
Detection of cycles in the wood chemical content of the mangrove species
Rhizophora mucronata Lam. by synchrotron X-ray fluorescence (SXRF)
Chapitre VII143
Impact d'une fertilisation NPKCa sur la composition chimique du bois de hêtre (Fagus sylvatica) Etudes des transferts internes d'éléments entre les cernes
Conclusion générale 163
Références bibliographiques168
Annexes

Introduction générale

Sous climat tempéré, les arbres stoppent leur croissance durant la période hivernale. Cette caractéristique conduit, en général, à la formation d'un cerne de croissance chaque année. La dendrochronologie ou science de la datation et de l'étude de ces cernes a vu le jour au début du $20^{\text{ème}}$ siècle grâce aux travaux d'Andrew Ellicott Douglass.

Les variations de la largeur de ces cernes sont utilisées *a posteriori* pour reconstruire l'histoire du climat (température, précipitations), des perturbations d'origine anthropique (pollution, sylviculture) ou naturelle (défoliations et maladies, tempêtes, incendies) et, plus généralement, de tout changement de l'environnement qui peut jouer un rôle sur la croissance des arbres (Stokes, 1980; Schweingruber, 1987; Fritts, 1991).

En réponse aux menaces de dépérissement forestier apparues en Europe et en Amérique du Nord à la fin du $20^{\text{ème}}$ siècle (Landmann et Bonneau, 1995; Mellert et al, 2004), de nombreuses études dendrochronologiques et dendrochimiques ont été entreprises afin de mieux comprendre l'origine de ce phénomène. L'augmentation des dépôts acides d'origine anthropique (acide sulfurique et nitrique) serait à l'origine d'une acidification des sols forestiers. Ces dépôts contribuent à la désaturation des sols qui se manifeste par une perte de cations sur le complexe absorbant tels que le calcium et le magnésium et à une augmentation de la disponibilité en cations acides tels que H⁺ et Al³⁺ (Ulrich et al, 1980). Ces changements au cours du temps du statut nutritif des sols influencent l'équilibre nutritionnel des arbres, leur croissance et leur état de santé.

Afin de comprendre les causes exactes et l'évolution au cours du temps de ces dépérissements, la composition chimique du sol ainsi que celle des feuilles de peuplements dépérissants a été suivie dans des sites ateliers ou des placettes permanentes sur des périodes de l'ordre de la décennie (Houle et al, 1997; Thimonier et al, 2000; Watmough et al, 2005). Néanmoins, ces études restent ponctuelles car les sites de suivi sont peu nombreux. De plus, les mesures de référence, faites avant l'augmentation des dépôts polluants, manquent. En effet, les données anciennes de composition chimique des sols ou des feuilles sont très rares.

Dans ce contexte, la dendrochimie ou étude de la composition chimique des cernes des arbres a suscité un fort intérêt puisqu'elle permet, *a priori*, une étude rétrospective de la nutrition des arbres quel que soit le site (Symeonides, 1979 ; Baes et Ragsdale, 1981 ; Baes et McLaughlin,

1984; Bondietti et al, 1989). Elle est basée sur le principe selon lequel les tissus conducteurs du bois présentent des charges électriques à la surface de la paroi de leurs cellules qui fixent une partie des ions contenus dans la sève. Un équilibre chimique se crée entre la sève brute et les parois des tissus conducteurs et, ainsi, le cerne formé une année donnée reflète au moins en partie la composition chimique de la sève brute qui l'a traversé au moment de sa construction (Amato, 1988). Baes et McLaughlin (1984) ont été les premiers à utiliser cette caractéristique du bois pour mettre en évidence les effets de l'acidification des sols sur la nutrition des arbres.

Depuis, la dendrochimie s'est développée et d'autres aspects ont été abordés avec succès tels que l'évolution au cours du temps des taux de contamination par des métaux lourds dans des régions industrielles (Symeonides, 1979; Robitaille, 1981; Guyette et al, 1991; Eklund 1995; Watmough et Hutchinson, 1996; Watmough et al, 1999).

Néanmoins, cette possibilité d'utiliser la dendrochimie de façon rétrospective a été remise en cause par certaines études dans lesquelles n'ont été observées aucunes corrélations entre la bois variations composition chimique du et les passées des conditions environnementales, impliquant alors des transferts probables d'éléments entre les cernes (Lepp, 1975; Barnes et al, 1976; Baes et Ragsdale, 1981; Baes et McLaughlin, 1984; Lukaszewski et al, 1988; McClehanen et al, 1989; Kudo et al, 1993; Momoshima et al, 1995; Smith et al, 1996; Watmough, 1997; Kagawa et al, 2002; Patrick et Farmer, 2006).

Ce manque de concordance entre les changements environnementaux et les variations de la composition chimique du bois pourrait s'expliquer en partie par le fait que, chez certaines espèces d'arbres, comme le hêtre par exemple, la sève brute circule dans une large zone externe de l'arbre, comprenant un grand nombre de cernes. Le bois formé reste donc en contact avec la sève des années après sa formation. Un nouvel équilibre chimique s'établit progressivement au cours des années successives de contact entre la sève brute et les parois des vaisseaux. Certains ions fixés sont échangés contre de nouveaux ions circulants (Bell et Biddulph, 1963), modifiant le message chimique enregistré initialement dans le bois, lors de sa formation.

D'autres mécanismes internes peuvent modifier les informations chimiques contenues dans le bois et notamment la remobilisation d'éléments chimiques depuis les cernes nouvellement formés, à l'extérieur de l'arbre, vers les cernes plus anciens, au cœur, et inversement. Ces remobilisations sont liées en partie à la formation du bois de cœur (duraminisation) et au

recyclage interne d'éléments chimiques (Stewart, 1966; Nabais et al, 1999; Houle et al, 2002; Meerts, 2002). Ces mouvements latéraux, contrôlés en grande partie par le fonctionnement des rayons ligneux, dépendent de l'espèce et de l'environnement dans lequel se développe l'arbre (Cutter et Guyette, 1993).

De plus, une grande part des études temporelles montre une tendance commune à une diminution des teneurs en cations depuis la moelle vers l'écorce pour la plupart des espèces. Momoshima et Bondietti (1990) ont montré que la diminution de la CBC (Cation Binding Capacity ou capacité de fixation des cations) de l'intérieur vers l'extérieur de l'arbre pourrait expliquer ces tendances décroissantes des concentrations observées dans les cernes.

Ces trois caractéristiques propres au bois (largeur de la zone de circulation de la sève dans le tronc, ampleur des phénomènes de remobilisation et de transfert interne et variations de la capacité de fixation des cations en fonction de la position du cerne dans l'arbre) peuvent donc fortement influencer les tendances observées au cours du temps (Momoshima et Bondietti, 1990; Herbauts et al, 2002; Padilla et Anderson, 2002).

En parallèle à ces études rétrospectives, temporelles, où chaque cerne ou groupe de cernes est analysé individuellement, une autre partie des recherches en dendrochimie a été consacrée à la comparaison des teneurs moyennes globales en divers éléments chimiques entre arbres situés sur différents sites. Ces études ont surtout été menées afin de dresser des cartographies de dépôts de métaux lourds liées à des pollutions industrielles (Guyette et Cutter, 1994; Nabais et al, 1996). Ces études spatiales ont également contribué à la découverte d'indicateurs des conditions nutritionnelles et de l'état de santé des arbres. Des relations étroites entre la composition chimique du sol, son pH ou sa texture et la composition chimique des cernes du bois ont été mises en évidence (Cutter et Guyette, 1990; DeWalle et al, 1991; Guyette et al, 1992a; McClenahen et Vimmerstedt, 1993; Watmough, 2002; Sariyildiz et Anderson, 2005; Kogelmann et Sharpe, 2006).

Andrews et al (1999) ont abordé un dernier aspect des études dendrochimiques : l'influence des caractéristiques chimiques du sol sur le recyclage interne d'éléments. En d'autres termes, le type de sol peut-il conduire à des stratégies nutritionnelles de l'arbre et notamment peut-il jouer sur les ratios de concentrations aubier/cœur. Cet effet, encore peu étudié à ce jour, doit être quantifié car il peut jouer sur les tendances temporelles observées.

De manière générale, la dendrochimie a longtemps été limitée par la résolution temporelle des mesures chimiques qu'offrent certaines méthodes de mesures. En effet, dans une grande majorité des cas, les méthodes destructives de type ICP (Inductively Coupled Plasma) ou AAS (Atomic Absorption Spectrometry) ont été largement utilisées. Ces méthodes requièrent une minéralisation préalable en phase liquide de la poudre de bois avec, le plus souvent, des regroupements de cernes annuels de croissance afin d'obtenir une quantité de matériel suffisante pour les analyses chimiques. Plus récemment, d'autres méthodes ont été utilisées car elles permettent de travailler en phase solide, c'est à dire directement sur l'échantillon de bois brut et ne requièrent pas de minéralisation préalable aux analyses chimiques. Ces méthodes permettent une bonne résolution ; l'étude à l'échelle intra-cerne est alors possible. Certaines d'entre elles comme SXRF (Synchrotron X-Ray Fluorescence) et EDS (Energy Dispersive Spectrometry) sont basées sur l'analyse du rayonnement X caractéristique émis par les atomes constitutifs de l'échantillon suite à une excitation par une source d'énergie incidente (rayonnement X ou électronique).

Cependant, ces méthodes d'analyse sont encore peu utilisées en dendrochimie car elles ne sont pas totalement adaptées aux échantillons biologiques complexes comme le bois et les résultats obtenus sont considérés comme non quantitatifs.

Cette thèse vise à tester, comprendre et développer les champs d'application à la dendrochimie de ces méthodes non destructives basées sur l'analyse des rayonnements X. Nous nous sommes intéressés à deux types de méthodes de mesure. D'une part, la microanalyse X sous microscope électronique et, d'autre part, la fluorescence X sous rayonnement synchrotron. La microanalyse X nous était facilement accessible à l'INRA de Nancy qui est équipé d'un ensemble microscope électronique à balayage et spectromètre EDS. A l'opposé, le rayonnement synchrotron n'est utilisable que dans le cadre de grands équipements nationaux. Nous avons eu accès à l'anneau du LURE avant son démantèlement. Notre travail vise notamment à mettre en place un protocole de préparation et d'analyse des échantillons de bois adapté à ces méthodes et à comparer les résultats obtenus avec ceux de méthodes de dosage classique comme l'ICP.

Outre ces aspects purement méthodologiques, cette thèse aborde des questions écologiques majeures encore peu voire non abordées à ce jour en dendrochimie. Cinq grands thèmes sont abordés dans le présent mémoire :

- la mise en place d'une technique de préparation et d'analyse d'échantillons de bois en vue d'analyses chimiques par EDS ;
- la comparaison d'une méthode de dosage classique, l'ICP, avec deux méthodes basées sur l'émission de rayons X, SXRF et EDS ;

- l'étude des potentialités bioindicatrices de la chimie du bois afin d'estimer les caractéristiques du sol ;
- la recherche de cycles annuels de la composition chimique pour la datation des bois tropicaux ;
- l'étude des transferts entre cernes d'éléments chimiques.

Après des rappels généraux sur l'anatomie du bois et sa composition chimique (chapitre I), la thèse se divise en deux grandes parties. Les travaux et résultats obtenus sont décrits à partir du chapitre III. La première partie est consacrée aux aspects méthodologiques avec un premier chapitre descriptif des principales méthodes utilisées à ce jour en dendrochimie (chapitre II), un deuxième chapitre où l'on compare les résultats obtenus sur des échantillons de bois par ICP, SXRF et EDS afin d'estimer la validité des mesures obtenues par spectrométrie de rayonnement X (chapitre III) et un troisième chapitre où l'on traite de la mise en place du protocole de préparation et de conditionnement des carottes de bois en vue des analyses chimiques par EDS (chapitre IV). La deuxième partie de cette thèse est consacrée à des applications de ces méthodes par rayonnement X. Les deux premiers chapitres de cette partie (chapitres V et VI) se présentent sous forme d'articles scientifiques en anglais. Le premier chapitre (chapitre V) s'intéresse à la comparaison de la composition chimique du bois de hêtres situés sur deux types de sols, calcaires et acides, par analyse EDS. Cette étude vise à tester le potentiel de bio-indication du bois vis-à-vis des conditions stationnelles et également à détecter de possibles effets du type de sol sur les redistributions internes d'éléments chimiques entre bois de cœur et aubier.

Les deux derniers chapitres (chapitres VI et VII) de cette thèse sont basés sur l'utilisation du SXRF. Dans une première étude (chapitre VI), nous avons recherché des cycles annuels de variation de la composition chimique d'une espèce tropicale de mangrove, *Rhizophora mucronata*. La plupart des arbres tropicaux ne présentent pas de cernes annuels de croissance comme les espèces tempérées et des indicateurs alternatifs de cyclicité dans le bois sont utilisés afin de dater ces arbres (densité du bois, datation au ¹⁴C, δ¹⁸O, δ¹³C, marquage cambial). L'estimation de l'âge des arbres tropicaux est un enjeu majeur de l'écologie forestière, puisque c'est une étape nécessaire à la compréhension de la dynamique des forêts tropicales (vitesse de croissance, structure des âges) qui nous échappe largement aujourd'hui. Dans ce chapitre, l'espèce étudiée se situe dans une mangrove présentant des contrastes saisonniers d'apports en minéraux liés à l'alternance de la saison des pluies et de la saison

sèche et ce sont ces alternances intra-annuelles que nous avons cherché à détecter dans le bois.

Une deuxième étude utilisant le SXRF (chapitre VII) est consacrée à l'étude des transferts internes d'éléments chimiques et au caractère bio-indicateur du contenu chimique des cernes de la chimie du sol suite à une fertilisation NPKCa dans une hêtraie de l'Ouest de la France (Fougères, 35). Les cernes annuels de croissance formés avant (1960-1972) et après (1974-1987) la date de fertilisation de 1973 ont été analysés chimiquement pour 4 arbres témoins et 4 arbres fertilisés. Cette étude vise à observer la redistribution entre cernes de ces éléments apportés en excès afin de juger des potentialités de bio-indication offertes par cette espèce.

1. Anatomie du bois. Composition chimique globale des arbres, Absorption, transport et fixation des ions dans la plante

Ce chapitre fait le bilan de notions générales liées à l'anatomie et à la composition chimique globale du bois. Il explicite notamment le parcours des nutriments depuis le sol vers les tissus du bois et leurs possibles remobilisations ultérieures.

1. Anatomie du bois

1.1. Formation des cellules du bois

L'accroissement en diamètre de la plante ou croissance secondaire est possible grâce à l'activité d'un méristème latéral, le cambium. Le bois est constitué de cellules issues des divisions de ce **cambium** (assise génératrice libéro-ligneuse) qui enveloppe l'ensemble des formations ligneuses de l'arbre. Après division cellulaire, les cellules du cambium (**initiales**) se différencient et se disposent spatialement pour assurer diverses fonctions avec un plan d'organisation spécifique d'origine génétique :

- les **initiales fusiformes** donnent naissance aux cellules du **xylème** et du **phloème**. Elles correspondent au système vertical des tissus conducteurs de l'arbre ;
- les **initiales courtes** produisent les **cellules des rayons ligneux** qui sont étirées dans le sens radial, à l'origine du système horizontal de tissus conducteurs secondaires.

Le bois assure diverses fonctions qui permettent le maintien de l'intégrité de l'arbre :

- il assure la fonction de conduction de la sève brute ascendante (xylème) qui se déplace depuis les racines vers le houppier dans le bois d'aubier et de la sève élaborée, depuis les feuilles vers les racines dans le phloème;
- il permet une fonction de soutien de la tige via les **fibres** ;
- il correspond à une zone de stockage de l'arbre (**parenchyme**) et à une zone d'élaboration et de transformation chimique de substances dans le **bois de cœur ou duramen**.

On définit en général trois plans d'analyse des tissus du bois :

- la coupe transversale (plan radial-tangentiel) qui est perpendiculaire à l'axe de la tige
- la coupe **radiale** (plan longitudinal-radial) qui est parallèle à l'axe de la tige et qui contient la moelle

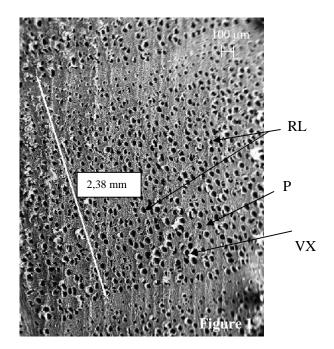
- la coupe **tangentielle** (plan longitudinal-tangentiel) qui est excentrée et parallèle à l'axe de la tige

La structure du bois est caractéristique de chaque espèce, elle est constante pour une espèce donnée et présente des analogies entre espèces voisines (Figures 1 et 3). Le cambium ne fonctionne pas en continu sous climat tempéré car son activité méristématique est dépendante de facteurs internes (régulation par des hormones) et externes (température, précipitations ...). Cette rythmicité de l'activité cambiale conduit à la formation de cernes annuels de croissance qui permettent des études rétrospectives de la croissance de l'arbre. La dendrochronologie permet l'identification et la datation de ces cernes de croissance par comparaison avec des courbes de croissance de référence.

1.1.1. Le xylème et les tissus de soutien

Le xylème correspond à l'ensemble des structures conductrices de la sève brute du bois (eau chargée de minéraux absorbée par les racines de l'arbre). On y distingue divers types cellulaires (Figures 2, 3, 4 et 5) :

- les trachéides qui sont issues de la dégénérescence de cellules du cambium. Elles forment des tubes creux qui présentent des parois terminales persistantes et communiquent entre elles au niveau des ponctuations;
- les **vaisseaux de conduction** sont issus des cellules du cambium. Ils possèdent des parois terminales partiellement voire totalement perforées (perforations). Les vaisseaux ressemblent à des tubes creux résultants de l'empilement de cellules issues des divisions du cambium. Les vaisseaux communiquent latéralement entre eux par des ponctuations ;
- les **cellules de contact** sont vivantes et communiquent avec les éléments conducteurs par les ponctuations ;
- le **parenchyme** est formé de cellules vivantes à parois cellulosiques ou lignifiées qui communiquent avec les cellules de contact par des plasmodesmes. Le parenchyme a souvent un rôle d'accumulation des réserves (amidon, lipides, protéines, sucres ...) mais selon sa position au sein de la plante il peut assurer diverses fonctions ;
- les canaux résinifères se rencontrent chez les conifères et certains feuillus (Dipterocarpacaea). Ils sont entourés de cellules sécrétrices qui sont riches en terpènes et polyphénols;



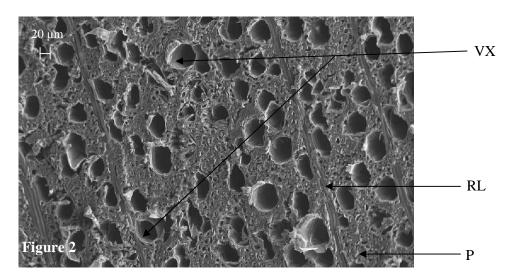
Figures 1, 2 et 3: Images au microscope électronique à balayage. EHT=20 kV, détecteur d'électrons secondaires. Photo Christophe Rose, INRA, Nancy.

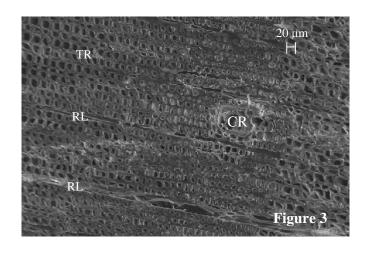
CR : canaux résinifères, P : parenchyme, RL : rayon ligneux, TR : trachéide, VX : vaisseaux du xylème

Figure 1 : Coupe transversale dans le bois de *Fagus sylvatica*. Un cerne de 2,38 mm y est identifié. Grandissement 75x

Figure 2 : Coupe transversale dans le bois de *Fagus sylvatica*. Grandissement 377x

Figure 3 : Coupe transversale dans le bois de *Pinus sylvestris*. Grandissement 396x





- les **fibres** qui correspondent à un ensemble de cellules allongées, lignifiées aux parois secondaires très épaisses et qui assurent le rôle de soutien de l'arbre. Ces fibres peuvent rester vivantes plusieurs années et accumuler des réserves.

1.1.2. Le phloème

Il permet la conduction de la **sève élaborée** et se situe au niveau de l'écorce interne de l'arbre (Figures 6 et 7). Il permet la migration des solutés depuis leur lieu de synthèse (feuilles) vers les zones puits ; lieux de respiration, de croissance et de stockage. Il est formé de cellules vivantes qui communiquent entre elles par des pores appelés **plasmodesmes**. Il constitue les **tubes criblés** chez les Angiospermes et les **cellules criblées** chez les Conifères. Des cellules de contact appelées les **cellules compagnes** sont reliées directement à ces tubes criblés par des plasmodesmes ; elles correspondent à des cellules du phloème modifiées qui sont en fait des cellules de transfert qui assurent des mouvements de substances entre le **symplaste** et l'**apoplaste** (détail dans le paragraphe 3.1.).

1.1.3. Les rayons ligneux

Ils sont issus des divisions cellulaires des initiales courtes du cambium. Les rayons ligneux se présentent sous forme de couches unies- ou multi-sériées de cellules (Figures 2, 3, 4 et 5). Ils peuvent être bordés de parenchyme. Ils assurent la conduction de substances chimiques latéralement dans l'arbre ainsi que leur stockage.

1.1.4. L'écorce

L'écorce, au sens forestier, désigne l'ensemble des tissus qui peuvent aisément être retirés de la tige de l'arbre. Deux parties distinctes peuvent être identifiées (Figures 6 et 7) :

- l'écorce externe comprend le phellogène (assise subéro-phellodermique) qui forme le suber (liège) vers l'extérieur et le phelloderme vers l'intérieur. Les cellules du suber peuvent être divisées en deux types : les cellules à parois fines avec dépôt de subérine qui forment un réseau de cellules jointives qui peuvent être remplies de substances organiques (résines, composés tannifères) et les cellules à paroi épaisse qui sont fortement lignifiées. Le phelloderme aurait un rôle de stockage d'amidon (Pfanz et Aschan, 2001) ;

- l'écorce interne comprend les tissus de la région du liber (phloème I et II). Elle est également formée d'un cortex comprenant un parenchyme cortical entourant le phloème qui joue un rôle de stockage de l'amidon et de cristaux d'oxalate de calcium (Trockenbrodt, 1995). Elle est traversée par des rayons libériens et est reliée au xylème par des rayons médullaires. On y trouve également des cellules aux parois lignifiées mortes ainsi que des cellules sclérifiées.

L'écorce représente pour l'arbre une barrière de protection contre les agressions de l'environnement et contre les pertes en eau et en minéraux. Néanmoins, elle n'est pas totalement étanche car certains gaz peuvent diffuser depuis l'air extérieur, ainsi que de l'eau et des molécules inorganiques (Katz et al, 1989 ; Garrec et Barrois, 1992 ; Lecomte, 1996).

1.2. La paroi des cellules du bois

Les cellules du bois sont construites à partir d'une matrice polymérique formée principalement de **cellulose** (40%). Durant la croissance de l'arbre, les molécules de cellulose sont arrangées en un réseau de fibrilles qui constitue la paroi des vaisseaux de conduction. Ce réseau de cellulose de la paroi primaire est enrobé dans une matrice qui peut contenir des polysaccharides, des **hémicelluloses** (25-35%), de la **lignine** (20-30%), des pectines, des protéines de structure, des glycoprotéines, de la cutine et de la subérine. Beaucoup de cellules végétales n'ont qu'une paroi primaire. Pour d'autres tissus comme le système de conduction de la sève, une paroi secondaire est déposée. Cette paroi secondaire empêche la croissance cellulaire par la solidification de la structure pariétale. Les cellules voisines communiquent entre elles grâce à des amincissements de la paroi primaire appelés **ponctuations**. Ces ponctuations persistent après le dépôt de la paroi secondaire et permettent la communication intercellulaire. La taille des parois des tissus conducteurs du xylème (trachéides et vaisseaux du xylème) est comprise en moyenne entre 1,5 et 11 µm.

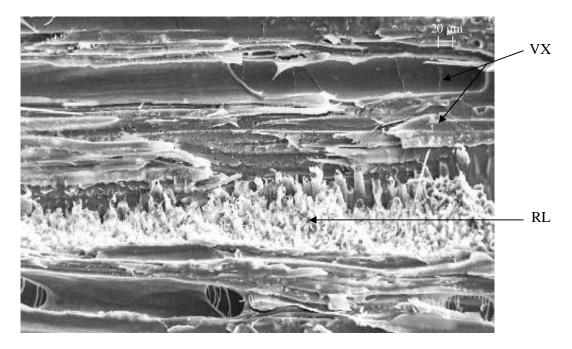


Figure 4 : Coupe radiale (plan longitudinal–radial) dans le bois de *Fagus sylvatica*. RL : rayons ligneux, VX : vaisseaux du xylème. Image au microscope électronique à balayage, grandissement 536x, EHT=20 kV, détecteur d'électrons secondaires. Photo Christophe Rose, INRA, Nancy.

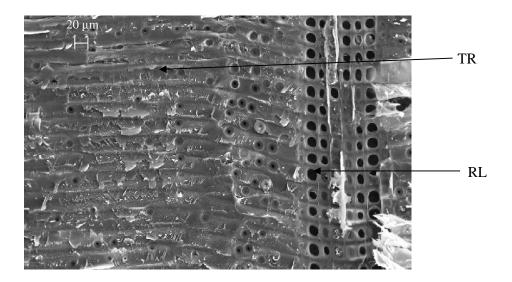


Figure 5 : Coupe radiale (plan longitudinal-radial) dans le bois de *Pinus sylvestris*. RL : rayons ligneux, TR : trachéides. Image au microscope électronique à balayage, grandissement 640x, EHT=20 kV, détecteur d'électrons secondaires. Photo Christophe Rose, INRA, Nancy.

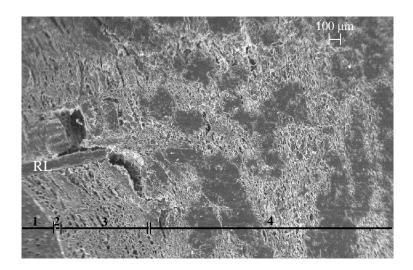


Figure 6 : Coupe transversale (plan radial-tangentiel) dans la zone de l'écorce de *Fagus sylvatica*. Les différentes zones de l'écorce depuis le dernier cerne d'aubier formé y sont identifiées : 1) xylème 2) zone cambiale 3) écorce interne 4) écorce externe. RL : rayons ligneux. Image au microscope électronique à balayage, grandissement 166x, EHT=20 kV, détecteur d'électrons secondaires. Photo Christophe Rose, INRA, Nancy.

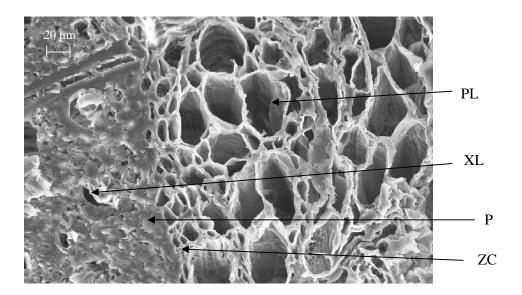


Figure 7 : Coupe transversale dans l'écorce de *Fagus sylvatica*. Vue détaillée de la figure 6 dans la zone de transition entre xylème et phloème. PL : vaisseaux du phloème, XL : vaisseaux du xylème, ZC : zone cambiale, P : parenchyme. Image au microscope électronique à balayage, grandissement 1000x, EHT=20 kV, détecteur d'électrons secondaires. Photo Christophe Rose, INRA, Nancy.

- 2. Absorption des éléments minéraux par la plante
- 2.1. Composition chimique des plantes

La composition chimique élémentaire des plantes regroupe environ une trentaine d'éléments chimiques qui peuvent se classer en deux grandes catégories :

- 9 éléments sont considérés comme **macro-nutriments** ou **nutriments majeurs** car ils sont présents à des teneurs au moins égales à 10⁻³-10⁻² g par g de tissu sec : C, H, O, N, P, S, K, Ca, Mg et dans certains cas Na, Cl et Si;
- les autres éléments chimiques présents sont considérés comme **micro-nutriments** ou **oligo-élements** car présents à des doses beaucoup plus faibles (10⁻⁵ à 10⁻⁹ g par g de matière sèche): Fe, Zn, Mn, Cu, Al, Ni, Co, Mo, B, I, F, Br et de manière plus ponctuelle Li, Ti, Rb, Ce, Cr voire d'autres éléments du tableau périodique.

A eux seuls, C, H et O représentent environ 99 % de la masse sèche de la plante. Pour le bois, les concentrations moyennes obtenues sur un ensemble d'espèces avec diverses méthodes d'analyses chimiques sont synthétisées dans le Tableau 1.

Ces mêmes éléments chimiques peuvent également être classés selon leur fonction biochimique au sein de la plante (selon Evans et Sorget, 1966 ; Mengel et Kirkby, 1987) :

- les éléments qui forment les composés organiques de la plante (C, H, O, N, S) tels que les acides aminés, les protéines, les acides nucléiques, la cystéine, la méthionine, certains coenzymes ;
- les éléments qui ont un rôle dans le stockage énergétique tels que le phosphore qui est intégré dans des sucres phosphatés, des acides nucléiques, des nucléotides, des phospholipides et qui jouent un rôle clef dans les réactions qui requièrent de l'ATP;
- les éléments qui ont un rôle de maintien de l'intégrité structurale : le bore (B) est intégré dans des molécules telles que le mannitol qui fait partie de la paroi cellulaire et il est impliqué dans l'élongation cellulaire et le métabolisme des acides nucléiques ;
- les éléments qui demeurent majoritairement sous forme ionique (K, Na, Mg, Ca, Mn, Cl) et qui sont impliqués dans de nombreuses fonctions détaillées dans le Tableau 2. Le sodium (Na) n'est pas indispensable aux plantes supérieures sauf pour les halophytes ;
- les éléments majoritairement impliqués dans le transfert des électrons (Fe, Cu, Zn, Mo, Ni).

₹	¹ He	10 Ne	18 Ar	³⁶ Kr	⁵⁴ Xe	86 Rn	
	₹	4 6	16 16 17 CI 18 Ar	⁵ Br	183	5 At	
	⋝	0 8	16 S	³⁴ Se	52 Te	84 Po	
	>	N L	ds	³² Ge ³³ As	48 Cd 49 In 50 Sn 51 Sb	3 B	
	≥	၁့	14 Si	32 Ge	us ₀₉	² Pb	
	=	g _s	13 AI	31 Ga	49 In	81 T	
				³⁰ Zn	⁴8 Cd	БН ₀₈	
				no _{sz}	47 Ag	n∀ 81	
				IN ₈₂	Pd 95	14 ₈₂	
				27 Co 28 Ni 29 Cu 30 Zn 31 Ga	⁴⁵ Rh ⁴⁶ Pd ⁴⁷ Ag	77 Ir 78 Pt 79 Au 80 Hg	¹⁰⁹ Une
				²⁶ Fе	4 Ru	SO 92	¹⁰⁸ Սոօ
				25 Min	₽ Tc	/ 75 Re	¹⁰⁷ Uns
				23 V 24 Cr 25 Min 26 Fe	⁴² Mo	74 V	¹⁰⁶ Unh
				23 V	[₽]	73 Ta	¹⁰⁵ Uпр
				22 Ti	⁴⁰ Zr	72 Hf	c 104 Unq ¹⁰⁵ Unp ¹⁰⁶ Unh ¹⁰⁷ Uns ¹⁰⁸ Uno ¹⁰⁹ Une
				21 Sc	39 ץ	⁵⁷ La	89 Ac
	=	⁴ Be	. 42 MG	‰ Ca	38 Sr	⁵⁶ Ва	88 Ra
-	1 H	³Li	ž	\$ *	37 ₽	82 99	87 Fr
	-	2	3	4	ŁΩ	9	_

Tm dY or mT	¹⁰³ Lr
dY ⁰	¹⁰² No
mT 69	¹⁰¹ Md ¹⁰² No ¹⁰³ Lr
68 Er 69	ա4 ⁰⁰¹
е7 Но	s3 ₆₆
66 Dy	Bk ⁹⁸ Cf ⁹⁹ Es ¹⁰⁰ Fm
dT 59	⁹⁷ Bk
64 Gd	1 ₈₆ Cm 97
63 Eu	₉₅ Am
62 Sm 63 Eu 64 Gd 65 Tb 66 Dy 67 Ho	⁹⁴ Pu ⁹⁵ Am
64 Pm	92 U 93 Np
Pr 60 Nd 61 Pm	92 U
59	Th ⁹¹ Pa
₅₈ Се	ЧL 06
9	7

Tableau 1 : Tableau périodique des éléments chimiques contenus dans le bois :

- Concentrations moyennes supérieures à 1%
- ☐ Concentrations moyennes entre 100 et 6000 ppm
- ☐ Concentrations moyennes inférieures à 200 ppm ☐ Eléments traces ou non détectés à ce jour

L'ensemble des fonctions connues à ce jour pour certains éléments chimiques est répertorié dans le Tableau 2. Tous les éléments absorbés par la plante n'ont pas de fonction précise ou du moins leur fonction exacte reste inconnue à ce jour : on parle d'éléments essentiels pour regrouper l'ensemble des éléments qui ont un rôle précis connu et dont l'absence perturbe la croissance et le développement de la plante. Selon l'organe de la plante, l'espèce et la période de l'année, les concentrations et les ratios de concentrations entre éléments peuvent être très variables.

2.2. Quelles sont les sources nutritives des arbres ?

Il existe diverses sources de substances nutritives pour les arbres. Les apports se font majoritairement par le sol via l'absorption racinaire et dans une moindre mesure via les dépôts atmosphériques (absorption foliaire et par le tronc). Les nutriments contenus dans le sol proviennent de la désintégration de la roche mère, des apports de litière et des dépôts atmosphériques. Ils sont présents sous forme dissoute et sous forme liée. Cependant, seule une petite partie d'entre eux est disponible sous forme dissoute dans l'eau contenue dans le sol (moins de 0,2%) : on parle de **solution du sol** diluée (10⁻³ M). Le reste des nutriments est lié à des détritus organiques, de l'humus et des composés inorganiques insolubles ou inclus dans des minéraux. Une partie de ces nutriments sous forme non libre (environ 98%) constitue une réserve qui peut être libérée lentement grâce à la minéralisation de l'humus. Les autres nutriments (2%) sont fortement fixés sur les colloïdes du sol et sont indisponibles pour la plante.

De manière générale, les substances humiques ainsi que les particules argileuses colloïdales contenues dans le sol fixent de manière réversible des ions, des molécules grâce à leurs charges électriques de surface. Ces charges sont négatives pour la plupart mais il existe des charges positives. Les colloïdes du sol peuvent ainsi être considérés comme des échangeurs d'ions. Cette fixation permet le maintien des ions dans le profil du sol et évite ainsi leur perte par lessivage. La **capacité d'échange** d'un sol est définie comme la capacité que possède le sol à libérer des ions depuis ces sites de fixation. En général, les ions sont d'autant plus retenus qu'ils possèdent de charges (Ca^{2+} sera retenu plus fortement que K^+). Parmi les ions à charge égale, ceux qui présentent le degré d'hydratation le plus faible seront retenus plus fortement que ceux à plus fort degré d'hydratation. De manière générale, un classement d'affinité a été établi ($Al^{3+} > H^+ > Ca^{2+} > Mg^{2+} > K^+ = NH^{4+} > Na^+$). Chaque ion peut déplacer

et remplacer un ion d'affinité moindre depuis les colloïdes du sol. A affinité égale pour le site de fixation, un ion présent en plus forte concentration dans la solution du sol pourra plus facilement déplacer des ions depuis leur site de fixation. Ainsi lorsque des ions sont ajoutés ou supprimés depuis la solution du sol, des échanges ioniques ont lieu entre les ions fixés sur les colloïdes et ceux présents dans la solution du sol. C'est cet équilibre entre la solution du sol, les colloïdes du sol et les réserves en substances minérales du sol qui contrôle la dynamique des apports d'éléments nutritifs aux plantes.

2.3. Influence des conditions du sol sur la solubilité des éléments minéraux

La disponibilité des éléments nutritifs du sol pour la plante peut dépendre des conditions de pH du sol et de la présence de composés chélatants; elle est spécifique à chaque élément chimique (Taiz et Zeiger, 1998; Lindsay, 1979; Bonneau et Souchier, 1979). De plus, en dessous de pH 3 et au dessus de pH 9, les cellules racinaires de la plupart des végétaux peuvent être endommagées. Le pH des sols est compris en moyenne entre 4 et 8 mais il peut varier de 2 à 10.

2.4. Absorption racinaire et transferts d'éléments entre cellules

Les racines absorbent les éléments minéraux depuis la solution du sol. Les éléments présents dans la solution du sol sous forme dissoute sont en concentrations faibles (inférieures à 1g.1⁻¹ pour NO₃-, SO₄²⁻, Ca²⁺, Mg²⁺ et inférieures à 0,1 g.1⁻¹ pour K⁺). L'apport d'un élément à la plante dépend de sa concentration au sein de la rhizosphère et du coefficient de diffusion vers les racines de la plante qui est spécifique à chaque ion. Ainsi, les ions nitrates rejoignent rapidement la surface des racines, par contre P et K migrent plus lentement vers la zone racinaire. La plupart des ions de la solution du sol entrent dans la racine avec l'afflux d'eau vers les parois cellulaires et les espaces intercellulaires du parenchyme du cortex racinaire (transport **apoplasmique**). Ce phénomène est une diffusion passive qui suit les concentrations et les gradients ioniques entre la solution du sol et l'intérieur de la racine.

Au total, 3 types de transports transmembranaires ont été mis en évidence (Marschner, 1995) :

- la diffusion simple : les molécules diffusent en fonction de la différence de concentration de part et d'autre de la membrane plasmique selon la loi de Fick, le transport est passif;
- la diffusion facilitée : transport via des protéines de transport qui facilitent la diffusion dans les cellules sans apport énergétique (transport passif). Ce transport permet le passage de

molécules chargées ou hydratées et de molécules insolubles. La direction du transport est déterminée par le gradient de concentration ou le gradient électrochimique. Ce passage permet des échanges bidirectionnels. Parmi les protéines de transport on trouve les **transporteurs** et les **canaux ioniques** : des canaux spécifiques à K⁺, Ca²⁺, H⁺ et Cl⁻ ont été mis en évidence (Tyerman, 1992 ; Schroeder et al, 1994) ;

- le transport actif : ce transport est rapide et permet l'échange de molécules contre des gradients de concentrations, ou des gradients électrochimiques. L'apport énergétique nécessaire au transport se fait en général par l'hydrolyse d'ATP (adénosine triphosphate). Il est unidirectionnel et nécessite un transporteur. Il permet la concentration d'éléments chimiques dans la cellule bien que ceux-ci soient faiblement concentrés dans le milieu extérieur.

La quantité et la diversité des éléments chimiques absorbés par les racines de la plante peuvent être augmentées par la présence de mycorhizes. Des phénomènes de **co-transport** c'est à dire un passage simultané dans le même sens de deux éléments chimiques distincts par les protéines de transport (**symport**) ou un passage simultané de ces deux éléments chimiques mais dans des directions opposées (**antiport**) peuvent exister. De même, des synergismes entre cations ou entre cations et anions existent; c'est le cas de Ca²⁺ qui peut faciliter l'absorption de K⁺ dans certaines conditions de pH (Viets, 1944).

- 3. Ascension des éléments minéraux
- 3.1. Apoplasme/symplasme

Les ions, une fois absorbés au niveau racinaire, commencent leur ascension au sein de la plante. Les échanges entre la plante et le milieu extérieur ou les échanges entre cellules doivent se faire sous certaines conditions liées à la présence de la paroi cellulaire. Deux voies principales de transfert intercellulaire sont possibles (Marschner, 1995) :

- l'apoplasme : il regroupe les espaces extra-cytoplasmiques situés dans la paroi. Il apparaît comme le lieu privilégié de circulation de l'eau, des sucres (saccharose, glucose) et de la majorité des ions minéraux. L'apoplasme contient de plus des enzymes susceptibles de modifier les substances circulantes. Cependant, les parois des cellules végétales (paragraphe 1.2) présentent des charges négatives (R.COO-) liées à la présence de composés pectocellulosiques. Ainsi l'apoplasme n'est pas un espace libre de circulation pour les solutés chargés. Au niveau racinaire, la zone de l'endoderme constitue une barrière majeure

imperméable au niveau de l'assise la plus interne de l'écorce de la racine par ses cellules jointives aux parois riches en subérine qui forment le cadre de Caspary. Le transit entre cellules au niveau de l'endoderme est ainsi impossible par voie apoplasmique et se fait ainsi par voie symplasmique soumise au contrôle membranaire ;

- le **symplasme** : les transferts s'y font directement de cytoplasme à cytoplasme grâce aux **plasmodesmes**. Les plasmodesmes sont des tractus qui traversent les parois et établissent une connexion cytoplasmique directe entre deux cellules adjacentes. Leur nombre et leur densité sont variables.

La majorité des ions circulent par voie symplasmique. Le passage par voie symplasmique permet la libération des ions dans les tissus conducteurs du xylème. Ce transit se fait selon les gradients de concentration intermembranaires Une fois intégrés dans la sève brute du xylème, les éléments minéraux sont distribués vers les parties aériennes de la plante. Arrivés au bout de leur transit les ions diffusent vers la paroi des cellules et sont activement transportés dans le parenchyme puis, par voie symplasmique, peuvent être stockés dans la vacuole cellulaire.

3.2. Transport dans le phloème et le xylème

3.2.1. Sève brute / sève élaborée

Les voies de circulation de la sève brute et de la sève élaborée sont cytologiquement différentes et chacune présente des mécanismes de conduction qui lui sont propres. La transpiration foliaire est le moteur principal de la circulation dans le xylème, la sève brute se trouve normalement sous une pression inférieure à la pression atmosphérique. Les parois lignifiées des vaisseaux et des trachéides confèrent la rigidité nécessaire pour éviter l'écrasement des tissus voisins face aux tensions imposées par le flux de transpiration. Les cellules de conduction mortes permettent une circulation apoplastique rapide.

La sève brute peut contenir en solution des ions minéraux, des composés organiques tels que les acides aminés, des sucres issus du métabolisme cellulaire; cette solution est diluée avec une concentration maximale de 1g/l de substances dissoutes.

Dans le phloème, le transport de la sève élaborée s'effectue sous une pression hydrostatique qui est supérieure à celle de l'atmosphère. Les métabolites ainsi que certains composés inorganiques sont transportés vers les zones puits par voie symplasmique. Le Tableau 3 indique les concentrations mesurées dans la sève du xylème et/ou du phloème de 4 espèces d'arbres lors de différents travaux ; la sève élaborée est nettement plus concentrée.

			Dambrine et	Osonubi et al	Glavac et al	Stark et al
	Pate et Jeschke (1993)		al (1992)	(1988) pour	(1990) pour	(1985) pour
	pour Banksia prionotes		pour <i>Picea</i>	Picea abies	Fagus	Pseudotsuga
			abies		sylvatica	menziesii
	Concentration	Concentration de la sève		Concentration		
	de la sève	élaborée	de la sève	de la sève	de la sève	de la sève
	brute (mg.l ⁻¹)	(mg.l ⁻¹)	brute (mg.l ⁻¹)	brute (mg.l ⁻¹)	brute (mg.l ⁻¹)	brute (ppm)
K	93	594	33,7	33,5 - 102,57	-	43,5 – 57,6
Ca	19	239	7,92	25,6 - 34,4	8 – 90	9,4 – 21,2
Mn	-	-	3,28	1,65 - 4,4	1- 22	0,06 – 0,19
Mg	13	155	1,93	3,6 – 14,1	2 – 18,5	2 – 3,3
P	-	-	9,2	-	-	4,9 – 6,4
Si	-	-	5,22	-	-	1,7 – 2,2
Na	42	554	-	-	-	0,49 – 0,6
Al	-	-	-	-	-	0,13 - 0,7
В	-	-	-	-	-	0,04 - 0,05
Cu	-	-	-	-	-	0,26-0,3
Fe	-	-	-	-	-	0,06 – 0,11
Mo	-	-	-	-	-	0,003 – 0,007
Zn	-	-	-	-	-	0,2-0,4

Tableau 3 : Concentrations moyennes en divers éléments chimiques mesurées dans la sève du xylème et du phloème de 4 espèces d'arbres. La présence d'un tiré indique que l'élément n'a pas été mesuré.

3.2.2. Transport des éléments chimiques dans le bois

Tous les composés ne possèdent pas la même habilité à être redistribués au sein des tissus végétaux. Les composés tels que As, K, Na, Mg, N, P, S et Cl même sous forme liée à des composés organiques peuvent facilement se déplacer au sein du système conducteur. Par contre d'autres éléments chimiques dont certains métaux lourds (Fe, Ni, Ba, Al, Pb, Cd) sont difficilement transportables. Ca, Sr, Mn, Zn, Rb et Cu sont des éléments moyennement transportables (Tableau 2). La mobilité des ions au sein du xylème est évaluée selon plusieurs

critères : la solubilité de l'ion, l'équilibre de concentration entre bois de cœur et aubier (équilibre de Mickaelis-Menten), le ratio entre la charge ionique et le poids atomique, le caractère essentiel ou non de l'élément pour la nutrition de la plante, le pH de la sève, la capacité de liaison le long du xylème (Cutter et Guyette, 1993).

3.3. Fixation des éléments minéraux le long des tissus conducteurs du xylème

La présence de composés pecto-cellulosiques chargés négativement à la surface des parois des tissus de conduction (vaisseaux ou trachéides) permet une fixation de cations contenus dans la sève brute. Les parois de ces tissus de conduction peuvent ainsi être comparées à des échangeurs cationiques semblables à une colonne échangeuse d'ions impliquant de nombreux déplacements ioniques (Bell et Biddlph, 1963; Ferguson et Bollard, 1976; Van de Geijn et Petit, 1979; McGrath et Robson, 1984). Les cations fixés sur la paroi des vaisseaux de conduction sont ainsi en équilibre constant avec les cations contenus dans la sève circulante. Le transport des ions via le flux de sève brute se fait uniquement après saturation des sites de fixation situés sur les parois des tissus de conduction. Les ions sont ainsi retardés au cours de leur transit vers les parties aériennes de la plante et le degré de retardement peut dépendre de la valence du cation, des autres cations présents dans la sève, de la quantité de charges négatives situées sur les parois des tissus de conduction, du pH de la sève, du flux de la sève brute vers les parties aériennes de la plante, des transferts latéraux par diffusion passive vers les espaces intercellulaires et la paroi des vaisseaux (Bell et Bidduh, 1963; Van Die et Vonk, 1967; Ferguson et Bollard, 1976; Wolterbeeck et al, 1984). La complexation des cations avec d'autres composés (acides aminés, peptides) permet de faciliter le transit des cations vers les parties aériennes de la plante (Sauter et Van Cleve, 1992 ; Senden et al, 1994 ; Vassil et al, 1998).

La capacité de fixation aux cations (CBC=cation binding capacity) permet d'estimer le potentiel de rétention des cations dans le bois (Momoshima et Bondietti, 1990; Momoshima et al, 1995). Cette CBC est fonction du pH de la sève avec une augmentation de la CBC à pH 8 par rapport à pH 7 (Momoshima et Bondietti, 1990). Les sites carboxyles situés dans les parois des tissus du xylème sont sensibles aux variations de pH de la sève car ces elles jouent sur leur degré d'ionisation. La CBC peut varier au cours du temps c'est à dire que le nombre de sites de fixation peut changer avec l'âge des tissus. Ainsi, des variations de la composition chimique des parois des vaisseaux ou des trachéides (proportion de lignine, cellulose et pectine) ou de l'anatomie des tissus conducteur (augmentation de la longueur des trachéides

qui implique une diminution des zones de connections inter-trachéides riches en pectine) au cours du développement de l'arbre peuvent influencer les quantités de cations fixés (Momoshima et Bondietti, 1990).

4. Transformation du bois au cours du vieillissement de l'arbre

4.1. Aubier et cœur

Pour la plupart des arbres, les cernes les plus externes contiennent des tissus conducteurs actifs (aubier) qui permettent l'ascension de la sève brute vers les parties aériennes de la plante. Son principal rôle est le stockage de substances dans la zone bordant le cambium. Le nombre de cernes inclus dans cette zone d'aubier est variable selon l'espèce. Les cernes de croissance qui ne présentent plus de fonction de conduction de la sève forment le bois de cœur ou duramen. La zone de transition entre aubier et cœur apparaît régulièrement comme une zone riche en composés chimiques. Le bois de cœur présente chez certaines espèces une coloration sombre qui est liée en partie au stockage de substances de résistance aux champignons et aux insectes (Panshin et al, 1964). Ainsi, il existe de grandes différences de composition chimique entre cœur et aubier (Stewart, 1966; Zimmermann et al, 1974; Bamber et al, 1985; Hillis, 1987). La perméabilité du bois de cœur est réduite et devient impossible par la mise en place de tyloses qui obstruent les vaisseaux. Certaines espèces telles que Fagus sylvatica ne présentent pas de véritable bois de cœur.

4.2. Passage du bois d'aubier en bois de cœur

Les causes exactes de la formation de ce type de bois sont encore inconnues. En générale, on considère que la formation du bois de cœur est contrôlée de manière à permettre le maintien d'une certaine quantité d'aubier fonctionnel dans le tronc (Bamber 1976; Bamber et Fukazawa, 1985). Lors du passage du bois d'aubier en bois de cœur, des redistributions d'éléments chimiques similaires à celles liées à la sénescence des feuilles sont observées. Ainsi une remobilisation des substances de stockage telles que l'amidon, les sucres solubles, les acides aminés, certains ions depuis le cœur vers l'aubier est possible; de même, une accumulation de composés secondaires depuis l'aubier vers le cœur (Merill et Cowling, 1966; Beadle et al, 1968; Ziegler, 1968; Wardell et Hart, 1973; Bamber et Fukazawa, 1985; Colin-Belgrand et al, 1993). Les rayons ligneux et les cellules du parenchyme

apparaissent comme les seules cellules vivantes dans l'aubier et le cœur (Stewart, 1966) et permettraient le transfert des éléments chimiques (Wardell et Hart, 1973).

4.3. Remobilisation et modifications des éléments chimiques fixés

De nombreuses études ont mis en évidence de plus faibles concentrations en P et K dans le bois de cœur comparé à l'aubier. Des translocations de ces 2 éléments vers les cernes de l'aubier durant la formation du bois de cœur ont été observées (Bowen, 1984 ; Van den Driessche, 1984; Lim et Cousens, 1986; Helmisaari et Siltala, 1989). Andrews et Siccama (1995) ont reporté une remobilisation du calcium et du magnésium depuis le bois de cœur de Chamaecyparis thyoides (L.) vers les zones de construction des nouveaux tissus conducteurs. Ces différences de concentrations divergent selon les espèces, les éléments chimiques et particulièrement entre conifères et angiospermes (Dambrine et al, 1991; Augusto et al, 2000; Penninckx et al, 2001; Meerts, 2002). En plus de ces transferts latéraux ou remobilisations internes de l'arbre liés en partie à ses besoins physiologiques, des expériences ont mis en évidence la présence de cations spécifiques dans des cernes formés avant un événement daté connu (Momoshima et al, 1995; Hagemeyer 1995; Kuhn et al, 1997). Par exemple, le ¹³/Cs introduit dans l'environnement suite à des explosions de bombes nucléaires au début des années 60 a pu être retrouvé dans des cernes formés bien avant cette augmentation de concentration (Momoshima et al, 1995). Le fait que certains vaisseaux restent fonctionnels des années après leur formation implique que de nouveaux équilibres chimiques se créent entre la sève circulante et la paroi des vaisseaux. La composition chimique d'un cerne peut alors être modifiée des années après sa formation et c'est ce phénomène qui explique en grande partie les tendances observées dans ces études.

Enfin, les minéraux étant considérés comme une ressource limitante pour les plantes, les mécanismes de remobilisation entre les différents organes sont nécessaires afin d'optimiser l'efficience d'utilisation de ces minéraux (Nambiar et Fife, 1991; Schlesinger, 1997; Lambers et al, 1998; Eckstein et al, 1999; Aerts et Chapin, 2000).

La remobilisation des éléments minéraux au sein du bois a été mise en évidence pour un grand nombre d'espèces d'arbres. Ce phénomène augmente l'efficience d'utilisation des éléments minéraux essentiels à l'arbre mais diminue ses potentialités en tant que bioindicateur temporel des changements environnementaux pour certains éléments chimiques.

Tableau 2 : Récapitulatif des formes d'absorption, des rôles physiologiques, des lieux de stockage, des modes de transport de quelques éléments chimiques majeurs des plantes. D'après W. Larcher 1980, Physiological Plant Ecology 2^{nde} edition Springer Verlag Berlin Heidelberg New York et L.Taiz et E. Zeiger 1998, Plant Physiology 2^{nde} edition, Sinuauer Associates, Inc., Publishers Sunderland, Massachusetts.

Elément chimique	Forme d'absorption	Forme d'incorporation dans la plante	Fonction dans la plante	Site d'accumulation	Transport
N	NO ₃ -, NH ₄ +	NO ₃ -libre dans les vacuoles, dans des composés organiques, protéines, acides nucléiques	Acides aminés, acides nucléiques, enzymes. Permet la croissance cellulaire	Dans les jeunes tiges des feuilles, les bourgeons, dans les organes de stockage, graine	Bon. Le plus souvent sous forme liée à des composés organiques.
Р	PO ₄ ³⁻ , HPO ₄ ²⁻	HPO ₄ ²⁻ / HPO ₄ ²⁻ Libre sous forme ionique ou sous forme de composé estérifié, de nucléotide	Impliqué dans les réactions de phosphorylation. On le retrouve souvent sous forme de phosphoesters dont les glucides phosphorylés qui jouent un rôle dans la photosynthèse, le métabolisme. Sert à la constitution de l'ADN, l'ARN, ATP, phospholipides	Stocké de préférence dans les organes de reproduction	Bon. Sous forme liée à des composés organiques
s	SO ₄ ² -	SO ₄ ²⁻ libre, ou lié à des groupements SH-, SS- ou à des esters	Composé du protoplasme et des enzymes, joue un rôle dans la structure des protéines, la respiration et le métabolisme des acides gras. Constituant des vitamines	Feuilles, graines	Bon. Sous forme de composé organique et peu sous forme d'ion
K	dissoute	K ⁺	Activation enzymatique (photosynthèse, nitrate réductase), osmorégulation, régulateur de l'hydratation cellulaire	S'accumule dans les zones de division cellulaire, dans les tissus jeunes, dans le parenchyme de l'écorce, dans les zones à métabolisme intense	Bon
Mg	dissoute	Mg^{2+}	Il peut être lié à la chlorophylle et aux pectates. Il est intégré à certaines enzymes et ribosomes. Régulateur de l'hydratation, du métabolisme de base (photosynthèse, respiration, synthèse ADN, ARN), activateur enzymatique, intervient dans des réactions enzymatiques mettant en jeu de l'ATP en favorisant la liaison ATP site actif enzymatique	Feuilles	Assez bon

Tableau 2 (suite)

Ca	Adsorbé, dissout, très déficient sur les sols très acides	Ca ²⁺	Il peut être lié organiquement à des pectates et sert à la formation des protopectines de la lamelle moyenne des parois cellulaires et à la lignification. Il assure ainsi le maintien de la structure des membranes cellulaires. Régulateur de l'hydratation, activateur enzymatique (amylase, ATPase), régulateur de la croissance en longueur et de la division cellulaire; il peut aussi être précipité sous la forme de cristaux d'oxalate de calcium Composé de certaines enzymes (cytochrome,)	Feuilles, écorce	Faible
Fe	Adsorbé, mobilisé	Fe ²⁺ Fe (III)-chelate	Métabolisme de base (réactions rédox), métabolisme azoté, synthèse de chlorophylle	Feuilles	Faible
Mn	Adsorbé, dissout, est plus disponible dans le sols acides	Mn ²⁺ Mn-chelate	Fait partie intégrante de certaines enzymes. Métabolisme de base (oxydases, photosynthèse, transfert des phosphates, métabolisme azoté, synthèse des acides nucléiques), stabilise la structure des chloroplastes	Feuilles	Le plus souvent faible
Zn	Adsorbé, soluble est plus mobilisé sur sol acide que basique	Zn ²⁺ Zn-chelate	Sert au métabolisme de la chlorophylle, activateur enzymatique, métabolisme de base, synthèse de régulateurs de croissance	Racines, tiges	Faible
Cu	Adsorbé, mobilisé plus abondamment sur sol acides que calcaires, forte fixation à l'humus	Cu ²⁺ Cu-chelate	Peut se lier à des acides humiques, composé des enzymes (phenoloxydase,). Métabolisme de base (photosynthèse, oxydases), métabolisme azoté, co-facteur enzymatique	Bois	Faible
Cl	Soluble, adsorbé	Cl ⁻	Libre mais stocké sous forme ionique dans les cellules. Aide au maintien de la neutralité électrique à travers les membranes, composé osmotiquement actif de la vacuole, activation enzymatique (photosynthèse)	Feuilles	Bon
Мо		MoO ₄ ²⁻	Intervient dans le métabolisme de l'azote via des molybdo-flavoprotéines. Constituant fondamental de la nitrate réductase		Faible
В		HBO ₃ ²⁻ H ₂ BO ³⁻	Intervient dans la migration et l'utilisation des sucres et le métabolisme des phénols. Joue un rôle dans l'absorption des cations et la régulation de l'entrée d'eau dans la plante	Feuilles, zones de croissance	Faible
Ni			Constituant de l'uréase		Très faible

2. Les différentes méthodes de dosages chimiques utilisées en dendrochimie

Les méthodes de détection des éléments chimiques utilisées dans les études dendrochimiques ont suivi l'évolution des techniques de mesures depuis les méthodes de dosage classiques telles que la chromatographie (qui ne seront pas développées dans le reste du chapitre) ou des méthodes plus résolutives telles que la FAAS (Flame Atomic Absorption Spectrometry) jusqu'au développement de méthodes plus rapides et présentant pour certaines des seuils de détection très bas : NAA (Neutron Activation Analysis), ICP-AES (Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrometry), ICP-MS (Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry), LA-ICP-MS (Laser Ablation-Inductively Coupled Plasma), PIXE (Particle Induced X-ray Emission), SXRF (Synchrotron X-ray Fluorescence), EDS (Energy Dispersive Spectrometry), SIMS (Secondary Ion Mass Spectrometry), LIBS (Laser Induced Breakdown Spectroscopy) et TXRF (Total X-ray Fluorescence). De nombreuses études dendrochimiques ont ainsi quantifié les teneurs en divers éléments chimiques du bois par ICP depuis les travaux de Baes (1984). La principale différence entre ces méthodes porte sur le niveau de préparation des échantillons de bois avec soit une minéralisation préalable par des acides concentrés (ICP-MS, ICP-AES), soit une analyse directe sur des échantillons de bois bruts (EDS, LA ICP-MS, LIBS, PIXE, TXRF, SIMS et SXRF).

La phase de minéralisation peut être très limitante pour les études à l'échelle du cerne annuel de croissance. En effet, la prise d'essai nécessaire pour se placer dans des gammes de concentrations au delà des limites inférieures de détection de l'appareil et ainsi optimiser la qualité des mesures est souvent importante. A l'opposé, les analyses sur échantillons bruts de bois permettent une étude à l'échelle annuelle voire intra-annuelle après un simple planage de la surface de l'échantillon. De plus, le couplage avec un système d'imagerie (caméra, microscope électronique) permet une localisation, qui peut être très précise, des différents points de mesure.

Les méthodes peuvent ainsi se distinguer en fonction du caractère quantitatif ou semiquantitatif de la mesure. En effet, celles qui passent par une mise en solution de l'échantillon et une comparaison des résultats avec des standards permettent une mesure exacte des concentrations. On parle de mesure quantitative. Par contre, les méthodes qui n'exigent pas de mise en solution préalable de l'échantillon de bois sont confrontées au problème de la comparaison des valeurs obtenues avec des standards présentant la même structure tridimensionnelle complexe (réseau tubulaire de vaisseaux, rayons ligneux, fibres, trachéides). Ces standards bois ne sont pas disponibles à l'heure actuelle et les mesures sont considérées comme semi-quantitatives. Elles permettent cependant une comparaison des échantillons entre eux.

Pour toutes les méthodes basées sur la mesure d'un fragment de petite taille de l'échantillon suite à une ablation (SIMS, LIBS et LA ICP-MS) ou à la mesure d'une petite surface de bois, se pose le problème de la représentativité de la mesure. Les valeurs obtenues peuvent être représentatives de la composition chimique de l'échantillon dans son intégrité à condition que :

- l'échantillon présente une forte homogénéité dans la répartition de ses différents atomes constitutifs ;
- la taille du fragment ou de la surface de mesure soit assez grande dans le cas d'éléments répartis de manière hétérogène ou très peu abondants dans le bois.

Quelque soit la méthode, si l'échantillon présente une forte hétérogénéité, il est nécessaire de multiplier le nombre de points de mesure afin d'approcher la valeur moyenne.

Les méthodes basées sur l'émission de rayons X par les atomes (SXRF, EDS) analysent un volume variable, superficiel, restreint et souvent non estimable de l'échantillon dans le cas d'analyse sur bois brut puisque la profondeur de pénétration du rayonnement excitateur dans ce type de matrice est difficilement mesurable ou simulable par des modèles.

Le choix de la méthode d'analyse doit finalement être raisonné en fonction des objectifs de l'étude et des contraintes précédentes. Pour les études intra-cerne (bois de printemps versus d'été, différenciation selon le type de tissus rayons, vaisseaux, profil en profondeur), seules les méthodes à haute résolution spatiale sont envisageables.

Nous aborderons dans cette partie de la thèse divers aspects méthodologiques. Dans un premier chapitre, l'ensemble des méthodes de dosage chimiques utilisées en dendrochimie sont décrites et leur limites méthodologiques discutées. Dans un deuxième chapitre, nous présenterons les résultats d'une comparaison entre une méthode quantitative (ICP) et les deux méthodes semi-quantitatives que nous avons employées dans notre thèse (EDS et SXRF), afin d'estimer dans quelle mesure elles diffèrent. Dans le troisième et dernier chapitre de cette partie, nous aborderons une question peu étudiée en dendrochimie, celle de l'impact du conditionnement des carottes de bois en amont des mesures chimiques, en comparant les

concentrations obtenues par EDS selon diverses techniques de conservation des échantillons. Dans le premier chapitre, les méthodes sont classées en deux grandes classes :

- les méthodes destructives qui impliquent une perte de l'échantillon analysé, après une phase de minéralisation et de mise en solution (ICP-MS, ICP-AES, FAAS, GFAAS) ou par ablation de l'échantillon brut (SIMS, LA ICP-MS et LIBS);
- les méthodes non destructives qui sont basées sur l'émission de rayons X via les interactions entre les atomes constitutifs de l'échantillon et une source incidente excitatrice qui conduit à l'émission de photons caractéristiques. Une dernière méthode non destructive basée sur l'émission radioactive des atomes (NAA) mesure les rayonnements γ émis après bombardement par un flux de neutrons.

La Figure 1 présente la fréquence d'utilisation de ces différentes méthodes en dendrochimie. On constate une forte augmentation, à partir des années 1990, de l'utilisation des méthodes permettant l'analyse sur bois brut. Les principales caractéristiques de chaque technique de mesure sont présentées au Tableau 1.

1. Quelques notions de physique atomique : la fluorescence des atomes

Chaque atome présente un certain nombre d'électrons périphériques à son noyau (Figure 2). Ces électrons sont organisés en couches ou orbitales caractérisées par leur nombre quantique n. Plus ce nombre quantique est faible, plus l'énergie de liaison des électrons au noyau est forte. On parle plus communément de couches K, L, M, ... pour définir les couches de nombres quantiques respectifs n=1, 2, 3, ... Chacune de ces couches contient 2n² électrons qui se répartissent en différentes sous-couches (s, p, d, ...). Les électrons de ces couches électroniques peuvent être éjectés suite à une excitation externe (électrons, rayons X, ...) d'énergie supérieure ou égale à l'énergie de liaison de l'électron au noyau atomique (le choix des énergies incidentes d'excitation conditionne ainsi la liste des éléments potentiellement mesurables). Cette éjection conduit à la formation d'un atome ionisé instable (atome excité). La désexcitation se fait par des transitions électroniques. Un électron d'une couche ou d'une sous-couche plus élevée se déplace pour combler la case quantique vide. Ce déplacement est accompagné d'un surplus énergétique qui se traduit soit par l'émission de photons dans le cas ou ce sont des électrons périphériques qui ont été excités (FAAS, GFAAS, ICP-AES, LIBS) soit par émission de rayons X dans le cas ou ce sont des électrons de cœur qui ont été excités (EDS, PIXE, SXRF, TXRF, WDS) (Annexe 1). Pour les électrons périphériques, les photons émis présentent une longueur d'onde caractéristique de l'atome dont ils proviennent. Pour les électrons de cœur, de nombreuses transitions électroniques sont possibles pour chaque atome et l'énergie libérée lors de ces transitions est fonction du niveau ionisé et est caractéristique d'un atome donné. Si les rayons X engendrés sortent de l'atome, on parle de fluorescence des atomes.

Selon le type de transition électronique mise en jeu, une dénomination a été définie afin de caractériser l'origine des rayons X créés (Figure 2) :

- on parle de spectres ou raies K pour toutes les transitions électroniques vers un niveau ionisé K, et de spectres L pour des transitions vers des niveaux ionisés L;
- on parle de plus de raies α , β ou γ selon les niveaux des couches et sous-couches donneuses d'électrons.
- 2. Les méthodes de dosage chimique destructives

2.1. Spectrométrie d'émission

Dans la plupart des méthodes de spectrométrie d'émission, l'échantillon est d'abord mis en solution. Une attaque acide préalable est effectuée afin de permettre la minéralisation des composés organiques complexes. Il existe au moins deux grands types d'attaques acides possibles :

- en milieu nitrique concentré (HNO₃) avec broyage de l'échantillon sec, ajout de l'acide et augmentation progressive de la température puis dilution finale dans de l'eau ultra pure ;
- en milieu H₂O₂-HClO₄ (acide perchlorique) avec une première mise en solution et agitation avec H₂O₂ de l'échantillon broyé puis ajout de l'acide perchlorique et chauffage progressif.

Cette mise en solution est nécessaire à la nébulisation (passage de l'état liquide à l'état de gouttelettes) de l'échantillon lors de l'introduction dans la source de chaleur de l'appareil. Cette nébulisation permet la dissociation des molécules constitutives de l'échantillon par la source de chaleur et la libération d'atomes qui sont alors dans un état excité durant un court laps de temps (10⁻⁸ s). La spectrométrie d'émission présente différentes modalités que l'on peut classer en fonction de la source de chaleur excitatrice utilisée.

2.1.1. ICP-AES (Inductively Coupled Plasma - Atomic Emission Spectrometry)

Après son introduction dans l'appareil, l'échantillon est nébulisé avec formation d'un aérosol liquide formé de microgouttelettes de quelques µm. Ces gouttelettes pénètrent dans une torche

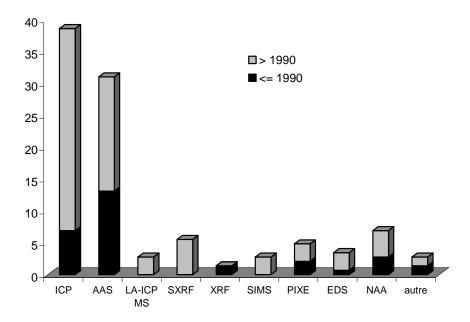


Figure 1 : Pourcentage de travaux publiés en dendrochimie utilisant diverses méthodes de dosage (sur un total de 145 publications analysées). La méthode « XRF » regroupe les méthodes basées sur la fluorescence X par excitation par un flux incident de rayons X autres que SXRF. « autre » : dosages par chromatographie et autres méthodes classiques.

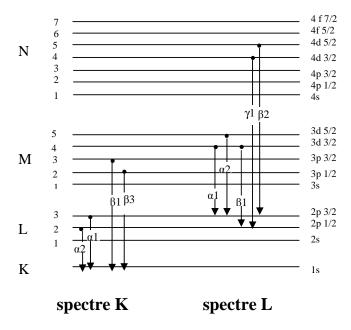


Figure 2 : Représentation schématique des différentes couches et sous-couches électroniques d'un atome. Les spectres K et L sont identifiés ainsi que quelques unes des différentes transitions électroniques possibles.

à plasma d'argon. Le plasma est obtenu après l'application d'une décharge électrique à un flux d'argon dirigé par des champs magnétiques. Les ions argon et les électrons libres ainsi créés sont soumis à des champs électromagnétiques qui provoquent un échauffement (jusqu'à $10~000^{\circ}$ K). Ces conditions de haute température et la présence d'ions argon conduisent à la dissociation et à l'ionisation des atomes issus de l'échantillon et contenus dans le plasma. Cet état d'excitation n'est pas durable et le retour à un état stable se fait par l'émission de photons caractéristiques. Les rayonnements émis par ce plasma sont orientés vers un spectromètre par des lentilles et/ou miroirs. L'analyse des différentes raies se fait dans le détecteur du spectromètre de façon simultanée ou séquentielle :

- l'analyse simultanée des différentes longueurs d'ondes est possible grâce à un système polychromateur comprenant autant de détecteurs que l'on souhaite analyser de raies, le nombre d'éléments détectables dépendant alors de la configuration de l'appareil;
- l'analyse séquentielle consiste en un balayage successif des différentes longueurs d'ondes par un système monochromateur.

L'échantillon étant introduit directement au centre du plasma durant environ 2 ms, la forte température atteinte permet une dissociation complète de la plupart des espèces moléculaires mais aussi un fort rendement d'excitation des atomes. Environ 70 éléments du tableau périodique peuvent être détectés de façon quantitative. Le seuil de détection de l'appareil est bas, du ppm au ppb. La méthode est dite comparative car les concentrations élémentaires de l'échantillon inconnu sont déterminées à partir de courbes d'étalonnage. En général, 40 à 50 éléments chimiques peuvent être détectés en 5-6 minutes par analyse simultanée.

2.1.2. ICP-MS (Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometer)

La méthode est similaire à l'ICP-AES, avec le même principe de génération d'ions. Cependant les ions sont séparés grâce à un spectromètre de masse. Ce sont donc les atomes eux-mêmes et non des photons qui sont détectés. La séparation via le spectromètre de masse permet également l'analyse des formes isotopiques des atomes. Le temps d'analyse est plus court que pour l'AES, 2-3 min pour détecter tous les éléments du tableau périodique. Le seuil de détection est très bas de l'ordre du ppb au ppt.

Des interférences existent car certains isotopes présentant la même masse peuvent ne pas être différenciés par le détecteur.

2.1.3. Limites et contraintes de l'analyse par ICP

La principale contrainte de ces méthodes par ICP est le pré-conditionnement des échantillons. En effet, l'attaque acide via des produits concentrés et corrosifs (HNO₃, H₂O₂, acide perchlorique) est une phase longue et délicate mais nécessaire afin de passer de la phase organique à une solution minérale. En ICP-AES, la quantité de poudre de bois sèche utilisée est en général importante (entre 100 et 2000 mg). Cette contrainte quantitative ne permet pas, le plus souvent, une étude à l'échelle annuelle voire intra-annuelle (un cerne moyen de 2 mm de large, pris dans une carotte de 5 mm de diamètre et de densité 500 kg.m⁻³ représente une masse de bois de 20 mg). Le choix d'analyser un échantillon volumineux permet de se placer dans une gamme de concentrations situées au-dessus du seuil de détection de l'appareil pour la plupart des éléments du tableau périodique et d'obtenir un échantillon assez homogène et représentatif. La prise d'essai peut être réduite à quelques dizaines de mg si on ne s'intéresse qu'à des éléments majeurs. L'ICP-MS permet une étude sur des quantités moindres d'échantillon et quelques mg suffisent en raison de son seuil bas de détection.

2.1.4. LA-ICP-MS (Laser Ablation - Inductively coupled Plasma-Mass Spectrometer)

Cette méthode est une amélioration de l'ICP-MS car, par couplage avec un laser, elle permet de s'abstenir de la mise en solution de l'échantillon. L'échantillon de bois brut est introduit directement dans la chambre de mesure. La taille de la chambre impose un fractionnement des carottes de bois (morceaux de 20 ou 50 mm maximum) et donc une analyse en plusieurs étapes. Le laser provoque l'ablation de très petits fragments d'échantillons (de 10 à 300 µm) voire parfois inférieur à 10 µm selon le type de laser et permet de localiser les zones à analyser via un système optique d'imagerie. Le couplage au spectromètre de masse permet de collecter et identifier les atomes éjectés.

2.2. LIBS (Laser Induced Breakdown Spectroscopy)

Cette méthode est basée sur le même principe que l'ICP-AES, mis à part que la source d'excitation atomique est un laser de forte énergie (flash de durée variable de l'ordre de 10 ns avec une énergie de quelques dizaines de mJ). Le laser permet de délivrer une quantité très élevée d'énergie dans un volume restreint durant un cours laps de temps et la densité de puissance ainsi obtenue est suffisante pour vaporiser la plupart des matériaux. Cette méthode

ne nécessite donc pas une mise en solution de l'échantillon. Les liaisons chimiques entre les atomes constitutifs de l'échantillon sont rompues et les atomes sont ionisés. Les atomes sont éjectés de l'échantillon et créent un plasma. Comme pour l'ICP-AES, la mesure des photons émis se fait à partir d'un détecteur rattaché à un spectromètre. Cette méthode ne nécessite pas de préparation préalable de l'échantillon et les mesures sont rapides (quelques µs à ms). L'ensemble des éléments du tableau périodique peut être détecté avec une limite de détection de 1 à 30 ppm pour la plupart d'entre eux. Cette méthode est considérée comme peu destructive car la quantité de matière éjectée est de l'ordre du ng au pg. En contrepartie, on n'analyse qu'une couche très superficielle de l'échantillon.

2.3. Spectrométrie d'absorption atomique : FAAS (Flame Atomic Absorption Spectrometry)

L'échantillon est mis en solution avec le même protocole que celui utilisé pour l'ICP puis placé sous une flamme. Cette flamme peut être issue de combustibles divers (gaz de ville, butane, acétylène, ...) et la chaleur produite est fonction du combustible choisi (2100–3400 °K). Cette chaleur va décomposer l'échantillon afin d'obtenir une vapeur atomique dont le plus grand nombre d'atomes possibles doit être excité. Les photons émis par les atomes excités vont absorber une partie de la lumière émise par une lampe cathodique. La longueur d'onde de cette lampe est caractéristique de l'élément à analyser et est orientée perpendiculairement au flux de photons générés. Seuls les atomes qui émettent un rayonnement photonique de longueur d'onde identique à celui de la lampe vont absorber une partie de la lumière émise par celle-ci. La concentration de l'élément est déterminée comme la réduction de la quantité de lumière parvenant au détecteur.

Une variante de cette méthode est la GFAAS (Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry) dans laquelle la flamme est remplacée par un tube de graphite chauffant.

Ces méthodes restent mono-élément et nécessitent un temps d'analyse de 10-15 s/élément et 3-4 min/élément pour FAAS et GFAAS respectivement et offrent une détection de l'ordre du ppm (FAAS) voire du ppb (GFAAS).

2.4. SIMS (Secondary Ion Mass Spectrometry)

Un faisceau incident primaire d'ions (oxygène, césium, gallium) est envoyé à la surface de l'échantillon. Ce faisceau très énergétique conduit à l'ionisation et à l'éjection des atomes de l'échantillon qui sont analysés par un spectromètre de masse. Cette méthode est destructive,

mais permet une analyse couche par couche en mode dynamique (résolution en profondeur de l'ordre du nanomètre sous certaines conditions). La détection de tous les éléments du tableau périodique est possible avec une bonne sensibilité.

3. Les méthodes de dosage chimique non destructives

Par convention, on parle de 1) spectrométrie de fluorescence X (XRF: X-ray fluorescence) pour les méthodes qui utilisent un faisceau incident de rayons X comme source excitatrice des atomes (SXRF, TXRF), de microanalyse X pour les méthodes qui utilisent un flux incident d'électrons (EDS) et de sonde ionique pour la méthode qui utilise une source incidente de protons (PIXE). L'ensemble des rayons X émis par l'échantillon suite à cette excitation est caractéristique de sa composition chimique ; on parle de **spectres** pour définir l'ensemble des raies détectées. Pour une raie donnée (soit une énergie des rayon X donnée), la quantité de rayons X collectée sera plus ou moins importante et la hauteur du pic caractéristique obtenu sera fonction de cette intensité. Le seuil de détection de ces méthodes dépend entre autre de la part des rayonnements perturbateurs du signal (fond continu) qui se superposent au signal X caractéristique émergent.

3.1. Faisceau d'électrons incidents

3.1.1. Les interactions électron/matière

Le bombardement d'un échantillon par un faisceau d'électrons conduit à diverses interactions (Figure 3). On peut les regrouper en deux grandes catégories :

- les interactions élastiques: lorsqu'un électron passe à proximité du noyau d'un atome, celui-ci crée une force d'attraction importante conduisant à une déviation de la trajectoire de cet électron. Ces variations brutales de trajectoire vont conduire certains électrons à ressortir de la structure de l'échantillon; on parle d'électrons rétrodiffusés, qui permettent l'obtention d'une image en microscopie électronique à balayage (MEB). Ce phénomène de rétrodiffusion est d'autant plus important que le numéro atomique de l'atome est élevé. Lors de cette déviation de trajectoire, l'électron primaire (incident) perd une partie de son énergie sous forme de rayons X non caractéristiques; c'est le rayonnement de freinage ou Bremsstrahlung responsable du fond continu de l'émission X.

- les interactions inélastiques : elles entraînent un transfert d'énergie des électrons incidents à la cible conduisant à l'émission de particules secondaires. Elles peuvent se faire avec des électrons de cœur (électrons proches du noyau atomique), provoquant l'émission de rayons X caractéristiques qui permet une analyse chimique de l'échantillon (microanalyse X). Ces interactions peuvent aussi se faire avec des électrons périphériques (électrons de valence) : l'électron incident cède une partie de son énergie à l'électron de valence qui est éjecté de l'atome. L'électron éjecté est appelé électron secondaire. Il est exploité en imagerie dans le microscope électronique à balayage. Les électrons secondaires sont de faible énergie (0-50 eV) et ne permettent pas une identification caractéristique de l'atome dont ils proviennent. Il existe différentes sources génératrices d'électrons qui peuvent être couplées à un analyseur chimique élémentaire : microsonde de Castaing, microscope électronique à transmission (MET) ou, microscope électronique à balayage (MEB).

3.1.2. EDS (Energy Dispersive Spectrometry)

Cet analyseur est souvent couplé à un MEB générateur d'électrons. L'interaction entre les électrons incidents et les atomes constitutifs de l'échantillon conduit à l'émission de rayons X détectés par un détecteur Si(Li) ou SDD (Silicon Drift Detector). L'ensemble des rayons X émis est analysé de manière simultanée par un seul et même détecteur.

3.1.3. WDS (Wavelength Dispersive Spectrometry)

Cette méthode est semblable à la précédente à la différence qu'une présélection des rayons X émis se fait, en amont du détecteur, par des cristaux. Elle est ainsi basée sur les propriétés de diffraction sélective des rayons X par ces cristaux spécifiques à chaque élément chimique. Le réglage de l'appareil se fait donc pour chaque élément chimique séparément. La résolution des mesures est nettement supérieure à celle obtenue par EDS car les rayons X de longueurs d'onde proches sont mieux différenciées. La gamme des éléments chimiques mesurables est fonction des cristaux existants. On mesure ainsi l'ensemble des éléments chimiques compris entre le béryllium et le plutonium selon les cristaux. Cette méthode présente de plus un meilleur rapport pic sur fond continu et ceci grâce à l'excellente résolution spectrale qu'offrent les cristaux en comparaison avec les détecteurs utilisés en EDS ; ce dispositif permet la détection d'éléments présents en faible concentration (50 ppm) comparé à l'EDS (200 ppm).

3.2. Rayons X incidents

Les deux méthodes ci-dessous utilisent un rayonnement incident de rayons X afin d'exciter les atomes de l'échantillon. Elles permettent une analyse semi-quantitative de tous les éléments du tableau périodique à partir du fluor (Z=11) jusqu'à l'uranium (Z=92) et pour certains modèles la détection de B, C, O, et N en plus des éléments précédemment cités. Le seuil de détection est de l'ordre de un à quelques centaines de ppm selon les éléments chimiques.

3.2.1. TXRF (Total X-Ray Fluorescence)

Cette méthode utilise une irradiation rasante de rayons X sur l'échantillon. La profondeur de pénétration des rayons X incidents est faible (quelques nm) ce qui limite le bruit de fond. Elle offre de plus l'avantage d'un seuil de détection bas et permet de doser les éléments de numéro atomique Z supérieur à 13 simultanément. La surface de l'échantillon doit être parfaitement plane, ce qui est difficile à réaliser avec du bois.

3.2.2. SXRF (Synchrotron X-Ray Fluorescence)

Le synchrotron est un accélérateur circulaire de particules (électrons). Sous l'action de champs magnétiques intenses, les électrons sont accélérés et émettent des rayons X d'énergie variable; c'est une source dite polychromatique. L'excitation atomique par ces rayons X est forte et le rendement de fluorescence (rayons X crées émergents) est important. L'ensemble des atomes de numéro atomique supérieur à 15 (P) peut être détecté. En général, la source polychromatique est transformée en source monochromatique en plaçant un cristal diffracteur entre la source polychromatique et l'échantillon: l'angle du cristal par rapport au faisceau permet d'obtenir l'énergie ou longueur d'onde désirée pour l'analyse chimique. Le système est parfois couplé à une caméra qui permet d'obtenir une image de l'objet et de cibler les

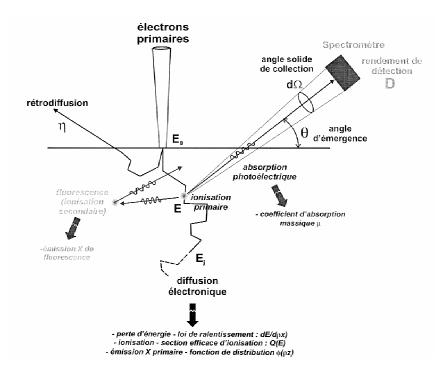


Figure 3 : Schéma des interactions possibles entre les atomes d'un échantillon et le flux incident d'électrons.

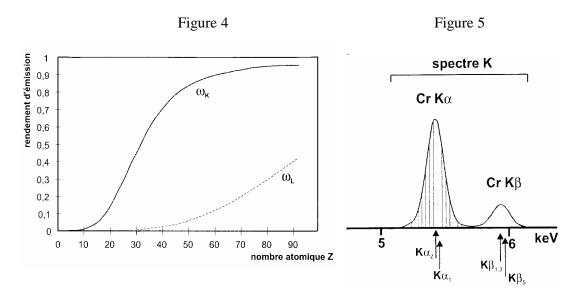


Figure 4 : Rendement d'émission ou rendement de fluorescence (ω) en fonction du nombre atomique en ligne continue noire pour les couches K et en pointillés pour les couches L.

Figure 5 : Représentation schématique des raies $K\alpha$ et $K\beta$ du chrome. Les différentes raies α et les différentes raies β sont identifiées.

zones de mesures. La taille du spot incident de rayons X est modifiable d'une centaine à quelques µms de diamètre selon les appareils.

3.3. Protons incidents : PIXE (Particule Induced X-Ray Emission)

Le faisceau incident excitateur est composé de protons de quelques Mev. L'interaction entre les atomes de l'échantillon et ces protons conduit à l'émission de rayons X caractéristiques détectés par un détecteur Si(Li) en général. Cette méthode est non destructive et rapide puisqu'une analyse complète se fait en quelques minutes. Elle présente une bonne sensibilité (quelques dizaines de ppm, avec un optimum pour les Z compris entre 20 et 30). Tous les éléments chimiques au dessus de Z=11 (Na) peuvent être détectés.

4. Limites et contraintes de ces méthodes d'interaction rayonnement incident – atomes

4.1. Avantages

L'avantage majeur de ces méthodes est la possibilité de travailler sur des matériaux frais, sans pré-conditionnement particulier de l'échantillon et de façon non destructive. Le couplage avec des techniques d'imagerie, comme dans le cas MEB/EDS, permet une excellente localisation des zones à analyser. Les mesures à l'échelle du cerne annuel de croissance, voire intra-cerne sont alors facilitées.

4.2. Limites méthodologiques

Ces méthodes sont généralement considérées comme semi-quantitatives pour certains types d'échantillons car elles ne permettent qu'une comparaison quantitative entre points de mesure et non une mesure exacte de la concentration chimique en un point de mesure. Ce caractère semi-quantitatif est lié au fait que des standards présentant les caractéristiques du bois brut aussi bien au niveau de la structure tridimentionelle qu'au niveau de la composition chimique ne sont pas disponibles afin de calibrer les mesures.

En EDS, afin d'estimer la concentration réelle dans l'échantillon, le logiciel compare les intensités des raies obtenues avec une banque de données internes (Annexe 2). L'intensité des raies de ces standards internes correspond à une certaine concentration pour un élément considéré dans certaines conditions opératoires. Les intensités de ces raies sont comparées à

celles obtenues pour l'échantillon dans les mêmes conditions opératoires. Ces standards internes regroupent différents éléments chimiques mais ne tiennent pas compte de la structure tridimensionnelle de l'échantillon qui est susceptible d'influencer le parcours du signal (rayons X et électrons). De plus, ils ne couvrent qu'une faible gamme de concentrations pour un élément chimique donné ce qui augmente les risques d'erreurs pour les valeurs extrêmes souvent en limite de détection de l'appareil ; c'est notamment le cas pour le bois qui présente de faibles teneurs pour la plupart des éléments. Ainsi, le plus souvent, les concentrations fournies par le logiciel d'analyse sont considérées comme semi-quantitatives.

Pour l'ensemble de ces méthodes, il est de plus difficile d'estimer le volume exact de l'échantillon analysé. La profondeur de pénétration du rayonnement incident dans le matériau bois n'est connue que très approximativement. En EDS/MEB, la zone prospectée par les rayonnements incidents est élargie par rapport à la surface de mesure fixée en amont de l'analyse par l'utilisateur sous l'effet du vide (effet skirt) en mode pression variable. Il est alors nécessaire de tenir compte de ces débordements éventuels lors de la définition des surfaces de mesures.

L'état de surface de l'échantillon est un paramètre également très important car les rugosités superficielles conduisent à une modification de l'intensité des rayonnements incidents et émergents et donc à une déformation du signal collecté par le détecteur. Cet état de surface est particulièrement difficile à maîtriser dans le cas du bois.

Pour l'EDS, des simulations du parcours moyen des électrons dans la matrice de l'échantillon permettent d'estimer la profondeur d'analyse (simulations de Monte Carlo) : ce parcours au sein de la matrice est fonction de l'énergie incidente, des phénomènes d'absorption et des déviations engendrées par les atomes constitutifs de cette matrice et leur agencement. Néanmoins, ces estimations restent très approximatives voire impossibles dans le cas de matrices complexes comme le bois. Pour des échantillons non biologiques, on considère, en général, que pour l'EDS le volume de matière excité par les électrons incidents est de l'ordre de 1 à quelques μm³. Si on estime que la taille moyenne des parois des tissus conducteurs est de l'ordre de 2-10 μm alors l'information chimique obtenue provient de différentes couches cellulaires.

4.3. Corrections apportées aux mesures

4.3.1. EDS

L'ensemble des corrections apportées aux résultats collectés par le détecteur est effectué grâce à un logiciel machine qui se base sur des modèles de type phi-rho(Z), ZAF et XPP issus des travaux de Castaing (1951). La plupart de ces modèles tiennent compte de grandeurs physiques liées à l'élément chimique considéré (dépendant de son numéro atomique Z) et, liées à la matrice (principalement l'absorption A) et des effets propres de la fluorescence (F) (Figures 3) :

- la perte d'énergie des électrons incidents dans la matrice : cette estimation repose sur la loi de ralentissement des électrons qui, par des chocs inélastiques, perdent progressivement une partie de leur énergie dans la cible. Cette perte d'énergie réduit les potentialités excitatrices des électrons et restreint la liste des atomes potentiellement ionisables ;
- la probabilité de rétrodiffusion d'une partie des électrons. Ces électrons ne seront plus considérés comme une source incidente excitatrice. Elle dépend de la matrice elle-même car les échantillons riches en atomes lourds présentent une forte rétrodiffusion ;
- la probabilité qu'un atome émette un rayonnement X (probabilité d'ionisation) : chaque atome ne présente pas la même capacité à être ionisé et à émettre un rayonnement X suite à une excitation externe. Cette capacité est appelée **section efficace** d'ionisation : elle est principalement fonction de l'énergie incidente de la source excitatrice et du niveau énergétique de la couche atomique considérée. Les intensités des raies (nombre d'impulsions) mesurées par le détecteur doivent être corrigées par ce facteur au risque de biaiser la comparaison des valeurs entre éléments chimiques (Figure 4) ;
- l'ionisation d'un atome peut produire un grand nombre de raies caractéristiques ($K\alpha 1$, $K\alpha 2$, $K\beta 1$, ...) appelées **spectre.** Seules les raies les plus probables seront considérées comme représentatives de l'atome. On détermine ainsi un **rendement de fluorescence** ou rendement d'émission qui définit pour chaque raie une probabilité de fluorescence. Ainsi, les raies K sont les plus probables pour la plupart des atomes dont Z<90.

L'ensemble des raies caractéristiques d'un atome sont regroupées par type ($K\alpha$, $K\beta$, $L\alpha$...) et elles forment un pic de raies $K\alpha$, $K\beta$, $L\alpha$... respectivement ; on estime une surface de pic pour chacun de ces pics. Cette surface est déterminée après suppression du fond continu et par un ajustement gaussien. Cet ajustement tient compte d'un écart-type de part et d'autre de la raie énergétique théorique compte tenu de la résolution du détecteur (Figure 5). La résolution du détecteur peut conduire à un élargissement important des raies et des raies proches peuvent se superposer pour certaines énergies. Ainsi, en EDS à 15 kV, la résolution (ou largeur) de la raie $K\alpha$ du manganèse est de 155 eV contre 17 eV en WDS à la même tension d'accélération. Il est donc impossible de différencier les raies $K\alpha$ 1 et $K\alpha$ 2 du manganèse en EDS. Des superpositions (ou interférences) de raies sont fréquemment observées avec intégration de la surface de pics d'un élément chimique au sein de la gaussienne d'un autre élément chimique présentant une énergie d'émission proche. Ce paramètre est estimé et intégré au modèle de correction ;

- la probabilité qu'un rayon X engendré interagisse avec le nuage électronique des atomes constitutifs de l'échantillon et conduise à une nouvelle ionisation de celui-ci : on parle d'ionisation secondaire ;
- la probabilité qu'un rayonnement X émerge de la matrice et parvienne au détecteur sous l'angle de détection θ . Elle est liée à l'absorption des rayons X par la matrice au cours de leurs parcours vers le détecteur ;
- le rendement de détection des appareils de mesure ;
- afin d'obtenir les résultats les plus justes possibles, il est nécessaire de se calibrer avant chaque analyse par l'acquisition d'un spectre de référence (dans notre cas nous avons utilisé le cobalt pur). Ce spectre de référence (ou étalon réel) permet d'indiquer que dans ces conditions opératoires, la surface de pic obtenue pour cet élément correspond à une concentration de 100 %; les surfaces de pics obtenues pour les éléments de l'échantillon sont calibrées par comparaison avec ce pic référence. Le passage régulier de cet élément de référence permet de tenir compte des éventuelles fluctuations du rayonnement incident d'électrons qui peuvent jouer sur le taux de rayons X collectés et ainsi sur la surface des pics ;

- les concentrations au sein de l'échantillon pour les divers éléments peuvent également être estimées par comparaison entre les surfaces de pics obtenues et celles enregistrées pour des standards internes dans les mêmes conditions opératoires. Ces standards internes consistent en des étalons dont les surfaces de pics théoriques sous différentes conditions opératoires sont contenues dans une banque de données du logiciel (étalon théorique). Les intensités des raies obtenues pour l'échantillon sont comparées à ces raies théoriques pour les mêmes conditions opératoires. Un k ratio est ainsi estimé c'est-à-dire, le rapport entre l'intensité mesurée dans notre échantillon pour un élément donné et l'intensité obtenue dans les mêmes conditions pour l'étalon correspondant.

Certains termes de cette correction sont connus avec une précision médiocre voire mauvaise.

4.3.2. SXRF

Les rayons X émis sont collectés par un détecteur Si(Li). En l'absence de témoins intégrés à la série de mesure, il n'existe pas comme pour l'EDS de corrections internes apportées aux données. Les mesures sont donc brutes, c'est à dire exprimées en nombre de coups par unité de temps (proportionnel au nombre de rayons X ayant impacté le détecteur). Des corrections sont ensuite apportées grâce à un logiciel machine externe. Elles consistent, après une identification des pics (ensemble des raies), en une estimation des effets de matrice sur les rayonnements incidents et émergents et en une estimation et une correction des possibles superpositions de raies. Des corrections supplémentaires sont apportées via le coefficient atomique (probabilité qu'un atome donné émette des rayonnements X suite à une excitation externe) et la dérive du faisceau (changement d'intensité du faisceau incident au cours des analyses qui joue sur l'intensité du rayonnement émergent).

5. Une autre méthode de dosage non destructive : NAA (Neutron Activation Analysis)

Cette technique est multi-éléments, non destructive et permet une mesure qualitative et quantitative des éléments mineurs et majeurs, voire d'éléments traces. Elle se différencie des méthodes basées sur les transitions électroniques puisqu'elle est basée sur des transitions nucléaires. L'échantillon est introduit dans un réacteur nucléaire (la fission d'uranium est couramment utilisée comme source de neutrons) dans lequel il est bombardé par des neutrons qui transforment les atomes en isotopes radioactifs. Les neutrons interagissent avec les

noyaux des atomes qui se retrouvent alors dans un état excité. La durée de vie du radioisotope produit dépend de sa demi-vie et le retour à un noyau stable se fait par émission de particules β et de rayonnement γ . Le rayonnement γ émis est caractéristique de l'atome dont il provient. Il existe différents types de détecteurs de ces rayonnements (à semi-conducteurs, à ionisation de gaz, à scintillation). La sensibilité de la mesure dépend de l'élément chimique considéré (de 0,1 ppb à 1 pour mille) et permet la détection de 74 éléments du tableau périodique selon les propriétés des isotopes. Les éléments les plus lourds ont de plus gros noyaux et présentent une section efficace de capture des neutrons plus importante ce qui augmentera leur probabilité d'activation. La technique, bien que résolutive, est peu utilisée car elle nécessite l'accès à des réacteurs nucléaires. Elle implique la prise en charge de l'échantillon après son analyse car il peut demeurer radioactif un certain temps, ce qui nécessite des précautions particulières souvent très onéreuses.

méthode	Source incidente	Détection	Eléments mesurables	Limites de détection	
SXRF	RX (synchrotron)	RX	Z>15 (P)	jusqu'au ppm	
EDS	ē	RX	Z>4 (Be)	200 ppm	
PIXE	protons	RX	Z>11 (Na)	jusqu'au ppt	
NAA	neutrons	Rγ	74 éléments	1000 ppm à 0,1 ppb	
SIMS	ions (O ²⁺ , Cs ⁺ , Ga ²⁺)	ions, isotopes	tous	ppt au ppq	
TXRF	RX	RX	Z>13(Al)	ppb au ppt	
WDS	Е	RX	Z>3 (Li)	50 ppm	
LIPS	RX	RX	tous	1 à 100 ppm	
ICP-MS	plasma argon	atomes	tous	ppb à ppt	
ICP-AES	plasma argon	photons	70 éléments	ppm à ppb	
FAAS/GFAAS	flamme/tube de	photons	tous	ppm à ppb	
	graphite	absorbés	coup	pp u ppo	

Tableau 1 : Comparaison synthétique des différentes méthodes de mesures évoquées avec le type de source incidente excitatrice, le type de signal émergent et collecté en vue de la détermination des concentrations, la liste des éléments mesurables et les limites de détection des appareils : ppm (10⁻⁶), ppb (10⁻⁹), ppt (10⁻¹²) ou ppq (10⁻¹⁶).

3. Comparaison de mesures de concentrations en éléments du bois par une méthode quantitative (ICP) et des méthodes semiquantitatives (EDS, SXRF).

1. Introduction

Les méthodes d'analyse chimique basées sur la détection de rayons X émis suite aux interactions entre les atomes constitutifs de l'échantillon et une source excitatrice externe sont dépendantes de phénomènes physiques complexes (absorption du rayonnement, déformation du signal ...); le signal X émergent constitue une mesure indirecte de la composition chimique de l'échantillon et dans le cas d'échantillons complexes comme le bois brut, toutes ces modifications ne sont pas connues précisément. En ICP, ces perturbations physiques sont plus limitées puisque l'échantillon est sous forme liquide et les possibles déformations du signal sont estimables via les standards en solution.

Ainsi, les mesures effectuées par EDS sur des échantillons de bois brut sont considérées comme semi-quantitatives puisqu'à l'heure actuelle aucun standard semblable à une matrice de bois n'est disponible afin de calibrer les valeurs. Pour estimer dans quelles mesures les résultats obtenus par EDS peuvent être considérés comme quantitatifs, il est nécessaire de comparer les concentrations mesurées avec des méthodes standardisées telles que l'ICP.

Le volume de l'échantillon de bois brut analysé en un point de mesure est plus ou moins important selon la méthode. En SXRF, les rayons X incidents forment un rayonnement cohérent qui ne nécessite pas des conditions de vide pendant l'analyse; ces rayons sont très pénétrants. En EDS, les électrons incidents nécessitent des conditions de vide spécifiques pour être focalisés sur l'échantillon; ils sont moins pénétrants que les rayons X. De plus, la surface de mesure réellement analysée en EDS est plus importante que celle prédéfinie par l'utilisateur par effet skirt (élargissement du faisceau d'électrons sous les conditions de vide en mode pression variable). En SXRF, la surface de mesure prédéfinie est semblable à celle fixée en amont des mesures. Le volume d'analyse sera donc variable selon la méthode utilisée; il est également dépendant de l'état de surface de l'échantillon (état de planage, composition chimique) qui joue sur la déformation des signaux incidents et émergents (chapitre II paragraphe 4.2.).

L'ICP consiste en une mesure de la totalité d'un broyat de bois qui est plus intégrative de la composition chimique globale qu'une mesure par EDS qui ne représente qu'une zone

ponctuelle et restreinte de l'échantillon. Selon l'homogénéité de la répartition des éléments chimiques dans le bois, il faut envisager deux cas de figure :

- l'élément est réparti de manière homogène : un seul point de mesure de petite surface peut suffire à estimer la concentration moyenne dans le bois ;
- l'élément est réparti de manière hétérogène dans le bois : la multiplicité des points de mesure est essentielle afin d'obtenir une concentration qui approche la concentration moyenne. Cette multiplication des points de mesures peut être évitée en choisissant une zone de mesure plus grande qui englobe alors les différentes zones, riches et pauvres, de l'échantillon.

Néanmoins, le choix d'utiliser de larges zones d'analyse en EDS doit être fait avec précaution car, par effet skirt, les électrons incidents risquent d'impacter des zones en dehors de la zone prédéfinie de l'échantillon. En SXRF, le rayonnement est plus ciblé et les débordements hors de la zone de définition sont limités (les mesures ne s'effectuant pas en conditions de vide mais à air ambiant). Mais le choix de la superficie de la zone de mesure en SXRF est restreint comparé à l'EDS et les larges zones de mesures ne peuvent pas être envisageables pour la plupart des modèles. La multiplicité de petites zones de mesure est alors la seule solution.

Ces 2 grandes différences entre l'ICP et les méthodes basées sur la détection de rayons X (volume d'analyse, absence de standards) contribuent au fait que la comparaison des concentrations obtenues par ces méthodes est envisageable mais qu'elle doit dépendre entre autres des éléments chimiques et de leur répartition au sein de la matrice de bois.

Dans ce chapitre, nous comparons les mesures obtenues sur des échantillons de bois d'épicéa par EDS et SXRF d'une part, et par une méthode de dosage quantitative, l'ICP, d'autre part. Pour évaluer les biais liés à la structure tridimensionnelle du bois sur les analyses par EDS, des mesures sur poudre de bois d'épicéa ont été menées en parallèle.

Une petite partie sera également consacrée à l'étude de la répétabilité des mesures chimiques par EDS et SXRF en se basant sur des résultats obtenus lors de divers chapitres de cette thèse.

2. Matériel et méthodes

Les échantillons de bois analysés ont été récoltés dans la forêt d'Aubure (Haut-Rhin France) dans le cadre de la thèse d'Anne Poszwa (Poszwa, 2000). Cette forêt se situe sur le bassin versant du Strengbach à 60 km de Strasbourg et a fait l'objet d'une étude d'acidification des sols forestiers (Poszwa et al, 1998; Dambrine et al, 1998). La pluviométrie annuelle est de

l'ordre de 1100 à 1600 mm. La parcelle étudiée (S90) est une plantation d'épicéas purs (*Picea abies* L. Karst) de 90 ans située sur le versant sud (1080 m d'altitude) sur sol brun acide (dystric cambisol, FAO). 5 épicéas dominants ont été abattus en 1995. Des rondelles de 5 cm d'épaisseur ont été débitées à 1,30 m de la base du tronc. Seul le bois final des cernes formés lors de 6 années sèches (1949, 1952, 1959, 1964, 1976, 1983) a été débité en fines lamelles à l'aide de ciseaux à bois dans le sens du fil du bois (le long de 2 rayons orientés nord et sud) et séché en étuve pour chacun des 5 épicéas échantillonnés (30 échantillons au total). Nous avons analysé chaque échantillon (une année dans un arbre) par 3 méthodes différentes (ICP, SXRF et EDS). Deux séries de mesures par ICP ont toutes été réalisées, l'une sur ICP-AES à Nancy (ICP NCY) dans le cadre de la thèse d'Anne Poszwa (Poszwa, 2000), l'autre à l'Unité de Service et de Recherche en Analyses Végétales et Environnementales (USRAVE) de l'INRA de Bordeaux (ICP BDX).

Trois séries de mesures par EDS ont été réalisées à Nancy, dans des conditions opératoires différentes, en variant la tension d'accélération d'une part, et en travaillant sur copeaux de bois brut ou sur poudre de bois d'autre part.

Les 30 échantillons n'ont pas tous pu être analysés avec l'ensemble des méthodes, car nous ne disposions pas de suffisamment de copeaux de bois (Tableau 1). De plus, les résultats obtenus par ICP à Bordeaux présentent des valeurs manquantes pour les concentrations en aluminium et phosphore, lorsqu'elles étaient en dessous du seuil de détection de l'appareil. Lors de la comparaison des méthodes deux à deux, les corrélations sont calculées sur l'ensemble des mesures communes aux deux méthodes considérées. Seuls 16 échantillons, présentant une quantité suffisante de matériel, ont été analysés avec l'ensemble des méthodes. La corrélation calculée à partir de ce sous-ensemble de 16 échantillons communs est également indiquée.

2.1. Analyse par ICP

Ces mesures ont été effectuées par Anne Poszwa dans le cadre de sa thèse. Un gramme de chaque échantillon a été déposé, après broyage, dans des capsules de platine puis soumis à une minéralisation sèche au four à 600 °C pendant 6 heures. Après refroidissement des échantillons, 0,4 ml de HCl 7,5 N ultra-pur ont été ajoutés aux cendres puis les solutions ont été chauffées jusqu'à évaporation complète de l'acide. Deux ml de HCl ont ensuite été ajoutés au résidu de minéralisation. Avant la mesure par ICP, 10 ml d'eau ultra-pure ont été ajoutés à un demi ml de chaque échantillon minéralisé. Les concentrations en Ca, Sr, K, Mg, Al et P ont été déterminées (Tableau 1) par ICP (ICP-AES, Jobin Yvon 38+).

Les mesures par ICP à Bordeaux ont porté sur les éléments Al, Ca, K, Mg, Mn et P (Tableau 1). Les copeaux de bois ont été broyés finement au broyeur à bille (MM 200, Retsch, Haan-Germany) avant leur envoi. Les poudres de bois ont été minéralisées à l'USRAVE par acide fluorhydrique (HF) puis analysés chimiquement par ICP-AES.

	C	O	Mg	Al	Si	P	S	Cl	K	Ca	Mn	Fe	Sr	Rb
ICP NCY (30)			X	X		X			X	X			X	X
ICP BDX (27)			X	x (6)		x (9)			X	X	X			
EDS BB1 (30)	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
EDS BB2 (19)	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
SXRF (17)		<u> </u>	•			•	<u> </u>	<u> </u>	X	X	X	X	X	Х

Tableau 1 : Récapitulatif des mesures effectuées par les différentes méthodes. La présence d'une croix indique que l'élément a été mesuré. L'absence de croix signifie que l'élément n'était pas détectable car présent en trop faible concentration sur l'ensemble des échantillons pour la méthode considérée ou qu'il n'était pas mesurable par cette méthode (Chapitre II, Tableau 1). La première colonne contient le nom de la méthode utilisée, entre parenthèses figure le nombre d'échantillons analysés. Les chiffres entre parenthèses à côté des croix correspondent au nombre de mesures valides fournies par l'ICP BDX, c'est à dire aux valeurs qui se trouvaient au-dessus de la limite de détection de l'appareil.

2.2. Analyse par SXRF

L'analyse par synchrotron a été effectuée au LURE (Paris) sur la ligne D15 de l'anneau de stockage. L'ensemble de cette installation est décrit par Chevallier et al (1996). La lumière blanche incidente est focalisée et monochromatisée par un cristal monochromateur, permettant de sélectionner les rayons X. Afin de détecter les éléments tels que le calcium et le manganèse, les photons de 17,5 kV ont été sélectionnés (les éléments chimiques à partir de Z=16 (soufre) peuvent être théoriquement détectés dans ces conditions). La taille de la zone de mesure était de 400 µm de diamètre avec une distance de travail de 3,5 cm et les mesures se faisaient à air ambiant. Les rayons X émergents caractéristiques de chaque atome étaient collectés par un détecteur Si(Li). La résolution de ce détecteur est de 150 eV pour la raie Ka du manganèse. L'ensemble des données collectées par le détecteur a été analysé par le logiciel WAPI : les éléments chimiques correspondants aux différentes énergies des raies collectées par le détecteur sont identifiés. Un contrôle visuel des éléments autoidentifiés par le logiciel a été effectué avec Pierre Chevallier (responsable de la ligne que nous avons utilisée) à partir de

spectres obtenus. Des corrections sont apportées aux données en fonction de la densité de la matrice et de sa composition chimique moyenne (7% H, 54% C et 39% O). La quantité de chaque élément chimique présent en un point de mesure est exprimée en surface de pics, calculée à partir de l'intensité et du nombre des raies énergétiques obtenues pour cet élément chimique. Plus un élément chimique est abondant dans l'échantillon, plus le nombre d'impulsions pour cet élément dans le détecteur est important et plus la surface de ses pics est importante. Les résultats ont été corrigés par les fluctuations (faibles) de l'intensité incidente du faisceau de rayons X au cours des analyses. Un coefficient de correction atomique a été également apporté : ce coefficient tient compte de la capacité de chaque élément chimique à réagir avec le faisceau incident et à réémettre des rayons X à travers la matrice. Trois copeaux de bois par échantillon, choisis aléatoirement, ont été analysés (1 point de mesure par copeau, soit 3 mesures par échantillon).

2.3. Analyse par EDS

Le détecteur EDS (Oxford Instruments EDS ATW) est couplé à un microscope électronique à balayage (LEO 1450 VP) qui émet les électrons incidents excitateurs des atomes de l'échantillon. Les rayons X engendrés suite aux interactions électrons/atomes sont collectés par un détecteur Si(Li). Les corrections apportées aux données sont présentées dans le chapitre II (paragraphe 4.3.1).

Une première série d'analyses a été réalisée par Raphaël Bailly, stagiaire de DEA, sur des copeaux de bois bruts (notées par la suite « EDS BB1 ») et sur de la poudre de copeaux compressée sous forme de pastille (notées par la suite « EDS P »). Pour la mise en pastille, les copeaux ont été broyés au broyeur à bille puis compressés sous presse. Cette mise en pastille permet d'obtenir une surface compacte et plane entraînant une moindre déformation des trajectoires des électrons incidents lors de la pénétration dans l'échantillon et conduit ainsi à un signal X émergent plus représentatif des atomes de l'échantillon. Les pastilles ont été métallisées par dépôt d'une fine couche de carbone à leur surface afin d'améliorer la circulation des flux électroniques et ainsi d'éviter les phénomènes de charge (accumulation d'électrons à la surface de l'échantillon).

L'ensemble des analyses chimiques a été effectué à une tension de 20 kV à pression variable (50 Pa) pour les échantillons de bois bruts et en haut vide pour les pastilles. La pression variable correspond à un vide différentiel entre la colonne (10⁻³ Pa) et la chambre de mesure

où se situe l'échantillon (quelques dizaines de Pa) ce qui permet de maintenir l'échantillon hydraté au cours des mesures ; l'échantillon de bois brut peut être directement introduit dans l'appareil de mesure. Néanmoins ce mode de travail en pression variable implique un possible élargissement du faisceau d'électrons au cours de son trajet vers l'échantillon (effet skirt). Le mode haut vide permet de maîtriser la surface de mesure car les effets skirt sont inexistants ; cependant il nécessite une métallisation en amont des mesures ce qui augmente le temps de préparation des échantillons et limite leur utilisation ultérieure.

Le temps d'acquisition de chaque mesure était de 50 s et la surface d'analyse de 1800 x 1200 µm (grandissement de 200 x). Les concentrations en Al, Ca, Fe, K, Mg, Mn et P ont été déterminées (Tableau 1). Trois pastilles ont été analysées par échantillon avec à chaque fois 3 zones de mesure par pastille (3 x 3 analyses par échantillon). Pour le bois brut, 3 copeaux de bois ont été analysés par échantillon avec, pour chaque copeau, 3 zones de mesures (3 x 3 analyses par échantillon).

La deuxième série d'analyses par EDS a été réalisée par Christophe Rose (notées par la suite « EDS BB2 ») sur les mêmes copeaux de bois bruts que ceux déjà mesurés en SXRF, à pression variable (50 Pa) et à une tension d'accélération plus élevée que pour la série précédente (EDS BB1), de 25 kV. Le temps d'acquisition et le grandissement sont restés les mêmes que pour la série EDS BB1. Les concentrations en Al, C, Ca, Cl, Fe, K, Mg, Mn, O, P, S et Si ont été déterminées (Tableau 1). Trois copeaux ont été analysés par échantillon. Sur chaque copeau, une zone de 1800 x 1200 μm a été divisée en quatre sous-zones de mesures adjacentes (450 x 300 μm), soit 3 x 4 analyses par échantillon, couvrant au total une surface trois fois plus petite que celle analysée dans la série EDS BB1.

3. Résultats

3.1. Corrélations entre les différentes méthodes

Les corrélations de Pearson entre toutes les paires de méthodes ont été calculées soit pour les seuls 16 échantillons communs à toutes les séries d'analyse (Tableau 2), soit pour tous les échantillons disponibles dans chaque comparaison (Tableau 3). De façon générale, les corrélations entre ICP NCY et ICP BDX sont significatives au seuil de 1% et élevées pour les quatre éléments mesurés en commun: Ca, K, Mg et P.

Calcium

Les mesures effectuées par EDS sur bois brut, quel que soit la série de mesure, sont non corrélées aux mesures effectuées par ICP ou SXRF. Par contre, les mesures sur poudre (EDS P), sont très corrélées aux mesures par ICP (Figure 1a), de façon aussi importante que les mesures par ICP entre elles (0,95 entre EDS P et ICP BDX contre 0,89 entre ICP NCY et ICP BDX pour les 16 échantillons communs, Tableau 2). Les mesures par EDS P sont corrélées, dans une moindre mesure, aux mesures effectuées par SXRF, pour les 16 échantillons communs uniquement (Tableau 2). Les mesures effectuées sur bois brut par SXRF sont significativement corrélées aux mesures par ICP. Les relations entre les valeurs obtenues sur bois brut EDS (EDS BB1 et EDS BB2) sont également significatives.

Potassium

Les corrélations entre les méthodes sont toutes très significatives (entre 0,73 et 0,96 pour les 16 échantillons communs, Tableau 2). Les plus fortes corrélations sont obtenues entre EDS P et les mesures par ICP BDX (Figure 1b) et ICP NCY (r=0,96 et r=0,95 respectivement, Tableau 2).

Manganèse

La corrélation la plus forte est celle obtenue entre les mesures par SXRF et ICP BDX (0,80). Si on considère les 16 échantillons communs (Tableau 2), les relations de EDS P avec les autres méthodes sont toutes non significatives, mis à part avec EDS BB2 (r=0,51). Par contre, si tous les échantillons sont pris en compte, les corrélations de EDS P avec ICP BDX et EDS BB1 deviennent significatives au seuil de 1% (Tableau 3).

Magnésium

Les mesures effectuées par EDS BB2 sont corrélées aux mesures par ICP BDX et ICP NCY quel que soit le nombre d'échantillons mais avec des corrélations moyennes (r=0,64 et r=0,69 respectivement) et aux mesures par EDS P (r=0,52).

Phosphore

Seules les corrélations entre ICP BDX et ICP NCY (r=0,88) et entre EDS BB2 et ICP NCY (r=0,74) sont significatives lorsque l'on considère les 16 échantillons communs (Tableau 2). La corrélation entre EDS P et ICP NCY est faiblement significative (r=0,39, P<0,05) si tous les échantillons sont pris en compte (Tableau 3).

Aluminium

Aucune corrélation significative n'a été obtenue pour l'aluminium quelque soit le nombre d'échantillons.

Si l'on compare ces corrélations linéaires avec des corrélations de rang de Spearman, les résultats précédents ne sont pas beaucoup modifiés. Les corrélations de Pearson qui étaient très significatives le restent. Par contre, les corrélations qui étaient faibles peuvent devenir non significatives en Spearman et inversement. Dans tous les cas, aucune des corrélations qui étaient faibles ou non significatives en Pearson et qui deviennent significatives en Spearman, ne montre de fortes corrélations.

		ICP NCY	SXRF	EDS BB1	EDS P	EDS BB2
	Ca	0,89 ***	0,58 *	ns	0,95 ***	ns
	K	0,91 ***	0,84 ***	0,82 ***	0,96 ***	0,90 ***
ICP BDX	Mn	-	0,80 ***	0,48 (*)	ns	ns
	Mg	0,94 ***	-	ns	ns	0,64 **
	P	0,88 ** (7)	-	ns (7)	ns (7)	ns (7)
		Ca	0,54 *	ns	0,88 ***	ns
		K	0,74 **	0,81 ***	0,95 ***	0,77 ***
	ICP NCY	Mn	-	-	-	-
		Mg	-	ns	ns	0,69 **
		P	-	ns	ns	0,74 **
			Ca	ns	0,50 *	ns
			K	0,73 **	0,80 ***	0,91 ***
		SXRF	Mn	0,70 **	ns	ns
			Mg	-	-	-
			P	-	-	-
				Ca	ns	0,60 *
				K	0,78 ***	0,74 **
			EDS BB1	Mn	ns	ns
				Mg	ns	ns
				P	ns	ns
					Ca	ns
					K	0,84 ***
				EDS P	Mn	0,51 *
					Mg	0,52 *
					P	ns

Tableau 2 : Corrélations de Pearson entre méthodes de mesures pour les échantillons communs à toutes les méthodes. Le nombre d'échantillons est de 16, sauf cas particuliers indiqués entre parenthèses. Seuil de significativité : *** p<0,001, ** p<0,01, * p<0,05, (*) P<0,6, ns non significatif.

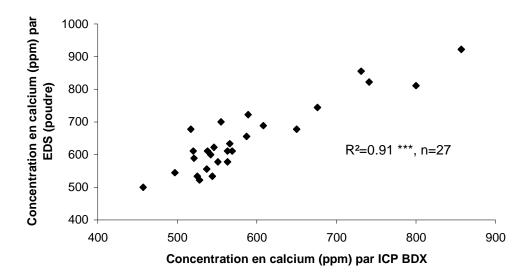


Figure 1a : Relation entre les concentrations en calcium mesurées par ICP (ICP BDX) et par EDS sur poudre de bois (EDS P) à partir des 27 échantillons communs à ces deux méthodes.

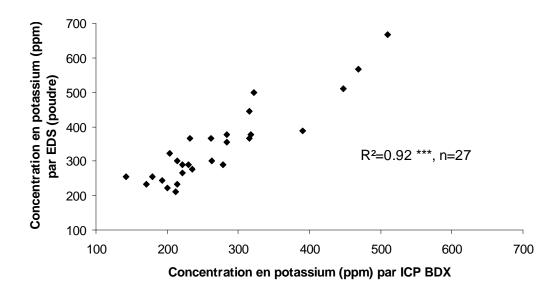


Figure 1b : Relation entre les concentrations en potassium mesurées par ICP (ICP BDX) et par EDS sur poudre de bois (EDS P) à partir des 27 échantillons communs à ces deux méthodes.

		ICP NCY	SXRF	EDS BB1	EDS P	EDS BB2	
	Ca	0,88 *** (27)	0,58 * (16)	ns (27)	0,91 *** (27)	ns (18)	
	K	0,90 *** (27)	0,84 *** (16)	0,84 *** (27)	0,92 *** (27)	0,88 *** (18)	
ICP BDX	Mn	-	0,80 *** (16)	0,67 *** (27)	0,58 ** (27)	ns (18)	
	Mg	0,95 *** (27)	-	ns (27)	0,50 ** (27)	0,63 ** (18)	
	P	0,85 ** (9)	-	ns (9)	ns (9)	ns (9)	
		Ca	0,52 * (17)	ns (30)	0,80 *** (30)	ns (19)	
		K	0,72 ** (17)	0,77 *** (30)	0,91 *** (30)	0,71 *** (19)	
	ICP NCY	Mn	-	-	-	-	
		Mg	-	0,37 * (30)	0,45 * (30)	0,63 ** (19)	
		P	-	ns (30)	0,39 * (30)	0,65 ** (19)	
			Ca	ns (17)	0,47 (*) (17)	ns (17)	
		SXRF	K	0,73 *** (17)	0,78 *** (17)	0,91 *** (17)	
			Mn	0,74 *** (17)	ns (17)	0,52 * (17)	
			Mg	-	-	-	
			P	-	-	-	
				Ca	ns (30)	0,53 * (19)	
				K	0,77 *** (30)	0,70 *** (19)	
			EDS BB1	Mn	0,58 *** (30)	ns (19)	
				Mg	ns (30)	ns (19)	
				P	ns (30)	ns (19)	
					Ca	ns (19)	
					K	0,79 *** (19)	
				EDS P	Mn	0,45 (*) (19)	
					Mg	0,51 * (19)	
					P	ns (19)	

Tableau 3 : Corrélations de Pearson entre méthodes de mesures. Le nombre d'échantillons est indiqué entre parenthèses et varie selon les comparaisons envisagées. Seuil de significativité : *** p<0,001, ** p<0,01, * p<0,05, (*) p<0,6, ns non significatif.

L'analyse en composante principale des tableaux précédents permet de visualiser les similarités entre méthodes. En résumé, les valeurs mesurées pour le potassium sont toujours cohérentes, quelle que soit la méthode de mesure. Si l'on considère l'analyse en composantes principales pour le potassium, seuls SXRF et EDS BB2 s'écartent légèrement des autres méthodes (Figure 2). Pour le calcium, les mesures EDS sur poudres sont cohérentes avec l'ICP contrairement aux mesures sur bois brut (Figure 2).

Pour les autres éléments, les méthodes de fluorescence donnent des valeurs peu corrélées entre elles ou avec l'ICP. Pour le manganèse, les mesures par EDS sur poudre et EDS BB2 se dissocient du reste des méthodes. Pour le magnésium, seules les mesures par ICP et EDS BB2 sont proches (Figure 2).

Les résultats obtenus par EDS sur bois brut dans des conditions opératoires différentes (EDS BB1 et EDS BB2) sont très cohérents pour le potassium et faiblement pour le calcium. Pour le magnésium, le manganèse et le phosphore, ils ne sont pas corrélés.

3.2. Comparaison des concentrations moyennes

Les mesures obtenues par les diverses méthodes de mesures ont été comparées de manière globale, c'est à dire à partir des concentrations moyennes obtenues par les méthodes pour les 16 échantillons communs (Figure 3). Les concentrations sont exprimées dans la même unité de mesure (ppm). Les mesures effectuées par SXRF n'étant pas exprimables en ppm puisque l'on obtient un nombre de coups par unité de temps ou surface de pic, elles ne seront pas considérées dans la suite des résultats. Néanmoins, il est important de préciser que les mesures par SXRF exprimées en surface de pics ont montré le même classement d'abondance que des mesures effectuées par ICP (Chapitre VI, paragraphe 4.1).

La comparaison de ces valeurs moyennes permet d'estimer dans quelle mesure les valeurs obtenues par EDS sont proches de valeurs quantitatives globales telles que mesurées en ICP sur l'ensemble de l'échantillon. Les concentrations obtenues pour chaque échantillon ne seront pas comparées point par point puisque les mesures ont été réalisées sur des copeaux ou des zones du bois différents, mais au niveau de l'ensemble de l'échantillon.

Les teneurs en aluminium sont largement supérieures en EDS comparées à celles mesurées par ICP (Figure 3). Cette différence est encore plus marquée pour les mesures EDS P. Pour le fer, les teneurs en EDS P sont très supérieures à celles obtenues en EDS BB1 ou EDS BB2.

Pour le calcium, les concentrations obtenues par EDS sur bois brut sont plus importantes que celles mesurées par ICP ou sur poudre de bois. Les teneurs en calcium sont également faiblement, mais significativement différentes entre ICP BDX et ICP NCY.

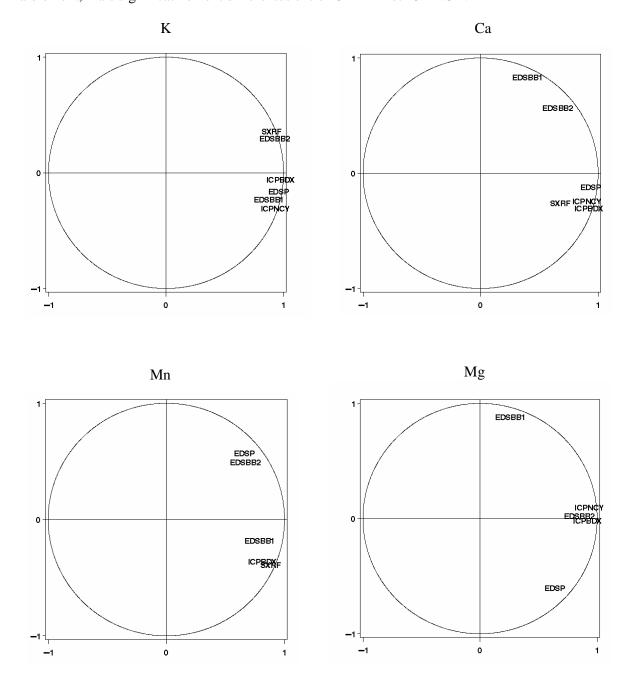


Figure 2 : Analyse en composante principale des concentrations en K, Ca, Mn et Mg obtenues par les diverses méthodes de mesures pour les 16 échantillons communs.

55

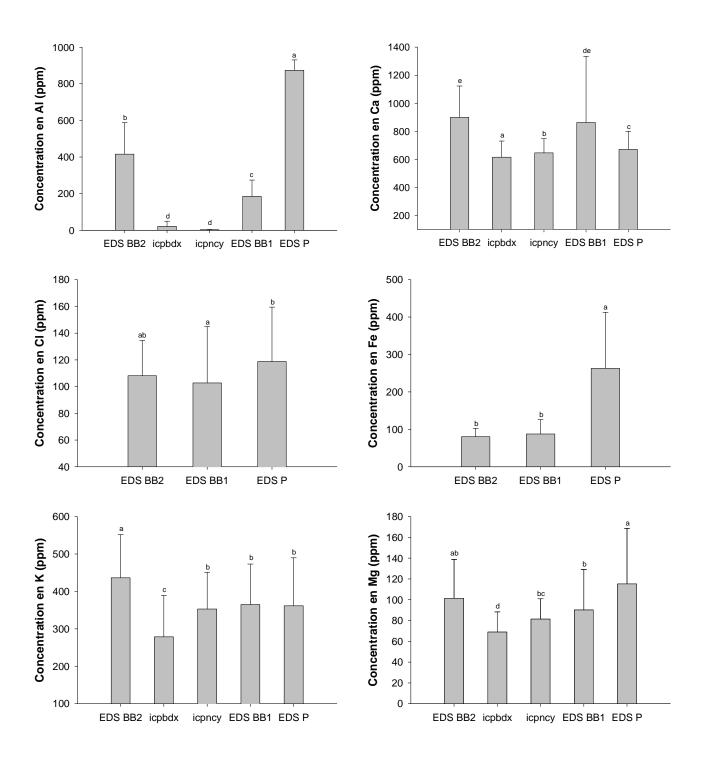
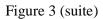


Figure 3 : Concentrations moyennes obtenues par les différentes méthodes de mesures pour les 16 échantillons communs. La significativité des différences entre méthodes (test t apparié) est indiquée au-dessus des diagrammes.



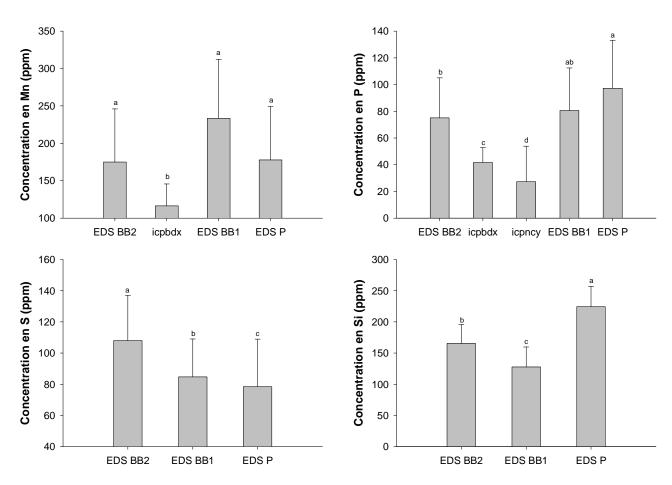


Tableau 5 : Coefficient de variation (CV) en % entre les différents points de mesures effectués sur un même échantillon. Ce CV est calculé sur 9 points en EDS BB1, 12 points en EDS BB2, 9 points en EDS P et 3 points en SXRF (paragraphes 2.2 et 2.3 de ce chapitre).

	Mg	Al	Si	P	S	Cl	K	Ca	Mn	Fe
EDS BB1	132	82	84	124	111	107	40	29	104	145
EDS P	104	18	54	116	126	104	37	19	109	113
EDS BB2	98	48	61	120	79	80	28	29	81	114
SXRF	-	-	-	-	-	_	29	28	31	71

Le chlore montre de plus fortes concentrations sur poudre que sur bois brut. Le potassium et le magnésium sont significativement plus faibles en ICP BDX, même par rapport à ICP NCY. Le potassium ne montre pas de différence significative de teneurs entre ICP NCY et EDS BB1 et EDS P. Les teneurs en magnésium sont identiques en EDS BB1, EDS BB2 et ICP NCY mais différentes des mesures par ICP BDX ou EDS P.

Le manganèse est très abondant en EDS BB1 comparé à l'ICP BDX. Le phosphore est faible en mesure ICP comparé aux valeurs obtenues par EDS. Pour le soufre et le silicium, de plus fortes valeurs sont obtenues en EDS BB2 et EDS P, respectivement.

En résumé:

Al: ICP << EDS BB < EDS P

Ca: ICP < EDS P < EDS BB

Fe: EDS BB << EDS P

K : ICP BDX < ICP NCY = EDS BB1 = EDS P

Mg: ICP BDX < ICP NCY = EDS BB <= EDS P

Mn: ICP BDX < EDS

P: ICP < EDS

De manière générale, les concentrations obtenues par EDS sont plus importantes que celles obtenues par ICP. Seul le potassium mesuré par EDS sur poudre ou bois brut peut être considéré comme potentiellement quantitatif lorsqu'on compare aux mesures par ICP. Les quantités de calcium sur bois brut sont très fortes comparées à celles obtenues par EDS sur poudre ou par ICP. L'aluminium est très abondant en EDS et le fer est très présent dans les poudres de bois. Il faut noter que pour la plupart des éléments (Ca, K, Mg, P) les concentrations moyennes obtenues par ICP dans deux laboratoires différents sont significativement différentes. Le sens de la différence est toujours le même (les mesures ICP NCY sont plus élevées que les mesures ICP BDX) et suggère donc une différence méthodologique et non due au choix des copeaux analysés dans chaque échantillon.

3.3. Répétabilité des mesures

Un sous-ensemble des échantillons mesurés par EDS et par SXRF ont été analysés deux fois afin d'estimer la répétabilité des mesures. En EDS, ces mesures répétées correspondent aux mesures effectuées sur les carottes de bois séchées à l'air (chapitre IV) notées « EDS 2 » dans

58

le tableau 4 avec au total 537 points de mesures répétés et aux mesures effectuées dans le chapitre V notées « EDS 1 » dans le tableau 4 avec un total de 960 points de mesure répétés. Pour SXRF, il s'agit des mesures répétées sur le bois de l'espèce tropicale de mangrove, *Rhizophora mucronata* (chapitre VI), avec seulement 12 points répétés pour l'ensemble des éléments.

Un modèle d'analyse de la variance des concentrations prenant en compte l'échantillon comme facteur explicatif unique (2 mesures par échantillons) a été estimé pour chaque élément. La répétabilité des mesures est donnée par l'erreur résiduelle de ce modèle, ou le coefficient de variation (CV) déduit de cette erreur (rapport de l'erreur résiduelle à la moyenne des mesures).

	Al	Ca	Cl	Cu	Fe	K	Mg	Mn	P	S	Si
SXRF	-	1	3	6	10	3	-	43	-	71	-
		(1.10^6)	$(1,5.10^5)$	(428)	(1860)	(3.10^5)		(976)		(9125)	
EDS 1	89	17	114	-	134	15	68	89	103	91	87
	(113)	(880)	(85)		(102)	(896)	(186)	(181)	(103)	(115)	(123)
EDS 2	32	30	99	-	106	70	-	104	188	94	87
	(407)	(736)	(182)		(194)	(502)		(194)	(107)	(155)	(225)

Tableau 4 : coefficient de variation (%) entre deux mesures répétées. La concentration moyenne de l'élément est indiquée entre parenthèse : en ppm pour EDS 1 et EDS 2 et en surface de pics pour SXRF.

Les éléments les plus abondants présentent les plus faibles coefficients de variation entre deux séries de mesures (Tableau 4). En SXRF, les mesures en Ca, K, Cl et Cu sont les plus répétables (CV<7 %), ce qui implique qu'une seule mesure suffit à estimer leur teneur dans le bois (Tableau 4). En EDS, les éléments les plus répétables sont Ca avec un CV égal à 17 et 30 % et K qui présente un CV de 15 % en EDS 1. Les autres éléments chimiques montrent de fortes variations (CV>30 %) : une mesure unique ne permet pas d'estimer les teneurs dans le bois.

Une mauvaise répétabilité en EDS peut être liée à la variation du volume de bois analysé entre les deux mesures. En effet, le volume de bois prospecté peut être variable par effet skirt et par la variation du parcours des électrons dans la matrice et ceci même entre deux mesures consécutives. Ainsi, les éléments présents de manière hétérogène ou ponctuelle dans le bois, plus précisément en marge du volume de mesure, peuvent être détectés lors d'une des deux mesures uniquement (celle de plus large volume). Les éléments présents en faible

concentration dans le bois sont sujets à d'importantes erreurs de mesures dues à l'appareil. En dessous de 100 ppm, on peut considérer, d'après le constructeur, que les erreurs associées à la mesure sont du même ordre de grandeur que la mesure elle-même (CV de 100 %); Ca et K ne sont pas concernés car ils présentent des teneurs moyennes supérieures à 100 ppm. La Figure 4 montre que les éléments abondants dans le bois sont, comme attendu, les plus répétables et que pour des éléments chimiques présents à des concentrations en dessous de 200 ppm, la répétabilité est faible (CV>70% dans la plupart des cas).

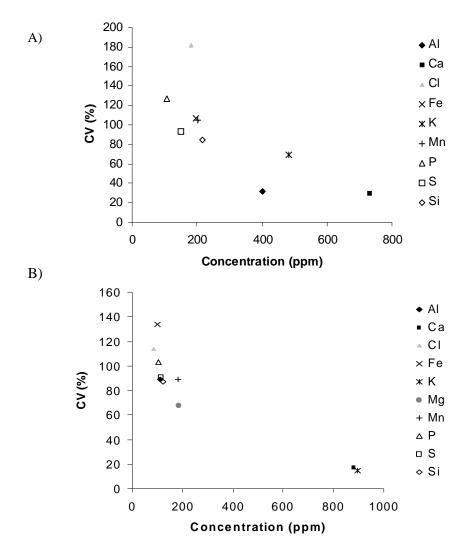


Figure 4 : Répétabilité des mesures en EDS (coefficient de variation entre deux mesures) en fonction de la concentration moyenne mesurée pour chaque élément. Les différents éléments chimiques sont identifiés. A) répétabilité dans l'échantillon EDS 2 ; B) répétabilité dans l'échantillon EDS 1.

60

4. Discussion et conclusion

De manière globale, les concentrations obtenues par ICP sont inférieures aux valeurs obtenues par EDS. Les éléments tels que P et Mn présents en faible teneur dans le bois (42 ppm et 107 ppm respectivement, valeurs médianes des mesures ICP BDX) sont significativement surestimés en EDS. Les concentrations obtenues par EDS sur des poudres sont identiques à celles obtenues par ICP pour Ca et K, présents tous deux à des concentrations élevées, de 555 ppm et 235 ppm respectivement (médianes des valeurs mesurées en ICP BDX). Les mesures par EDS peuvent être considérées comme quantitatives pour les deux éléments présentant des concentrations dans le bois supérieures à 200 ppm, le calcium mesuré dans des poudres de bois et le potassium mesuré dans des poudres ou dans du bois brut. En dessous de 100 ppm, les mesures par EDS sont en général soumises à une forte variabilité, souvent d'amplitude égale aux valeurs mesurées elles-mêmes ce qui pourrait en partie expliquer les divergences avec les mesures par ICP.

Les concentrations importantes en fer obtenues par EDS pour les poudres de bois sont très probablement liées à la préparation des échantillons lors de la mise en pastille. Malgré les précautions prises lors de la préparation des échantillons (nettoyage des ustensiles et de la surface de travail à l'éthanol), une contamination reste envisageable car la poudre de bois n'était pas complètement isolée de la pastilleuse.

Généralement, les concentrations en aluminium étaient plus importantes en EDS qu'en ICP. Cette surestimation n'est pas facilement attribuable à une cause particulière mais la chambre du microscope étant très riche en aluminium, on peut penser que l'aluminium mesuré est en partie lié à une contamination par la chambre.

Les valeurs obtenues à 25 kV sur bois brut (EDS BB2) montrent des concentrations en Al, Ca, K, Mg, Si et S supérieures (de manière significative ou non) aux valeurs obtenues par EDS BB1 à 20 kV, et qui s'écartent plus des valeurs mesurées en ICP. Ainsi une mesure à 25 kV pourrait avoir tendance à surestimer les concentrations des éléments contenus dans le bois.

De façon très caractéristique, les valeurs de calcium mesurées dans le bois brut par EDS ne sont pas significativement corrélées aux mesures par ICP, alors qu'elles le sont très significativement lorsqu'il s'agit de poudre de bois. La répartition du calcium au sein du bois est hétérogène. Il se présente souvent sous forme de cristaux d'oxalate de calcium. Une

mesure systématique ou préférentielle dans des zones riches en calcium conduit à une surestimation de la teneur en calcium de l'échantillon comparée à une mesure sur un broyat d'échantillon plus volumineux englobant des zones riches et pauvres en calcium. Inversement, la mesure systématique dans une zone pauvre en cristaux d'oxalate de calcium conduit à une sous estimation de la teneur réelle moyenne du bois. Cette répartition hétérogène pourrait donc expliquer pourquoi les mesures par EDS après un broyage du bois deviennent significativement corrélées à celles par ICP. Les mesures par SXRF sur bois brut sont corrélées significativement aux mesures par ICP contrairement aux mesures par EDS sur bois brut. Les rayons X incidents utilisés en SXRF sont plus pénétrants que les électrons incidents utilisés en EDS. Le volume de bois exploré par SXRF est donc probablement plus important que celui exploré en EDS et la mesure est ainsi plus intégratrice. Dans le cas d'une répartition hétérogène, la multiplication des zones de mesures en EDS devrait permettre de tamponner les variations entre zones enrichies et appauvries et de se rapprocher d'une valeur moyenne. Larsson et Helmisaari (1998) avaient déjà mis en évidence un tel phénomène sur du bois de pin sylvestre par EDXRF pour Fe et Cu et préconisaient la multiplication des zones d'études pour les éléments répartis de manière hétérogène au sein du cerne. Pour le potassium qui est réparti de manière homogène dans le bois, les corrélations entre ICP et EDS, que ce soit sur poudre ou bois brut, sont très significatives et la multiplicité des points de mesures en EDS n'est pas indispensable. Une cartographie préalable de la répartition des éléments minéraux au sein du bois devrait permettre d'améliorer la stratégie de mesure à adopter afin d'estimer leur concentration moyenne dans le bois en EDS.

Une autre part de la variabilité entre méthodes de mesure provient du fait que les fragments de bois analysés par les différentes méthodes, bien qu'issus du même échantillon, présentent des différences liées à la variabilité intra-échantillon (entre copeaux pour le bois brut, ou pastilles pour le bois broyé, entre points de mesures sur un même copeau ou une même pastille). L'étude des différences (CV %) entre points de mesure sur les copeaux ou pastilles d'un même échantillon (Tableau 5) permet de mettre en évidence une forte hétérogénéité pour certains éléments. Cette variabilité peut être une des causes des divergences observées entre méthodes de mesures notamment pour des éléments tels que Cl, Fe, P, Mn, Mg et S.

4. Analyse des taux de bouclage et effets du conditionnement des échantillons de bois sur les mesures par EDS

Les rayons X collectés par le détecteur EDS sont issus des réactions entre les atomes de l'échantillon et les électrons incidents. Suite aux modifications des signaux incidents et émergents évoquées dans le chapitre II (paragraphe 4.3.1), une partie des rayons X crées ne parvient pas au détecteur. Pour les rayons X collectés par le détecteur, une partie d'entre eux n'est pas représentative des atomes constitutifs de l'échantillon. En effet, lors de leur parcours vers le détecteur, les rayons X crées interagissent avec les atomes de l'échantillon; ces interactions conduisent à une modification de leur énergie initiale d'émission. Ces rayonnements X ne sont alors plus représentatifs des atomes dont ils sont issus. Ces perturbations du signal X émergent au cours de son parcours dans la matrice sont en partie estimées par le logiciel machine.

Le modèle de correction XPP utilisé par l'EDS de Nancy (Oxford Instruments EDS ATW) permet de déterminer les titres massiques des différents atomes présents dans l'échantillon en estimant l'intensité de leurs raies caractéristiques en référence aux intensités de ces mêmes raies obtenues pour des standards internes (chapitre II, paragraphes 4.2 et 4.3). Une liste des éléments chimiques présents dans l'échantillon est définie par l'utilisateur à partir de l'auto identification effectuée par le logiciel machine et à l'appréciation de l'utilisateur. La somme de ces titres massiques exprimés en % est le « taux de bouclage ». Ce taux de bouclage est en général différent de 100% car une partie des rayons X collectés n'est pas identifiée :

- ces rayons X non identifiés par le détecteur peuvent correspondre à des éléments chimiques présents dans l'échantillon mais non spécifiés dans la liste prédéfinie par l'utilisateur en amont des analyses. Il s'agit le plus souvent d'éléments présents de manière très ponctuelle ;
- ils peuvent également être non spécifiques en raison des nombreuses interactions évoquées ci-avant. Leur énergie d'émission initiale ayant été modifiée lors du parcours dans la matrice de l'échantillon ;
- les interactions élastiques entre les électrons et le noyau des atomes constitutifs de l'échantillon conduisent à l'émission de rayons X non caractéristiques responsables du fond continu (chapitre II, paragraphe 3.1.1). Le logiciel machine modélise ce fond continu et dans le cas de matrices complexes comme le bois, le modèle pourrait le surestimer. Les rapports pics (intensité des raies) sur fond continu seraient alors diminués ainsi que les titres massiques qui en découlent : le taux de bouclage serait alors amoindri.

Dans la première partie de ce chapitre, nous analysons les valeurs et la répartition des différents taux de bouclages obtenus au cours de trois séries de mesures.

Des mouvements d'éléments chimiques entre cellules ou cernes du bois ont été mis en évidence (chapitre I, paragraphe 4.3). Ces mouvements sont principalement liés à la physiologie propre de l'arbre et à l'efficience d'utilisation des éléments minéraux essentiels à la plante. Ces transferts internes se font entre cellules proches dans le cas de tissus vivants et par les rayons ligneux. Ces mouvements concernent essentiellement les éléments qui sont faiblement liés aux parois. La fixation des cations dans le bois est liée à la présence de substances pectiques qui présentent des groupements carboxyles chargés négativement et qui attirent les cations (chapitre I, paragraphe 3.3). Divers travaux ont déterminé la part des cations qui était faiblement liée ou fortement liée à ces parois. Ainsi, de simples lavages à l'eau permettent de récupérer la fraction très labile et les cations extraits peuvent être dosés (Momoshima et al, 1995; Herbauts et al, 2002). Pour la fraction des cations qui est plus fortement liée aux parois et selon le protocole de Momoshima et al (1995), la poudre de bois est placée dans une solution concentrée d'acide chlorhydrique afin d'extraire l'ensemble des cations fixés et de les remplacer par des ions H⁺. Les ions H⁺ qui se sont fixés sur les parois sont ensuite remplacés par des ions Ca²⁺ en plaçant la poudre de bois dans une solution de CaCl₂. Les ions H⁺ expulsés sont alors dosés par une solution de NaOH à pH 6; ils correspondent aux ions Ca²⁺ qui se sont fixés. La capacité de fixation des cations dans les tissus du xylème est alors calculée (CBC=cation binding capacity). Cette CBC dépend des conditions de pH de la sève car elle va jouer sur les caractéristiques chimiques des groupements carboxyles de la paroi (Momoshima et al, 1995). Les changements de la composition chimique de la sève (ou d'une solution dans laquelle est plongée le bois) conduisent à un nouvel équilibre entre les cations fixés au sein des parois et les cations de la solution. L'équilibre de Donnan est défini comme une distribution entre 2 solutions ioniques séparées par une membrane semi-perméable ou une barrière. Cette barrière conduit à une distribution inégale des concentrations en solutés ioniques car elle est sélective. La répartition des cations de diverses valences est déterminée par les différences de charges entre la paroi et la solution extérieure (Momoshima et Bondietti, 1990). Ces mêmes auteurs ont ainsi estimé l'influence des changements de la concentration en K⁺ et Ca²⁺ de la sève sur le stockage de ces cations dans bois. Ils sont ainsi mis en évidence que 1) Ca²⁺ s'accumule préférentiellement sur les parois des tissus du xylème comparé à K⁺; 2) une augmentation de pH de la sève conduit à une augmentation de la fixation de Ca^{2+} et K^+ dans la paroi; 3) les changements du ratio Ca^{2+} / K^+ dans la sève affectent le ratio dans le bois ; suggérant ainsi que la fixation des cations dans le bois suit un équilibre de Donnan.

Plus récemment, Herbauts et al (2002) ont mis en évidence qu'au moins 75% du K était présent sous forme hydrosoluble chez *Fagus sylvatica* et *Quercus robur*. Les mêmes auteurs ont montré qu'au moins 80% du Mg fixé dans les parois du bois et 30-60% du Ca respectivement pour *Fagus sylvatica* et *Quercus robur* ne sont pas facilement extractibles par une solution de SrCl₂; Mg et Ca peuvent ainsi être considérés comme peu mobiles pour ces espèces.

Les éléments chimiques potentiellement mobiles doivent être très sensibles aux gradients de concentrations et d'humidité au sein de l'arbre. Ainsi, on comprend qu'il soit nécessaire d'estimer les possibles biais que peuvent entraîner les étapes de conservation et de retrait de l'eau des échantillons avant l'analyse chimique sur la répartition des éléments le long de la carotte de bois.

Dans la deuxième partie de ce chapitre, nous avons comparé les effets sur nos mesures par EDS de trois modalités de conservations des échantillons de bois : 1) la conservation à l'air libre suite au carottage, qui conduit à un séchage long accompagné de gradients d'humidité au sein de l'échantillon ; 2) la conservation des carottes de bois à l'état congelé juste après le prélèvement qui devrait permettre de figer les éléments contenus dans le bois. Les échantillons sont alors directement placés dans un cryoconservateur d'azote liquide après prélèvement sur le terrain puis conservés dans un congélateur à -80°C au laboratoire. Ce conditionnement nécessite de veiller à ce que les carottes ne décongèlent pas au cours de l'analyse chimique afin de limiter les possibles transferts internes liés aux gradients de décongélation. L'analyse doit donc se faire à froid ; 3) la lyophilisation qui implique que les échantillons soient congelés suite au prélèvement puis lyophilisés. La lyophilisation permet de déshydrater les échantillons et d'assurer un état stable d'hydratation à la fin du conditionnement. Le passage direct de l'eau de l'état de glace à l'état de vapeur devrait limiter les transferts internes d'éléments.

Nous avons étudié l'impact de ces 3 modalités de conditionnement (séchage à l'air, lyophilisation et congélation) sur la variabilité des concentrations mesurées dans le bois (concentrations moyennes, différences entre périodes et différences entre sites).

Pour ce faire, un ensemble de 10 arbres a été sélectionné et 3 carottes par arbre, chacune conditionnée selon une des 3 méthodes précédentes, ont été analysées.

1. Analyse des taux de bouclage obtenus lors de 3 séries d'analyses chimiques

La définition des conditions opératoires idéales à l'analyse de notre échantillon de bois repose sur plusieurs paramètres :

- l'intensité de sonde (en nA ou pA) qui correspond au diamètre du faisceau électronique. Elle doit permettre une bonne statistique de comptage (impulsions dans le détecteur) en respectant un temps d'acquisition (temps de mesure dans une zone donnée de l'échantillon) raisonnable et en évitant de saturer le détecteur. Cette saturation du détecteur est liée au fait que plus le flux incident d'électrons est important plus les rayons X engendrés sont nombreux et le détecteur nécessite un temps d'analyse du signal plus long. Ainsi, le logiciel ajoute au temps d'acquisition prédéfini un temps supplémentaire nécessaire à l'acquisition de l'ensemble des rayons X crées ; on parle de temps mort pour évoquer ce temps additionnel ;
- la tension d'accélération (en kV) qui permet de définir l'accélération des électrons. Plus cette tension sera élevée plus le faisceau sera fin, convergent et pénétrant. La tension d'accélération doit être au moins deux fois et demi supérieure à l'énergie d'ionisation de la raie la plus énergétique analysée. Par exemple, pour Mn, l'énergie d'ionisation de la raie Kα est de 5,89 kV et la tension d'accélération nécessaire à son excitation doit être d'au moins 14,7 kV. Cette tension doit donc être choisie en fonction des éléments chimiques présents dans l'échantillon. Elle aura une influence directe sur la profondeur de pénétration des électrons et ainsi sur la résolution spatiale de l'analyse;
- les conditions de vide permettent de définir les conditions de pression dans la chambre de mesure. Un vide poussé permet de centraliser le faisceau incident d'électrons et ainsi de limiter l'effet skirt en mode pression variable. Néanmoins, il peut conduire à un effet de charge c'est à dire à l'accumulation d'électrons à la surface de l'échantillon. Cette accumulation entraîne une perte de signal. Ainsi les conditions de vide doivent être réglées en tenant compte du compromis entre effet skirt et effet de charge ;
- le temps d'acquisition correspond au temps durant lequel le faisceau incident d'électrons va balayer la zone de mesure définie. Ce temps doit être choisi de manière à permettre 1) la détection de l'ensemble des éléments chimiques présents dans l'échantillon. Les éléments lourds nécessitant un temps plus long pour l'émission de rayons X caractéristiques ; 2) la détection d'éléments présents en faible concentration. Les différents balayages de la zone doivent permettre de conclure de manière fiable quant à la présence et à l'abondance des différents éléments chimiques ;

- la distance entre la source émettrice (colonne du microscope) et l'échantillon doit permettre d'optimiser le point d'impact du faisceau au centre de la surface de mesure prédéfinie ; cette distance est fixée par le constructeur à 15 mm. Il est également nécessaire que la surface de l'échantillon excitée par le faisceau incident soit toujours à la même distance physique du détecteur. Les aspérités de surface de l'échantillon étant très variables entre les zones du bois, ce réglage doit se faire via la mise au point de l'image de chaque zone de mesure. En effet, malgré le planage, la surface de l'échantillon présente des aspérités qui modifient cette distance. Il est donc important de faire la mise au point pour chaque point de mesure et d'enregistrer ses coordonnées en x, y et z.

Afin de vérifier si le réglage des paramètres précédemment cités est optimal pour nos analyses, nous nous sommes basés sur une mesure sur une pastille de cobalt pur (chapitre II, paragraphe 4.3.1) et une mesure dans une zone aléatoire de l'échantillon. La pastille de cobalt devait permettre de vérifier si les conditions choisies permettaient d'obtenir des taux de bouclage proches de 100%; dans notre cas, un nombre d'impulsions dans le détecteur EDS (rayonnements X caractéristiques du cobalt) de 5000 impulsions par seconde, ainsi qu'un temps mort de 40-50% permettaient de vérifier ce critère. L'essai sur une zone de l'échantillon avec le même réglage permettait d'obtenir au mieux des taux de bouclages autour de 70-80%, avec 2000-3000 impulsions au niveau du détecteur par seconde (toutes raies énergétiques confondues) avec un temps mort de 15-20%. Les taux de bouclage de 100% étaient très rarement mesurables. Ces essais permettent également de vérifier si le filament de tungstène émetteur d'électrons est correctement aligné face à la colonne.

Au final, ces réglages et essais visent à veiller à ce que les conditions opératoires de départ soient strictement identiques et qu'ainsi le faisceau incident génère a priori la même réponse de la part de l'échantillon.

Enfin, l'acquisition d'un spectre de référence (sur une pastille de cobalt dans notre cas) valide est nécessaire avant chaque analyse chimique pour débuter l'analyse de l'échantillon ; elle correspond à un calibrage (chapitre II, paragraphe 4.3.1).

Pour les 3 séries de mesures analysées dans cette partie, les taux de bouclage moyens obtenus restent proches de 70 % et l'étendue des valeurs est large (Tableau 1). Comme la surface de l'échantillon peut être hétérogène le long de la carotte, l'essai initial dans une zone non représentative de la surface globale de l'échantillon peut conduire à un réglage non optimal

pour d'autres points de mesure. Pour les 3 cas présentés, plus de la moitié des taux de bouclages sont compris entre 63-80% et moins de 0,5% sont inférieurs à 40% (Tableau 1, Figure 1). En considérant les spectres dans le détail, les points de mesures présentant des faibles taux de bouclages (inférieurs à 40%) étaient associés à une mauvaise qualité de l'image de l'échantillon (image floue) : une image de la surface de l'échantillon analysée était systématiquement enregistrée avant chaque analyse chimique.

Pour ces points, les faibles taux de bouclages mesurés peuvent être causés par 1) un effet skirt (élargissement de la zone de mesure prédéfinie en dehors de l'échantillon) en raison d'une variation aléatoire des conditions opératoires liées aux conditions de vide ; 2) un mauvais positionnement de l'échantillon sous le faisceau incident ; 3) l'existence de conditions particulières de surface de l'échantillon (débris ...). Pour les 2 premières causes évoquées, une partie des rayonnements X collectés n'est alors plus spécifique de l'échantillon de bois mais provient des éléments chimiques composant les divers supports de la chambre de mesure (éléments non spécifiés pour certains dans la liste prédéfinie par l'utilisateur).

La répétition des mesures effectuées pour ces points, en conservant les mêmes coordonnées de positionnement, montre les mêmes tendances. Il est ainsi peu probable que les conditions opératoires aient fluctué dans ces mêmes zones lors de 2 séries de mesures distinctes. Pour une partie de ces points, un pic important d'aluminium, caractéristique de la platine de support, était obtenu suggérant que le positionnement de l'échantillon devait être responsable des faibles taux de bouclages. Enfin, dans les autres cas, l'image de la surface de l'échantillon montrait des aspérités de surfaces qui, pour les 2 répétitions, ont dû fortement perturber les différents signaux.

Il faut préciser que l'obtention d'images floues peut être également liée à des variations d'intensités du faisceau incident d'électrons qui jouent sur la brillance de l'image. Ces fluctuations conduisent à des variations des rayons X caractéristiques engendrés et donc du taux de bouclage. Elles sont estimées via le passage entre chaque échantillon de la même pastille de cobalt utilisée comme spectre de référence. Le nombre d'impulsions dans le détecteur pour la pastille de cobalt (nombre de rayons X caractéristiques de Co ayant impacté le détecteur) avant et après chacun des points de mesure sur notre échantillon est considéré afin de corriger la part des variations de concentrations qui peut être liée à des variations du flux incident d'électrons. Le rapport final crée par le logiciel machine permet de quantifier ces variations d'impulsions sur le cobalt. Ainsi après vérification de ces rapports, il apparaît que les variations d'intensité du faisceau existent et peuvent être importantes. Néanmoins, les corrections apportées par le logiciel sont adéquates; c'est à dire qu'une augmentation du flux

incident d'électrons se traduisant par une plus grande quantité de rayons X émergents conduit le logiciel à diminuer proportionnellement les concentrations obtenues pour l'échantillon et inversement.

Pour conclure, il existe de fortes variations entre points analysés dans les taux de bouclage des mesures. Les taux de bouclages de 100% sont rares et dans la majorité des cas, des valeurs autour de 70% étaient obtenues. Les causes possibles à l'obtention de faibles taux de bouclage peuvent être diverses :

- certains éléments chimiques peuvent avoir été omis dans la liste prédéfinie par l'utilisateur. Néanmoins, en aucun cas, cet élément manquant ne pourrait représenter les 30% restants dans le cas d'un échantillon de bois (il est inconcevable par exemple de trouver 30% de Ti dans du bois) :
- la particularité du bois est sa forte hétérogénéité aussi bien au niveau de la diversité des éléments chimiques qui le constituent qu'au niveau des importants écarts de concentrations entre éléments; et notamment la présence d'éléments en faible concentration (Chapitre I, paragraphe 2.1). Notre réglage des conditions opératoires visait à optimiser la mesure des cations mineurs tels que Ca, K et Mn et en aucun cas des cations majeurs tels que C et O. Ces deux éléments étaient ajoutés à la liste des éléments possibles mais dans nos conditions, ils sont très mal estimés. Ces contrastes de concentrations et ce réglage non approprié aux éléments majeurs du bois doivent probablement contribuer aux problèmes de taux de bouclage obtenus;
- la géométrie de la surface de l'échantillon (bosses, creux, débris, aspérités, inclinaison de l'échantillon ...) doit avoir un effet sur la perte, la dispersion du signal. Ces effets sont encore inconnus dans le cas de matrices complexes comme le bois. Dans notre cas, nous avons déjà observé une amélioration de la qualité de la mesure chimique liée à l'état de surface de l'échantillon suite aux changements de mode de planage (cutter, rabot bois, fendage à la lame de rasoir) au cours de la thèse ;
- les biais analytiques propres au système EDS utilisé et liés aux problèmes du maintien du vide dans la chambre en mode pression variable. Ces biais peuvent être contournés en travaillant en haut vide et non en vide partiel après métallisation de l'échantillon au carbone. Néanmoins cette démarche nécessite une phase supplémentaire de conditionnement de l'échantillon.

Nous préconisons en tous cas d'écarter les mesures présentant des taux de bouclages inférieurs à 40%. Pour le reste des mesures, il nous semble préférable de n'en conserver

qu'une partie (95%, voire 98%) en éliminant les valeurs extrêmes les plus basses et les plus fortes dans le cas ou l'amplitude des taux de bouclage est large. Lors du réglage de l'appareil de mesure en amont des analyses, un plus grand nombre d'essais sur l'échantillon doit être réalisé afin de couvrir divers états de surface et ainsi d'optimiser les conditions opératoires. L'idéal serait d'envisager des réglages différentiels selon les zones du bois (bois de cœur et aubier par exemple).

- 2. Effets du conditionnement des échantillons de bois sur les mesures chimiques
- 2.1. Matériel et méthodes

2.1.1. Site de prélèvement

Les prélèvements de bois ont été effectués en juillet 2003 sur des pins sylvestres de la forêt domaniale de St Avold (Nord-Est de la France). Ce massif avait déjà fait l'objet d'une étude sur les variations de la croissance radiale du pin sylvestre au cours du XX^e siècle. Dans cet objectif, un réseau de placettes y a été mis en place entre juin 1999 et janvier 2000 (Peiffer et Dupouey, 2000). La forêt domaniale de St Avold occupe la plaine de Creutzwald et couvre une superficie de l'ordre de 2740 ha, sur des substrats essentiellement sableux et acides. Nous avons sélectionné deux placettes, parmi les 58 de ce réseau, présentant des pins sylvestres avec peu de cernes manquants et des pH assez contrastés (placettes 18 et 5 de pH 3,8 et 3,35 respectivement), de façon à augmenter les différences potentielles de contenu chimique du bois entre placettes. Le pin sylvestre était l'essence principale de l'étage dominant. Dans chacune des deux placettes, les cinq plus gros pins sylvestres en diamètre dans une placette de 6 ares ont été échantillonnés.

2.1.2. Prélèvement des carottes de bois

Les cinq pins sylvestres ont été carottés à cœur à la tarière de Pressler (avec un carotteur à moteur thermique) à 1,30 m. Les tarières ont été nettoyées à l'éthanol avant chaque prélèvement pour éliminer les résidus de résines. Pour chaque arbre, trois carottes ont été prélevées dans une zone triangulaire de 10 cm de côté de manière à limiter au maximum les effets liés à la variabilité intra-arbre. Après le prélèvement, deux carottes ont été immédiatement placées dans un cryoconservateur et la troisième carotte a été conservée à air ambiant.

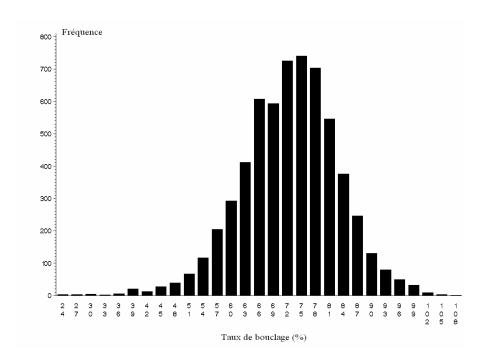


Figure 1 : Diagramme de la répartition (fréquence) des taux de bouclages pour la série de mesure du chapitre V (5760 mesures : 12 placettes x 4 arbres x 2 périodes x 10 années x 3 zones x 2 répétitions).

série	moyenne	min	max	médiane	Q1	Q3	mesures	% (<40%)
chapitre IV	70,42	22,14	118,06	70,07	62,62	78,17	1620	0,5
chapitre V	73,2	27,9	108,25	73,47	66,77	79,6	5760	0,5
chapitre III	69,3	46,88	92,99	69,49	63,16	74,88	270	0

Tableau 1: Taux de bouclage obtenus lors de 3 séries de mesures (chapitres IV, V et III respectivement). Les valeurs obtenues pour la série du chapitre IV correspondent à l'ensemble des valeurs obtenues pour les 3 modalités de conditionnement (2 placettes x 5 arbres x 3 périodes x 6 années x 3 zones x 3 modalités). La série du chapitre V correspond aux valeurs obtenues pour les 12 placettes x 4 arbres x 2 périodes x 10 années x 3 zones x 2 répétitions. Les valeurs de la série du chapitre III correspondent aux 30 échantillons de bois brut mesurées (EDS BB1) soit 30 échantillons x 3 copeaux x 3 zones. Moyennes des taux de bouclage, valeurs minimum et maximum, valeur médiane, quartiles inférieur et supérieur et % des valeurs dont le taux de bouclage est inférieur à 40%.

2.1.3. Conditionnement des carottes de bois

Les carottes une fois prélevées ont été conditionnées selon trois modalités différentes pour chaque arbre :

- la carotte qui avait été placée à air ambiant a été conservée à air ambiant au laboratoire jusqu'à l'analyse chimique ;
- une des deux carottes placées dans le cryoconservateur a été conservée au congélateur à 80°C puis lyophilisée avant l'analyse chimique;
- la dernière carotte a été conservée au congélateur (-80°C) puis analysée chimiquement par EDS en la maintenant congelée à l'aide d'une platine Peltier (-40°C).

Dans chaque carotte, trois séries de 6 cernes successifs (ou périodes) ont été découpées :

- une série dans l'aubier (1995-2000)
- une série dans le bois de cœur (1910-1915)
- une série dans une zone de transition (dont les années sont variables selon les arbres, voir tableaux ci-dessous). La limite entre le bois de cœur (plus foncé) et l'aubier (plus clair) a été fixée visuellement et la série a été prélevée à cheval sur cette limite.

Nous avons donc analysé au total 2 placettes x 5 arbres x 3 périodes x 6 cernes x 3 modalités, soit 540 cernes. La datation exacte de chaque cerne a été faite en se basant sur les courbes de croissance radiale de l'étude dendrochronologique de Peiffer et Dupouey (2000).

placette/arbre	18/1	18/3	18/4	18/5	18/7
âge en 2000	119	123	123	119	114
cerne de cœur le plus externe	1928	1930	1925	1938	1922
zone de transition	1926-31	1928-33	1923-28	1936-41	1920-25
placette/arbre	5/1	5/2	5/3	5/4	5/5
âge en 2000	116	116	125	116	126
cerne de cœur le plus externe	1948	1927	1938	1933	1931
zone de transition	1946-51	1925-30	1936-41	1931-36	1929-33

2.1.3.1. Séchage à l'air

Le repérage des différentes années a été effectué sur les carottes séchées à l'air. Les carottes ont été planées à l'aide d'un cutter et après nettoyage à l'éthanol de manière à bien différencier les cernes annuels dans le plan perpendiculaire au fil du bois (coupe transversale, plan radial-tangentiel). Puis les carottes sèches ont été planées une deuxième fois à l'aide d'un rabot à bois, cette fois dans le sens du fil du bois, dans un plan longitudinal-radial. En effet, l'analyse chimique se fait en présentant ce plan longitudinal-radial perpendiculairement au faisceau incident. Cette orientation de l'échantillon permet de présenter au faisceau électronique incident les parois des cellules et non leur lumen. Or, dans ce plan, les limites entre cernes ne sont pas visibles sur l'image obtenue en microscopie électronique. Nous avons donc marqué au préalable chaque limite de cerne dans ce plan par de petits trous, en se basant sur les limites de cernes observées sur le plan radial-tangentiel. Pour chaque cerne, un trou a été fait au début du bois de printemps et un second à la transition bois été/printemps.

2.1.3.2. Congélation

Pour les carottes congelées, le repérage des limites entre cernes s'est fait dans un réfrigérant à -35°C, par analogie avec des photographies des carottes séchées à l'air et par comparaison visuelle avec les périodes prédécoupées des carottes sèches.

Les 3 périodes ont été isolées et planées dans le sens du fil du bois (plan longitudinal-radial) par fendage à l'aide d'une lame de rasoir. Le repérage des années, la découpe des périodes et le planage ont été réalisés après nettoyage des ustensiles et des surfaces de travail à l'éthanol, l'ensemble de ces étapes se faisant toujours dans le réfrigérant à -35°C afin de limiter au maximum la décongélation de l'échantillon. Une fois les périodes découpées et les années repérées, les blocs de cernes à analyser ont été replacés au congélateur à -80°C puis positionnés encore congelés sous le faisceau d'électrons. Afin de conserver l'état de congélation, les échantillons étaient placés sur une platine Peltier qui permet de maintenir l'échantillon à -45°C durant l'analyse chimique. Les échantillons sont introduits sur le portoir refroidi et y sont fixés par un gel spécifique polymérisant à froid (tissue tek).

2.1.3.3. Lyophilisation

La lyophilisation, ou séchage à froid, est un procédé qui permet de retirer l'eau contenue dans un échantillon afin de le rendre stable à température ambiante et ainsi de faciliter sa conservation. Elle utilise le principe physique de la sublimation. La sublimation est le passage d'un élément de l'état solide à l'état gazeux directement sans passer par l'état liquide. Les carottes ont été conservées à -80°C avant d'être lyophilisées. Le repérage des années et la découpe des périodes ont été réalisés comme pour les carottes congelées. Puis les trois blocs de cernes individualisés ont été replacés au congélateur à -80°C. Ces trois périodes prédécoupées dans chaque arbre ont ensuite été placées dans le lyophilisateur à -20°C sous vide primaire pendant 2 jours puis à -10°C pendant trois jours et enfin le cinquième jour, la température a été remontée à +20°C afin que les échantillons conservent leur état d'hydratation une fois replacés à air ambiant. Suite à la lyophilisation, les échantillons ont été fendus avec une lame de rasoir dans le sens du fil du bois. Les années ont été repérées sur le plan longitudinal-radial par des petits trous comme pour les carottes de la modalité « séché à l'air ». Les échantillons ont ensuite été conservés dans des piluliers placés dans un dessiccateur jusqu'à leur analyse chimique.

2.1.4. Analyse chimique par EDS

L'analyse des composés chimiques du bois a été effectuée en mode pression variable (VP) à 34 Pa avec un faisceau incident d'électrons de 15 kV (entre 2000/2500 coups sur l'échantillon et 15-20 % de temps mort). Chaque point de mesure correspond à un grandissement de 200 x soit une surface de 1800 x 1200 µm analysée durant 100 secondes. 3 points de mesures adjacents ont été effectués par année de croissance. Ce sont donc 2 placettes x 5 arbres x 3 périodes x 6 années x 3 modalités de préparation x 3 points, soit 1620 points de mesures au total qui ont été réalisés. Les échantillons lyophilisés et séchés à l'air étaient placés directement sur un portoir et fixés sur un scotch adhésif double face en vue de l'analyse chimique.

2.1.5 Analyse statistique

Les 3 points de mesures effectués pour une combinaison (placette x arbre x année) donnée ont été moyennés afin d'obtenir une mesure chimique par année. Les différences entre modalités

que ce soit au niveau des effets placettes ou des effets période ont été testées par analyse de la variance (ANOVA, SAS version 8.0).

2.2. Résultats

2.2.1. Taux de bouclage des mesures chimiques

Les points de mesure présentant des taux de bouclages inférieurs à 60% ont été écartés de l'analyse (soit 17% des mesures, avec 82% des valeurs inférieures à 60% comprises entre 51 et 59% de taux de bouclage); certaines combinaisons (placette x arbre x année) ont alors été supprimées car les 3 points de mesures effectués dans une année donnée bouclaient à moins de 60%. Au final, 84% des combinaisons initiales ont été analysées pour l'ensemble des 3 modalités de préparation ; soit 152 mesures au lieu de 180 (6 années x 3 périodes x 5 arbres x 2 placettes).

La moyenne des taux de bouclage (Tableau 2) n'est pas significativement différente entre les 3 modalités de préparation des échantillons (analyse de la variance ANOVA, avec la modalité comme seul facteur explicatif des taux de bouclage). Cependant, la modalité « séché à l'air » montre une plus large gamme de variation de taux de bouclages comparée aux deux autres modalités (écart type de 10,3 en « séché à l'air » comparé à 6,7 et 7,2 respectivement pour les modalités « congelé » et « lyophilisé », Tableau 2).

2.2.2. Comparaison des concentrations moyennes mesurées par les 3 modalités de préparation

Les éléments chimiques les plus abondants dans le bois de pin sylvestre par EDS sont le calcium puis le potassium quelle que soit la modalité de mesure (Tableau 3). Le phosphore présente de faibles concentrations, surtout pour la modalité « séché à l'air » (85 ppm). Le coefficient de variation entre les mesures effectuées sur un jeu commun de cernes montre des variations nettes selon la modalité de préparation de la carotte (Tableau 3). Il est le plus élevé pour les carottes lyophilisées, le plus faible pour les carottes séchées à l'air et intermédiaire pour les carottes congelées. On retrouve la relation attendue entre le coefficient de variation entre les mesures et les concentrations moyennes (Figure 2), mais ce n'est pas elle qui explique la fait que la modalité « lyophilisé » donne des valeurs plus variables entre cernes que la modalité « séché à l'air ».

Les différences de concentrations obtenues entre les 3 modalités sont faibles mais

significatives pour le calcium (r²=2,9% **), le chlore (r²=3,4% ***), le potassium (r²=3,4% ***) et le silicium (r²=2,1% **) (Figure 3) et non significatives pour le manganèse (Analyse de la variance, ANOVA, avec la modalité comme seul facteur explicatif des variations de concentrations). Les corrélations de Pearson entre modalités de mesures peuvent être significatives pour des éléments tels que le calcium et le potassium qui présentent des différences significatives de concentrations moyennes entre les modalités (Tableau 4). La corrélation entre modalités de préparation des échantillons est significative au seuil de P<0,001 pour les éléments majeurs comme le calcium et le potassium. Elle reste significative mais moindre pour le phosphore et le soufre et disparaît pour le chlore et le manganèse. Pour le silicium, la corrélation est non significative sauf entre les modalités « congelé » et « séché à l'air » où la relation devient significative mais négative.

modalité	nombre mesures	moyenne (%)	Ecart type	minimum	maximum
congelée	152	72	6.7	60.9	90.5
lyophilisée	152	74	7.2	60.5	97.6
air	152	74	10.3	60.1	115

Tableau 2 : Taux de bouclage des mesures chimiques par EDS selon la modalité de préparation des carottes. Les différents paramètres (moyenne, écart-type, minimum et maximum) sont calculés à partir des valeurs obtenues pour 152 cernes communs aux 3 modalités de préparation. Toutes les valeurs sont exprimées en %.

modalité	Ca	Cl	K	Mn	P	S	Si
congelée	690 (40)	105 (95)	350 (64)	160 (90)	100 (92)	120 (85)	160 (58)
lyophilisée	810 (51)	120 (99)	390 (66)	190 (89)	110 (98)	120 (88)	170 (69)
Air	690 (35)	160 (96)	460 (58)	150 (88)	85 (93)	130 (85)	200 (52)

Figure 3 : Moyenne des concentrations (ppm) mesurées pour chaque modalité de préparation des carottes sur l'ensemble des années, des arbres et des placettes communes (152 cernes analysés). Entre parenthèses : coefficient de variation en %.

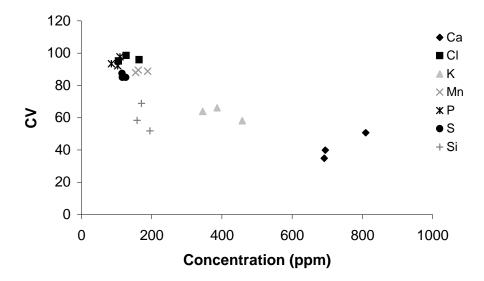


Figure 2 : Coefficient de variation (CV) entre les concentrations mesurées dans l'ensemble des 152 cernes communs en fonction de la concentration moyenne mesurée pour chaque modalité.

	Ca	Cl	K	Mn	P	S	Si
congelé*lyophilisé	0.37 ***	ns	0.31 ***	ns	0.27 ***	0.18 *	ns
lyophilisé*air	0.45 ***	ns	0.45 ***	ns	0.16 (*)	0.30 ***	ns
congelé*air	0.53 ***	ns	0.41 ***	ns	0.17 *	0.21**	-0.20 **

Tableau 4 : Coefficient de corrélation de Pearson entre les différentes modalités de mesures à partir des 152 valeurs communes. Seuil de significativité : ***, P<0,001; **, P<0,02; *, P<0,05; (*), P<0,06; ns, non significatif.

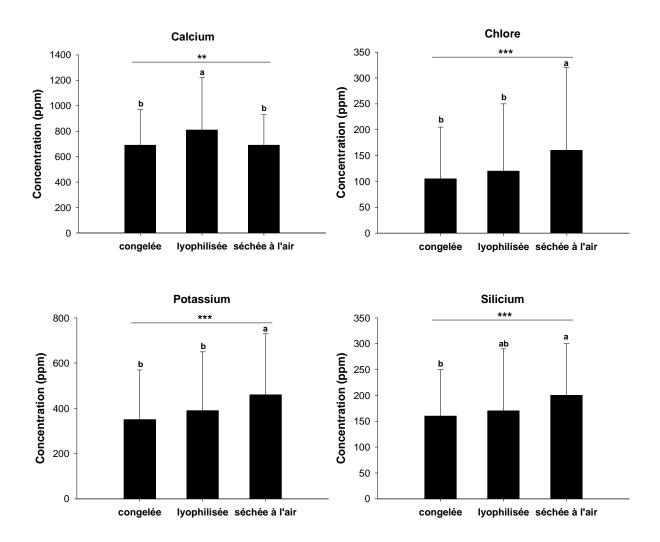


Figure 3 : Concentrations moyennes en calcium, chlore, potassium et silicium selon la modalité de conditionnement des carottes. La significativité des différences entre méthodes est spécifiée (seuil de significativité : ***, P<0,001; **, P<0,02; *, P<0,05; ns, non significatif). Deux méthodes significativement différentes (test de comparaison multiple des moyennes de Tukey) sont identifiées par des lettres différentes.

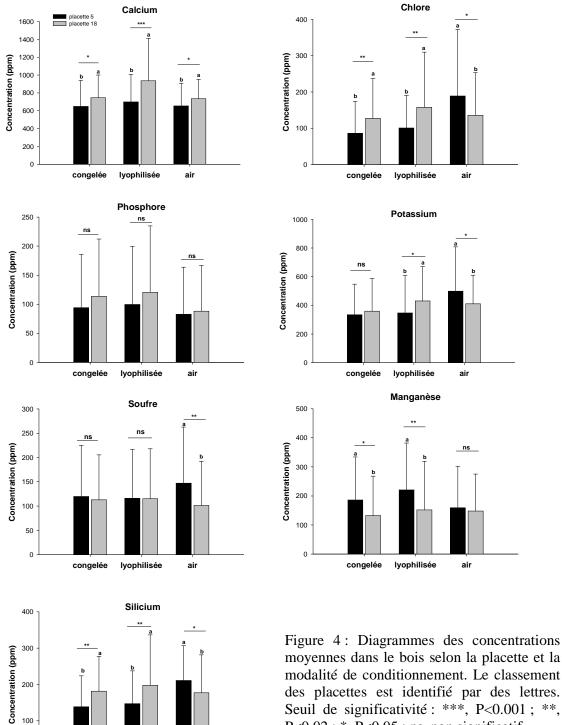
2.2.3. Mise en évidence de différences intra- et inter-échantillons

2.2.3.1. Différences entre placettes (Figure 4)

Des différences significatives de concentrations en calcium, chlore et silicium apparaissent entre les deux placettes échantillonnées. La placette 18 présente des teneurs significativement plus élevées en calcium que la placette 5 quel que soit le conditionnement de la carotte de bois. Cette différence est cohérente avec le fait que la placette 18 a un pH du sol plus élevé que la placette 5. L'amplitude de cette différence est plus faible pour les modalités « séché à l'air » et « congelé ». Pour le chlore, le silicium et, dans une moindre mesure, le potassium, les différences entre placettes sont significatives mais montrent des tendances inverses selon la modalité avec, à chaque fois, une tendance opposée de la modalité « séché à l'air » par rapport aux deux autres modalités. Pour le manganèse, seule la modalité « séché à l'air » ne montre pas de différence de concentration entre les 2 placettes. Le soufre diffère selon la placette uniquement en modalité « séché à l'air ».

2.2.3.2. Différences entre périodes (Figure 5)

Des différences de concentrations entre les périodes existent et dépendent des éléments chimiques. L'aubier (années 1995-2000) est plus riche en soufre, phosphore et potassium et plus pauvre en calcium et manganèse que les cernes formés plus anciennement (zone de transition et/ou zone de cœur) quelle que soit la modalité. Pour le manganèse, cette différence entre périodes n'est pas significative dans la modalité « lyophilisé ». Pour le chlore, des différences significatives entre périodes sont mises en évidence uniquement dans la modalité « congelé » mais cet effet est faible comparé aux précédents. Aucune différence entre périodes n'a été observée pour le silicium. Le calcium apparaît comme l'élément chimique le plus contrasté entre périodes.



modalité de conditionnement. Le classement des placettes est identifié par des lettres. Seuil de significativité: ***, P<0.001; **, P<0.02; *, P<0.05; ns, non significatif

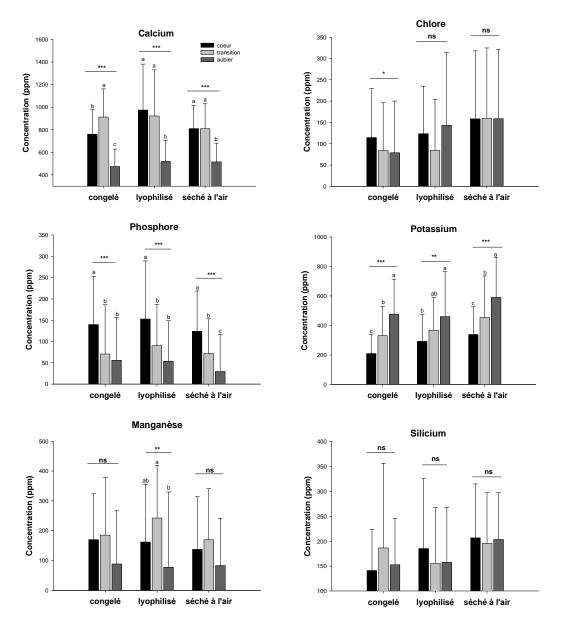
100

0

lyophilisée

air

congelée



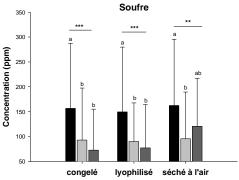


Figure 5: Diagrammes des concentrations moyennes dans le bois selon la zone (aubier, cœur et transition) et la modalité de conditionnement. Le classement des périodes est identifié par des lettres. Seuil de significativité: ***, P<0,001; **, P<0,02; *, P<0,05; ns, non significatif.

2.3 Conclusion sur les effets de la modalité de conditionnement des échantillons de bois

Les trois modalités de préparation des échantillons ont montré des différences significatives de concentrations moyennes dans le bois pour Ca, Cl, K et Si. Les corrélations de Pearson entre modalités, sur l'ensemble des points de mesures, étaient significatives pour Ca et K, les deux éléments les plus abondants dans le bois et, dans une moindre mesure pour S et P mais restent tout de même faibles (r<0,54). La modalité de préparation des échantillons doit influencer au moins en partie les concentrations mesurées dans le bois et ceci notamment pour Ca qui est très abondant en modalité « lyophilisé » comparé aux deux autres modalités et pour Cl, K et Si qui sont plus abondants en modalité « séché à l'air » comparés aux deux autres modalités.

Pour le manganèse, les arbres situés sur la placette la plus acide présentaient des teneurs moyennes plus fortes; mais cette différence n'était significative que pour la modalité « lyophilisé ». Les arbres situés sur la placette 18, la placette la moins acide, présentaient de plus fortes concentrations en Ca quelque soit la modalité. Cette différence est la plus marquée en modalité « lyophilisé ».

Des différences de concentrations entre périodes du bois (cœur/transition/aubier) ont été mises en évidence avec les 3 modalités pour Ca, P, K et S avec de plus faibles teneurs en Ca et de plus fortes teneurs en P, K et S dans l'aubier. Pour Mn, des différences entre périodes étaient obtenues avec les 3 modalités, mais elles étaient significatives en modalité « lyophilisé » uniquement. Ainsi, bien que la concentration moyenne en Mn mesurée dans le bois soit identique entre les 3 modalités, des différences au niveau des effets périodes et placettes laissent penser que la préparation des échantillons joue un rôle dans la répartition de ce cation dans le bois.

Ces résultats confortent le fait que la composition chimique du bois doit refléter au moins en partie les variations de la composition chimique du sol et que, pour Ca, quelle que soit la modalité cet effet est significatif et va dans le sens attendu, par contre pour le manganèse la significativité de l'effet observé dépend de la modalité de préparation de l'échantillon. Dans tous les cas, ces effets sont plus marqués en modalité « lyophilisé ».

Les tendances inverses des concentrations en Cl, K et Si observées entre placettes en modalité « séché à l'air » comparées aux deux autres modalités sont difficilement interprétables.

Une part des différences entre modalités est liée à la variabilité intra-arbre puisque ce ne sont pas les mêmes carottes qui ont été analysées par les 3 modalités. Néanmoins, les effets

significatifs mis en évidence sur l'ensemble des périodes, ou l'ensemble des arbres d'une même placette ne peuvent être expliqués par ce paramètre.

Ainsi, face à ces résultats, il est difficile de conclure quant au choix de la modalité à adopter. D'un point de vue pratique, il s'est avéré que la modalité congelée était moyennement contrôlable. La platine Peltier ne permet pas une maîtrise totale de l'état de congélation de l'échantillon, avec une décongélation de surface au fur et à mesure de l'analyse chimique sous l'effet du rayonnement électronique incident. De plus, cette modalité impose un positionnement de l'échantillon sur la platine Peltier qui a une surface de 5,2 cm² seulement, ce qui implique un fractionnement des échantillons avec un passage de chaque zone (aubier/cœur/transition) séparément. Cette contrainte augmente le temps total nécessaire aux analyses.

Pour ce qui est de la modalité « séché à l'air », la surface créée après planage au rabot n'était pas toujours aussi plane que celle obtenue par fendage à la lame de rasoir pour les deux autres modalités. Cet état de surface doit, au moins en partie, expliquer la plus large amplitude des taux de bouclages obtenue en modalité « séché à l'air ».

Les possibles transferts internes d'éléments chimiques liés au conditionnement des carottes de bois peuvent être considérés comme faibles car sinon, les différences entre zones de bois seraient fortement influencées par les modalités. A l'échelle inter-annuelle, en modalité « lyophilisé », pour Ca, et en modalité « séché à l'air » pour Si et S, des différences significatives de concentrations apparaissaient entre les années de mesures d'une même période (P<0,001 pour Ca et P<0,05 pour Si et S, résultats non présentés). Pour les autres éléments chimiques ou la modalité « congelé », les variations de concentrations au sein d'une même période étaient non significatives. Ainsi, des transferts à plus petite échelle, entre années d'une même période, peuvent être envisageables selon la modalité de préparation des échantillons.

La modalité lyophilisée, bien qu'elle implique une phase de conditionnement des échantillons plus longue, offre l'avantage d'une plus grande maîtrise de l'état d'hydratation des échantillons avec une homogénéisation des conditions opératoires. Cependant, il faut améliorer la qualité du planage en planant par exemple les carottes avant la lyophilisation lorsque les carottes sont encore congelées de manière à obtenir une coupe franche.

Ainsi dans un soucis d'homogénéisation de la préparation des échantillons et afin d'optimiser les conditions de mesures, la lyophilisation apparaît comme la modalité à préconiser pour des analyses chimiques par EDS.

Effects of the soil type (calcareous vs acidic) on beech (*Fagus sylvatica*) wood and bark chemical composition measured by EDS and on leaves nutrient content.

Weitner A.¹, Bailly R.^{1,2}, Rose C.1, Dupouey J.L.^{1,3}

¹UMR Forest Ecology and Ecophysiology, Phytoecology team, INRA Nancy, F-54280 Champenoux, France

² current address: School of Plant Biology Faculty of Natural and Agricultural Sciences, University of Western Australia 35 Stirling Highway Crawley WA 6009 Australia
³ Corresponding author (dupouey@nancy.inra.fr)

Abstract

Dendrochemistry has successfully been used to reconstruct pas soil acidification. But due to internal remobilisations of some chemical elements between rings, the temporal trends registered by tree rings can be modified afterwards. External factors could also have an influence on wood chemical composition and among them the chemical composition of the soil where the tree grows. Here, we compared the chemical composition of wood (heart- and sapwood) of Fagus sylvatica L. trees growing in two soil types (calcareous vs acids). We used EDS (Energy Dispersive Spectrometry), a non destructive method which has never been used to respond to dendrochemical questions involving several trees and sites. In addition, we measured leaves and bark chemical composition. We obtained significant differences in wood Ca and Mn content between soil types. Variations in wood Mn content were highly correlated with soil pH. These results suggest that wood Mn content can be considered as a potential indicator of soil nutrient status. Interestingly, bark contained more Ca and Mn compared to wood and high variations between soil types. Significant differences between heart- and sapwood K content were observed whatever the soil types. For Ca and Mn, significant differences were observed depending on the soil type. This suggests that the tree origin site can plays a key role on whole wood chemical content and moreover in the heart- to sapwood ratios. We conclude that caution should be taken when interpreting the temporal trends observed in the wood of trees coming from different sites.

Weak relationships were obtained between soil and leaf or wood chemical composition suggesting trees maintain equilibrium between their chemical elements. EDS can be considered as a satisfactory method to estimate tree ring chemical composition.

Keywords: Fagus sylvatica, dendrochemistry, inter-sites, soil acidity, leaf, bark, EDS

Introduction

Soil acidification is expressed as a soil pH decrease resulting from the loss of the soil capacity to neutralize acids coming from atmospheric deposition (Reuss and Johnson, 1986). These acid deposits lead to a loss in some base cations from soils which could play a key role on forest health and productivity (Likens et al, 1996; Ouimet et al, 2001; Duchesne et al, 2002). Long-term monitoring on natural forest soils revealed a severe depletion of some base cations, especially calcium and magnesium in North America (Houle et al, 1997; Likens et al, 1998; Markewitz et al, 1998; Courchesne et al, 2005; Watmough et al, 2005) and in Europe (Ulrich et al, 1980; Thimonier et al, 2000; Watmough et al, 2005). In addition to the accelerated cations depletion from soils, soil acidification could increase aluminium availability which interferes with plant cation uptake and root growth (Cronan and Grigal, 1995). But, due to high spatial variability in soil chemical composition within a stand, other potential indicators of these temporal changes are commonly used. Thus, the chemical composition of leaves was followed through time in coniferous needles (see Landmann et al, 1997 and Mellert et al, 2004 for synthesis) and in decideous species (Flückiger and Braun, 1998; Duquesnay et al, 2000). Unfortunately previous data on soil or leaf chemical composition are rare and restricted to the past 40 years for leaves.

Starting with the pioneer study of Baes and McLaughlin (1984), past soil acidification has often been reconstructed from tree-ring chemical composition. Variations in tree-ring chemical content along time could be considered as a potential indicator of environmental changes during tree life because of the capacity of wood to fix cations. Vessels and tracheids have negative charges on their cell walls. As long as sap flows through vessels and tracheids, their cell walls can fix cations from the sap. Most of tree species have a heartwood zone containing vessels or tracheids where sap does not flow anymore and previous absorbed elements are characteristics of sap chemical composition at the time of their fixation. But if the sap still flows, its cations are able to displace previously fixed cations from the cell wall, depending on their electronic charge and mass; concentration of cations in wood depends on this cation exchange capacity (CEC) which represents the capacity of some elements to be released from their fixation sites (Bell and Biddulph, 1963). Temporal tree-ring studies, especially in wood of coniferous species, showed a decrease in concentration of calcium and other divalent cations from the pith to the cambium zone and related them to changes in soil nutrient content along time (Bondietti et al, 1989; Lévy et al, 1996; Watmough et al, 1999;

Augustin et al. 2005). However these temporal trends as potential indicators of soil acidification are influenced by the decrease of the cation fixation sites assessed as CBC (Cation Binding Capacity) in the vessels cell wall over time (Momoshima and Bondietti 1990; Padilla and Anderson, 2002). Herbauts et al. (2002) explained the temporal trends of wood Ca content in Quercus robur (L.) and Fagus sylvatica (L.) by radial change in Ca exchange capacity. In general, large differences in chemical composition of heartwood compared to sapwood have been observed (Meerts, 2002) because of the recycling of cations from dying wood cells (Stewart, 1965; Nabais and Hagemeyer, 1999; Houle et al, 2002). For a large number of species, high concentrations of nitrogen, phosphorus and potassium are measured in sapwood and high concentrations of Ca in heartwood. Moreover, P and K are considered as mobile between rings (Cutter and Guyette, 1993; Myre and Camiré, 1994). Ca and manganese are viewed as moderately mobile (Cutter and Guyette, 1993) or immobile (Myre and Camiré, 1994). Some trees appeared as better spatial then temporal indicators of soil contamination by pollutants because of these cations remobilisations (Dion et al, 1993). Based on these previous results, it appears that the temporal trends recorded in tree rings may be influenced by internal remobilisation (Cutter and Guyette, 1993).

In addition, several studies have mentioned the importance of the relationship between soil chemical status assessed as chemical content or soil pH and wood chemical composition. A number of known chemical elements are dependent on soil redox conditions (Tyler and Olsson, 2001). Among them, Mn, an essential plant element, is pH-dependant because its concentration in the soil solution and afterwards in the plant increases when soil pH decreases (Marschner, 1995). For Juniperus virginiana (L.), Cutter and Guyette (1990) showed a positive correlation between soil pH and sap pH. Guyette et al. (1992) did not detect any lead or cadmium in the wood of Juniperus virginiana (L.) growing on basic soils but detected them on acidic soils. In the same way, Guyette and Cutter (1994) concluded that barium and Mn wood content of Juniperus virginiana (L.) could be used as temporal indicator of sulphate activity on acidic soils only. Nabais et al (1996) showed that the temporal distributions of nickel in Quercus ilex (L.) rings depend on the soil type. McClenahen and Vimmerstedt (1992) observed a significant effect of soil texture in addition to climate on the temporal and spatial comparison of Liriodendron tulipifera (L.) xylem chemistry. The influence of the site of origin on wood chemical content seems important to consider for temporal studies especially when a lot of farther sites are investigated.

More of the dendrochemical investigations have been made by Inductively Coupled Plasma (ICP) or Atomic Absorption Spectrometry (AAS) which needs time-during preparation of the

samples with mineralization in liquid phase. Recently, new spectrometric methods based on the interaction of the atoms composing the sample with an incident beam are used to estimate the chemical composition of wood, such as; EDS (Energy Dispersive Spectrometry), SXRF (Synchrotron X-ray Fluorescence), SIMS (Secondary Ion Mass Spectrometry), PIXE (Particle Induced X-ray Emission) and NAA (Neutron Activation Analysis). All these methods do not require any mineralization before measurements and chemical analyses at the intra-ring level are possible. Among these methods, EDS has been few used and only for the mapping of elements in specific wood tissues (Jeremic et al, 2004; Minocha et al, 2001; Kuhn et al, 1997; DeGroot and Kuster, 1986).

Here, the chemical composition of *Fagus sylvatica* rings (heart- and sapwood) coming from two contrasted soil types (calcareous vs acidic soils) was measured to estimate the possible tree internal remobilisations of some major cations (Ca, K, Mn) linked to soil type. We also compared the chemical composition of wood, leaf and bark between these two types of soils to test their potential use as soil nutrient status indicators. This study, at our knowledge, is the first one that combines leaves, wood, soil and bark chemical analyses at the spatial scale by EDS.

Materials and methods

In the 1970's a network of 122 sites was established by INRA (National Institute for Agricultural Research) in order to determine factors affecting health and productivity of French beech forests (Timbal, 1974). This network, situated in north-eastern France, presents a large range of beech forests with soils types varying from calcareous rendzina to acidic podzols (Thimonier et al, 2000). This zone was impacted by the 1999's storm and only the sites presenting tree mortality below 50 % and with a slope lower than 5% were kept for our study. In order to limit the age effect on wood chemistry, sites with dominant trees of between 90 and 120 year-old in 1995 were selected; a part of these dominant trees were dead in 2004. In total, 12 sites were sampled in the present study, half on calcareous soils and half on acidic soils. These sites were also selected based on the pH of the upper soil layer, leading to pH of the 6 acidic soils ranging from 3.7 to 4.8 (mean 4.3) and pH of the 6 calcareous soils ranging from 5.8 to 7.3 (mean 6.3, Table 1). Climate is semi-continental with annual precipitations comprised between 900 and 1100 mm and temperature between 8.7°C and 9.3°C. Elevation of the studied sites varied between 320 and 460 m.

Table 1: Mean wood and soil Ca, K, Mn concentrations and soil pH at each site.

		Wood (ppm)		Soil (ppm)				
Soil type	Site	Ca	K	Mn	Ca	K	Mn	pH H ₂ O
	52	705	702	262	4	8.99	0.82	3.7
	62	573	996	361	14.03	14.47	12.36	4.0
acidic	72	808	738	252	30.06	8.21	10.44	4.3
acidic	82	509	813	316	6.01	15.25	5.22	4.4
	71	874	786	245	80.16	14.47	15.93	4.5
	90	693	1113	169	60.12	27.76	14.56	4.8
	4	985	994	112	400.78	22.29	7.14	5.8
	3	965	904	112	500.98	31.67	9.34	6.1
calcareous	2	1182	663	86	440.86	20.33	5.77	6.1
curcurcous	36	1157	1265	96	721.4	39.88	1.65	6.1
	35	1102	831	88	681.33	18.38	2.47	6.5
	41	1114	931	78	1001.95	18.38	1.1	7.3

Soil sampling and chemical analysis

The topsoil layer at each site was chemically analysed in 1991 (Thimonier et al, 2000). At each site, composite samples made of 6 sub-samples were dried at 40°C and sieved at 2 mm. Soil pH was measured in a 5:1 water/soil ratio solution. Exchangeable cations (Ca, K, Mg and Mn) were measured after extraction by an ammonium acetate solution (1M) at pH 7 (Table 1).

Leaf sampling and chemical analyses

Around 100 sun leaves from high sunlit branches were sampled on the 6 largest trees in diameter at each site with a shotgun in August 1996 (Duquesnay et al, 2000). Leaves were dried at 65°C during 2 days and milled for Ca, Mg, Mn, Fe and K concentrations determination by ICP-AES (Inductive Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrometry; Jobin-Yvon) after mineralization by HClO₄ and H₂O₂.

Wood core sampling, tree ring datation and preparation for chemical analyses

The four largest trees in diameter among dominant trees at each site were cored at 1.30 m between January and February 2005. Two wood cores per tree were extracted (one opposite to the other) with a Pressler Borer and immediately placed in a Dewar filled with liquid nitrogen. One core was used for tree-ring counting and datation and a second one for chemical analyses. The borer was washed with ethanol (95 %) after each coring. In the laboratory, cores for ring counting were kept at -10°C and cores for chemical analyses were kept at -80°C. The trees were between 82 and 117 years old in 2004 following these tree-ring measurements. Then one 10 year-long ring sequence was chosen in the inner zone of the trunk (1925-1934) and another one in the outer zone of the trunk (1994-2003, Figure 1). These two sequences presented the same mean growth rate (2.1 mm.y⁻¹ in the inner zone and 1.9 mm.y⁻¹ in the outer zone), enabling to limit the possible dilution effect of some chemical elements linked to growth rate. Due to the differences in coloration, the browner inner zone was attributed to the heartwood and the outer zone to the sapwood. Because the trees had not the same age, the heartwood zone was more or less developed depending on the tree and the 1925-1934 sequence was identified as a heartwood zone for all trees. However, Fagus sylvatica is considered as a species lacking true heartwood (Tessier Du Cros, 1981). Bark was carefully kept attached to the sapwood. The two ring sequences were isolated with a razor blade in a freezing chamber (-35°C) and lyophilized during 2 days at -20°C, 3 days at -10°C and 5 hours at 20°C. Cores were planed by a razor blade in the longitudinal radial plane.

Wood and bark chemical analysis

Following Harju et al (1996) that showed higher concentrations in the earlywood of *Picea abies* compared to latewood for a range of element, all chemical analyses were performed on the earlywood and also in the parenchyma cells of the bark zone (Figure 2). A Dispersive Energy Spectrometer (EDS, Oxford Instruments EDS ATW) coupled with a scanning electron microscope at variable pressure (50 Pa in the ambient chamber) scanned three windows of 763 x 572 µm during 100 s in both earlywood and bark parenchyma. In total, 2880 windows were scanned in the wood (12 sites x 4 trees x 2 sequences x 10 years) and 48 windows (12 sites x 4 trees) were scanned in the bark parenchyma. In order to assess analytical repeatability, all ring sequences were analyzed twice, one time immediately after the other. The focus distance was 15 mm and the accelerating voltage was 20 kV.

In addition, other chemical measurements were done along a line in the bark zone, from the 2003-tree-ring to the external bark, including four tissues types: xylem (with the 2003-04 tree rings), the cambial zone, phloem and the bark parenchyma zone. Before analyses, the core was coated with carbon. Each measurement window (380 x 250 μ m) was scanned during 100s at high vaccum and was up against the previous and the following one.

Energy Dispersive Spectrometry principle

This method is based on the emission of atom-specific X-rays from the atoms composing a sample after their excitation by an incident beam. In the case of the EDS used in this study, the incident beam is composed of electrons generated by the SEM. The emitted X-rays are collected by a Si(Li) detector which converted this signal into concentrations after some corrections by the XPP system based on Castaing (1951) and after comparison with internal standards.

Due to multiple interactions of the X-rays with the atoms composing the sample before going out the sample in the direction of the detector, they can lose part of their initial energy or be emitted in a different angle of the detector. Only measurements for which at less 50 % of the emitted X-rays could be collected and identified by the Si(Li) detector were kept for subsequent data analyses which represents 98 % of the chemical measurements.

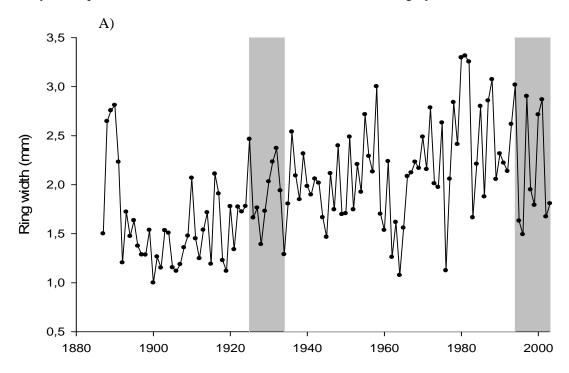
Statistical analyses

Data analyses were performed by SAS 8.2 software. The analytical repeatability was estimated by the difference between the two repeated measurements (10 years x 2 sequences x 4 trees x 12 sites). For each chemical element, all measurements were integrated in a linear model. Residuals of the model which correspond to the difference between the two measurements were averaged and a coefficient of variation (CV) was calculated for each element.

The six measurements within a ring (three windows analyzed twice in a given ring) were considered as analytical repetitions and averaged prior to statistical analyses. Differences in wood chemical content between soil types (acidic vs calcareous) or between the two sequences (heartwood vs sapwood) were estimated in a mixed linear model. The selection of a stand in a soil type and the selection of a tree in a given stand were considered as random

91

Figure 1: Mean tree ring width per year (mm.yr⁻¹) for acidic (B) and calcareous soils (A). The analysed sequences (1925-1934 and 1994-2003) are indicated in grey.



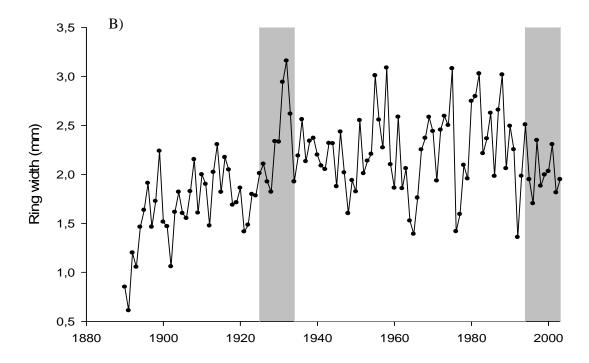


Figure 2: Schematic representation of the measurement localisations in the wood core. Three windows ($600*750\mu m$, in grey) were chosen in the earlywood zone of the longitudinal-radial plane of each tree ring for chemical analyses.

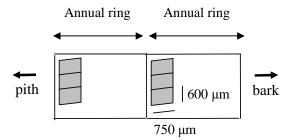


Table 2: Wood chemical content calculations are based on one mean value per tree ring (960 values). Mean wood concentration, maximum and minimum values are expressed in ppm. The coefficient of variation (CV in %) represents the dispersion of the values between the different measurements. The coefficient of variation between two measurements (CV repeatability in %) reflects the analytical repeatability.

	Al	Ca	Cl	Fe	K	Mg	Mn	Na	P	S	Si
Mean (ppm)	113	880	85	102	896	186	181	121	103	115	123
Maximum (ppm)	1033	2433	483	467	7417	983	600	467	250	300	667
Minimum (ppm)	0	283	0	0	167	0	0	0	0	0	17
CV(%)	68	35	54	61	52	62	72	54	46	43	42
CV repeatability (%)	89	17	114	134	15	68	89	114	103	91	87

effects. The measurements of the different years within a given 10-year sequences were considered auto-correlated in the mixed model.

The differences in wood and bark chemical content between soil types was estimated by an ANOVA analysis with one mean concentration per tree (4 trees x 6 sites per soil type).

For leaves, the difference between soil types was estimated based on one mean value per site.

The differences in chemical composition among the different bark tissues were estimated by a Tukey test.

Results

Wood chemical content and analytical repeatability

Eleven elements were detected in beech wood in addition to carbon and oxygen (Table 2). Ca and K were the most abundant elements (880 and 896 ppm respectively) and their measurements showed a high repeatability with CV of 17% for Ca and 15% for K, compared to the other elements (CV above 68%).

Differences between heartwood and sapwood content

The K content was significantly higher in the heartwood than in the sapwood, whatever the soil type (Figure 3). Ca was significantly more concentrated in heartwood but only on acidic soils. While the Mn content showed an opposite trend with typical higher value in the heartwood than in the sapwood on calcareous soils only. The differences among the 10 years composing each sequence were not significant for Mn (Table 3A), while the differences among years were significant at the 0.05 level for Ca and K, but they explained at best 4.5% only of the variance for a given sequence.

Differences in wood chemical content between acids and calcareous sites

The difference in wood chemical content between acidic and calcareous soils is significant for Ca and Mn at the P<0.001 level (F=33.72 and F=38 respectively). The K content did not vary significantly between soil types (Figure 3, Table 3B). In calcareous soils, the trees contain

94

more Ca and less Mn in wood compared to acidic soils.

Relationships between wood, leaf and soil chemical composition

Calcium

For acidic sites, wood and leaves contained more Ca on Ca-rich soils compared to Ca-poor soils (Table 4). But the relationship flattened for calcareous soils above a soil Ca concentration of 400 ppm (Figure 4).

Manganese

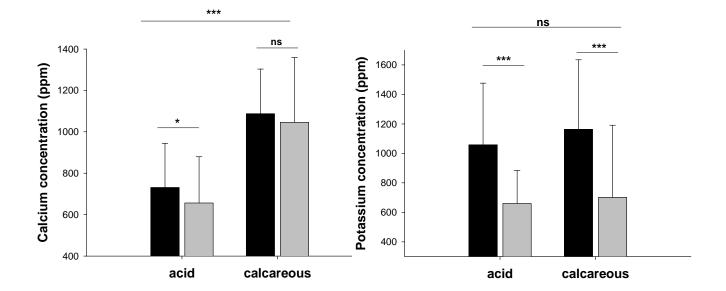
Wood and leaves Mn concentrations are not significantly correlated with the soil concentration (Figure 5) but the trees grown on acidic soils showed higher concentrations than trees situated on calcareous soils (Table 4). The ln of the wood or leaf Mn content was significantly correlated with soil pH (Figure 6).

Comparison of wood, leaf and bark concentrations between sites

The bark zone was more concentrated in Ca, Mn and K than wood by 15.4-24.7, 2.6-8.1 and 2.5-3.2 times, respectively depending on the soil type (Table 4). Ca was present as numerous calcium oxalate crystals spread in the different bark tissues. K was more concentrated in the cambial zone and in the phloem vessels. Ca and Mn were more abundant in the phloem and the bark parenchyma (Table 5).

There was no significant difference in the bark K concentration between the two soils types (Table 3B). The variations in Ca and Mn bark content were explained at 65% and 63% respectively by the soil type (Table 3B); in comparison to wood with 58 % and 66% respectively and leaves with 77% and 82 % respectively (Table 3B). These differences in the Ca and Mn wood content between soil types were higher than the differences between the different sites of a same soil types (Table 3A, 3B). There were few differences in the wood chemical content of the trees growing in the same site (Table 3A).

Figure 3: Mean concentrations (ppm) of Ca, K, Mn calculated by soil type (acidic or calcareous) in heartwood (black bars) and sapwood (grey bars). The significance of the differences between soil type, and period are expressed above the histograms (*** P<0.001, ** P<0.01, * P<0.05, ns non-significant).



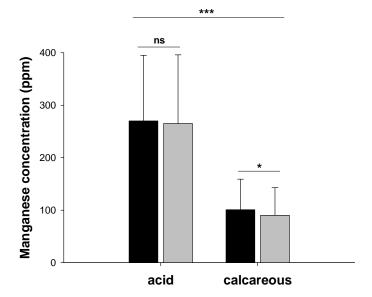


Table 3A

		Ca	K	Mn
tree within a	1.9 % ***	0.5% ***	ns	
site within a soil type	acidic soil	31.7% ***	14.6% ***	22.2 % ***
	calcareous soil	7.7% ***	11.5% ***	5.2 % ***
year within a sequence	heartwood	1.4 % **	1.5% **	ns
	sapwood	4.5% ***	1.2% *	ns

Table 3B

	wood		leaf			bark			
Ca	K	Mn	Ca	K	Mn	Ca	K	Mn	
58% ***	ns	66% ***	77% ***	ns	82% ***	65% ***	ns	63% ***	

Table 3: (A) Percentage of total variance at the site level explained by the variability between trees. Percentage of total variance at the soil type level explained by the variability between the sites composing the soil type. (B) ANOVA of type of soil effect (ordered in 2 classes calcareous vs acidic) on wood elemental concentrations are also represented.

(* P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001 and ns=not significant)

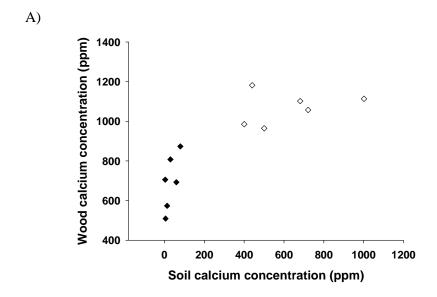
Table 4: Mean Ca, Mn and K concentrations (ppm) in wood, leaf and bark by soil type (acidic vs calcareous).

	Aci	dic soils (ppi	m)	Calcareous soils (ppm)			
	Ca	Mn	K	Ca	Mn	K	
bark	10 628	2168	2732	26 311	244	2351	
wood	694	267	858	1067	95	932	
leaf	5510	2603	7970	11580	420	8460	

Table 5: Mean concentration of Ca, K and Mn (ppm) measured in different bark tissues. The number of measurements in each tissue depends on the tissue length. The letters situated after the concentrations correspond to the significance of the difference between tissues.

	Ca	K	Mn
parenchyma	16 362a	1881b	865ab
phloem	14 006a	3725a	1649a
transition	6109b	5073a	773ab
xylem	1087b	873b	201b

Figure 4: Mean wood (A) and leaf (B) calcium concentration function of the soil calcium concentration in calcareous soils (white diamonds) and in acids soils (black diamonds).



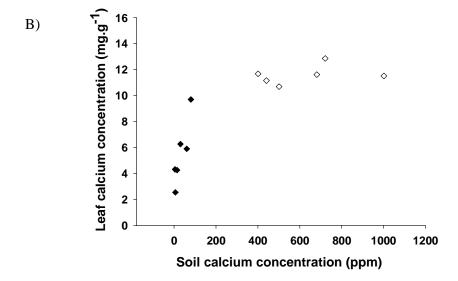
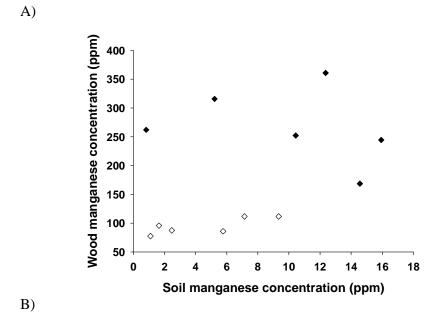


Figure 5: Mean wood (A) and leaf (B) manganese concentration function of the soil manganese concentration in calcareous soils (white diamonds) and in acids soils (black diamonds).



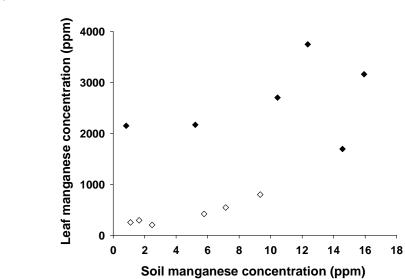
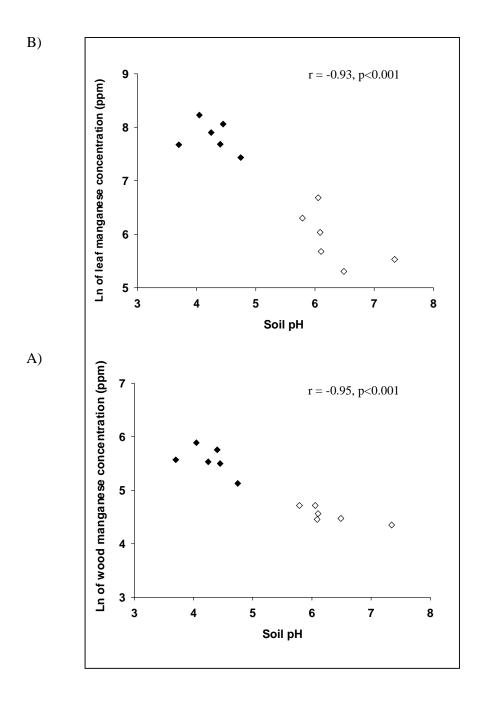


Figure 6: Neperian logarithm of the wood (A) and leaf (B) manganese concentration function of the soil pH in calcareous soils (white diamonds) and in acids soils (black diamonds). The Pearson correlation of the relationship is also indicated.



Discussion

Wood chemical measurements by EDS

EDS was able to detect 11 chemical elements in the beech wood. High analytical repeatability was obtained for Ca and K, the most abundant element in the wood. Our range of Ca, K and Mn concentrations were larger than those observed by Penninckx et al (2001) in 130-160 year-old beech trees obtained by AAS (Atomic Absorption Spectrometry): 420-810 ppm for Ca, 700-1350 ppm for K and 180-340 ppm for Mn. These trees were situated on more acidic ochreous brown earth soil (topsoil pH of 3.2) than in our study, and this can explain the lower concentrations observed. Meish et al (1986) measured Ca on 140-160 year-old beech trees situated under influence of acid emissions and obtained a similar range of concentrations (145-2643 ppm) as ours.

Comparison of acidic and calcareous soils

When considering the wood chemical composition between acidic and calcareous soils, Ca was more abundant in trees situated in calcareous soils and Mn was more abundant in trees situated in acidic soils. De Walle et al (1991) observed more Ca and less Mn wood content for *Quercus rubra*, *Prunus serotina*, *Tsuga canadensis* and *Pinus strobus* in their most basic soils. Kogelmann and Sharpe (2006) showed significant differences in *Acer saccharum* wood Mn content among 3 sites with higher Mn content on their most acidic site. On the contrary, for *Fagus sylvatica*, Sariyildiz and Anderson (2005) observed more Mn and less Ca leaves content on high fertility soils compared to low fertility soils.

For leaves and wood the differences in chemical composition between sites was high but Ca and Mn leaves or wood content were not linearly correlated to soil content. Nutritional status of a forest site has already been assessed by chemical analysis of some elements in tree leaves (diagnostic foliar analysis, DFA, Lundegardh, 1951) but specific cautions are taken for leaf sampling. In fact, leaf chemical composition varies a lot from year to year depending on climatic conditions (Bonneau, 1988; Schleppi et al, 2000) and it varies within the same year due to remobilisation before leaf abscission (Helmisaari, 1992a; 1992b; 1995; Duchesne et al; 2001): these two factors lead to high intra-tree and inter-tree variability. Balsberg Pahlsson (1989) found weak relationships between *Fagus sylvatica* leaves chemical composition (Ca,

Mn) and soil variables. However, significant positive relationships between leaves and soil Ca content have been observed for deciduous species (Clüsener, 1990; Duquesnay, 1998) and coniferous species (Hendricks et al, 1994).

For wood, De Visser et al. (1992) showed that Mn content corresponded to soil Mn²⁺ concentrations in the soil solution for a study period of 5 years but they did not detect any relationship for Ca. For Acer saccharum, Watmough (2002) showed a linear relationship between wood and soil Ca content for 19 sites. In this study, topsoil Ca concentration varied between 8.5-166.7 mg.kg-1 and was below ours (4-1002 mg.kg-1) and it did probably not lead to a saturation effect as we observed for the most calcareous soils. In the same study, they did not observed any significant relationship between soil and wood Mn concentrations. In calcareous soils, calcium is present in high concentrations and consequently on tree sap which could lead to its important fixation on vessels fixation sites. As Fagus sylvatica has been shown to present a high saturation rate of its fixation sites for Ca and Mg compared to Quercus robur (Herbauts et al, 2002), all its fixation sites could be occupied and no more calcium could be fixed anymore. In general, the absence of significant correlations between nutrient concentrations in soil and in plant can be an indicator of the tendencies of species to maintain equilibrium between elements. In the present study, this can be the case for calcium in the more calcareous soils as we observed a saturation effect in wood and leaves. Moreover, soil nutrient content does not correspond to nutrients availability for plants which is influenced by different factors like climatic conditions (Barber, 1995) which play a key role on element dissolution and absorption by roots. Arthur et al. (1998) observed 30 % more Ca on the wood of Fagus grandifolia trees growing in moist sites relative to driest sites. As we only sampled leaves from the year 1996 which was a dry year, the relationships between leaves and soil Ca or Mn content can probably be improved by considering more years.

Wood Mn content assessed as ln [Mn] was highly related to soil pH variations. Such a relationship at the spatial scale has already been observed for a range of other species (see for a synthesis, Guyette et al, 1992). This result points to the potential use of *Fagus sylvatica* tree rings to estimate site acidity and nutrient status at the spatial scale.

Bark as potential indicator of soil nutrients status

We observed higher concentrations of Ca and Mn content in bark compared to wood as observed from previous works for deciduous species (Boucher and Côté, 2002; André and Ponette, 2003). These high concentrations decrease the errors of measurements by EDS. The

large differences in bark chemistry between the two soil types appeared as a promising tool to estimate tree nutrient status and tree health as observed by Legrand and Asta (1993) who measured bark pH and related high bark acidity with tree dying.

Differences between sequences in wood nutrient content

In this study, K and to a lesser extend Ca in acidic soils presented higher concentrations in heartwood compared to sapwood. Penninckx et al (2001) obtained the same tendencies for 130-160 years old Fagus sylvatica trees. Boucher and Côté (2002) showed such a difference in Ca concentrations for Fagus grandifolia trees situated in an acidic soil but no significant difference for K. These temporal trends could be partly explained by a decrease of the CEC (Cation Exchange Capacity) from pith to the outer wood rings as observed for Fagus sylvatica by Herbauts et al (2002). The difference in tree ring chemical content is also influenced by remobilization of chemical elements which can remove from their fixation sites to other wood parts. For the study species, Herbauts et al (2002) showed that more than 75 % of K was present in a water-soluble form and consequently could be considered as very mobile between Fagus sylvatica rings. For Ca, they showed that 30% was present in a non extractable form (by SrCl₂) and could be viewed as potentially less mobile than K. The high difference in K content we observed between heartwood and sapwood could be partly due to its high mobility. For Ca this age effect was significant on acidic soils only. Andrews et al (1999) suggested that the rate of remobilization from senescing sapwood of Chamaecyparis thyoides could be influenced by the soil nutrient status. For their species, they observed typical less heartwood Ca content on Ca-poor soils compared to Ca-rich soils and explained this tendency by the need of the tree to maintain a physiological minimum in its living wood. However we observed the contrary with a significant higher Ca heartwood content compared to sapwood in acidic soils. As observed by Penninckx et al (2001), Fagus sylvatica does not actively resorb its heartwood nutrients to sapwood compared to typical heartwood species like *Quercus*. This strategy in nutrient recycling seems to be dependent on tree species and could explain the lack of a general conclusion when comparing hearwood/sapwood content on different soils.

For the studied network, decreased concentrations in Ca were observed for leaves and soil between 1969/71 and 1990's (Duquesnay et al, 2000; Thimonier et al, 2000). These temporal changes in soil content linked to acidifying deposits could partly explain the decreased concentrations in wood Ca we obtained in acidic soils which are supposed to be more sensible

to base cations losses from soil.

Conclusions

Weak relationships were observed between wood and leaf Ca and Mn content and soil content. Fagus sylvatica wood Ca and Mn content showed significant differences between sites (calcareous vs acids). Wood Mn content was dependant on soil pH and thus appeared as a promising indicator of site nutrient status. Significant differences between sequences (heart-and sapwood) were observed for K whatever the site of origin; for Ca and Mn these differences appeared significant depending on the soil type. This effect of soil on tree ring chemistry and on cations remobilization between heart- and sapwood supposed that the site of origin should be considered as a potential factor of variations when temporal studies are investigated. EDS appeared as a promising method to estimate wood chemical content.

Acknowledgments: The authors gratefully acknowledge ADEME (French Environment and Energy Management Agency) for financial support. We thanks F. Le Tacon and J. Timbal from INRA Nancy, France for the installation, in the 1970's, of the beech stand network we studied here. We are thankful to A. Duquesnay from INRA Nancy, France and A. Thimonier from WSL, Switzerland for sampling and chemical analyses of leaves and soils respectively. Thanks to P. Behr from INRA Nancy, France for technical assistance. Thanks to INRA of Arras and Nancy, France for chemical analyses by ICP.

References

André F., Ponette Q. (2003) Comparison of biomass and nutrient content between oak (Quercus petraea) and hornbeam (Carpinus betulus) trees in a coppice-with-standards stand in Chimay (Belgium). Ann. For. Sci., 60: 489-502.

Andrews J. A., Siccama T. G., Vogt K. A. (1999) The effect of soil nutrient availability on retranslocation of Ca, Mg and K from senescing sapwood in Atlantic white cedar. Plant and soil, 208, 117-123.

Arp P. A., Manasc J. (1987) Red spruce stands downwind from a coal-burning power generator: tree-ring analysis. Can. J. For. Res., 18, 251-264.

Augustin S., Stephanowitz H., Wolff B., Schröder J., Hoffmann E. (2005) Manganese in tree rings of Norway spruce as an indicator for soil chemical changes in the past. Eur. J. Forest Res., 124, 313-318.

Baes C.F., McLaughlin S. B. (1984) Trace elements in tree rings: evidence of recent and historical air pollution. Science, 224, 494-497.

Balsberg Påhlsson A. M. (1992) Influence of nitrogen fertilization on minerals, carbohydrates, amino acids and phenolic compounds in beech (Fagus sylvatica L.) leaves. Tree Physiol., 10, 93-100.

Barber S. A. (1995) Soil nutrient bioavailability: a mechanistic approach, John Wiley & Sons.

Bell C. W., Biddulph O. (1963) Translocation of calcium: exchange versus mass flow. Plant Physiology, 38, 610-614.

Berger T. W., Köllensperger G., Wimmer R. (1994) Deposition of atmospheric constituents and its impact on nutrient budgets of oak forests (Quercus petraea petraea and Quercus robur) in Lower Austria. Forest Ecology and Management, 70, 183-193.

Bergkvist B. F. L. (1992) Soil acidification and element fluxes of a Fagus-Sylvatica forest as influenced by simulated nitrogen deposition. Water, Air, and Soil Pollution, 65, 111-133.

Bondietti E. A. McLaughlin S. B. (1992) Evidence of historical influences of acidic deposition on wood and soil chemistry. in: Atmospheric deposition and forest nutrient cycling by D.W. Johnson and S.E. Lindberg Springer-Verlag ed, 358-377.

Boucher P., Côté B. (2002) Characterizing base-cation immobilization in the stem of six hardwoods of eastern Canada. Ann. For. Sci, 59, 397-407.

Bonneau M. (1988) Le diagnostic foliaire. Rev. For. Fr., 40 special issue, 19-28.

Castaing R. (1951) Application des sondes électroniques à une méthode d'analyse ponctuelle chimique et cristallographique. Thèse de doctorat d'état, Université de Paris.

Clüsener M.G. (1990) The content of Mg, Ca and K in plant tissues and their relationship to soils in natural ecosystems p.345-356. *In* "Element concentration cadasters in ecosystems, methods of assessment and evaluation". Lieht H. and Markert B. (eds). VCH Verlagsgesellschaft mbH, D-6940 Weinheim 448 p.

Côté B., Camiré C., (1995) Application of leaf, soil, and soil, and tree ring chemistry to determine the nutritional status of sugar maple on sites of different levels of decline. Water, Air and Soil Pollution, 83, 1-11.

Cronan C. S., Grigal D. F. (1995) Use of calcium/aluminium ratios as indicators of stress in forest ecosystems. J. Environ. Qual., 24, 209-226.

Cutter B. E., Guyette R. P. (1990) A note on sap pH in eastern Redcedar (Juniperus virginiana L.). Wood and Fiber Science, 22, 109-112.

Cutter B. E., Guyette R. P. (1993) Anatomical, chemical, and ecological factors affecting tree species choice in dendrochemistry studies. J. Environ. Qual., 22, 611-619.

DeGroot R. C., Kuster T., (1986) SEM X-ray microanalysis of tracheid cell walls in southern yellow pibe sapwood treated with water-dispersible pentachlorophenol. Wood and Fiber Science, 1(1),58-67.

De Visser P. H. B (1992) The relations between chemical composition of oak tree rings, leaf, bark, and soil solution in a partly mixed stand. Can. J. For. Res., 22, 1824-1831.

DeWalle D. R., Swistock B. R., Sayre R. G., Sharpe W. E. (1991) Spatial variations of sapwood chemistry with soil acidity in Appalachian forests. J. Environ. Qual., 20, 486-491.

Dion M. L. S., Kennedy G., Courchesne F., Zayed J. (1993) Evaluation of Black spruce (Picea mariana) as a bioindicator of aluminium contamination. Water, Air, and Soil Pollution, 71, 29-41.

Duchesne L., Ouimet R., Houle D. (2002) Basal area growth of Sugar maple in relation to acid deposition, stand health, and soil nutrients. J. Environ. Qual., 31, 1676-1683.

Duchesne L., Ouimet R., Camiré C., Houle D. (2001) Seasonal nutrient transfers by foliar resorption, leaching, and litter fall in a northern hardwood forest at Lake Clair Watershed, Quebec, Canada. Can. J. For Res. 31, 333-344.

Duquesnay A. (1998) Changements de la composition foliaire et de la productivité des hêtraies dans le quart Nord-Est de la France entre 1970 et 1995. Ph.D. Diss. Univ. Henri Poincaré, Nancy, France, 222 p.

Duquesnay A., Dupouey J. L., Clement A., Ulrich E., Le Tacon F. (2000) Spatial and

temporal variability of foliar mineral concentration in beech (Fagus sylvatica) stands in northeastern France. Tree Physiology, 20, 13-22.

Federer C. A., Hornbeck J. W., Tritton L. M., Martin C. W., Pierce R. S., Smith C. T. (1989) Long-term depletion of calcium and other nutrients in eastern U.S. forests. Environmental Management, 13, 593-601.

Ferguson I. B., Bollard E. G. (1976) The movement of calcium in woody stems. Ann.Bot, 40, 1057-1065.

Flückiger W., Braun S. (1998) Nitrogen deposition in Swiss forests and ist possible relevance for leaf nutrient status, parasite attacks and soil acidification. Environ. Pollut., 102, 69-76.

Guyette R. P., Cutter B. E. (1994) Barium and manganese trends in tree rings as monitors of sulfur deposition. Water, Air, and Soil Pollution, 73, 213-223.

Guyette R. P., Cutter B. E., Henderson G. S. (1992) Reconstructing soil pH from manganese concentrations in tree rings. Forest Science, 38, 727-737.

Hagemeyer J. L. D., Breckle S. W. (1993) Development of annual xylem rings and shoot growth of young beech (Fagus sylvatica L.) grown in soil with various Cd and Zn levels. Water, Air, and Soil Pollution, 69, 351-361.

Harju L., Lill J. O., Saarela K. E., Heselius S. J., Hernberg F. J., Lindroos A. (1996) Study of seasonal variations of trace-element concentrations within tree rings by thick-target PIXE analyses. Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B, 109/110, 536-541.

Helmisaari H. S. (1992a) Nutrient retranslocation in three Pinus sylvestris stands. For Ecol. Manage. 51, 347-367.

Helmisaari H. S. (1992b) Nutrient retransloctaion within the foliage of Pinus sylvestris. Tree Physiol. 10, 45-58.

Helmisaari H. S. (1995) Nutrient cycling in Pinus sylvestris stands in eastern Finland. Plant Soil 168-169, 327-336.

Herbauts J. P. V., Gruber W., Meerts P. (2002) Radial variations in cation exchange capacity and base saturation rate in the wood of pedonculate oak and European beech. Can. J. For. Res., 32, 1829-1837.

Houle D., Duchesne L., Moore J. D., Laflèche M. R., Ouimet R. (2002) Soil and tree ring chemistry response to liming in a sugar maple stand. J. Environ. Qual., 31, 1993-2000.

Izuta T., Yamaoka T., Nakaji T., Yonekura T., Yokoyama M., Funada R., Koike T., Totsuka T. (2004) Growth, net photosynthesis and leaf nutrient status of Fagus crenata seedlings grown in brown forest soil acidified with H2SO4 or HNO3 solution. Trees Structure and Function, 18, 677-685.

Jeremic D., Cooper P., Srinivasan U. (2004) Comparative analysis of balsam fir wetwood, heartwood, and sapwood properties. Can. J. For. Res., 34, 1241-1250.

Jordan D. N., Wright L. M., Lockaby B. G. (1990) Relationship between xylem trace metals and radial growth of Loblolly pine in rural Alabama. J. Environ. Qual., 19, 504-508.

Kogelmann W. J., Sharpe W. E. (2006) Soil acidity and manganese in declining and nondeclining sugar maple stands in Pennsylvania. J. Environ. Qual., 35, 433-441

Kuhn A. J., Schröder W. H., Bauch J. (1997) On the distribution and transport of mineral elements in xylem, cambium and phloem of Spruce (Picea abies [L.] Karst.). Holzforschung, 51, 487-496.

Landmann G., Hunter I. R., Hendershot W. (1997) Temporal and spatial development of magnesium deficiency in forest stands in Europe, North America and New Zeland. In: Magnesium deficiency in forest ecosystems, R.F. Hüttl, W. Schaaf (Eds), Kluwer Academic Publishers, 23-64.

Legrand I., Asta J., Goudard Y. (1996) Variations in bark acidity and conductivity over the trunk length of silver fir and Norway spruce. Trees, 11, 54-58.

Likens G. E., Driscoll C. T., Buso D. C. (1996) Long-term effects of acid rain: response and recovery of a forest ecosystem. Science, 272, 244-246.

Lundegardh H. (1951) Foliar analysis. Hilger & Watts, London, p 176.

Maas E.V., Moore D. P., Mason B. J. (1968) Manganese absorption by excised Barley roots. Plant Physiol., 43, 527-530.

Marschner H. (1995) Minearl nutrition of higher plants, 2nd ed. Academic Press, San Diego, California, USA.

McClenahen J.R., Vimmerstedt J.P. (1993) Soil, climate, and atmospheric deposition relationships with elemental concentrations in annual rings of Tuliptree. J. Environ. Qual., 22, 23-32.

Meerts (2002) Mineral nutrient concentrations in sapwood and heartwood: a literature review. Ann. For. Sci, 59, 713-722.

Meisch H. U., Kessler M., Reinle W., Wagner A., (1986) Distribution of metals in annual rings of the beech (Fagus sylvatica) as an expression of environmental changes. Experientia, 42, 537-542.

Mellert K. H., Prietzel J., Straussberger R., Rehfuess K. E. (2004) Long-term nutritional trends of conifer stands in Europe: results from the RECOGNITION project. Eur. J. Forest Res., 123, 305-319.

Miller E. K., Blum J. D., Friedland A. J. (1993) Determination of soil exchangeable-cation

loss and weathering rates using Sr isotopes. Nature, 362, 438-441.

Minocha R., McQuattie C., Fagerberg W., Long S., Noh E.W. (2001) Effects of aluminium in red spruce (Picea rubens) cell cultures: cell growth and viability, mitochondrial activity, ultrastructure and potential sites of intracellular aluminium accumulation. Physiologia plantarum, 113, 486-498.

Momoshima N., Bondietti E. A. (1990) Cation binding in wood: applications to understanding historical changes in divalent cation availability to red spruce. Can. J. For. Res., 20, 1840-1849.

Momoshima N., Eto I., Kofuji H., Takashima Y., Koike M., Imaizumi Y., Harada T. (1995) Distribution and chemical characteristics of cations in annual rings of Japanese Cedar. J. Environ. Qual., 24, 1141-1149.

Myre R., Camiré C. (1994) The establishment of stem nutrient distribution zones of European larch and tamarack using principal component analysis. Trees, 9, 26-34.

Nabais C., Freitas H., Hagemeyer J. (1999) Dendroanalysis: a tool for biomonitoring environmental pollution? The Science of the Total Environment, 232, 33-37.

Nabais C., Freitas H., Hagemeyer J., Breckle S. W. (1996) Radial distribution of Ni in stemwood of Quercus ilex L. trees grown on serpentine and sandy loam (umbric leptosol) soils of NE-Portugal. Plant and soil, 183, 181-185.

Ouimet R., Duchesne L., Houle D., Arp P. A. (2001) Critical loads and exceedances of acid deposition and associated forest growth in the northern hardwood and boreal conifers forest in Québec, Canada. Water, Air, Soil Pollut., 1, 119-134.

Padilla K. L., Anderson K. A. (2002) Trace element concentration in tree-rings biomonitoring centuries of environmental change. Chemosphere, 49, 575-585.

Penninckx V., Glineur S., Gruber W., Herbauts J., Meerts P. (2001) Radial variations in wood mineral element concentrations: a comparison of beech and pedunculate oak from the belgian Ardennes. Ann. For. Sci, 58, 253-260.

Reuss J. O., Johnson D. W. (1986) Acid deposition and the acidification of soils and waters. Springer-Verlag, New York.

Schaumloffel J. C., Filby R. H., Moore B. C. (1998) Ponderosa pine tree rings as historical monitors of zinc and cadmium pollution. J. Environ. Qual., 27, 851-859.

Schmull M., Hauck M. (2003) Element microdistribution in the bark of Abies balsamea and Picea rubens and its impact on epiphytic lichen abundance on Whiteface Mountain, New York. Flora, 198, 293-303.

Shortle W. C., Smith K. T., Minocha R., Lawrence G. B., David M. B. (1997) Acidic

deposition, cation mobilization, and biochemical indicators of stress in healthy red spruce. J. Environ. Qual., 26, 871-876.

Smith K. T, Shortle W. C., Minocha R., Alexeyev V. A. (1996) Dynamics of calcium concentrations in stemwood of red spruce and siberian fir. in: Proceedings, 1995 meeting of the Northern Global Change Program by Hom J., Birdsey R., O'Brian K., eds, 230-238.

Stewart C. M. (1965) Excretion and heartwood formation in living trees. Science, 153, 1068-1074.

Tendel J., Wolf K. (1988) Distribution of nutrients and trace elements in annual rings of pine trees (Pinus silvestris) as indicator of environmental changes. Experientia, 44, 975-980.

Tessier Du Cros E. (1981) Le hêtre, INRA, Paris.

Thimonier A., Dupouey J. L., Le Tacon F. (2000) Recent losses of base cations from soils of Fagus sylvatica L. stands in northeastern France. Ambio, 6, 314-321.

Timbal J. (1974) Principaux caractères écologiques et floristiques des hêtraies du nord-est de la France. Ann. Sci. For., 31, 27-45.

Tyler G., Olson T. (2001) Plant uptake of major and minor mineral elements as influenced by soil acidity and liming. Plant and soil, 230, 307-321.

Ulrich B. (1986) Natural and anthropogenic component of soil acidification. Z. Pflanzenernaehr. Bodenkd., 149, 702-717.

Watmough S. A. (2002) A dendrochemical survey of sugar maple (Acer saccharum Marsh.) in south-central Ontario, Canada. Water, Air, and Soil Pollution, 136, 165-187.

Watmough S. A., Aherne J., Alewell C., Arp P., Bailey S., Clair T., Dillon P., Duchesne L., Eimers C., Fernandez I., Foster N., Larssen T., Miller E., Mitchell M., Page S. (2005) Sulfate, nitrogen and base cation budgets at 21 forested catchments in Canada, the United States and Europe. Environmental Monitoring and Assessment, 109, 1-36.

Watmough S. A., Hugues R. J., Hutchinson T. C. (1999) 206Pb/207Pb Ratios in tree rings as monitors of environmental change. Environ. Sci. Technol., 33, 670-673.

Wolterbeek H. Th., Van Luipen J., de Bruin M. (1984) Non-steady state xylem transport of fifteen elements into the tomato leaf as measured by gamma-ray spectroscopy: A model. Physiol. Plant., 61, 599-606.

Yanai R. D., Phillips R. P., Arthur M. A., Siccama T. G., Hane E. N. (2005) Spatial and temporal variation in calcium and aluminium in northern hardwood forest floors. Water, Air, and Soil Pollution, 160, 109-118.

Detection of cycles in the wood chemical content of the mangrove species *Rhizophora mucronata* Lam. by synchrotron X-ray fluorescence (SXRF)

Anny Weitner ¹, Jean-Luc Dupouey ^{1,*}, Christophe Rose ¹, Anouk Verheyden ^{2,**}, Pierre Chevallier ³, Hans Beeckman ², Frédéric Mothe ⁴ and Etienne Dambrine ⁵

¹ Forest Ecology and Ecophysiology Unit, INRA Nancy, F-54280 Champenoux, France

² Laboratory for General Botany and Nature Management, Vrije Universiteit Brussel, Pleinlaan, 2, B-1050 Brussels, Belgium

^{**} Current address: Biology department, SUNY Orange, Middletown, NY, USA.

³ Pierre Süe Laboratory, CEA/CNRS, Université Paris Sud, Bat 209D, F-91405 Orsay, France

⁴ Lerfob, INRA Nancy, F-54280 Champenoux, France

⁵ Forest Ecosystems Biogeochemistry Unit, INRA Nancy, F-54280 Champenoux, France

^{*} Author for correspondence: Email: dupouey@nancy.inra.fr, Tel: +33 3 83 39 40 49, Fax: +33 3 83 39 40 69.

Summary

- . Most tropical trees do not show annual growth rings like temperate trees and cannot be dated using standard dendrochronological techniques. Alternative methods have been explored to estimate their age and growth history.
- . Here, the wood chemical content of *Rhizophora mucronata*, a Kenyan mangrove species, was measured in order to identify annual chemical element cycles by synchrotron X-ray fluorescence, a method still scarcely applied to tree cores. This mangrove environment presents seasonal cycles of water level and salinity. Annual rings had been previously identified by cambial marking and wood anatomy measurements. Wood density was also measured.
- . Annual cycles in wood chemical content were detected for bromine, calcium, manganese and strontium by Fourier spectral analysis of the X-ray signal. The annual patterns observed may be related to seasonal variations in water salinity and redox conditions or to internal remobilization of elements linked to phenological cycles. In addition to these annual cycles, bromine and chlorine content displayed a strong long-term increasing trend. No general correlation was observed between element content and density variations, suggesting that wood macroporosity did not impact SXFR measurements.
- . Such studies, combining X-ray fluorescence analysis and density measurements are promising for the detection of annual rings in tropical tree species.

Keywords: dendrochemistry, mangrove, *Rhizophora mucronata*, synchrotron X-ray fluorescence, tropical dendrochronology

1. Introduction

All temperate tree species display clear annual tree rings in relation to the strong seasonal climatic cycle. Such annual growth rhythms are usually lacking in tropical species (Détienne, 1989; Sass *et al.*, 1995; Stahle, 1999). As a consequence, the age and growth history of most tropical trees are still unknown, making sustainable forestry practices difficult. This question remains one of the major challenges in ecological research (Worbes, 1995, 2002). In a few number of species, annual rhythms could be detected using different markers. Cyclic variations in wood-cell anatomy have been linked to rainfall seasonality (Buckley *et al.*, 1995;

Devall *et al.*, 1995; Stahle *et al.*, 1999; Worbes, 1999; Enquist and Leffler, 2001; Dünisch *et al.*, 2003; Fichtler *et al.*, 2004; Brienen & Zuidema, 2005; Verheyden *et al.*, 2005), periodic occurrence of floods (Worbes, 1989) or seasonality in tree phenology (Gill, 1971). Some studies have associated anatomical ring delimitation and ¹⁴C dating (Chambers *et al.*, 1998, Fichtler *et al.*, 2003; Menezes *et al.*, 2003, Robertson *et al.*, 2004). Although easier to measure and strongly linked to anatomical variations, wood density variations have seldom been used to detect annual rhythms (Gourlay, 1995; Eshete & Stahl, 1999), leading to ambiguous delineation of ring boundaries. More recently, Verheyden *et al.* (2004b), Evans & Schrag (2004), Poussart *et al.* (2004) and Poussart & Schrag (2005) have discovered annual cycles of ¹³C/¹²C and ¹⁸O/¹⁶O ratios in tropical tree rings.

Dendrochemistry, the elemental chemical analysis of wood, has been successfully tested to estimate the age of a ringless tropical species (Poussart et al., 2006); annual cycles of calcium content have been identified in a Miliusa velutina tree from Thailand. These authors used synchrotron X-ray fluorescence (SXRF), a spectroscopic technique recently applied to wood chemical analysis (Martin et al., 1998; Naftel et al., 2001; Punshon et al., 2003, 2005; Vives et al., 2005). This method is non destructive, fast, requires a very limited preparation of the samples and has a high spatial resolution. Due to its low detection limit for elements with atomic number greater than 20 (Chevallier et al., 1996; Vives et al., 2005), it is particularly well adapted to the determination of heavy metal elements. However, depth of penetration of the incident X-ray beam is not well controlled in such a heterogeneous biological material and wood porosity could impact SXRF measurements. Wood density should be characterized prior to SXRF analyses in order to quantify the exact role of anatomical variations. Mangroves are coastal forests developing in tropical and subtropical regions and adapted to saline environment. They present an alternation of a dry and a wet season each year. The high freshwater supply during the wet season and the high evaporation rate during the dry season change redox conditions, which play a key role in chemical element release from sediments in which trees are rooted (Clark et al., 1998). This large fluctuation of element availability within the year could lead to variations in tree nutrition and tree-ring content. Mangroves are disappearing at a rate of 1% per year (FAO, 2006). Knowledge of their ecological functioning is needed to establish an adequate management system (Devoe & Cole, 1998; Kairo et al., 2001). Many mangrove studies have investigated the differences in element uptake and accumulation between salt excretors and salt excluders (Clough, 1984; Field, 1984; Werner & Stelzer, 1990; Cram et al., 2002) as well as the physiological responses to salinity conditions at the leaf level (Ball & Farquhar, 1984; Suarez et al., 1998; Sobrado, 1999, 2000). More

recently, interest in mangrove soil and wood chemistry has grown up because of their sediment contamination by metals like copper, zinc and lead caused by anthropogenic activities (Tam & Wong, 2000; Machado *et al.*, 2002; MacFarlane *et al.*, 2003; Defew *et al.*, 2005).

Chemical composition of mangrove plant tissues has already been studied but most of these studies only analysed roots and leaves at a given date of the year (Kao & Chang, 1998; Alongi et al., 2003). These works focused on specific chemical elements linked to anthropogenic pollution (heavy metals and macronutrients) in natural or controlled conditions (MacFarlane & Burchett, 2000; MacFarlane & Burchett, 2002), on plant response to fertilization (Feller et al., 2003), on plant chemical composition in different controlled salinity conditions (Field, 1984; Jayasekera, 1991; Kao et al., 2001) or natural salinity conditions linked to annual sea level variations (Yu et al, 2004). These studies have shown that spatial variations in the environment of mangrove trees, including concentration of elements in sediments, as well as variations in sea salinity, are reflected in tree chemical composition.

Recently, an alternation of wood colorations in the mangrove species *Rhizophora mucronata*, has been shown to correspond to annual growth rings (Verheyden *et al.*, 2004a). However, while the rings are visible to the naked eye, there are no anatomical ring boundaries, indicating a continuous growth throughout the year. *Rhizophora mucronata* wood further also showed cyclic signals in high resolution stable isotopes profiles (δ^{18} O, δ^{13} C) (Verheyden *et al.*, 2004b) as well as high resolution vessel density profiles, which correlated to air temperature and relative humidity (Verheyden *et al.*, 2005).

In this study, we test the potential use of geochemical indicators to identify chemical elements cycles in the wood of *Rhizophora mucronata*, based on synchrotron X-ray fluorescence measurements. We also measured intra-ring wood density variations. Such a parallel investigation of wood density and wood chemical content variations using SXRF method at the intra-annual level had never been undertaken before.

2. Materials and Methods

2.1. Site conditions and sampling

The sampling site is located in Gazi Bay, Kenya (39.50°E, 4.42°S), near Mombasa, in a basin forest with tidal water. The forest has one side open to the ocean. Average salinity is 38‰. This mangrove is sheltered from strong wave action. Two seasonal rivers discharge in Gazi

Bay: Kidogoweni in the north and Mkurumuji in the south. Mean annual precipitation at Mombasa (1890-1985) was 1144 mm (Lieth, 1999). Rainfall along the Kenyan coast displays a bimodal distribution with a long (from April to July) and a short (October and November) rainy seasons (McClanahan, 1988) (Fig. 1). January and February are the driest months. Monthly average temperature ranges from 23.3°C to 29.9°C with a mean annual temperature of 26.4°C (1931-1990, Lieth, 1999). The Kenyan coastline experiences two high tides per 24 hours. This zone is permanently inundated with seawater, diluted by freshwater inputs during rainy periods and concentrated because of high evaporation during dry periods.

One stem disc from *Rhizophora mucronata* was collected in 1999 in Gazi (this sample is deposited in the xylarium of the royal Museum for Central Africa: reference number Tw 55891). It was collected 30 cm above the highest stilt roots. The tree was 6.5 m in height. The stem disc was polished up to 1200 grit to allow recognition of fine wood anatomical features and vacuum cleaned to prevent dust from accumulating in the vessel lumen.

2.2. Ring boundaries identification

Despite early reports of the absence of growth rings in R. mucronata (Panshin, 1932; Van Vliet, 1976), a recent study has proven the presence of annual growth rings, based on results obtained from cambial marking experiments as well as trees of known age collected from a plantation site (Verheyden et al., 2004a). The annual growth rings in this species consist of a low vessel density layer (which appears as a dark ring) and a high vessel density layer (which appears as a light ring) (Fig. 2). Variations in vessel density between rings are gradual and fuzzy. This lack of distinct ring boundaries suggests a continuous radial growth. Based on the results from previous cambial marking experiments, it has been shown that the formation of the low vessel density layer starts around April-May, at the beginning of the long rainy season, and ends at the end of the short rainy season (November), while formation of the high vessel density layer extends from November to March (Verheyden et al., 2004a), during the dry season. We named the former earlywood (EW) and the latter latewood (LW) because Rhizophora mucronata presents an increased rate of photosynthesis and stomatal conductance during the rainy season (Mwangi Theuri et al., 1999). Each annual ring was attributed to the year of EW formation. The studied sample displayed 19 such annual rings, from 1981 to 1999, for a total length of 54.7 mm.

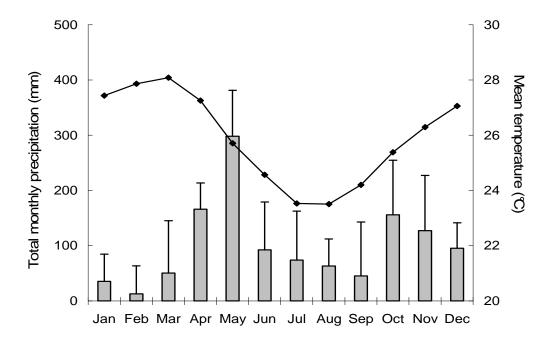


Figure 1. Mean monthly precipitation (grey bars, one standard deviation is represented) and mean temperature (solid diamonds) for the Mombasa meteorological station over the period November 1989-October 1999.

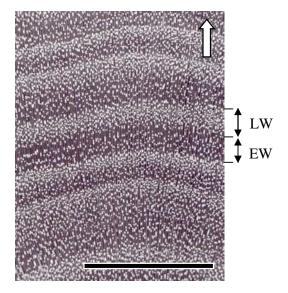


Figure 2. Transversal section of the studied stem disc showing the alternation of low vessel density earlywood (EW) and high vessel density latewood (LW). White arrow indicates the growth direction and scale bar represents 1 cm.

2.3. Densitometric measurements

A 2-mm thick and 54.7-mm long stick was cut from the sampled disc. Density was measured by a standard microdensitometric technique based on sample X-ray absorption (Polge, 1978) at INRA (National Institute for Agronomic Research) Nancy. Wood density is the wood dry mass per unit of volume and thus depends on wood porosity. Twenty spots per annual ring were analysed between the years 1981 and 1999. Thus, the measurement pace varied along the core, according to the ring widths. It was 0.17 mm on average.

2.4. Spectroscopic measurements

The synchrotron X-ray analysis took place at LURE (Laboratory for the Use of Electromagnetic Radiations) facilities (Orsay, Paris), using the D15 fluorescence beamline at the DCI storage ring. This installation is described in details by Chevallier et al. (1996). The white X-ray beam was focused and monochromatised by a Bragg-Fresnel multilayer lens. Photons of 17.5 kV were selected. A focal spot of 400 µm in diameter was selected in order to include several vessels under the beam (mean vessel diameter 67 and 71µm in early- and latewood respectively, Verheyden (2004)) and to be able to measure several spots within a ring (3.7 mm width on average). The work distance was 3.5 cm. Measurements were conducted in reflection mode at normal air atmosphere. The X-ray fluorescence spectrum was recorded with a Si(Li) detector set perpendicularly to the incident beam in the orbital plane of the synchrotron ring. The data acquisition time was 6 minutes for each spectrum. The energy resolution of Si(Li) detector was 150 eV as measured for Mn Kα peak and the detector area was 13 mm². All the wood chemical elements above Z=15 (phosphorus) could be theoretically detected in these conditions. The count rates for the detected elements were sufficiently high to ensure statistical reliability. The same stick, previously used for densitometry, was chemically analysed every 400 µm along a radial line, from the bark towards the pith, starting just after the bark zone. The X-ray incident beam was perpendicular to the transverse plane of the wood sample. In order to avoid juvenile wood and to limit the total acquisition time, only the last 10 rings, from 1990 to 1999 (more precisely, from latewood of 1989 to earlywood of 1999 inclusively) were considered. Eighty eight spots were analysed, for a total length of 35.6 mm. This sampling interval would correspond to a measurement every 42 days on average if growth rate was constant along the year. Twelve spots were analysed twice in order to get an estimate of repeatability of the measurements.

The spectra recorded by the detector were analysed with the WAPI software (Chevallier *et al.*, 1993). SXRF provides semi-quantitative results only. For each element, its wood content is calculated as peak areas which represent the sum of the atom-specific X-rays collected by the detector. Peak areas are expressed in counts per acquisition time. L rays were taken in consideration for elements with Z>40 only. Raw peak areas were corrected for the fluctuation of the incident beam intensity during the analysis. In order to make the measurements comparable among elements, peak areas were then divided, for each element, by its atomic specific coefficient which indicates the capacity to react with the beam and to release a signal in the considered matrix. In this calculation, the theoretical wood matrix composition was specified as 7% H, 54% C and 39% O.

2.5. Fourier spectral analysis

In order to detect annual cycles, all series of element concentrations and wood density were subjected to a Fourier analysis. Measurements, initially taken at equidistant intervals, were transformed into time series. For this purpose, all the spot coordinates were linearly rescaled, separately in early- and latewood of each annual ring, by using time anchor-points. These anchor points were located at the borders between early- and latewood. From previous cambial marking experiments (Verheyden et al., 2004a), we dated the beginning of early- and latewood formation in April and November respectively. This transformation allows to take into account interannual variations in growth rate and differences between early- and latewood, but cannot take into account variations within early- or latewood of a given year. Times series were detrended before analysis, by standardizing raw measurements to a zero mean and unit variance within each year. The signal was then decomposed into a sum of sine and cosine waves of increasing frequencies. Periodograms, which represent the amplitude of the signal versus frequencies, were calculated with the SPECTRA procedure of SAS 8.0 (SAS, 1999). Departure of the time series of element concentrations from a random signal (white noise) was tested using the Fisher's Kappa. This test detects the presence of one major sinusoidal component and compares its mean amplitude with amplitudes of other frequencies.

2.6. Intra- and inter-annual correlations

Correlations between elements were studied by principal component analysis (PCA), at the inter- or intra-annual levels. Inter-annual correlations were analysed after averaging all spots

over each year, leading to a 16 elements x 10 years table. In order to study intra-annual correlations between elements, long-term trends were removed before PCA by standardizing measurements to a zero mean and unit standard deviation within each annual ring, leading to a 16 elements x 88 spots table. The two first axes of each PCA were examined in order to identify elements presenting the same inter- or intra-annual patterns of variation.

3. Results

3.1. Wood density

Wood density was high, 930 kg.m⁻³ on average. It varied between 706 and 1134 kg.m⁻³ (coefficient of variation of 7%, Fig. 3o). From the fifth ring measured (year 1985), a clear annual pattern of variation appeared: earlywood, formed during the rainy season was denser (952 kg.m⁻³) than latewood formed during the dry season (900 kg.m⁻³). This annual periodicity in wood density was confirmed by the large peak observed in the periodogram at a 12-month period (Fig. 4e, Fisher's Kappa=24.4, P<0.001). There was a slight but significant tendency for wood density to increase with time (Fig. 3o).

3.2. Wood chemical composition

Sixteen elements (As, Br, Ca, Cl, Cu, Fe, Hg, K, Mn, Ni, Pb, Rb, S, Sr, Ti and Zn) were detected in *Rhizophora mucronata* by SXRF analysis (Table 1). Calcium, potassium and chlorine presented the highest average peak areas, nickel, lead, mercury and rubidium the lowest. The high coefficients of variation along the core observed for lead, titanium and nickel were associated with a strong asymmetric distribution of measured peak areas, with a high number of null or very low values and a few extreme measurements. Repeatability between two measurements, as assessed by the coefficient of variation, was better for As, Br, Ca, Cl, Cu, Fe, K, Rb, Sr and Zn (CV lower than 13%) than for the rest of the elements (CV above 42%).

Variations in element peak areas along the core were of much larger amplitudes than variations in wood density, as showed by the comparison of coefficient of variations: between 19% and 87% for most elements, and 7% only for wood density. Variations of element peak areas and wood density along the core were not systematically correlated (Table 1). Significant correlations were low and both positive (Br, Cl, K) and negative (Ca, Sr).

Element	mean of peak	variation along	repeatability	main period	Fisher's	correlation
	areas	the core	CV (%)	(months)	Kappa	with wood
		CV (%)				density
As	51	19	12	-	5.3 ^{ns}	-0.04 ^{ns}
Br	1,635	36	1	12	23.3***	0.36***
Ca	1,021,174	50	1	12	8.2**	-0.29**
Cl	148,755	36	3	15	9.8**	0.22^{*}
Cu	428	33	6	-	5.1 ^{ns}	-0.18 ^{ns}
Fe	1,860	65	10	-	5.9 ^{ns}	-0.08^{ns}
Hg	25	51	46	9	9.4**	-0.11 ^{ns}
K	317,298	24	3	10	9.9**	0.24^{*}
Mn	976	23	43	12	13.3***	0.01 ^{ns}
Ni	17	144	142	-	6.3 ^{ns}	-0.07 ^{ns}
Pb	1	278	NA	12	8.4**	-0.03 ^{ns}
Rb	26	57	9	-	5.5 ^{ns}	-0.11 ^{ns}
S	9,125	87	71	8.5	6.7^{*}	0.06 ^{ns}
Sr	4,739	44	1	12	6.8*	-0.23*
Ti	350	143	106	-	4.6 ^{ns}	-0.01 ^{ns}
Zn	522	50	6	-	6.0 ^{ns}	-0.11 ^{ns}

Table 1. Detectable chemical elements in the wood of *Rhizophora mucronata*. Mean of the SXRF peak areas over all spots measured (n=88), expressed in counts per 6 minutes for the 400 µm diameter study spot, and corresponding coefficients of variation (CV). Repeatability (NA: not acquired): coefficient of variation between two repeated measurements made on 12 spots. Fisher's Kappa: test of significance of the largest component of the periodogram; the corresponding periodicity (months) is indicated, for significant periods only (*: P<0.05, **: P<0.01, ***: P<0,001, ns: not significant).

Figure 3

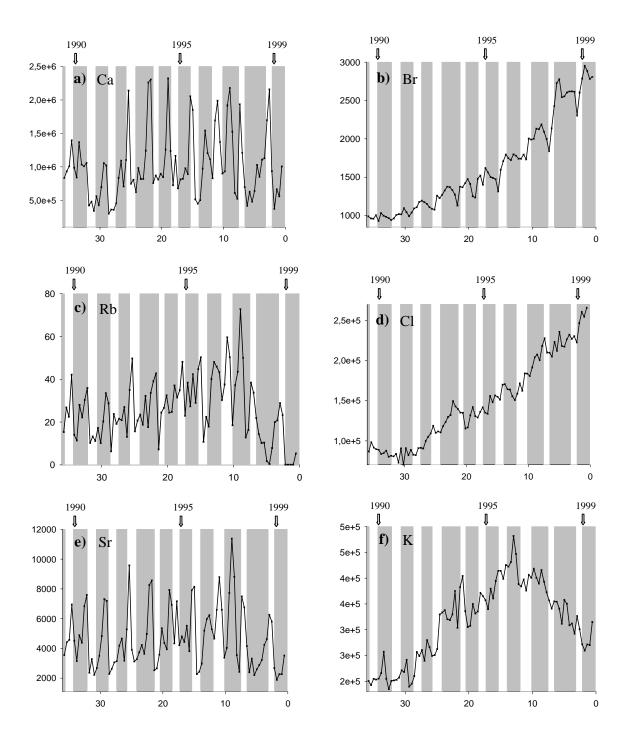


Figure 3 (continued)

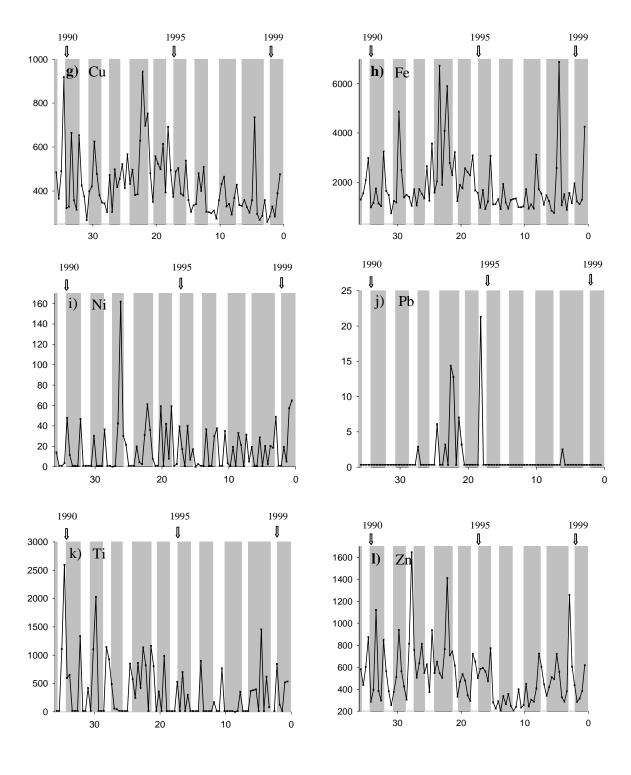


Figure 3 (continued)

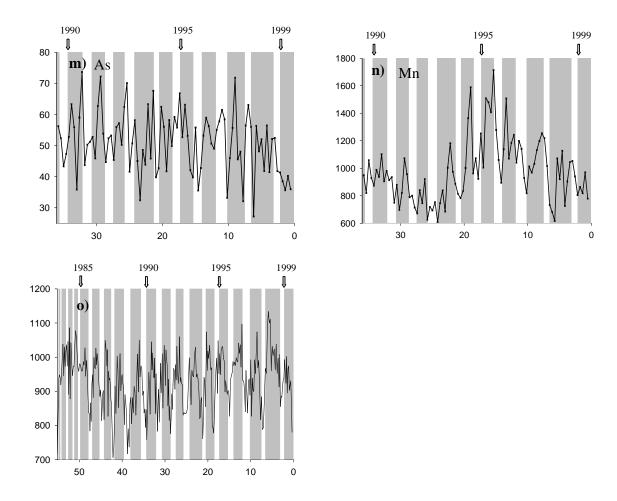


Figure 3. Variations of chemical elements peak areas (counts per 6 min), Z axis, and wood density (kg.m⁻³) along the tree core (mm) from the pith (left) to the bark (right), X axis. Earlywood and latewood are identified by grey zones and white zones, respectively. a) Ca, b) Br, c) Rb, d) Cl, e) Sr, f) K, g) Cu, h) Fe, i) Ni, j) Pb, k) Ti, l) Zn, m) As, n) Mn, o) wood density.

3.3. Intra-ring correlations between chemical elements

The principal component analysis of the intra-annual pattern for the 16 elements showed that some elements could be grouped together (Fig. 5a): calcium, rubidium and strontium on the one hand, and iron, copper and zinc on the other hand. These two groups of elements covaried at the intra-annual level which means that, within each group, elements displayed a similar seasonal pattern of variation (Fig. 3) with Pearson coefficient of correlations (r) between 0.79 and 0.90 for the first group, and between 0.46 and 0.57 for the second one. The first axis of the PCA separated bromine from other chemical elements: bromine displayed negative Pearson coefficient of correlations with most elements, especially calcium (r=-0.41), strontium, manganese and rubidium. All mentioned correlations were significant at the P<0.001 level.

3.4. Inter-annual correlations

When considering the first axis of the PCA (Fig. 5b), two groups could be identified with chlorine and bromine on the right and mercury, titanium and zinc on the left. Bromine and chlorine strongly increased from the pith to the bark (Fig. 3b,d) whereas mercury, titanium and zinc showed an opposite, but much weaker, trend (Fig. 3k,l data not shown for mercury). Potassium and manganese reached a peak in 1996 and 1995, respectively (Fig. 3f,n). Rubidium increased continuously from 1988 to 1997 and then abruptly decreased (Fig. 3c). For copper, iron and zinc, there was a tendency to display concomitant peaks of concentration (Fig. 3g,h,l). For the same 3 elements and for Ni and Pb (Fig. 3i,j), high peaks of concentration were observed in earlywood of the years 1992 or 1993, two very dry years for the considered period (1990-99).

3.5. Cyclicity in wood element content

The periodograms (Fig. 4) and the Fisher's Kappa tests (Table 1) showed a significant annual cyclicity for Br, Ca, Mn, Pb and Sr. Other elements, such as Cl, K, Hg and S displayed a significant peak of periodicity, but at different periods: 15, 10, 9 and 8.5 months, respectively. When considering the monthly values of element content averaged over the 1990-99 period (more precisely from latewood of 1989 to earlywood of 1999), two types of seasonal

Figure 4. Periodograms of wood chemical content and wood density. The spectral density (vertical axis) is expressed as a function of the Fourier spectral period (horizontal axis, expressed in months). Only elements displaying a 12-month rhythm are represented, except lead which was poorly repeatable. a) Br, b) Ca, c) Mn, d) Sr, e) wood density.

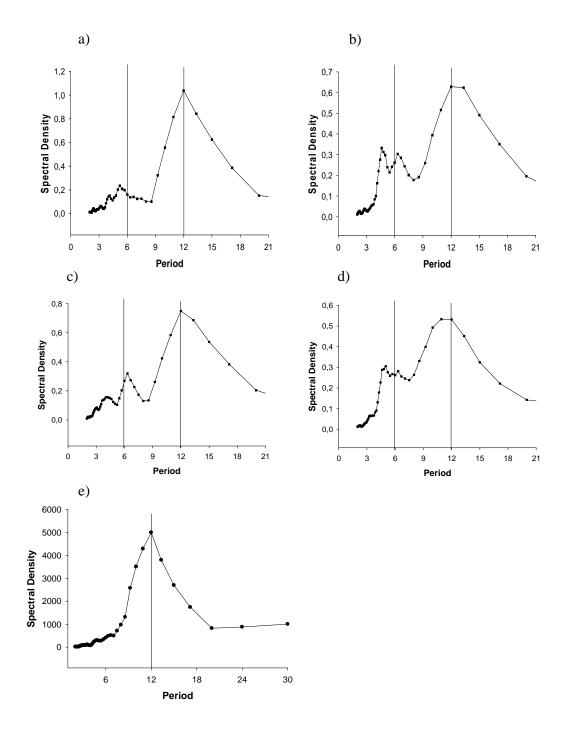
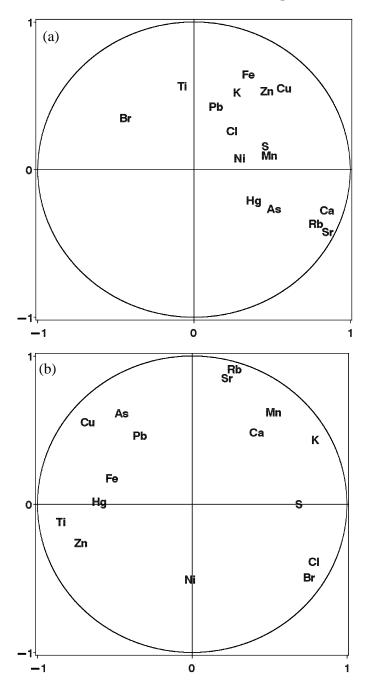


Figure 5. Principal component analysis of the correlations between element concentrations. Projection of elements in the plane of axes 1 (horizontal) and 2 (vertical). (a): analysis of intra-annual correlations after standardization to a mean value, removing inter-annual variations (16 element peak areas x 88 spots) and (b): analysis of raw correlations, taking into account inter-annual variations (16 element peak areas x 10 years, from 1990 to 1999).



variations could be distinguished (Fig. 6). Bromine displayed a unique pattern of variation: it reached a peak in May and then decreased towards November, whereas most other elements had an opposite pattern. They presented a minimum in March (Mn) or in April (Ca and Sr), before the beginning of the earlywood formation, then peaked in August (Mn) or in October (Ca and Sr). Intra-annual correlations of element contents with wood density variations were significant for Br and Ca only (Pearson correlation coefficient r=0.37, P<0.001 and r=-0.20, P<0.05 respectively). When calculated with the quantity of wood built within a month (product of wood density per ring area), instead of raw wood density, none of the intra-annual correlations with element contents were significant.

Investigations under scanning electronic microscopy coupled with EDS (energy dispersive X-ray spectroscopy) analysis showed that, in the latewood, calcium, and to lesser extent, strontium were present in crystalline form and located in rays (Fig. 7) which may correspond to oxalate crystals as already observed in African *Acacia* species (Gourlay, 1995).

4. Discussion

4.1. SXRF measurements

Sixteen elements could be detected by synchrotron X-ray fluorescence in Rhizophora mucronata wood. Few other chemical analyses of Rhizophora wood have been published (Alongi et al., 2003; see Verheyden 2004 for a synthesis). We found a similar ranking for average content of elements as that observed in previous studies: among the common elements analysed, Ca, K, Cl and S were the most abundant, Zn and Cu the less abundant, Br, Sr, Fe and Mn presenting intermediate contents. When comparing the ranking of average element contents in our study and in previous measurements made by ICP, after total ring acid mineralization, on the same tree species in the same region (including one stem disc from the same tree we sampled) (Verheyden, 2004), a very high correlation was found (r=0.92, P<0.001, n=11 elements, log-log Pearson correlation) between the two methods. Although the exact depth of X-ray penetration and fluorescence attenuation are difficult to assess with accuracy in such a heterogeneous biological material, these strong correlations with ICP measurements show that, on average, SXRF provided appropriate semi-quantitative measurements. Moreover, the absence of a general positive correlation between element peak areas provided by SXRF and wood density variations (Table 1) show that SXRF measurements are not depending on wood porosity in our sample.

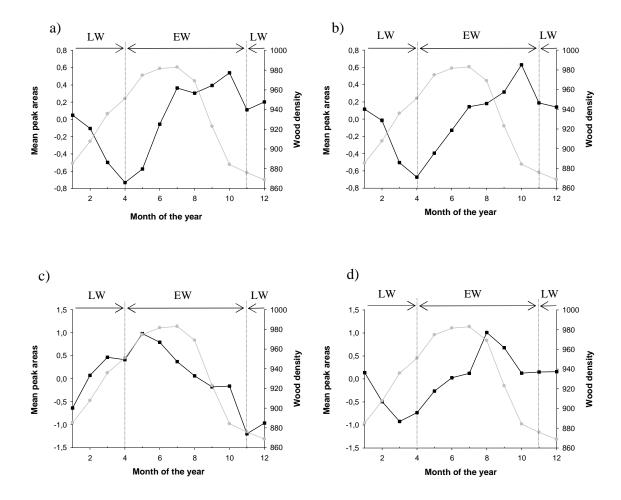
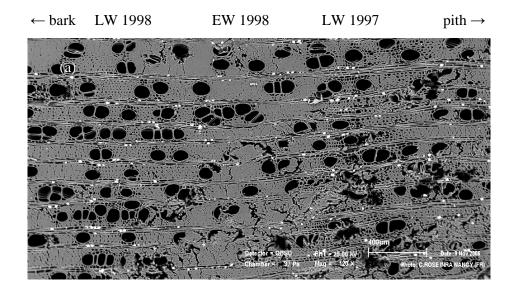
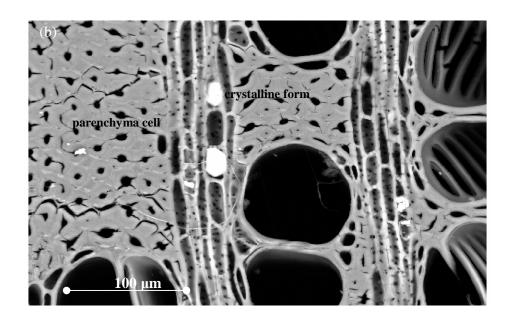


Figure 6. Variations of chemical element peak areas along the year (black line). Each spot measured by SXRF has been associated to an estimated date. For each tree ring, the beginning of earlywood was associated to April and beginning of the latewood to November. Each period (earlywood or latewood) was then divided into 7 and 5 months respectively with constant growth rate. Mean peak area for each month was finally calculated after standardization of raw measurements to a zero mean and unit variance within each year. On each graph is superimposed the variation of wood density along the year (kg.m⁻³, grey line), averaged over the 1990 to 1999 period.

a) Ca b) Sr c) Br d) Mn. Early- (from April to October) and latewood (from November to March) periods are identified.

Figure 7





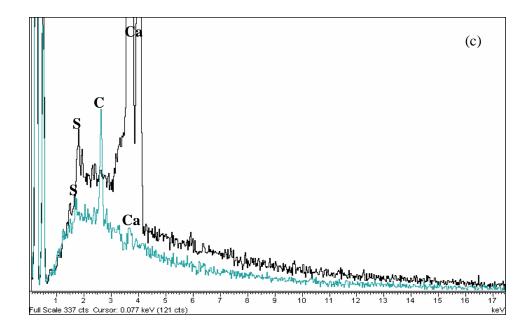


Figure 7 (continued). (a): SEM photograph of the transverse plane of *Rhizophora mucronata* wood. Bark is on the left, centre of the tree on the right. The image is centered on the 1998 earlywood (long rainy season). This low vessel density zone is bordered by the two high vessel density zones of 1997 and 1998 latewood (on the right and left, respectively). Crystalline forms which probably correspond to calcium oxalate crystals, more abundant in the latewood zones, are visible as small white dots.

- (b): detailed view of a calcium oxalate crystal in the transverse plane of *Rhizophora* mucronata wood.
- (c): EDS spectra of a 5 μ m spot centred on the previous calcium oxalate crystal (upper curve, in black) and centred on an adjacent parenchyma cell wall (lower curve, in grey). X axis corresponds to the different energies of the collected X rays and Z axis corresponds to peak high.

This suggests that SXRF may reflect elements concentrations from a superficial and thin layer of wood material.

This lack of correlation with wood density variations can also be explained by the lower amplitude of density variations between spots in comparison with those of element concentrations. Finally, SXRF was able to detect local spots of rare elements such as As, Hg and Ni. ICP analysis is usually not able to detect such spots because the amount of wood needed for measurements is too large.

4.2. Cyclicity in wood element content

A significant annual cyclicity was detected for calcium, manganese, strontium and bromine.

This was made possible because we could anchor element concentration measurements in time using wood anatomy variations, on a year to year basis. Our calculations assumed a constant growth rate within EW or LW of each year and constant dates for the transitions between EW and LW over the studied period. These two approximations could explain part of the observed shift in the calculated chemical signal from year to year and tend to flatten the seasonal patterns, which are probably sharper. However, it must be pointed out that the onset of the long rainy season varied little around April, by one month at most, between 1990 and 1999.

Calcium, strontium and manganese concentrations displayed a minimum at the end of latewood formation and increased in earlywood, during the main rainy season. Bromine concentration increased during latewood formation and peaked at the beginning of the earlywood formation. Poussart *et al.* (2006) also observed seasonality of calcium concentrations in *Miliusa velutina*, a terrestrial tropical tree.

These cycles in wood element concentrations could be explained by both external, environmental factors and internal, physiological variations. In such tropical environment, the dry season presents high evaporation rates and a reduced freshwater supply from both precipitations and incoming rivers, which increases the concentration of most seawater chemical elements (Wolanski, 1992). This external environmental cycle fits the annual variations of bromine concentrations we observed. Ca, Sr and Mn displayed an opposite cycle. Most of seawater calcium is not in an available form because calcium carbonates are formed in saturated water at high pH and high salinity levels. During the rainy season, seawater pH decreased and calcium should become more available for trees because of the progressive dissolution of carbonates and release of Ca²⁺. In forest ecosystems, strontium

behaves as calcium (Poszwa *et al.*, 2000), because of its similar ionic radius and valence. The high correlations between strontium and calcium, both at the inter- and intra-annual level, suggest that these two elements are not distinguished during root uptake. Our observation of the colocalization of calcium and strontium in crystalline forms of latewood confirms this common behaviour. Momoshima and Bondietti (1990) had already observed a constant Sr/Ca ratio vertically along the trunk of *Picea rubens*. Interestingly, patterns of variations in rubidium were similar to those of calcium and strontium.

Among internal factors which could explain the intra-annual patterns of elements, the simplest one is the dilution effect linked to variations in growth rate. For calcium, manganese and strontium, element concentrations displayed a minimum at the beginning of the main rainy season, when the growth rate increased. From density measurements, we calculated that wood mass increment, integrated along the entire circumference, increased by 55% from December to July (by a 15% increase in density and a 37% increase in basal area growth rate). This is in agreement with higher photosynthetic rates measured for *Rhizophora mucronata* during the rainy season (Mwangi *et al*, 1999). If the flux of elements to the cambium does not strictly follow this acceleration of carbon fixation during the first part of the year, a lag should appear between the increasing growth rate and element concentrations in wood, as observed for calcium, manganese and strontium (Fig. 6).

Other physiological processes could be invoked. It has been observed that leaf litter production of *Rhizophora mucronata* along the Kenyan coasts varies cyclically along the year by a factor of 3 or 4 (Slim *et al.*, 1996; Gwada & Kairo, 2001). Moreover, senescent leaves accumulate chlorine and release nitrogen (Slim *et al.*, 1996). Betoulle *et al.* (2001) also observed seasonal variations of calcium concentration in leaves of mangrove trees in French Guyana. Thus, these cycles could play a role on element concentrations in wood through remobilization and internal transfer of elements from the leaves or other reserve compartments to the trunk. However, Wang *et al.* (2003) did not observed any retranslocation before leaf abscission for Ca, Mg and Cl in *Kandelia candel* and some studies showed a very low transport of calcium from leaves to phloem (Bukovac & Wittwer, 1957; Helmisaari, 1992). Finally, Verheyden *et al.* (2005) have shown intra-annual variations in *Rhizophora* wood anatomy, with a higher density of smaller vessels built during latewood formation. Using laser ablation, Verheyden (2004) investigated relative element concentrations in different cell types (vessels, fibers and ray parenchyma) and found the highest concentrations in fibers for Cu, Mn, Pb, Zn, the highest concentrations in vessels and ray parenchyma for Ca.

Therefore, the element distribution (in particular Ca) could partially be explained by the different proportions of the wood cell types, especially vessels.

Soils of the studied mangrove are permanently flooded. However, element uptake depth in soils could vary along the year according to atmospheric climatic conditions. Because most soil characteristics probably vary vertically, including elements concentrations, salinity and soil pH, these variations of the depth of nutrient uptake could induce temporal changes in wood element concentrations.

4.3. Inter-annual variations in wood element content

Bromine and chlorine concentrations in wood displayed a parallel long-term, increasing trend. Salinity of coastal systems has been reported to increase as a result of decreasing freshwater inputs, due to higher freshwater sampled for agriculture (Kairo et al., 2001), but this trend could hardly explain the 3 times increase in wood concentration observed within the 10 years analysed. Internal, physiological factors should more likely be responsible for these trends. Translocation of several chemical elements between rings have already been shown for temperate trees (Cutter & Guyette, 1993; Nabais et al., 1999), but never studied for bromine and chlorine. Bromine and chlorine could be transported to the most external part of the trunk, thus creating an increasing trend in concentration from the pith to the bark of the tree. Aging of the tree could also lead to slow changes in wood anatomy and cell wall composition. Momoshima and Bondietti (1990) showed that ions binding capacity varies with the age of wood. The two anions Br and Cl could be less efficiently retained in older cells, in the inner part of the tree, due to a possible smaller density of anion-exchange sites. Finally, long-term changes in the depth of uptake by roots in the sediment which present specific depth distribution of salinity could also play a role in wood chemical composition (Marchand et al, 2004). Potassium and manganese displayed less conspicuous long-term variations, with a peak of concentration around the year 1996. Vanderlei et al. (1999) observed similar peaks for the same elements for an Amazon basin tree.

The typical isolated high peaks of concentration for metallic trace elements, especially copper, iron and zinc, are probably linked to variations in redox sediment conditions. Metals are more or less abundant in mangroves sediments but unavailable for plants because immobilised as sulfides (Nieboer & Richardson, 1980; Peters *et al.*, 1997; Machado *et al.*, 2002). Changes in sediment chemical properties (redox potential, pH) as a consequence of changes in temperature and precipitation could lead to their common release with punctual

peaks of concentration (Harbison, 1986; Clark et al., 1998). MacFarlane et al. (2003) showed that root copper, lead and zinc and leaf zinc contents of Avicennia marina were good temporal biological indicators of intra-annual variations in sediment concentrations. The significant correlations observed among metallic trace element concentrations in wood, both at the intra-and inter-annual levels reinforce this hypothesis. Interestingly, we measured high concentrations of copper, iron, nickel, lead and zinc in 1992 or 1993. These very dry years in Eastern and Southern Africa, which induced oxidative conditions in the sediments, are linked to an El Niño event. This link between these climatic events and wood element concentrations should be further explored.

Finally, significant annual cycles could be detected by synchrotron X-ray fluorescence in the wood chemical content of *Rhizophora mucronata* for a set of elements, calcium, manganese, strontium and bromine. We confirm here previous observations made by Poussart *et al.* (2006) on another tropical tree, but for a larger range of elements. For *Rhizophora mucronata*, wood microdensity variations alone would be an enough powerful indicator of annual ring limits, which performs even better than chemical concentrations. This might not always be the case. Thus, such studies, combining dendrochemical investigations and density measurements, should be extended to more trees, other species and other types of environment in the tropical regions.

5. Acknowledgements

This work was financially supported by the French Environment and Energy Management Agency (ADEME). We thank Pierre Gelhaye for his technical assistance and Sliman Elhani and Anne Poszwa for their scientific contribution.

References

Alongi DM, Clough BF, Dixon P, Tirendi F. 2003. Nutrient partitioning and storage in aridzone forests of the mangroves *Rhizophora stylosa* and *Avicennia marina*. *Trees* 17: 51-60.
Ball MC, Farquhar GD. 1984. Photosynthetic and stomatal responses of the grey mangrove, *Avicennia marina*, to transient salinity conditions. *Plant Physiology* 74: 7-11.

- Betoulle JL, Fromard F, Fabre A, Puig H. 2001. Caractérisation des chutes de litière et des apports au sol en nutriments dans une mangrove de Guyane française. *Canadian Journal of Botany* **79**: 238-249.
- Brienen RJW, Zuidema PA. 2005. Relating tree growth to rainfall in Bolivian rain forests: a test for six species using tree rings analysis. *Oecologia* **146**: 1-12.
- Buckley BM, Barbetti M, Watanasak M, D'Arrigo R, Boonchirdchoo S, Sarutanon S. 1995. Dendrochronological investigations in Thailand. *IAWA Journal* **16**: 393-409.
- Bukovac MJ, Wittwer SH. 1957. Absorption and mobility of foliar applied nutrients. *Plant Physiology* **32**: 428-435.
- Chambers JQ, Higuchi N, Schimel JP. 1998. Ancient trees in Amazonia. *Nature* **391**: 135-136.
- Chevallier P, Wang JX, Piccot D, Legrand F, Abbas K. 1993. Comptes-rendus de la conférence spectrométrie γ et X, Saint Rémy-Lès-Chevreuse, Notes CEA N-2756.
- Chevallier P, Dhez P, Legrand F, Erko A, Agafonov Y, Panchenko LA, Yakshin A. 1996. The LURE-ITM X-ray fluorescence photon microprobe. *Journal of Trace and Microprobe Techniques* **14**: 517-539.
- Clark MW, McConchie D, Lewis DW, Saenger P. 1998. Redox stratification and heavy metal partitioning in *Avicennia*-dominated mangrove sediments: a geochemical model. *Chemical Geology* **149**: 147-171.
- Clough BF. 1984. Growth and salt balance of the mangroves *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. and *Rhizophora stylosa* Griff. in relation to salinity. *Australian Journal of Plant Physiology* **11**: 419-430.
- Cram WJ, Torr PG, Rose DA. 2002. Salt allocation during leaf development and leaf fall in mangroves. *Trees* **16**: 112-119.
- Cutter BE, Guyette RP. 1993. Anatomical, chemical, and ecological factors affecting tree species choice in dendrochemistry studies. *Journal of Environmental Quality* **24**: 209-226.
- Defew LH, Mair JM, Guzman HM. 2005. An assessment of metal contamination in mangrove sediments and leaves from Punta Mala Bay, Pacific Panama. *Marine Pollution Bulletin* **50**: 547-552.
- Détienne P. 1989. Appearance and periodicity of growth rings in some tropical woods. *IAWA Bulletin* **10**: 123-132.
- Devall MS, Parresol BR, Wright SJ. 1995. Dendroecological analysis of *Cordial alliodora*, *Pseudobombax septenatum* and *Annona spraguei* in central Panama. *IAWA Journal* **16:** 411-424.

- Devoe NN, Cole TG. 1998. Growth and yield in mangrove forests of the Federated States of Micronesia. *Forest Ecology and Management* **103**: 33-48.
- Dünisch O, Ribeiro Montoia V, Bauch J. 2003. Dendroecological investigations on *Swietenia macrophylla* King and *Cedrela odorata* L. (Meliaceae) in the central Amazon. *Trees* 17: 244-250.
- Enquist BJ, Leffler AJ. 2001. Long-term tree ring chronologies from sympatric tropical dry-forest trees: individualistic responses to climatic variation. *Journal of Tropical Ecology* **17**: 41-60.
- Eshete G, Stahl G. 1999. Tree rings as indicators of growth periodicity of acacias in the Rift Valley of Ethiopia. *Forest Ecology and Management* **116**: 107-117.
- Evans MN, Schrag DP. 2004. A stable isotope-based approach to tropical dendroclimatology. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **68**: 3295-3305.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) 2006. Global forest resources assessment 2005. FAO, Rome, Italy, pp. 1-320. (see also http://www.fao.org/forestry/site/3652/en/).
- Feller IC, Whigham DF, McKee KL, Lovelock CE. 2003. Nitrogen limitation of growth and nutrient dynamics in a disturbed mangrove forest, Indian River Lagoon, Florida. *Oecologia* **134**: 405-414.
- Fichtler E, Clark DA, Worbes M. 2003. Age and long-term growth of trees in an old-growth tropical rain forest, based on analyses of tree rings and ¹⁴C. *Biotropica* **35**: 306-317.
- Fichtler E, Trouet V, Beeckman H, Coppin P, Worbes M. 2004. Climatic signals in tree rings of *Burkea africana* and *Pterocarpus angolensis* from semiarid forests in Namibia. *Trees* **18**: 442-451.
- Field CD. 1984. Movement of ions in tropical mangroves. *Proceeding of the Asian Symposium on Mangrove Environment Research and Management* 514-520.
- Gill M. 1971. Endogenous control of growth-ring development in *Avicennia*. *Forest Science* **17**: 462-465.
- Gourlay ID. 1995. The definition of seasonal growth zones in some African *Acacia* species A review. *IAWA Journal* **16**: 353-359.
- Gwada P, Kairo JG. 2001. Litter production in three mangrove stands of Mida Creek, Kenya. *South African Journal of Botany* **67**: 443-449.
- Harbison P. 1986. Mangrove muds A sink and a source for trace metals. *Marine Pollution Bulletin* **17:** 246-250.

- Helmisaari HS. 1992. Nutrient retranslocation in three *Pinus sylvestris* stands. *Forest Ecology and Management* **51**: 347-367.
- Jayasekera R. 1991. Chemical composition of the mangrove, *Rhizophora mangle L. Journal of Plant Physiology* **138**: 119-121.
- Kairo JG, Dahdouh-Guebas F, Bosire J, Koedam N. 2001. Restoration and management of mangrove systems-a lesson for and from the east African region. *South African Journal of Botany* **67**: 383-389.
- Kao WY, Chang KW. 1998. Stable carbon isotope ratio and nutrient contents of the *Kandelia* candel mangrove populations of different growth forms. *Botanical Bulletin of Academia* Sinica **39**: 39-45.
- Kao WY, Tsai HC, Tsai TT. 2001. Effect of NaCl and nitrogen availability on growth and photosynthesis of seedlings of a mangrove species, *Kandelia candel* (L.) Druce. *Journal of Plant Physiology* **158**: 841-846.
- Lieht H. 1999. Climate diagrams of the world. (CD-Series: Climate and Biosphere) (eds. H. Lieht, J. Berlekamps, S. Fuest and S. Riediger). Blackhuys Publishers, Leiden, The Netherlands.
- McClanahan TR. 1988. Seasonality in East Africa's coastal waters. *Marine Ecology-Progress Series* **44**: 191-199.
- MacFarlane GR, Burchett MD. 2000. Cellular distribution of copper, lead and zinc in the grey mangrove, *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. *Aquatic Botany* **68**: 45-59.
- MacFarlane GR, Burchett MD. 2002. Toxicity, growth and accumulation relationships of copper, lead and zinc in the grey mangrove *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. *Marine Environmental Research* **54**: 65-84.
- MacFarlane GR, Pulkownik A, Burchett MD. 2003. Accumulation and distribution of heavy metals in the grey mangrove, *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh.: biological indication potential. *Environmental Pollution* **123**: 139-151.
- Machado W, Moscatelli M, Rezende LG, Lacerda LD. 2002. Mercury, zinc and copper accumulation in mangrove sediments surrounding a large landfill in southeast Brazil. *Environmental Pollution* **120**: 455-461.
- Marchand C, Baltzer F, Lallier-Vergès E, Albéric P. 2004. Pore-water chemistry in mangrove sediments: relationship with species composition and developmental stages (French Guiana). *Marine Geology* **208**: 361-381.

- Martin R, Sham W, Won G, Heide P, Jones K, Song S, Protz, R. 1998. Secondary ion mass spectroscopy and synchrotron X-ray fluorescence in the study of the qualitative variation in metal content with time in tree rings. *Canadian Journal of Forest Research* **28**: 1464-1470.
- Menezes M, Berger U, Worbes M. 2003. Annual growth rings and long-term growth patterns of mangrove trees from the Bragança peninsula, north Brazil. *Wetlands Ecology and Management* 11: 233-242.
- Momoshima N, Bondietti EA. 1990. Cation binding in wood: application to understanding historical changes in divalent cation availability to red spruce. *Canadian Journal of Forest Research* **20**: 1840-1849.
- Mwangi Theuri M, Kinyamario JI, Van Speybroeck D. 1999. Photosynthesis and related physiological processes in two mangrove species, *Rhizophora mucronata* and *Ceriops tagal*, at Gazi Bay, Kenya. *African Journal of Ecology* **37**: 180-193.
- Nabais C, Freitas H, Hagemeyer J. 1999. Dendroanalysis –A tool for biomonitoring environmental pollution. *Science of the Total Environment* **232**: 33-37.
- Naftel SJ, Martin RR, Jones KW, Feng H, Savard MM, Begin C. 2001. Synchrotron radiation analysis of a smelter impacted tree-ring sample. *Canadian Journal of Analytical Sciences and Spectroscopy* **46**: 118–122.
- Nieboer E, Richardson DHS. 1980. The replacement of the nondescript term 'heavy metals' by a biologically and chemically significant classification of metals ions. *Environmental Pollution* 1: 3-26.
- Panshin AJ. 1932. An anatomical study of the woods of the Philippine mangrove swamps. *Philippine Journal of Science* **48**: 143-205.
- Peters EC, Gassman NJ, Firman JC, Richmond RH, Power EA. 1997. Ecotoxicology of tropical marine ecosystems. *Environmental Toxicology and Chemistry* **16**: 12-40.
- Polge H. 1978. Fifteen years of wood radiation densitometry. *Wood Science and Technology* **12**: 187-196.
- Poszwa A, Dambrine E, Pollier B, Atteia O. 2000. A comparison between Ca and Sr cycling in forest ecosystems. *Plant and Soil* **225**: 299-310.
- Poussart PF, Evans MN, Schrag DP. 2004. Resolving seasonality in tropical trees: multi-decade, high-resolution oxygen and carbon isotope records from Indonesia and Thailand. *Earth and Planetary Science Letters* **218**: 301-316.
- Poussart PF, Scharg DP. 2005. Seasonally resolved stable isotope chronologies from northern Thailand deciduous trees. *Earth and Planetary Science Letters* **235**: 752-765.

- Poussart PM, Myneni SCB, Lanzirotti A. 2006. Tropical dendrochemistry: a novel approach to estimate age and growth from ringless trees. *Geophysical Research Letters* **33**: L17711, doi: 10.1029/2006GL026929
- Punshon T, Bertsch PM, Lanzirotti A, McLeod KW, Burger J. 2003. Geochemical signature of contaminated sediment remobilization revealed by spatially resolved X-ray microanalysis of annual rings of *Salix nigra*. *Environmental Science and Technology* **37**: 1766-1774.
- Punshon T, Lanzirotti A, Harper S, Bertsch PM, Burger J. 2005. Distribution and speciation of metals in annual rings of Black Willow. *Journal of Environmental Quality* **34**: 1165-1173.
- Robertson I, Froyd CA, Walsh RPD, Newbery DM, Woodborne S, Ong RC. 2004. The dating of dipterocarp tree rings: establishing a record of carbon cycling and climatic change in the tropics. *Journal of Quaternary Science* **19**: 657-664.
- SAS 1999. SAS/STAT User's Guide, Version 8. SAS Institute Inc., Cary NC, USA.
- Sass U, Killmann W, Eckstein D. 1995. Wood formation in two species of *Dipterocarpaceae* in peninsular Malaysia. *IAWA Journal* **16**: 371-384.
- Slim FJ, Gwada PM, Kodjo M, Hemminga MA. 1996. Biomass and litterfall of *Ceriops tagal* and *Rhizophora mucronata* in the mangrove forests of Gazi Bay, Kenya. *Marine and Freshwater Research* **47**: 999-1007.
- Sobrado MA. 1999. Drought effects on photosynthesis of the mangrove, *Avicennia germinans*, under contrasting salinities. *Trees* 13: 125-130.
- Sobrado MA. 2000. Relation of water transport to leaf gas exchange properties in three mangrove species. *Trees* **14**: 258-262.
- Sobrado MA. 2004. Influence of external salinity on the osmolarity of xylem sap, leaf tissue and leaf gland secretion of the mangrove *Laguncularia racemosa* (L.) Gaertn. *Trees* 18: 422-427.
- Stahle DW. 1999. Useful strategies for the development of tropical tree-ring chronologies. *IAWA Journal* **20**: 249-253.
- Stahle DW, Mushoveb PT, Cleaveland MK, Roig F, Haynes GA. 1999. Management implications of annual growth rings in *Pterocarpus angolensis* from Zimbabwe. *Forest Ecology and Management* **124**: 217-229.
- Suarez N, Sobrado MA, Medina E. 1998. Salinity effects on the leaf water relations components and ion accumulation patterns in *Avicennia germinans* (L.) L. seedlings. *Oecologia* **114**: 299-304.

- Tam NFY, Wong YS. 2000. Spatial variation of heavy metals in surface sediments of Hong Kong mangrove swamps. *Environmental Pollution* **110**: 195-205.
- Vanderlei Martins J, Artaxo P, Ferraz ESB, Tabacniks MH. 1999. Chronological studies of tree-rings from the Amazon Basin using thick target PIXE and proton backscattering analysis. *Nuclear Instrumental Methods B* **150**: 240-247.
- Van Vliet GJCM. 1976. Wood anatomy of the *Rhizophoraceae*. *Leiden Botanical Series* 3: 20-75.
- Verheyden A. 2004. *Rhizophora mucronata* wood as a proxy for changes in environmental conditions. Ph. D. thesis, Brussels Univ.
- Verheyden A, Kairo JG, Beeckman H, Koedam N. 2004a. Growth rings, growth ring formation and age determination in the mangrove *Rhizophora mucronata*. *Annals of Botany* **94**: 59-66.
- Verheyden A, Helle G, Schleser GH, Dehairs F, Beeckman H, Koedam N. 2004b. Annual cyclicity in high-resolution stable carbon and oxygen isotope ratios in the wood of mangrove tree *Rhizophora mucronata*. *Plant Cell and Environment* 27: 1525-1536.
- Verheyden A, De Ridder F, Schmitz N, Beeckman H, Koedam N. 2005. High-resolution time series of vessel density in Kenyan mangrove trees reveal a link with climate. *New Phytologist* **167**: 425-435.
- Vives AES, Silva RMC, Medeiros JG da S, Tomazello Filho M, Barroso RC, Zucchi OLAD, Moreira S. 2005. Accumulation of elements in annual tree rings measured by synchrotron X-ray fluorescence analysis. *X-Ray Spectrometry* **34**: 411-416.
- Wang WQ, Wang M, Lin P. 2003. Seasonal changes in element contents in mangrove element retranslocation during leaf senescence. *Plant and Soil* **252**: 187-193.
- Werner A, Stelzer R. 1990. Physiological responses of the mangrove *Rhizophora mangle* grown in the absence and presence of NaCl. *Plant Cell and Environment* **13**: 243-255.
- Wolanski E. 1992. Hydrodynamics of mangrove swamps and their coastal waters. *Hydrobiologia* **247**: 141-161.
- Worbes M. 1989. Growth rings, increment and age of trees in inundation forests, savannas and a mountain forest in the neotropics. *IAWA Bulletin* **10**: 109-122.
- Worbes M. 1995. How to measure growth dynamics in tropical trees a review. *IAWA Journal* 16: 337-351.
- Worbes M. 1999. Annual growth rings, rainfall-dependent growth and long-term growth patterns of tropical trees from the Caparo forests reserve in Venezuela. *Journal of Ecology* **87**: 381-403.

- Worbes M. 2002. One hundred years of tree-ring research in the tropics a brief history and an outlook to future challenges. *Dendrochronologia* **20**: 217-231.
- Yu KF, Zhao JX, Liu TS, Wang PX, Qian JL, Chen TG. 2004. Alfa-cellulose δ^{13} C variation in mangrove tree rings correlates well with annual sea level trend between 1982 and 1999. Geophysical Research Letters **31**, L11203, doi:10.1029/2004GL019450.

7. Impact d'une fertilisation NPKCa sur la composition chimique du bois de hêtre (*Fagus sylvatica* L.) - Etude des transferts internes d'éléments entre les cernes.

Depuis le début des années 1980, l'étude des cas de dépérissements forestiers observés en Europe a permis de mettre en évidence une relation étroite entre l'intensité des symptômes mesurés sur les arbres (jaunissement des feuilles, niveau de défoliation) et des carences nutritives pour certains éléments minéraux au niveau foliaire (notamment Ca et Mg) (Ulrich et al, 1979; Ulrich, 1980; Zech et Popp, 1983; Zötll et Mies, 1983; Krause et al, 1987; Landmann et al, 1987, 1988). Dans un écosystème forestier, les déficits nutritionnels, qu'ils soient simples ou multiples, peuvent influencer significativement la production forestière. Dans les cas les plus extrêmes, ils peuvent engendrer une diminution de la vitalité des arbres par une perte massive de feuilles, la mortalité des cimes, des nécroses le long du tronc et conduire à la mort de l'arbre (Ulrich et al, 1979; Ulrich, 1983; Nys 1989).

Afin d'accroître la fertilité de ces sols pauvres, deux types d'apports peuvent être effectués (Duchaufour, 1985; Toutain et al, 1988): 1) la fertilisation qui consiste à appliquer une substance (engrais) au sol ou sur le feuillage afin d'assurer une croissance optimale des arbres 2) l'amendement qui consiste à apporter au sol une substance (calcaire, calco-magnésienne...) afin d'en améliorer ses propriétés physico-chimiques (Bonneau, 1995). L'objectif d'un amendement n'est pas, comme pour la fertilisation, d'augmenter la production forestière à court terme mais de restaurer la fertilité chimique du sol (pH, taux de saturation en cations) via une amélioration du cycle biogéochimique et de l'activité biologique.

Ce type de pratique n'est pas très répandu en France en partie en raison du mode passé de gestion forestière qui préconisait d'adapter, dans chaque station, les espèces forestières à la fertilité du milieu (Bonneau, 1966).

Ce n'est qu'à la fin des années cinquante que sont jetées les bases de la fertilisation forestière en France par Duchaufour (1958). Les exportations de matière végétale étant faibles et la durée de vie des peuplements longue, les apports devraient permettre non seulement une amélioration immédiate de la nutrition des arbres mais aussi le maintien ou la restauration d'une minéralisation active de la matière organique du sol (Bonneau, 1966). De manière plus générale, le processus normal d'évolution des sols forestiers acides au cours du vieillissement des peuplements est une acidification croissante qui conduit, à plus ou moins long terme, à un

disfonctionnement racinaire, à des problèmes de mycorhization et à des carences nutritives pour les arbres (Toutain et al, 1988) qui peuvent être corrigés par des apports adéquats.

Des effets favorables de la fertilisation sur la productivité de nombreuses espèces résineuses ont été mis en évidence (Bonneau et al, 1972; Nys, 1981; Lemoine, 1993; Fehlen et Picard, 1994). Les essais de fertilisation sur des espèces feuillues sont moins nombreux (Garbaye et al, 1974; Diagne, 1982; Becker et al, 1996; Bonneau, 1996; Marsalle, 1996) et montrent un effet positif et durable de la fertilisation sur la croissance des arbres. Généralement, la fertilisation et l'amendement améliorent la qualité nutritive des sols via une augmentation de son pH, de sa CEC et de sa teneur en divers cations essentiels à la plante (Toutain et al, 1988; Houle et al, 2002; Wargo et al, 2002; Pernes-Debuyser, 2004).

La mise en place du diagnostic foliaire permet de détecter d'éventuels déséquilibres nutritionnels via une analyse chimique des feuilles et la comparaison avec des tables de statut nutritionnel (Bonneau, 1988). Les résultats de Liu et al (1994) suggèrent que les problèmes de déficience foliaire en K chez *Acer saccharum* peuvent être améliorés par une fertilisation par divers cations couplée à un amendement (K₂SO₄, CaCO₃, CaMg(CO₂)₂). Wargo et al (2002) ont mis en évidence un effet favorable du chaulage sur la vitalité du houppier *d'Acer saccharum* dépérissants. Moore et Ouimet (2006) ont mis en évidence un effet significatif et durable (10 ans) d'un chaulage sur la composition chimique foliaire en calcium et sur la vigueur du houppier d'*Acer saccharum* diminuant ainsi le dépérissement de ces arbres soumis à des dépôts acides importants.

Quelques rares études se sont intéressées à la composition chimique du bois et notamment à ses variations au cours du temps suite à des fertilisations ou à des amendements. Ces études montrent une augmentation des teneurs en Ca et K, en N et en P dans le bois et une diminution en Mn suite à une fertilisation NPK (Finer et Kaunisto, 2000) ou une augmentation des teneurs en N, P, Ca et aucun effet sur les teneurs en K et Mg suite à un amendement calcique et dolomitique couplé à une fertilisation NPK dans une plantation de *Picea abies* (Ingerslev, 1999).

Les expériences de fertilisation et/ou amendement à une date précise au cours du développement des arbres constituent d'excellents dispositifs pour l'étude des potentialités de la chimie du bois comme bio-indicateur temporel rétrospectif des variations de l'environnement. Ces modifications brusques de l'environnement chimique des arbres devraient être visibles au niveau de la composition chimique des cernes des arbres mis en place à la même période. Cependant, les transferts latéraux, qui entraînent des modifications de la composition chimique des cernes après leur formation, de certains éléments chimiques

peuvent diminuer fortement, voire empêcher d'utiliser la composition chimique des cernes comme un indicateur rétrospectif des modifications de la chimie du sol (DeWalle et al, 1991; Houle et al, 2002). Ces transferts internes dépendent de différents paramètres évoqués dans le chapitre I (paragraphes 3.2.2 et 4.2) et V. Kashuba-Hockenberry et DeWalle (1994) suggèrent que les teneurs en divers cations dans les cernes de *Quercus coccinea* peuvent être utilisées afin de détecter des changements de la chimie du sol suite à un chaulage; néanmoins, les transferts internes liés à la conduction du bois d'aubier, jusqu'à 10 années avant et après le chaulage, ne permettent pas de déterminer la date précise de l'événement.

Ces possibles transferts internes doivent être quantifiés car ils modifient le message chimique préenregistré dans les cernes limitant ainsi les potentialités d'utiliser la composition chimique du bois comme un indicateur rétrospectif des conditions environnementales dans lesquelles l'arbre a poussé.

Afin d'étudier les effets d'une fertilisation NPKCa sur la nutrition du hêtre et d'estimer les potentialités de cette espèce pour les études rétrospectives de l'acidification des sols (qui implique souvent des modifications de la disponibilité en calcium), nous avons déterminé la composition chimique des cernes de hêtres d'une futaie de l'ouest de la France par SXRF (Synchrotron X-ray Fluorescence). Les cernes annuels de croissance formés avant (1960-1972) et après (1974-1987) la fertilisation effectuée en 1973 ont été analysés chimiquement pour 4 arbres témoins et 4 arbres fertilisés. Les différences de teneurs entre arbres témoins et fertilisés devraient permettre de conclure quant aux effets de la fertilisation sur la nutrition des arbres. La distribution temporelle des éléments nous apportera des informations sur les transferts internes.

Matériel et méthode

Site d'étude

Le site d'étude se situe en forêt domaniale de Fougères (Ouest de la France, Ile-et-Vilaine) dans une jeune futaie de hêtres (*Fagus sylvatica*) (Gruat, 1995 ; Tillier 1995). Il est situé sur un plateau en pente faible ; l'altitude est comprise entre 115 et 191 m. Le climat est de type océanique tempéré avec des températures douces et ne présentant pas de forts écarts annuels (moyenne annuelle de 11,2 °C pour la période 1966-95 ; relevée à la station météorologique de Fougères). La pluviométrie totale annuelle est d'environ 900 mm et est répartie de manière assez homogène au cours de l'année.

Dispositif expérimental et échantillonnage

Un dispositif expérimental de fertilisation a été installé en 1972 par F. Le Tacon et H. Oswald dans les parcelles 75 et 77, au lieu dit « Le Cordon des Druides » (Figure 1). Le peuplement forestier comprenait 95% de hêtres issus d'une régénération naturelle et était traité en futaie. L'âge moyen des arbres était de 92 ans en 2003. Des éclaircies régulières, environ tous les 6 ans, ont été effectuées. Le peuplement repose sur une épaisse couche de limons éoliens. Le sol est de type brun acide faiblement lessivé mais non hydromorphe (Tillier, 1995). Le dispositif comprenait initialement 7 traitements (Témoin, N, P, Ca, NCa, NPCa, NPKCa) répartis entre ces 2 parcelles avec pour chaque traitement 4 répétitions. Seuls les traitements témoin et NPKCa seront analysés dans cette étude. Le traitement témoin n'a subit aucune fertilisation. Le traitement NPKCa constitue un traitement complet avec plusieurs apports :

- 100 kg/ha de N apporté sous forme d'ammonitrate en mai 1973, renouvelé en mai 1974;
- 150 kg/ha de P₂O₅ apporté sous forme de super triple en avril 1973 ;
- 150 kg/ha de K₂O apporté sous forme de sulfate de potassium en avril 1973 ;
- 1500 kg/ha de CaO apporté sous forme de CaCO₃, en mai 1973.

Pour notre étude nous avons échantillonné une parcelle unitaire (répétition) parmi les 4 parcelles unitaires fertilisées NPKCa (F4) et une parcelle unitaire parmi les témoins (T2). Ces deux parcelles unitaires ont été choisies de manière à être très proches l'une de l'autre afin de limiter les variations spatiale liées au sol (Figure 1). En raison du faible nombre d'échantillons que nous pouvions analyser au LURE, cette stratégie était préférable à celle, plus classique, d'une répartition des arbres échantillonnés dans toutes les parcelles unitaires, même si elle présente un certain risque.

Prélèvement des échantillons de bois

Quatre arbres témoins et 4 arbres fertilisés (NPKCa) ont été carottés à cœur en septembre 2003. Ces arbres ont été choisis dans l'étage dominant. Les années correspondant à chaque cerne de croissance ont été repérées.

Analyse chimique du bois

L'analyse chimique du bois a été effectuée par SXRF (Synchrotron X-Ray Fluorescence) au LURE (Laboratoire d'Utilisation du Rayonnement Electromagnétique) à Orsay (Paris) sur la ligne D15 de l'anneau de stockage DCI. Cette installation est décrite en détail par Chevallier

et al. (1996). Les rayons X blancs ont été focalisés et monochromatisés par une lentille multicouche Bragg-Fresnel. Les photons de 17,5 kV ont été sélectionnés. La taille du spot de mesure était de 400 µm de diamètre de manière à inclure plusieurs vaisseaux sous le faisceau. La distance de travail, c'est à dire la distance entre l'échantillon et le détecteur, était de 3,5 cm. L'ensemble des mesures a été réalisé en mode réflexion à atmosphère ambiante. Les spectres de rayonnements X engendrés ont été collectés par un détecteur Si(Li) positionné perpendiculairement par rapport au faisceau incident. Le temps d'acquisition d'un spectre pour chaque point de mesure était de 6 min. La résolution du détecteur est de 150 eV pour la raie Kα du manganèse et la surface du détecteur était de 13 mm². Ces réglages de l'appareil permettent de détecter l'ensemble des éléments du tableau périodiques à partir du numéro atomique Z=15 (phosphore). Le nombre de coups qui correspond au nombre de rayons X détectés pour un élément chimique donné était suffisant pour assurer une bonne fiabilité statistique. Une analyse chimique a été effectuée dans chaque cerne de croissance de l'arbre dans le plan radial tangentiel, plus précisément depuis le milieu du cerne 1960 jusqu'au milieu du cerne de 1988 (13 ans avant la date de fertilisation, en 1973, et 15 ans après cette date). Pour certains arbres des mesures complémentaires ont été effectuées dans les cernes plus récents jusqu'en 2003. Les spectres collectés par le détecteur Si(Li) ont été analysés grâce au logiciel WAPI (Chevallier et al, 1993). Pour chaque élément chimique, son contenu dans le bois a été calculé comme la somme de l'ensemble des rayons X collectés et spécifiques d'un atome donné; on parle de surface de pics. Ces surfaces sont exprimées en coups par temps d'acquisition (dans notre cas ce sont des coups par 6 min). Les raies L ont été considérées pour les éléments dont Z était supérieur à 40. Les surfaces de pics obtenues ne correspondent pas à des concentrations ; les mesures SXRF sont semi quantitatives. Pour un élément donné, le nombre de rayons X collectés par le détecteur est proportionnel au nombre de rayons X incidents (flux de rayons X arrivant à la surface de l'échantillon). Ces variations du faisceau incident ont été importantes (le courant initial dans l'anneau DCI a varié entre 252 et 315 mA). Nous avons donc corrigé l'ensemble des mesures afin d'en tenir compte.

Afin de permettre une comparaison des mesures entre éléments chimiques, les surfaces de pics ont également été divisées pour chaque élément par un coefficient spécifique. Ce coefficient correspond à la capacité pour un atome d'être excité par le faisceau incident et d'émettre un rayonnement X caractéristique dans la matrice bois. Pour ce calcul, nous avons considéré une composition chimique moyenne de la matrice de bois : 7% H, 54% C et 39% O.

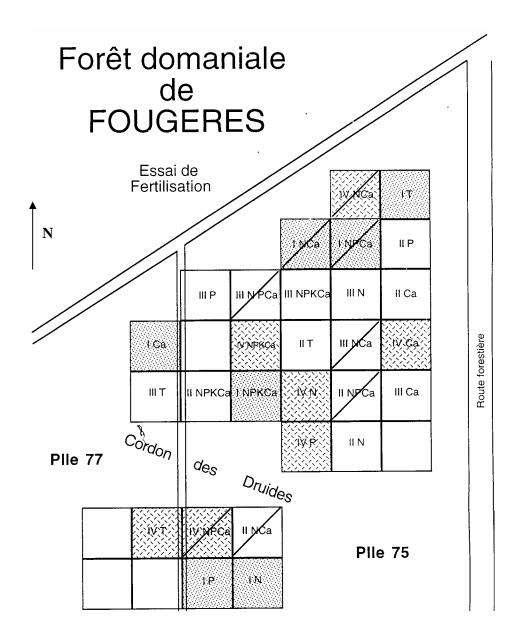


Figure 1 : Plan du dispositif expérimental de la forêt de Fougères (parcelles 75 et 77). Les placettes unitaires échantillonnées sont II T (témoin) et IV NPKCa (fertilisée). Echelle : 1/2000.

Résultats

Composition chimique globale du bois - Comparaison entre arbres témoins et fertilisés

L'analyse en composantes principales (ACP) du tableau des 15 éléments détectés (liste au Tableau I) x 232 cernes (29 cernes/arbre x 4 arbres/traitement x 2 traitements) analysés permet de résumer les principaux résultats obtenus. L'axe 1 regroupe tous les éléments chimiques d'un même côté (positif, Figure 4). C'est donc un simple axe de richesse chimique globale. Il représente 30% de la variance totale. Les cernes se différencient donc tout d'abord en fonction de leur richesse en éléments, ces richesses étant fortement corrélées entre tous les éléments. Les éléments les plus caractéristiques de cette richesse globale sont Rb, Zn, Hg, K, Ca et Br.

Il existe un fort effet arbre sur cette richesse globale (Figure 3a), un peu plus net chez les arbres fertilisés que chez les arbres témoins : certains arbres sont riches en tous éléments (arbre 13 par exemple), d'autres pauvres en tous éléments (arbre 12). Mais il existe aussi un effet du traitement sur cette richesse globale, plus fort encore que l'effet arbre : le traitement fertilisé est globalement plus riche en tous éléments que le traitement témoin (Figure 2 et Tableau 1). Enfin, il existe un effet de la période de mesure sur cette position sur l'axe 1 de l'analyse en composantes principales, mais chez les arbres traités uniquement : ils sont plus riches en tous éléments après la fertilisation qu'avant.

Mais le résultat le plus intéressant apparaît sur l'axe 2 de cette ACP. Quelques éléments chimiques différencient fortement les arbres traités et témoins (Figure 2). Une analyse de variance de l'effet traitement pour chaque élément (Tableau 1) montre des différences significatives de teneur pour presque tous les éléments analysés, sauf le plomb et le cuivre. Les arbres fertilisés présentent de plus fortes teneurs en Br, Ca, Hg, K et de plus faibles teneurs en Ba, Mn et Sr comparés aux arbres témoins. Les différences les plus significatives portent sur les teneurs en mercure : 65% de la variance totale des mesures expliquée par le seul effet de la fertilisation. Il apparaît un effet arbre significatif sur cet axe 2, mais curieusement, c'est dans le groupe des 4 arbres témoins qu'il se manifeste le plus nettement (Figure 3a). De même, il apparaît un effet année, visible uniquement parmi les cernes des arbres témoins (Figure 3b).

Tendances temporelles, transferts internes d'éléments chimiques

Brome (Figure 5)

Les arbres fertilisés présentent des teneurs moyennes plus élevées pour la plupart des années mesurées. Sur l'ensemble des arbres, mis à part les arbres 12 et 27, la teneur en Br dans le bois reste assez stable au cours du temps ou diminue légèrement depuis 1960 vers les cernes plus récents. L'arbre 13 (NPKCa) montre cette même tendance temporelle néanmoins le pic de concentration observé en 1977 le différencie des autres arbres. Ce même arbre présente de plus fortes teneurs que l'ensemble des autres arbres sur la période 1960-1983.

Calcium (Figure 6)

Les arbres fertilisés sont en moyenne situés à des teneurs plus élevées en Ca que les arbres témoins. L'ensemble des arbres, mis à part l'arbre 1 (NPKCa), montre une tendance à une légère diminution de la teneur en Ca au cours du temps depuis 1960 vers les cernes plus récents. L'arbre 1 (NPKCa) montre un important pic en 1974, juste après la date de fertilisation de 1973, ainsi qu'un pic en 1963 puis sa teneur en Ca augmente vers les cernes les plus externes de l'arbre.

Mercure (Figure 7)

Tous les arbres témoins montrent une diminution de leur contenu depuis 1960 vers les cernes les plus récents. Pour les arbres fertilisés, la tendance n'est pas aussi régulière et elle dépend de l'arbre. Les arbres fertilisés présentent des teneurs supérieures aux témoins sur l'ensemble de la période, mis à part l'arbre 12 (NPKCa).

Potassium (Figure 8)

Globalement, la teneur en K augmente au cours du temps pour l'ensemble des arbres. L'arbre 12 (NPKCa) reste nettement en dessous des valeurs mesurées pour les autres arbres fertilisés. En 1974, l'arbre 1 (NPKCa) montre un pic de concentration en K.

Manganèse (Figure 9)

L'arbre 27 (Témoin) se différencie nettement des autres arbres avec des teneurs beaucoup plus importantes sur la période 1960-1985 mis à part en 1974-75, lors du pic de concentration de l'arbre 1 (NPKCa). Les arbres témoins présentent dans l'ensemble plus de Mn que les arbres fertilisés.

Strontium (Figure 10)

Les teneurs en Sr des arbres témoins sont supérieures à celles des arbres fertilisés. Pour les arbres témoins, on peut distinguer 2 pics de concentration, l'un durant la période 1970-75 et l'autre entre 1989-94. Les arbres fertilisés ne montrent pas de tendance significative au cours du temps.

Sur l'ensemble de ces figures, l'arbre 27 (Témoin) se différencie des autres arbres en 1986 par une diminution notable des teneurs en Ca, Hg, K, Mn, Sr et dans une moindre mesure Br. Pour cette date et ces éléments, les teneurs mesurées deviennent nulles. Il pourrait s'agir d'un problème analytique. Cependant, les teneurs restent normales pour les autres éléments.

Tableau 1 : Analyse de la variance (ANOVA) de l'effet traitement (2 classes : NPKCa / Témoin) sur les concentrations obtenues (1 mesure par année et par échantillon) pour chaque élément chimique. La part de la variance expliquée par un effet du traitement est indiquée (%), ainsi que la probabilité associée (*** = P < 0.001, ** = P < 0.001, * = P < 0.005, ns = non significatif). Les surfaces de pics moyennes (nombre de coups par 6 min) sont également spécifiées pour chacun des traitements.

Elément	Probabilité	R ² (%)	Surface de pics moyenne (arbres NPKCa)	Surface de pics moyenne (arbres témoins)
As	***	5.3	59	49
Ba	***	20.7	6607	8918
Br	***	39	87	38
Ca	***	19.6	394 486	302 923
Cu	ns	-	-	-
Fe	**	4.4	2172	3593
Hg	***	65	3073	985
K	***	18.6	478 482	331 709
Mn	***	13.5	48 664	61620
Ni	***	5.2	105	72
Pb	ns	-	-	-
Rb	***	4.9	261	219
Sr	***	12.9	376	453
Ti	**	4.8	843	556
Zn	*	2.2	966	847

Figure 2 : Analyse en composantes principales du tableau des 15 éléments détectés x 232 cernes analysés. Projection des cernes (individus) dans le plan des axes 1 et 2. On a représenté le traitement, témoin ou fertilisé.

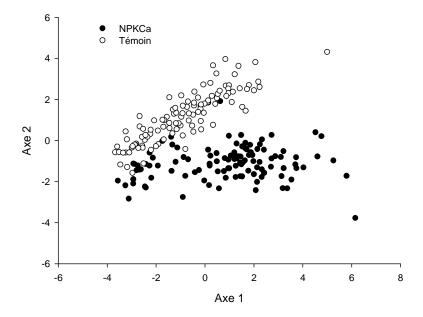
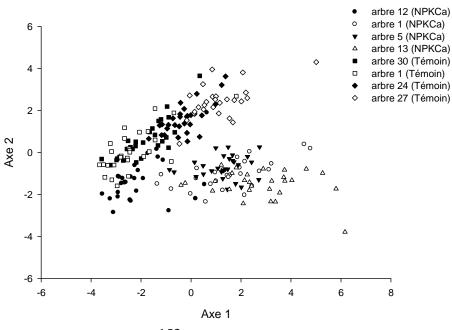


Tableau 2 : Analyse de la variance (ANOVA) de l'effet arbre par traitement sur les concentrations obtenues (1 mesure par année et par échantillon) pour chaque élément chimique. La part de la variance expliquée par un effet arbre est indiquée (%), ainsi que la probabilité associée (*** = P<0,001, ** = P<0,01, * = P<0,05, ns = non significatif).

Elément	Probabilité Témoin	R ² (%) Témoin	Probabilité NPKCa	R ² (%) NPKCa
As	***	39	***	76
Ba	ns	-	***	25
Br	***	46	***	38
Ca	***	59	***	32
Cu	*	7.4	***	54
Fe	***	42	**	13
Hg	***	31	***	78
K	***	61	***	76
Mn	***	80	***	26
Ni	***	60	***	19
Pb	ns	-	ns	-
Rb	***	46	***	62
Sr	***	46	***	39
Ti	**	11.7	Ns	-
Zn	***	28	***	54

Figure 3 : Analyse en composantes principales du tableau des 15 éléments détectés x 232 cernes analysés. Projection des cernes (individus) dans le plan des axes 1 et 2. (a) : Représentation de la position des cernes de chaque arbre. (b) : Représentation de la position des cernes de chaque année.

(a)





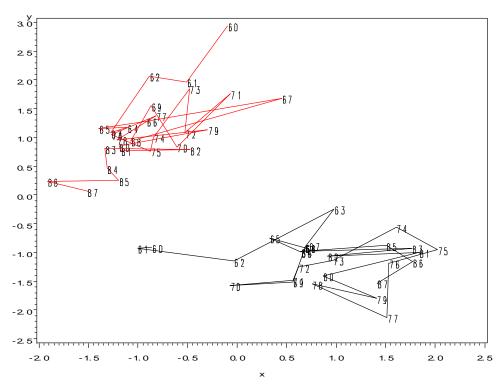
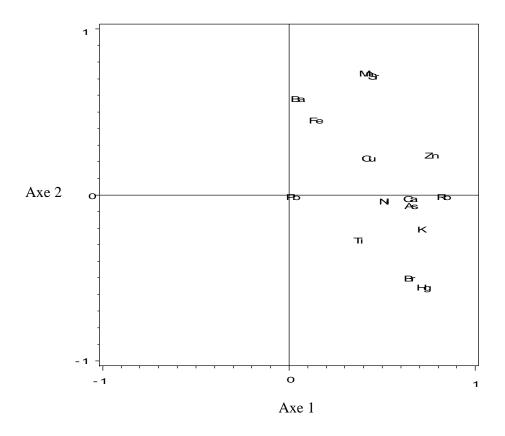


Figure 4 : Analyse en composantes principales du tableau des 15 éléments détectés x 232 cernes analysés. Projection des éléments chimiques (variables) dans le plan des axes 1 et 2.



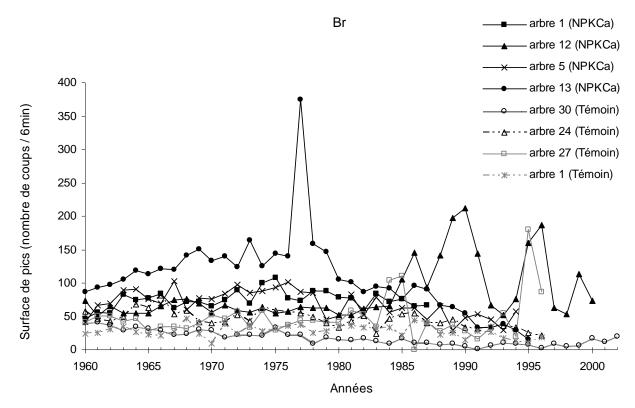


Figure 5

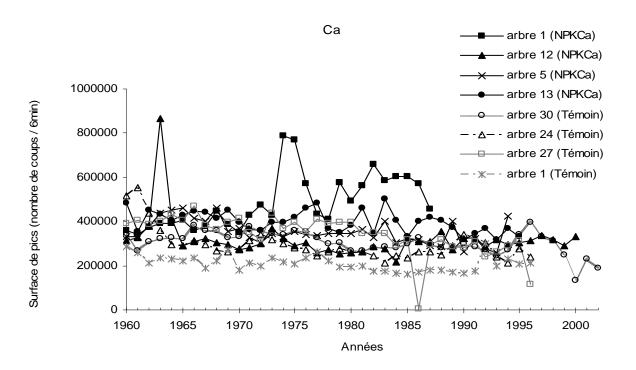


Figure 6

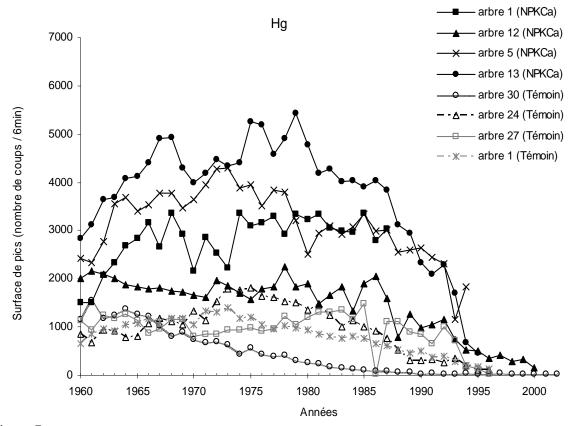
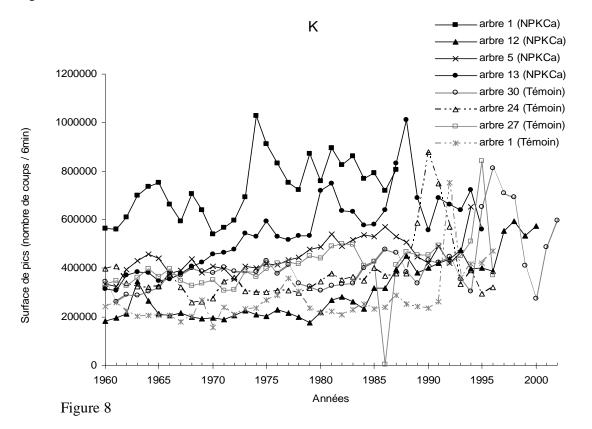
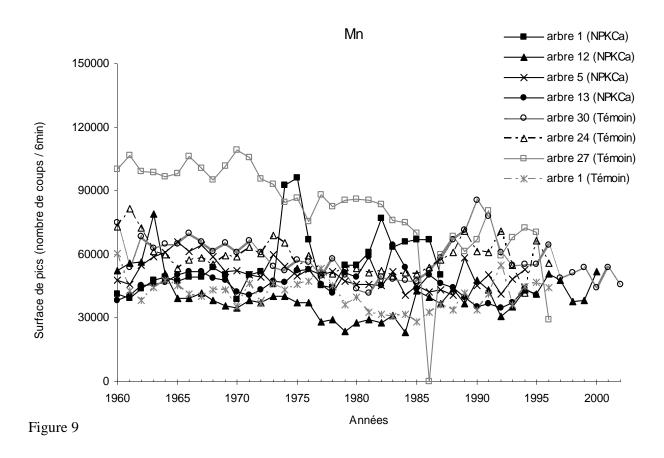


Figure 7





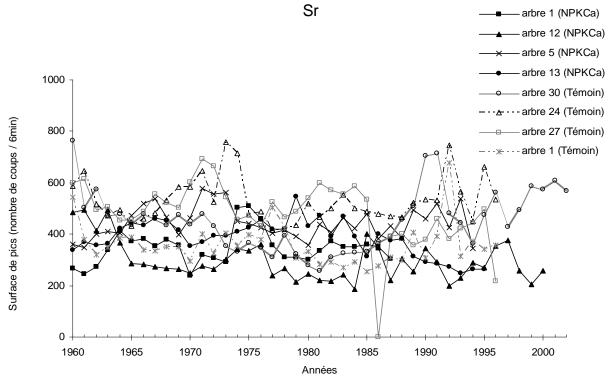


Figure 10

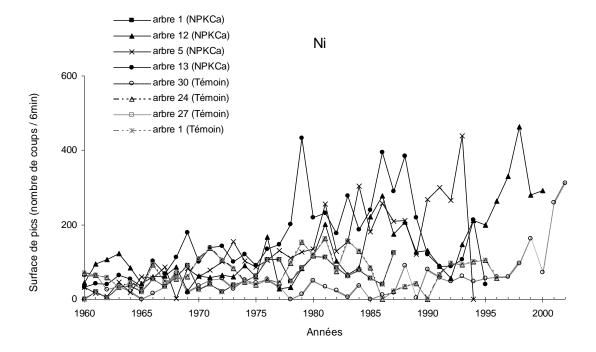


Figure 11

Figures 5 à 11 : Teneurs en éléments chimiques (respectivement par ordre des figures, Br, Ca, Hg, K, Mn, Sr, Ni) au cours du temps pour les différents arbres témoins et NPKCa.

Discussion

La fertilisation NPKCa a conduit à une augmentation des concentrations dans les cernes de Fagus sylvatica en As, Br, Ca, Hg, K et Rb. Le brome et le mercure sont particulièrement caractéristiques de ces changements. Les arbres fertilisés montrent par contre des concentrations plus faibles en Ba, Mn et Sr comparés aux arbres témoins. En considérant que les conditions stationnelles étaient identiques avant la fertilisation, puisque les 2 sites échantillonnés sont côte à côte, les variations de la disponibilité en éléments liées à la fertilisation sont la seule explication aux différences observées. Dans les cas où cette disponibilité augmente, on peut se poser la question de savoir s'il s'agit d'une augmentation due directement à l'apport dans le fertilisant, ou contrôlée indirectement par des modifications de la biodisponibilité des éléments du sol induites par le fertilisant. Pour les éléments traces en particulier, il serait intéressant de connaître leur teneur dans le fertilisant apporté, ce dont nous ne disposons pas. Le fabricant de ce fertilisant assure que les teneurs en éléments traces sont inférieures à 0,5 ppm pour tous les éléments, sauf As (1 ppm). Dans ces conditions, qui méritent vérification, il n'est pas possible par exemple d'expliquer le triplement de la concentration en mercure observé dans les cernes des arbres fertilisés et il faut alors invoquer un effet indirect sur la disponibilité du mercure dans le sol.

Une diminution de la teneur en Mn et Sr dans le bois avait était déjà été observée par Kashuba-Hockenberry et DeWalle (1994) pour *Quercus coccinea* après chaulage. Au niveau des feuilles, Moore et al (2006) ont mis en évidence une diminution de la concentration en Mn suite à un chaulage. Le chaulage conduirait à une diminution de la teneur en Mn dans les horizons supérieurs du sol, et ceci seulement 3 ans après le traitement (Long et al, 1997) Tillier (1995) a montré, sur le même site que celui de cette étude, une augmentation du pH et de l'activité biologique du sol suite à la fertilisation NPKCa. Ces changements de la chimie du sol peuvent conduire à une diminution de la solubilité du Mn (chapitre V) réduisant ainsi sa disponibilité pour les arbres (Guyette et al, 1992b).

Pour la plupart des éléments, les différences de concentration observées entre le traitement témoin et le traitement fertilisé le sont aussi bien avant qu'après la date de fertilisation. Un seul élément fait exception à cette règle, le nickel, pour lequel on observe une augmentation dans le traitement fertilisé et uniquement après 1973. Les transferts internes postérieurs à la mise en place des cernes peuvent expliquer les différences de concentrations observées entre les traitements fertilisé et témoin dans les cernes élaborés avant la date de fertilisation, de 1960 à 1972. Ces transferts internes peuvent être de deux types. Ils peuvent être latéraux, avec

échanges d'éléments entre la zone externe et la zone interne de l'arbre, via les rayons ligneux par exemple. Mais ils peuvent être aussi verticaux, avec rééquilibrage du contenu chimique des cellules avec celui de la sève brute. Dans le cas du hêtre, de nombreuses plages de cellules restent vivantes de nombreuses années après leur formation, dans l'intérieur du tronc. La délimitation de l'aubier même est difficile voire impossible. Ces cernes encore actifs peuvent continuer à échanger des éléments avec la sève. En effet, les tissus conducteurs du bois se comportent comme une colonne échangeuse d'ions. Les cations précédemment fixés peuvent être remplacés par de nouveaux ions circulants (Momoshima et Bondietti, 1990). Les ions ainsi dissociés de leur site de fixation sont entraînés via le flux de sève vers les parties aériennes de la plante. Si le contenu de la sève change, celui des cellules pourra donc aussi changer. Pour Mn par exemple, on observe une diminution de sa concentration sur l'ensemble des carottes des arbres fertilisés, après mais aussi avant la date de fertilisation. Cette diminution peut s'expliquer par une baisse de la teneur de la sève en Mn après la fertilisation, baisse qui se répercuterait sur les cernes fabriqués avant 1973 mais qui seraient encore traversés par la sève brute. Ces rééquilibrages internes affectent l'ensemble des cernes que nous avons mesurés. Cela étant, nous n'avons analysé qu'une période de 13 années avant et 14 années après la date de fertilisation, et il est difficile de conclure quant à l'étendue maximale possible de ces rééquilibrages internes.

La présence des pics de concentrations en Ca et K entre 1974-75, juste après la fertilisation pour l'arbre 1 (NPKCa) fait de cet arbre un bon indicateur rétrospectif des conditions stationnelles dans lesquelles il s'est développé. Cependant, l'existence d'un pic de Mn à la même période est plus difficilement compréhensible. En effet, les causes évoquées dans le paragraphe précédent portent à croire que l'indication de la fertilisation doit se faire par une diminution de la teneur en Mn des cernes. Hutchinson et al (1998) ont observé la même tendance dans les cernes d'*Acer saccharum* mais suite à une fertilisation acidifiante (NH₄)₂SO₄; les cernes formés durant les 2 années de fertilisation montraient des teneurs élevées en Mn. Il est ainsi difficile de conclure quant aux causes de la présence de ce pic de Mn pour cet arbre.

Pour le strontium, les arbres fertilisés présentent en moyenne des teneurs plus faibles que les témoins; cette tendance serait liée à une substitution de Sr par Ca. En effet, ces deux cations présentent des caractéristiques similaires et ne sont pas dissociés lors de l'absorption racinaire (Poszwa et al, 2000); le rapport Sr/Ca de la solution du sol dirigerait le ratio dans la sève circulante et ainsi serait un bon indicateur des conditions de nutrition des arbres.

Les raisons de la diminution de concentration de Ba dans le bois des arbres fertilisés restent inconnues. A notre connaissance, cet effet n'a encore jamais été mis en évidence.

Les effets d'une fertilisation ou d'un amendement sur le pH et la composition chimique du sol pouvent être visibles plusieurs années après le traitement (Toutain et al, 1988; Pernes-Debuyser et Tessier, 2004); il est ainsi normal que ces tendances soient mesurables dans les cernes sur de larges périodes. Les fortes concentrations en Ca et K mesurées dans le bois des arbres fertilisés montrent que les cernes des arbres peuvent être des indicateurs de la modification de la composition chimique du sol. Néanmoins, un seul arbre fertilisé montre un pic de concentration en Ca et K juste après la période de fertilisation. Mis à par le K qui montre de fortes concentrations au niveau des cernes proches de l'écorce et qui sont liées à son implication dans le métabolisme de l'arbre (McClenahen et al, 1989), l'absence de pics caractéristiques et notamment dans les cernes proches de la date de fertilisation implique un rééquilibrage interne des éléments chimiques entre cernes de croissance. Dans notre étude, ce phénomène se manifeste par de plus fortes teneurs moyennes en Ca dans le bois pour les arbres fertilisés comparé aux témoins. Houle et al (2002) avaient également fait l'hypothèse de rééquilibrages internes pour les éléments Mg et Mn suite à un chaulage dolomitique d'Acer saccharum déficients en calcium.

Les variations au cours du temps des concentrations en Ca, K et Mn ont permis de mettre en évidence des comportements très différents entre arbres d'un même traitement. Les arbres échantillonnés étaient tous d'âges très proches (82 ans en moyenne) et cette cause de variabilité inter-arbre doit donc être écartée. Certaines études ont montré un effet significatif et fort de la fertilisation sur la croissance en diamètre des arbres dominants accentuant ainsi les écarts entre arbres de la strate dominante (Becker 1992; Lebourgeois et al, 1993; Marsalle, 1996). Dans notre étude, l'arbre 1 (NPKCa), le plus dominant, est le seul à présenter un pic caractéristique en Ca et K suite à la fertilisation de 1973. Avec l'arbre 13, il présente des concentrations moyennes pour la plupart des éléments plus élevées que celles mesurées dans les deux autres arbres fertilisés (Figure 3). Or, ces deux arbres 1 et 13 sont de plus gros diamètre. A l'inverse, l'arbre 12 et l'arbre 5 qui sont de plus petit diamètre présentent le plus souvent des niveaux de concentrations inférieurs. Ils avaient été notés sur le terrain comme ayant un statut co-dominant à dominant, et non dominant strict. Ces résultats suggèrent un effet différentiel de la fertilisation selon le statut social de l'arbre avec un plus fort apport nutritif pour les arbres les plus dominants. Ces différences pourraient s'expliquer par des accès préférentiels des arbres dominants aux ressources nutritives et ceci par un système racinaire plus efficace. Cette augmentation de l'efficacité de prélèvement ne se fait néanmoins

pas par une augmentation de la synthèse de racines fines mais par une optimisation des racines en place en limitant le turnover racinaire (Bakker, 1998).

L'existence de fortes variations entre arbres que ce soit au niveau des concentrations moyennes dans le bois ou au niveau des tendances temporelles implique que pour cette étude la composition chimique du bois de *Fagus sylvatica* n'est pas un bon indicateur des changements de la chimie du sol et la datation précise d'événements liés à la disponibilité en Ca, K ou Mn paraît compromise. La présence de nombreux cernes actifs implique de nouveaux rééquilibrages entre les ions contenus dans la sève circulante et les ions précédemment fixés le long du xylème réduisant ainsi les potentialités bioindicatrices à l'échelle du cerne annuel (Cutter et Guyette, 1993). Herbauts et al. (2002) on montré que K présente une mobilité potentielle importante car il est trésent à 75 % sous une forme hydrosoluble dans le bois de *Fagus sylvatica*.

En conclusion, les transferts internes de Ca, K et Mn sont importants dans le bois de *Fagus sylvatica* limitant ainsi la possibilité de leur utilisation pour l'étude rétrospective temporelle de l'acidification des sols. On retrouve et confirme par contre le résultat obtenu au chapitre V : les variations spatiales de la composition du sol, induites par la fertilisation, se traduisent par des différences très significatives dans la composition du bois. Les teneurs en éléments majeurs, Ca et K, et en Mn permettent d'identifier sans ambiguïté les arbres issus du placeau fertilisé de ceux issus du placeau témoin. Un résultat nouveau est apparu au cours de cette étude : la fertilisation provoque des modifications importantes de la bio-disponibilité pour de nombreux éléments traces. Dans un contexte de projet de mise en œuvre d'amendements à grande échelle, il nous paraît important d'approfondir la compréhension de ces effets.

De fortes différences entre arbres ont été observées aussi bien au niveau des concentrations moyennes qu'au niveau des tendances temporelles ; la fertilisation favoriserait la nutrition des arbres dominants. Afin d'optimiser les résultats obtenus, il serait nécessaire de multiplier le nombre d'arbres échantillonnés ainsi que le nombre de sites, en essayant de limiter la variabilité interstationnelle, et de procéder à une analyse de l'ensemble des années de chaque échantillon, en particulier jusqu'au cœur de l'arbre. Il serait intéressant de tester les effets de la fertilisation sur des essences où l'aubier est mieux délimité, telles que les chênes.

Conclusion générale

Notre travail visait à répondre à certaines questions écologiques majeures concernant la nutrition et la bio-indication des conditions environnementales via la dendrochimie. Pour ce faire, nous avons testé l'utilisation de méthodes de mesure basées sur la spectrométrie de rayonnement X des atomes (EDS, SXRF), encore peu utilisées à ce jour en dendrochimie, pour mesurer la composition chimique du bois en divers éléments. Ces méthodes offrent l'avantage de pouvoir s'abstenir des phases longues et parfois dangereuses de minéralisation nécessaires aux mesures par ICP, méthode majoritairement utilisée pour les études dendrochimiques. Néanmoins, elles n'étaient pas adaptées, a priori, aux échantillons complexes comme le bois brut.

Ainsi, cette thèse visait également à développer un aspect purement méthodologique lié à la préparation, au conditionnement et à la mesure chimique du bois par ces méthodes nouvelles et en particulier par EDS, ce système analytique étant disponible dans notre laboratoire.

Au cours de cette thèse, trois études ont été menées via l'utilisation des méthodes SXRF ou EDS. La première étude, par EDS, testait les potentialités bio-indicatrices de la chimie du bois pour l'estimation des conditions nutritionnelles d'un site forestier. Les résultats obtenus montrent que la composition chimique en Ca, K et Mn de cernes de hêtre varie significativement en fonction du type de sol, calcaire ou acide. Les variations de concentration en Mn étaient fortement corrélées au pH du sol. La teneur en cations du bois pourrait donc être considérée comme un indicateur des contraintes nutritionnelles liées à l'acidité du sol. Dans ce cadre, le ratio Ca/Mn apparaît comme l'indicateur le plus discriminant. D'hors et déjà, ce résultat permet d'envisager certaines applications très prometteuses. Des contacts ont par exemple été établis avec des archéologues qui cherchent à déterminer l'origine des bois retrouvés dans des sites anciens. Dans certains cas, ils cherchent juste à départager deux zones potentielles d'origine qui justement se trouvent sur des substrats géologiques contrastés. Notre technique pourrait répondre à cette question.

Ces variations entre sites se retrouvent également au niveau du contenu en Mn et Ca de l'écorce suggérant que le contenu chimique de l'écorce pourrait potentiellement être utilisé comme un outil de diagnostic nutritionnel. Les mesures y sont plus fiables et rapides en raison de concentrations plus élevées d'un facteur 10 environ. Cette perspective est d'autant plus intéressante que l'écorce est facilement accessible au prélèvement. Il serait donc intéressant

de continuer et développer ces analyses, qui pourraient constituer une piste alternative au diagnostic foliaire. Il faudrait étendre nos observations à de plus larges gammes de sols afin de tester plus précisément ce caractère bio-indicateur du bois. La comparaison de la composition chimique du bois et de l'écorce entre arbres sains et dépérissants pourrait aussi être intéressante.

Des différences significatives de concentrations entre aubier et cœur ont été mesurées pour K. Pour Ca et Mn, ces variations entre l'intérieur et l'extérieur de l'arbre dépendaient du type de sol, acide ou calcaire. Ce résultat suggère que le site d'origine d'un arbre peut influencer les tendances observées dans la composition chimique du bois et qu'il est nécessaire de tenir compte de ce facteur dans l'interprétation des tendances à long terme mises en évidence dans des arbres provenant de sites différents.

La deuxième étude abordait la problématique de la datation des arbres tropicaux. La composition chimique du bois mesurée par SXRF a été testée comme un outil alternatif afin de détecter une cyclicité d'ordre annuel au sein du bois d'une espèce tropical de mangrove Rhizophora mucronata. Les résultats ont mis en évidence une cyclicité annuelle pour Br, Ca, Mn et Sr. Ces cycles pourraient être liés à des variations saisonnières de la salinité de l'eau et des conditions redox du sédiment, ainsi qu'à des remobilisations internes d'éléments chimiques liées au cycle phénologique de l'arbre. Ces résultats sont importants car ils sont les premiers obtenus pour cette espèce, et ce n'est que la deuxième fois que des rythmes dans le contenu chimique du bois sont observés dans une espèce tropicale. Bien que préliminaires, ces résultats sont prometteurs car ils nous ont permis de mettre évidence la possible utilisation de la composition chimique du bois comme un repère cyclique temporel dans le bois d'espèces tropicales. Ils doivent cependant être confirmés sur un plus grand nombre d'arbres de la même espèce voire d'autres espèces et pour de plus grandes séries temporelles. Nous envisageons de reprendre le même type d'étude en Guyane cette fois, où la recherche forestière est bien implantée. Il existe dans ce territoire des écosystèmes terrestres où l'âge des arbres est connu car ils ont été plantés. Dans certains sites, des mesures régulières du diamètre pratiquées depuis plusieurs dizaines d'années permettraient même de reconstruire la croissance radiale passée. Ces sites constituent des terrains privilégiés où tester la dendrochimie en tant que marqueur de rythme annuel de croissance chez les arbres tropicaux.

La troisième étude a également été menée par SXRF. La comparaison de la composition chimique du bois de hêtre (*Fagus sylvatica* L.) entre deux sites, un site fertilisé NPKCa et un

site témoin, montre un effet significatif et fort de la fertilisation sur les teneurs moyennes en Br, Ca, Hg et K du bois. Notamment, Hg et Br pourraient être des indicateurs de fertilisation passée des sols. Là encore, nos études sont préliminaires et nécessitent d'être confirmées sur plus d'arbres, dans d'autres expériences de fertilisation et sur d'autres essences. Il faudra vérifier rapidement en particulier si l'importante augmentation des éléments traces suite à la fertilisation est bien le résultat d'une augmentation de leur disponibilité dans le sol ou si les fertilisants n'étaient pas eux-mêmes contaminés, bien que cette dernière hypothèse paraisse peu probable. Il faut souligner en tous cas l'importance, pour la dendrochimie comme pour d'autres domaines de la recherche forestière, de ces expériences anciennes de fertilisation et d'amendement qui constituent un patrimoine précieux à conserver et entretenir. Elles fournissent de très intéressantes expériences en milieu naturel de « marquage » de l'environnement par une perturbation trophique brutale. Les fortes variations entre arbres d'un même traitement au niveau des tendances temporelles de Ca, K et Mn, mais surtout l'importance des transferts internes mis en évidence dans cette expérience diminuent les possibilités d'utiliser la chimie des cernes de hêtre comme indicatrice, à l'échelle annuelle, des conditions environnementales dans lesquelles l'arbre s'est développé; en particulier la reconstruction de l'acidification passée du sol paraît compromise. Le statut de dominance de l'arbre au sein du peuplement conditionnerait au moins en partie les différences observées entre les arbres; ce point devrait être approfondi et ceci notamment via une comparaison au niveau du fonctionnement racinaire (profondeur de prélèvement, efficacité du prélèvement...). Une meilleure compréhension des causes de la variabilité inter-arbre du contenu chimique du bois permettrait d'améliorer l'utilisation de la dendrochimie en tant que marqueur des variations de l'environnement si elle permet par exemple de mieux orienter le choix des arbres lors de l'échantillonnage. D'hors et déjà, les arbres dominants, comme souvent dans les études de bio-indication, semblent à privilégier.

Les études que nous avons menées sur le hêtre conduisent, entre autres conclusions, au fait que les transferts internes d'éléments perturbent et même empêchent l'utilisation du contenu chimique des cernes comme bio-indicateur temporel fin des variations de l'environnement. Ce résultat s'explique principalement par la distribution du flux de sève, chez cette espèce, sur un grand nombre de cernes. Il va à l'encontre de nombreux résultats publiés précédemment où le contenu en cations ou en éléments traces métalliques des cernes était utilisé pour marquer des effets de l'acidification des sols ou des dépôts atmosphériques, respectivement. Le choix de cette espèce avait été guidé par le fait que c'est l'une des plus ubiquistes dans les forêts du

Nord-Est de la France, un atout important pour la bio-indication. Il va donc falloir maintenant tester et rechercher d'autres espèces. Les résineux sont bien sûrs de bons candidats, et c'est d'ailleurs sur eux que la plupart des études dendrochimiques antérieures avaient porté. Mais le chêne, pour lequel on sait que la sève ne circule que dans les tous derniers cernes, voire le dernier cerne uniquement en année normale, et qui présente une zone d'aubier de taille bien définie est à tester. Le fait que nous ayons pu mettre en évidence des rythmes annuels de concentrations chez *Rhizophora* montre clairement que toutes les espèces ne présentent pas de forts transferts internes pour tous les éléments. Il faut aussi noter que les études publiées jusqu'à maintenant en dendrochimie n'ont pas toujours pris la précaution de prendre en compte l'importance des transferts internes dans l'interprétation des résultats obtenus. Il reste un travail important de caractérisation de ces transferts internes pour les principales essences d'intérêt. Dans ce but, des expériences de marquage, isotopiques mais aussi en effectuant des apports d'éléments traces au sol, seraient à mener. Elément par élément, il serait intéressant de trouver des fractions de bois dans lesquelles ils sont moins mobiles, comme cela a déjà était fait pour le carbone avec la cellulose.

Concernant la méthode EDS, les concentrations chimiques obtenues sont, en général, plus élevées que celles mesurées par ICP. Les échantillons de bois doivent être lyophilisés avant l'analyse chimique par EDS. Une cartographie préalable de la distribution des éléments chimiques au sein de l'échantillon est préconisée afin d'optimiser la taille et le nombre de zones de mesures à effectuer dans le cas de mesures de composition chimique globale. Un protocole de préparation et d'analyse des échantillons de bois a été établi au cours de cette thèse néanmoins certains points restent à éclaircir : 1) l'influence de l'orientation de la carotte de bois sous le faisceau incident, 2) le planage qui doit être amélioré afin de limiter les déformations des rayonnements incidents et émergents et les contaminations potentielles. L'automatisation de l'acquisition des coordonnées des points d'analyse à partir des mesures d'accroissements des cernes permettrait de gagner en résolution d'une part et de diminuer le temps nécessaire à la mise en route de l'analyse chimique d'autre part. Selon l'échelle de mesure à laquelle on se place, il serait intéressant de procéder à un étude plus poussée des différences de compositions chimiques entre types de tissus (rayons, fibres, bois de printemps, bois d'été, parenchyme...). Enfin, l'utilisation du système WDS, que notre laboratoire va prochainement acquérir, devrait permettre de détecter des éléments traces et d'améliorer la résolution des mesures pour les éléments peu abondants; ceci notamment pour Mn qui s'avère souvent en limite de détection pour l'EDS.

Pour la méthode SXRF, nos résultats ont montré que, bien que les mesures ne soient pas strictement quantitatives, elles permettent : 1) de classer, pour un élément, les différents échantillons entre eux, et 2) de classer les éléments chimiques par ordre d'abondance. Pour les éléments répartis de façon homogène dans le bois, tel que le potassium, la mesure est quasiment quantitative. Notre laboratoire est en cours de négociation afin de bénéficier d'un accès au nouveau rayonnement synchrotron, SOLEIL, qui remplace le dispositif du LURE. Nous essayons aussi d'accéder au rayonnement synchrotron de l'ESRF à Grenoble. Il faut reconnaître que ces méthodes basées sur la fluorescence X à partir d'un rayonnement synchrotron ne seront probablement jamais d'un accès banal pour les dendrochimistes.

En conclusion, pour les aspects méthodologiques, la composition chimique d'échantillons de bois bruts par SXRF et EDS a montré des différences significatives entre les traitements comparés lors des diverses études environnementales réalisées. De plus, il semblerait que 1) les valeurs obtenues en EDS et SXRF pour le K, bien que semi-quantitatives, s'approchent de valeurs quantitatives, et 2) les valeurs obtenues en SXRF permettent d'ordonner, dans certains cas, les éléments chimiques par ordre d'abondance. Mais la comparaison de ces méthodes entre elles et avec la méthode de référence de l'ICP ne peut être que très limitée. En effet, elles ne mesurent pas la même chose : bois total en ICP, contenu de la surface des parois en spectrométrie. Les questions qui se posent réellement sont plutôt de deux ordres : (1) quelle cible de mesure, quel compartiment du bois est le plus adéquat en fonction d'un objectif d'analyse donné? et (2) Comment établir des standards de mesure fiables, adaptés au bois, en spectrométrie? Sur la première question, nous avons montré dans cette thèse que, en raison de la rapidité de mise en œuvre des méthodes spectrométriques, en particulier sous microscope électronique, elles sont aujourd'hui probablement plus performantes que les méthodes classiques pour la détection de variations spatiales dans le contenu en éléments majeurs du bois. La deuxième question n'a pas reçu de réponse satisfaisante aujourd'hui.

En conclusion, pour les aspects biologiques, les résultats obtenus sur le potentiel caractère bio-indicateur de la chimie du bois 1) des conditions de pH du sol, 2) d'une cyclicité interne d'ordre annuel pour l'espèce tropicale de mangrove, 3) de mobilités internes d'éléments chimiques, et 4) de fertilisations passées du sol, permettent de conclure que cet outil est tout à fait probant et présente un large panel d'applications qui reste encore à développer.

Références bibliographiques

Aerts R., Chapin F. S. III. (2000) The mineral nutrition of wild plants revisited: a re-evaluation of processes and patterns. *Adv. Ecol. Res.*, 30, 1-67.

Amato I. (1988) Tapping tree rings for the environmental tales they tell. *Analyt. Chem*, 60, 1103-1107.

André F., Ponette Q. (2003) Comparison of biomass and nutrient content between oak (*Quercus petraea*) and hornbeam (*Carpinus betulus*) trees in a coppice-with-standards stand in Chimay (Belgium). *Ann. For. Sci.*, 60, 489-502.

Andrews J. A., Siccama T. G., Vogt K. A. (1999) The effect of soil nutrient availability on retranslocation of Ca, Mg and K from senescing sapwood in Atlantic white cedar. *Plant Soil*, 208, 117-123.

Andrews J. A., Siccama T. G. (1995) Retranslocation of calcium and magnesium at the heartwood-sapwood boundary of Atlantic white cedar. *Ecology*, 76, 659-663.

Arp P. A., Manasc J. (1987) Red spruce stands downwind from a coal-burning power generator: tree-ring analysis. *Can. J. For. Res.*, 18, 251-264.

Augustin S., Stephanowitz H., Wolff B., Schröder J., Hoffmann E. (2005) Manganese in tree rings of Norway spruce as an indicator for soil chemical changes in the past. *Eur. J. Forest Res.*, 124, 313-318.

Augusto L., Ranger J., Ponette Q., Rapp M. (2000) Relationships between forest tree species, stand production and stand nutrient amount. *Ann. For. Sci.*, 57, 313-324.

Baes III C. F. (1985) Elemental analysis of tree rings. Cambial Act., 2, 2–8.

Baes III C. F., McLaughlin S. B. (1984) Trace elements in tree rings: evidence of recent and historical air pollution. *Science*, 224, 494-497.

Baes C. F., Ragsdale H. L. (1981) Age-specific lead distribution in xylem rings of three tree genera in Atlanta, Georgia. *Environ. Pollut. (Series B)*, 2, 21-35.

Bakker M. (1998) Effets des amendements calciques sur les racines fines de chêne (*Quercus petraea* et *robur*) : conséquences des changements dans la rhizosphère. Thèse de Doctorat, Université Nancy I, 287 p.

Balsberg Påhlsson A. M. (1992) Influence of nitrogen fertilization on minerals, carbohydrates, amino acids and phenolic compounds in beech (*Fagus sylvatica* L.) leaves. *Tree Physiol.*, 10, 93-100.

Bamber R. K., Fukazawa K. (1985) Sapwood and heartwood: a review. *Forestry Abst.*, 46, 567-580.

Bamber R. K. (1976) Heartwood its function and formation. Wood Sci. Technol., 10, 1-8.

Barber S. A. (1995) Soil nutrient bioavailability: a mechanistic approach, John Wiley & Sons.

Barnes D., Hamadah M. A., Otaway J. M. (1976) The lead, copper and zinc content of tree rings and bark. *Sci. Total. Environ.*, 5, 63-67.

Barrois A. (1989) Pénétration corticale et distribution d'un fongicide dans un jeune plant forestier. Rapport de DEA de Biologie Végétale et Forestière, Université de Nancy I, 62 p.

Beadle N. C. W., White G. J. (1968) The mineral content of the trunks of some Australian woody plants. *Proc. Ecol. Soc. Aust.*, 3, 55-60.

Becker M., Lévy G., Lefèvre Y. (1996) Radial growth of mature pedunculate and sessile oaks in response to drainage, fertilization and weeding on acid pseudogley soils. *Ann. Sci. For.*, 53, 585-594.

Becker M. (1992) Radial growth of mature silvers firs (*Abies alba* Mill.) fertilized in 1969. Interaction of climate and competition. In "Tree rings and Environment". Proceedings International symposium "Tree rings and Environment", Ystad (Sweden), 3-9 September, 1990, Lundqua report, 34, 17-21.

Bell C. W., Biddulph O. (1963) Translocation of calcium: exchange versus mass flow. *Plant Physiol.*, 38, 610-614.

Berger T. W., Köllensperger G., Wimmer R. (1994) Deposition of atmospheric constituents and its impact on nutrient budgets of oak forests (*Quercus petraea petraea* and *Quercus robur*) in Lower Austria. For. Ecol. Manage., 70, 183-193.

Bergkvist B. F. L. (1992) Soil acidification and element fluxes of a *Fagus sylvatica* forest as influenced by simulated nitrogen deposition. *Water, Air, and Soil Pollution*, 65, 111-133.

Bondietti E. A., McLaughlin S. B. (1992) Evidence of historical influences of acidic deposition on wood and soil chemistry. *In*: Atmospheric deposition and forest nutrient cycling. Johnson D.W and Lindberg S.E. Springer-Verlag (eds), 358-377.

Bondietti E. A., Baes C. F., McLaughlin S. B. (1989) Radial trends in cation ratios in tree rings as indicators of the impact of atmospheric deposition on forests. *Can. J. For. Res.*, 19, 586-584.

Bonneau M. (1996) Sessile oak seedling fertilization and leaf mineral composition in western France. *Ann. Sci. For.*, 53, 605-613.

Bonneau M. (1995) Fertilisation des forêts dans les pays tempérés. ENGREF (Ed.), Nancy, 367 p.

Bonneau M. (1988) Le diagnostique foliaire. Rev. For. Fr., 40, 19-28.

Bonneau M., Souchier B. (1979) Constituants et propriétés du sol, Ed Masson 459 p.

Bonneau M., Gelpe J., Illy G. (1972) Résultats de deux essais de fertilisation sur pin maritime adulte dans les Landes. *Ann. Sci. For.*, 29, 353-367.

Bonneau M. (1966) La fertilisation forestière. Rev. For. Fr., 18, 552-574.

Boucher P., Côté B. (2002) Characterizing base-cation immobilization in the stem of six hardwoods of eastern Canada. *Ann. For. Sci.*, 59, 397-407.

Bowen G. D. (1984) Coping with low nutrients. In: Bowen GD, Nambiar EKS (eds) Nutrition of plantation forests. Academic Press, London, pp 33-64.

Castaing R. (1951) Application des sondes électroniques à une méthode d'analyse ponctuelle chimique et cristallographique. Thèse de Doctorat, Université de Paris.

Chevallier P., Dhez P., Legrand F., Erko A., Agafonov Y., Panchenko L. A., Yakshin A. (1996) The LURE-ITM X-ray fluorescence photon microprobe. *Journal of Trace and Microprobe Techniques*, 14, 517-539.

Chevallier P., Wang J. X., Piccot D., Legrand F., Abbas K. (1993) Comptes-rendus de la conférence spectrométrie γ et X, Saint Rémy-Lès-Chevreuse, Notes CEA N-2756.

Clüsener M. G. (1990) The content of Mg, Ca and K in plant tissues and their relationship to soils in natural ecosystems p.345-356. *In*: Element concentration cadasters in ecosystems, methods of assessment and evaluation. Lieht H. and Markert B. (eds). VCH Verlagsgesellschaft mbH, D-6940 Weinheim, 448 p.

Colin-Belgrand M., Ranger J., d'Argouges S. (1993) Transferts internes d'éléments nutritifs dans le bois de châtaignier (*Castanea sativa* Miller): approche dynamique sur une chronoséquence de peuplements. 1. Distribution des éléments minéraux. *Acta Oecol.*, 14, 653-680.

Côté B., Camiré C., (1995) Application of leaf, soil, and soil, and tree ring chemistry to determine the nutritional status of sugar maple on sites of different levels of decline. *Water, Air and Soil Pollution*, 83, 1-11.

Cronan C. S., Grigal D. F. (1995) Use of calcium/aluminium ratios as indicators of stress in forest ecosystems. *J. Environ. Qual.*, 24, 209-226.

Cutter B. E., Guyette R. P. (1993) Anatomical, chemical, and ecological factors affecting tree species choice in dendrochemistry studies. *J. Environ. Qual.*, 22, 611-619.

Cutter B. E., Guyette R. P. (1990) A note on sap pH in eastern Redcedar (*Juniperus virginiana* L.). Wood and Fiber Science, 22, 109-112.

Dambrine E., Pollier B., Poszwa A., Ranger J., Probst A., Viville D., Biron P., Granier A. (1998) Evidence of current soil acidification in spruce stands in the Vosges mountains, Noth-Eastern France. *Water, Air, and Soil Pollution*, 105, 43-52.

Dambrine E., Carisey N., Pollier B., Girard S., Granier A., Lu P., Biron P. (1992) Dynamique des éléments minéraux dans la sève xylémique d'épicéas de 30 ans. *Ann. Sci. For.*, 49, 489-510.

Dambrine E., Le Goaster S., Ranger J. (1991) Croissance et nutrition minérale d'un peuplement d'épicéa sur sol pauvre. III. Prélèvement racinaire et translocation d'éléments minéraux au cours de la croissance. *Acta Oecol.*, 12, 791-808.

DeGroot R. C., Kuster T., (1986) SEM X-ray microanalysis of tracheid cell walls in southern yellow pine sapwood treated with water-dispersible pentachlorophenol. *Wood and Fiber Science*, 1, 58-67.

De Visser P. H. B (1992) The relations between chemical composition of oak tree rings, leaf, bark, and soil solution in a partly mixed stand. *Can. J. For. Res.*, 22, 1824-1831.

DeWalle D. R., Swistock B. R., Sayre R. G., Sharpe W. E. (1991) Spatial variations of sapwood chemistry with soil acidity in Appalachian forests. *J. Environ. Qual.*, 20, 486-491.

Diagne A. (1982) Effets d'une fertilisation minérale sur l'humification, les cycles biologiques et la productivité d'une hêtraie acidiphile sur grès de l'Est de la France. Thèse de Docteur Ingénieur, Université de Nancy I, 72 p.

Dion M. L. S., Kennedy G., Courchesne F., Zayed J. (1993) Evaluation of Black spruce (*Picea mariana*) as a bioindicator of aluminium contamination. *Water, Air, and Soil Pollution*, 71, 29-41.

Duchaufour P. (1985) La fertilité du sol : le point de vue du forestier. Le point de vue de l'agronome. C.R. Acad. Agric. Fr., 71, 413-418.

Duchaufour P. (1958) L'utilisation des engrais en forêt. Rev. For. Fr., 10, 377-392.

Duchesne L., Ouimet R., Houle D. (2002) Basal area growth of Sugar maple in relation to acid deposition, stand health, and soil nutrients. *J. Environ. Qual.*, 31, 1676-1683.

Duchesne L., Ouimet R., Camiré C., Houle D. (2001) Seasonal nutrient transfers by foliar resorption, leaching, and litter fall in a northern hardwood forest at Lake Clair Watershed, Quebec, Canada. *Can. J. For. Res.*, 31, 333-344.

Duquesnay A., Dupouey J. L., Clement A., Ulrich E., Le Tacon F. (2000) Spatial and temporal variability of foliar mineral concentration in beech (*Fagus sylvatica*) stands in northeastern France. *Tree Physiol.*, 20, 13-22.

Duquesnay A. (1998) Changements de la composition foliaire et de la productivité des hêtraies dans le quart Nord-Est de la France entre 1970 et 1995. Thèse de Doctorat, Université Nancy I, 222 p.

Eckstein R. L., Karlsson P. S., Weih M. (1999) Leaf life span and nutrient resorption as determinants of plant nutrient conservation in temperate—arctic regions. *New Phytol.*, 143, 177-190.

Eklund M. (1995) Cadmium and lead deposition around a Swedish battery plant as recorded in oak tree rings. *J. Environ. Qual.*, 24, 126-131.

Evans H. J., Sorger G. J. (1966) Role of mineral elements with emphasis on the univalent cations. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 17, 47-76.

Federer C. A., Hornbeck J. W., Tritton L. M., Martin C. W., Pierce R. S., Smith C. T. (1989) Long-term depletion of calcium and other nutrients in eastern U.S. forests. *Environ. Manage.*, 13, 593-601.

Fehlen N., Picard J. F. (1994) Influence de la fertilisation sur la végétation spontanée et la croissance radiale de l'Epicéa commun (*Picea abies* (L.) karst) dans une plantation adulte des Ardennes Françaises. *Ann. Sci. For.*, 51, 569-580.

Ferguson I. B., Bollard E. G. (1976) The movement of calcium in woody stems. *Ann. Bot.*, 40, 1057-1065.

Finer L., Kaunisto S. (2000) Variation in stemwood nutrient concentrations in scots pine growing on Peatland. *Scand. J. For Res.*, 15, 424-432.

Flückiger W., Braun S. (1998) Nitrogen deposition in Swiss forests and its possible relevance for leaf nutrient status, parasite attacks and soil acidification. *Environ. Pollut.*, 102, 69-76.

Frey-Wyssling A., Bosshard H. H. (1959) Cytology of the ray-cells in sapwood and heartwood. *Holzforsch.*, 13, 129-137.

Fritts, H. C. (1991) Reconstructing large-scale climatic patterns from tree-ring data. University of Arizona Press, Tucson, AZ, 286 p.

Garbaye J., Leroy P. H., Oswald H. (1974) Premiers résultats de cinq années de fertilisation sur jeunes peuplements de chêne en forêt de Bercé. *Rev. For. Fr.*, 26, 51-58.

Garrec J. P., Barrois A. (1992) Caractéristiques de la fixation et de la pénétration corticale. Passage du phosphite dipotassique et de l'eau au travers d'écorces isolées. *Environ. Exp. Bot.*, 32, 11-23.

Glavac V., Koenies H., Ebben U. (1990) Seasonal variation of calcium, magnesium, potassium, and manganese contents in xylem sap of beech (*Fagus sylvatica* L.) in a 35-year-old limestone beech forest stand. *Trees*, 4, 75-80.

Gruat E. (1995) Etude de l'influence des amendements sur la production de bois de hêtre et l'évolution chimique d'un sol acide sous hêtraie (*Fagus sylvatica* L.). Rapport de stage de fin de 4^{ème} année, 58 p.

Guyette R. P., Cutter B. E. (1994) Barium and manganese trends in tree rings as monitors of sulfur deposition. *Water, Air, and Soil Pollution*, 73, 213-223.

Guyette R. P., Cutter B. E., Henderson G. S. (1992a) Inorganic concentration concentrations in the wood of eastern redcedar grown on different sites. *Wood and Fiber Science*, 24, 133-140.

Guyette R. P., Cutter B. E., Henderson G. S. (1992b) Reconstructing soil pH from manganese concentrations in tree rings. *Forest Sci.*, 38, 727-737.

Guyette R. P., Cutter B. E., Henderson G. S. (1991) Long-term correlations between mining activity and levels of lead and cadmium in tree-rings of eastern Red-Cedar. *J. Environ. Qual.*, 20, 146-150.

Hagemeyer J. (1995) Radial distribution of Cd in stems of oak trees (*Quercus robur* L.) reanalyzed after 10 years. *Trees*, 9, 200-203.

Hagemeyer J., Lohrmann D., Breckle S. W. (1993) Development of annual xylem rings and shoot growth of young beech (*Fagus sylvatica* L.) grown in soil with various Cd and Zn levels. *Water, Air, and Soil Pollution*, 69, 351-361.

Harju L., Lill J. O., Saarela K. E., Heselius S. J., Hernberg F. J., Lindroos A. (1996) Study of seasonal variations of trace-element concentrations within tree rings by thick-target PIXE analyses. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B*, 109/110, 536-541.

Helmisaari H. S. (1995) Nutrient cycling in *Pinus sylvestris* stands in eastern Finland. *Plant Soil*, 168/169, 327-336.

Helmisaari H. S. (1992a) Nutrient retranslocation in three *Pinus sylvestris* stands. *For. Ecol. Manage.*, 51, 347-367.

Helmisaari H. S. (1992b) Nutrient retransloctaion within the foliage of *Pinus sylvestris*. *Tree Physiol.*, 10, 45-58.

Helmisaari H. S., Siltala T. (1989) Variation in nutrient concentrations of *Pinus sylvestris* stems. *Scand. J. For. Res.*, 4, 443-451.

Herbauts J., Penninckx V., Gruber W., Meerts P. (2002) Radial variations in cation exchange capacity and base saturation rate in the wood of pedonculate oak and European beech. *Can. J. For. Res.*, 32, 1829-1837.

Hillis W. E. (1987) Heartwood and tree exudates. Springer-Verlag, New York, 268 p.

Hocking P. J. (1980) The composition of phloem exudates and xylem sap from tree tobacco (*Nicotiana glauca* Groh). *Ann. Bot.*, 45, 633-643.

Houle D., Duchesne L., Moore J. D., Laflèche M. R., Ouimet R. (2002) Soil and tree ring chemistry response to liming in a sugar maple stand. *J. Environ. Qual.*, 31, 1993-2000.

Houle D., Paquin R., Camiré C., Ouimet R., Duchesne L. (1997) Response of the Lake Clair Watershed (Duchesnay, Quebec) to change in precipitation chemistry (1988-1994). *Can. J. For. Res.*, 27, 1813-1821.

Hutchinson T. C., Watmough S. A., Sager E. P. S., Karagatzides J. D. (1998) Effects of excess nitrogen deposition and soil acidification on sugar maple (*Acer saccharum*) in Ontario, Canada: an experimental study. *Can. J. For. Res.*, 28, 299-310.

Ingerslev M. (1999) Above ground biomass and nutrient distribution in a limed and fertilized norway spruce (*Picea abies*) plantation. Part I. Nutrient concentrations. For. Ecol. Manage., 119, 13-20.

Izuta T., Yamaoka T., Nakaji T., Yonekura T., Yokoyama M., Funada R., Koike T., Totsuka T. (2004) Growth, net photosynthesis and leaf nutrient status of *Fagus crenata* seedlings grown in brown forest soil acidified with H₂SO₄ or HNO₃ solution. *Trees*, 18, 677-685.

Jeremic D., Cooper P., Srinivasan U. (2004) Comparative analysis of balsam fir wetwood, heartwood, and sapwood properties. *Can. J. For. Res.*, 34, 1241-1250.

Jordan D. N., Wright L. M., Lockaby B. G. (1990) Relationship between xylem trace metals and radial growth of Loblolly pine in rural Alabama. *J. Environ. Qual.*, 19, 504-508.

Kagawa A., Aoki T., Okada N., Katayama Y. (2002) Tree-ring strontium-90 and cesium-137 as potential indicators of radioactive pollution. *J. Environ. Qual.*, 31, 2001-2007.

Kashuba-Hockenberry L., DeWalle D. R. (1994) Dendrochemical response to soil liming in scarlet oak. *J. For. Res.*, 24, 564-567.

Katz C., Oren R., Schulze E. D., Milburn J. A. (1989) Uptake of water and solutes through twigs of *Picea abies* (L.) Karst. *Trees*, 3, 33-37.

Kogelmann W. J., Sharpe W. E. (2006) Soil acidity and manganese in declining and nondeclining sugar maple stands in Pennsylvania. *J. Environ. Qual.*, 35, 433-441.

Krause G. H. M., Arndt U., Brandt C. J., Bucher J., Kenk G., Matzner E. (1987) Forest decline in Europe: development and possible causes. *Water, Air, and Soil Pollution*, 31, 647-668.

Kudo A., Suzuki T., Santry D. C., Mahara Y., Miyahara S., Garrec J. P. (1993) Effectiveness of tree rings for Pu history at Nagasaki, Japan. *J. Environ. Radioactivity*, 21, 55-63.

Kuhn A. J., Schröder W. H., Bauch J. (1997) On the distribution and transport of mineral elements in xylem, cambium and phloem of spruce (*Picea abies* (L.) Karst.). *Holzforsch.*, 51, 487-496.

Lambers H., Chapin F. S. III., Pons T. L. (1998) Plant Physiological Ecology, Springer-Verlag, Berlin.

Landmann G., Bonneau M. (1995) Forest decline and atmospheric deposition effects in the French mountains, G Landmann, M. Bonneau (Eds), Springer-Verlag, 461 p.

Landmann G., Bonneau M., Elrich I. (1988) Dépérissement des forêts et difficultés nutritionnelles dans le massif des Vosges. Journées de travail DEFORPA, Palais des Congrès de Nancy, vol. 1.

Landmann G., Bonneau M., Adrian M. (1987) Le dépérissement du sapin et de l'épicéa commun dans le massif vosgien est-il en relation avec l'état nutritionnel des peuplements ? *Rev. For. Fr.*, 39, 5-11.

Larcher W. (1980) Physiological plant ecology 2^{nde} edition Springer Verlag, Berlin, Heidelberg New York.

Larsson C., Helmisaari H. S. (1998) Accumulation of elements in the annual rings of Scots pine trees in the vicinity of a copper-nickel smelter measured by scanning EDXRF. *X-Ray Spectrometry*, 27, 133-139.

Lebourgeois F., Becker M., Bonneau M. (1993) Influence d'une fertilisation minérale sur la croissance radiale de sapinières dépérissantes dans les Vosges. *Rev. For. Fr.*, 45, 639-650.

Lecomte F. (1996) Etude de la perméabilité au cuivre des écorces isolées de bouleau (*Betula verrucosa*). Mémoire de DEA, Université de Nancy I.

Legrand I., Asta J., Goudard Y. (1996) Variations in bark acidity and conductivity over the trunk length of silver fir and Norway spruce. *Trees*, 11, 54-58.

Lemoine P. (1993) Etude dendrochronologique du pin maritime (*Pinus pinaster* Ait.) sur le dispositif de fertilisation de Mimizan (Landes). Rapport de DEA de Biologie Forestière, Nancy, 23 p.

Lepp N. W. (1975) The potential of tree ring analysis for monitoring heavy metal pollution patterns. *Environ. Pollut.*, 9, 49-61.

Likens G. E., Driscoll C. T., Buso D. C. (1996) Long-term effects of acid rain: response and recovery of a forest ecosystem. *Science*, 272, 244-246.

Lim M. T., Cousens J. E. (1986) The internal transfer of nutrients in a Scots pine stand. 1. Biomass components, current growth and their nutrient content. *Forestry*, 59, 1-16.

Lindsay W. L. (1979) Chemical equilibria in soils, New York: John Wiley & Sons, 449 p.

Liu G., Côté B., Fyles J. W. (1994) Effects of base action fertilization on the nutrient status, free amino acids and some carbon fractions of the leaves of sugar maple (*Acer saccharum* Marsh.). *Plant and Soil*, 160, 79-86.

Long P. L., Horsley S.B., Lilja P. R. (1997) Impact of forest liming on growth of sugar maple and associated hardwoods. *Can. J. For. Res.*, 27, 1560-1573.

Lukaszewski Z., Siweck R., Opydo J., Zembrzuski W. (1988) The effect of industrial pollution on Zinc, Cadmium and Copper concentration in the xylem rings of Scot's pine (*Pinus sylvestris* L.) and the soil. *Trees*, 2, 1-6.

Lundegardh H. (1951) Foliar analysis. Hilger & Watts, London, 176 p.

Maas E. V., Moore D. P., Mason B. J. (1968) Manganese absorption by excised Barley roots. *Plant Physiol.*, 43, 527-530.

Marsalle S. (1996) Etude dendroécologique d'un peuplement adulte de hêtre (*Fagus sylvatica* L.) fertilisé dans l'ouest de la France (Forêt de Fougères). Rapport de DEA de Biologie Forestière, Nancy, 13 p.

Marschner H. (1995) Mineral nutrition of higher plants, 2nd ed. Academic Press, San Diego, California, USA.

McClenahen J. R., Vimmerstedt J. P. (1993) Soil, climate, and atmospheric deposition relationships with elemental concentrations in annual rings of Tuliptree. *J. Environ. Qual.*, 22, 23-32.

McClenahen J. R., Vimmerstedt J. P., Scherzer A. (1989) Elemental concentrations in tree rings by PIXE: statistical variability, mobility, and effects of altered soil chemistry. *Can. J. For. Res.*, 19, 880-888.

McGrath J. F., Robson A. D. (1984) The movement of zinc through excised stems of seedling of *Pinus radiata* D. Don. *Ann. Bot.*, 54, 231-242.

Meerts (2002) Mineral nutrient concentrations in sapwood and heartwood: a literature review. *Ann. For. Sci.*, 59, 713-722.

Meisch H. U., Kessler M., Reinle W., Wagner A., (1986) Distribution of metals in annual rings of the beech (*Fagus sylvatica*) as an expression of environmental changes. *Experientia*, 42, 537-542.

Mellert K. H., Prietzel J., Straussberger R., Rehfuess K. E. (2004) Long-term nutritional trends of conifer stands in Europe: results from the RECOGNITION project. *Eur. J. Forest Res.*, 123, 305-319.

Mengel K., Kirkby E. A. (1987) Principles of plant nutrition. 4th Ed, International Potash Institute, Bern, Switzerland, 687 p.

Merill W., Cowling E. B. (1966) Role of nitrogen in wood deterioration; amounts and distribution in tree stems. *Can. J. Bot.*, 44, 1555-1580.

Miller E. K., Blum J. D., Friedland A. J. (1993) Determination of soil exchangeable-cation loss and weathering rates using Sr isotopes. *Nature*, 362, 438-441.

Minocha R., McQuattie C., Fagerberg W., Long S., Noh E. W. (2001) Effects of aluminium in red spruce (*Picea rubens*) cell cultures: cell growth and viability, mitochondrial activity, ultrastructure and potential sites of intracellular aluminium accumulation. *Physiologia plantarum*, 113, 486-498.

Momoshima N., Eto I., Kofuji H., Takashima Y., Koike M., Imaizumi Y., Harada T. (1995) Distribution and chemical characteristics of cations in annual rings of Japanese Cedar. *J. Environ. Qual.*, 24, 1141-1149.

Momoshima N., Bondietti E. A. (1990) Cation binding in wood: applications to understanding historical changes in divalent cation availability to red spruce. *Can. J. For. Res.*, 20, 1840-1849.

Moore J. D., Ouimet R. (2006) Ten-year effect of dolomitic lime on the nutrition, crown vigor, and growth of sugar maple. *Can. J. For. Res.*, 36, 1834-1841.

Myre R., Camiré C. (1994) The establishment of stem nutrient distribution zones of European larch and tamarack using principal component analysis. *Trees*, 9, 26-34.

Nabais C., Freitas H., Hagemeyer J. (1999) Dendroanalysis: a tool for biomonitoring environmental pollution? *Sci. Total Environ.*, 232, 33-37.

Nabais C., Freitas H., Hagemeyer J., Breckle S. W. (1996) Radial distribution of Ni in stemwood of *Quercus ilex* L. trees grown on serpentine and sandy loam (umbric leptosol) soils of NE-Portugal. *Plant Soil*, 183, 181-185.

Nambiar E. K. S., Fife D. N. (1991) Nutrient retranslocation in temperate conifers. *Tree Physiol.*, 9, 185-207.

Nys C. (1989) Fertilisation, dépérissement et production de l'épicéa commun (*Picea abies* Karst.) dans les Ardennes. *Rev. For. Fr.*, 41, 336-347.

Nys C. (1981) Réponse d'un peuplement adulte d'épicéa commun (*Picea abies* Karst.) à la fertilisation dans le Limousin. *Rev. For. Fr.*, 33, 217-227.

Osonubi O., Oren R., Werk K. S., Schulze E. D., Heilmeier H. (1988) Performance of two *Picea abies* (L.) Karst. stands at different stages of decline. *Oecologia*, 77, 1-6.

Ouimet R., Duchesne L., Houle D., Arp P. A. (2001) Critical loads and exceedances of acid deposition and associated forest growth in the northern hardwood and boreal conifers forest in Québec, Canada. *Water, Air, and Soil Pollution*, 1, 119-134.

Padilla K. L., Anderson K. A. (2002) Trace element concentration in tree-rings biomonitoring centuries of environmental change. *Chemosphere*, 49, 575-585.

Panshin A. J., De Zeeuw C., Braun H. P. (1964) Textbook of wood technology. I. Structure, identification, uses, and properties of the commercial woods of the United States, McGraw-Hill, New York.

Pate J. S., Jeschke W. D (1993) Mineral uptake and transport in xylem and phloem of the proteaceous tree, *Banksia prionotes*. *Plant Soil*, 155/156, 273-276.

Patrick G. J., Farmer J. G. (2006) A stable lead isotopic investigation of the use of sycamore tree rings as a historical biomonitor of environmental lead contamination. *Sci. Total Environ.*, 362, 278-291.

Peiffer M., Dupouey J.L. (2000). Variations de la croissance radiale du pin sylvestre au cours du XX^e siècle en forêt domaniale de Saint-Avold – Rôle possible de la pollution atmosphérique –Rapport final convention O.N.F.-I.N.R.A., mai 2000, 43 p.

Penninckx V., Glineur S., Gruber W., Herbauts J., Meerts P. (2001) Radial variations in wood mineral element concentrations: a comparison of beech and pedunculate oak from the belgian Ardennes. *Ann. For. Sci.*, 58, 253-260.

Pernes-Debuyser A., Tessier D. (2004) Soil physical properties affected by long-term fertilization. *Eur. J. Soil Sci.*, 55, 505-512.

Pfanz H., Aschan G. (2001) The existence of bark and stem photosynthesis in woody plants and its significance for the overall carbon gain. *Progress in Botany*, 62, 477-510.

Poszwa A., Dambrine E., Pollier B., Atteia O. (2000) A comparison between Ca and Sr cycling in forest ecosystems. *Plant and Soil*, 225, 299-310.

Poswa A. (2000) Utilisation des isotopes du strontium pour évaluer la dynamique des éléments minéraux dans des écosystèmes forestiers sous climat boréal, tempéré et tropical. Thèse de Doctorat, Université de Nancy I, 80 p.

Poszwa A., Dambrine E., Pollier B., Fichter J. (1998) Mise en évidence directe de l'acidification d'un sol forestier à Aubure (bassin versant du Strengbach, Haut-Rhin). *Ecologie*, 29, 407-410.

Reuss J. O., Johnson D. W. (1986) Acid deposition and the acidification of soils and waters. Springer-Verlag, New York.

Robitaille G. (1981) Heavy metal accumulation in the annual rings of balsam fir *Abies balsamea* (L.) Mill. *Environ. Pollut. Ser. B*, 2, 193-202.

Sariyildiz T., Anderson J. M. (2005) Variation in the chemical composition of green leaves and leaf litters from three deciduous tree species growing on different soil types. *For. Ecol. Manage.*, 210, 303-319.

Sauter J. J., van Cleve B. (1992) Seasonal variation of amino acids in the xylem sap of *Populus x Canadensis* and its relation to protein body remobilisation. *Trees*, 7, 26-32.

Schaumloffel J. C., Filby R. H., Moore B. C. (1998) Ponderosa pine tree rings as historical monitors of zinc and cadmium pollution. *J. Environ. Qual.*, 27, 851-859.

Schlesinger W. H. (1997) Biogeochemistry. An analysis of global change, Academic Press, San Diego, CA, USA, 588 p.

Schmull M., Hauck M. (2003) Element microdistribution in the bark of *Abies balsamea* and *Picea rubens* and its impact on epiphytic lichen abundance on Whiteface Mountain, New York. *Flora*, 198, 293-303.

Schroeder J. I., Ward J. M., Gassmann W. (1994) Perspectives on the physiology and, structure of inward-rectifying K⁺ channels in higher plants: Biophysical implications for K⁺ uptake. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 23, 441-471.

Schweingruber F. H. (1987) Flächenhafte dendroklimatische temperature-rekonstruktionen für Europa. *Die Naturwissenschaften*, 74, 205-212.

Senden M. H. M. N., Van der Meer A. J. G. M., Verburg T. G., Wolterbeek H. Th. (1994) Effects of cadmium on the behaviour of citric acid in isolated tomato xylem cell walls. *Journal of Experimental Botany*, 45, 597-606.

Shortle W. C., Smith K. T., Minocha R., Lawrence G. B., David M. B. (1997) Acidic deposition, cation mobilization, and biochemical indicators of stress in healthy red spruce. *J. Environ. Qual.*, 26, 871-876.

Smith K. T, Shortle W. C., Minocha R., Alexeyev V. A. (1996) Dynamics of calcium concentrations in stemwood of red spruce and siberian fir. *In*: Proceedings, 1995 meeting of the Northern Global Change Program by Hom J., Birdsey R., O'Brian K., eds, 230-238.

Stark N., Spitzner C., Essig D. (1985) Xylem sap analysis for determining nutritional status of trees: *Pseudotsuga menziesii. Can. J. For. Res.*, 15, 429-437.

Stewart C. M. (1966) Excretion and heartwood formation on living trees. *Science*, 153, 1068-1074.

Stokes M. A. (1980) The dendrochronology of fire history. *In*: M. A. Stokes and J. H. Dieterich, eds., Proceedings of the Fire History Workshop, October 20-24, 1980, Tucson, Arizona. USDA Forest Service General Technical Report RM 81: 1-3.

Symeonides C. (1979) Tree-ring analysis for tracing the history of pollution: application to a study in northern Sweden. *J. Environ. Qual.*, 4, 482-486.

Taiz L., Zeiger E. (1998) Plant physiology. Second edition. Sinauer Associates, Inc. Publishers Sunderland, Massachussetts, 792 p.

Tendel J., Wolf K. (1988) Distribution of nutrients and trace elements in annual rings of pine trees (*Pinus silvestris*) as indicator of environmental changes. *Experientia*, 44, 975-980.

Tessier Du Cros E. (1981) Le hêtre, INRA, Paris.

Thimonier A., Dupouey J. L., Le Tacon F. (2000) Recent losses of base cations from soils of *Fagus sylvatica* L. stands in northeastern France. *Ambio*, 6, 314-321.

Tillier P. (1995) Effets à long terme d'amendements minéraux sur l'écosystème hêtraie de plaine : interaction faune-humus. DEA de Biologie des populations et Eco-Ethologie., Université Nancy I, 25 p.

Timbal J. (1974) Principaux caractères écologiques et floristiques des hêtraies du nord-est de la France. *Ann. Sci. For.*, 31, 27-45.

Toutain F., Diagne A., Le Tacon F. (1988) Possibilités de modifications du type d'humus et d'amélioration de la fertilité des sols à moyen terme en hêtraie par apport d'éléments minéraux. *Rev. For. Fr.*, 40, 99-107.

Trockenbrodt M. (1995) Calcium oxalate crystals in the bark of *Quercus robur*, *Ulmus glabra*, *Populus tremula* and *Betula pendula*. *Ann. Bot.*, 75, 281-184.

Tyerman S. D. (1992) Anion channels in plants. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol.*, 43, 351-371.

Tyler G., Olson T. (2001) Plant uptake of major and minor mineral elements as influenced by soil acidity and liming. *Plant Soil*, 230, 307-321.

Ulrich B. (1986) Natural and anthropogenic components of soil acidification. Z. Pflanzenernähr. Bodenkd., 149, 702-717.

Ulrich B. (1983) Soil acidity and its relations to acid deposition. *In* Effects of accumulation and air pollutants in forest ecosystems. *Edited by* B. Ulrich and J. Pankrath. Reidel Publ. Co., Hingham, Mass. pp. 127-146.

Ulrich B. (1980) Die Wälder in Mitteleuropa: Messergebnisse ihrer Umweltbelastung, Theorie ihrer Gefährdung, Prognose ihrer Entwicklung. *Allgemeine Forst Zeitschrift*, 44, 6 p.

Ulrich B., Mayer R., Khanana P.K. (1980) Chemical changes due to acid precipitation in a loess-derived soil in central Europe. *Soil Sci.*, 130, 193-199.

Ulrich B., Mayer R., Khanna P. K. (1979) Deposition von Luftverunreinigungen und ihre Auswirkungen in Waldökosystemen im Solling. Schriften aus der Forstl. Fakultät d. Univ. Göttingen u.d. Niedersäch. Forstl. Versuchsanstalt vol. 58. J.D. Sauerländer's Verlag, Frankfurt am Main, 291 pp.

Van de Geijn S. C., Petit C. M. (1979) Transport of divalent cations. Cation exchange capacity of intact xylem vessels. *Plant Physiol.*, 64, 954-958.

Van Den Driessche R. (1984) Nutrient storage, retranslocation and relationship of stress to nutrition. *In*: Nutrition of Plantation Forests. Ed. by Bowen, G. D.; Nambiar, E. K. S. London: Academic Press, pp. 181-209.

Van Die J., Vonk C. R. (1967) Selective and stereospecific absorption of various amino acids during xylem translocation in tomato stems. *Acta Bot. Neer.*, 16, 147-152.

Vassil A. D., Kapulnik Y., Raskin I., Salt D. E. (1998) The role of EDTA in lead transport and accumulation by Indian Mustard. *Plant Physiol.*, 117, 447-453.

Viets F. G. Jr. (1944) Calcium and other polyvalent cations as accelerators of ion accumulation by excised barley roots. *Plant Physiol.*, 19, 466-480.

Wardell J. F., Hart J. H. (1973) Radial gradients of elements in White Oak wood. *Wood Sci.*, 5, 298-303.

Wargo P. M., Minocha R., Wong B. L., Long R. P., Horsley S. B., Hall T. J. (2002) Measuring changes in stress and vitality indicators in limed sugar maple on the Allegheny Plateau in north-central Pennsylvania. *Can. J. For. Res.*, 32, 629-641.

Watmough S. A., Aherne J., Alewell C., Arp P., Bailey S., Clair T., Dillon P., Duchesne L., Eimers C., Fernandez I., Foster N., Larssen T., Miller E., Mitchell M., Page S. (2005) Sulfate, nitrogen and base cation budgets at 21 forested catchments in Canada, the United States and Europe. *Environmental Monitoring and Assessment*, 109, 1-36.

Watmough S. A. (2002) A dendrochemical survey of sugar maple (*Acer saccharum* Marsh.) in south-central Ontario, Canada. *Water, Air, and Soil Pollution*, 136, 165-187.

Watmough S. A., Hugues R. J., Hutchinson T. C. (1999) 206Pb/207Pb Ratios in tree rings as monitors of environmental change. *Environ. Sci. Technol.*, 33, 670-673.

Watmough S. A. (1997) An evaluation of the use of dendrochemical analyses in environmental monitoring. *Environ. Review*, 5, 181-201.

Watmough S. A., Hutchinson T. C. (1996) Analysis of tree rings using inductively coupled plasma mass spectrometry to record fluctuations in a metal pollution episode. *Environ. Pollut.*, 93, 93-102.

Wolterbeek H. Th., Van Luipen J., de Bruin M. (1984) Non-steady state xylem transport of fifteen elements into the tomato leaf as measured by gamma-ray spectroscopy: A model. *Physiol. Plant.*, 61, 599-606.

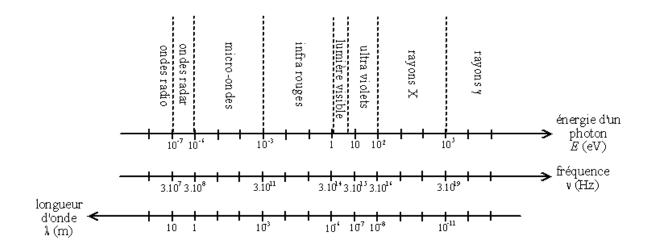
Yanai R. D., Phillips R. P., Arthur M. A., Siccama T. G., Hane E. N. (2005) Spatial and temporal variation in calcium and aluminium in northern hardwood forest floors. *Water, Air, and Soil Pollution*, 160, 109-118.

Zech W., Popp E. (1983) Magnesiummangel, einer der Grunde für das Fichten und Tannensterben in N-O Bayern. *Forstwissenschaftliches Centralblatt*, 183, 50-55.

Ziegler H. (1968) Biologische Aspekte der Kernholzbildung. Holz Roh-Werkst., 26, 61-68.

Zimmermann M. H., Brown C. L. (1974) Trees, structure and function, Springer, Berlin.

Zötll H. W., Mies E. (1983) Die Fichtenerkrankung in Hochlagen des Südschwarz-waldes. *Allgemeine Forst. Und Jagdzeitung*, 154, 110-114.



Annexe 1 : Classement des ondes électromagnétiques par longueur d'onde, fréquence et énergies des photons. D'après Wikipédia : http://fr.wikipedia.org/wiki/Rayonnement_%C3%A9lectromagn%C3%A9tique

Annexe 2

Z	Element	Standard		Element	Standard
5	В	В	49	In	InAs
6	С	CaCO3	50	Sn	Sn
7	N	Not defined	51	Sb	Sb
8	0	CaCO3	52	Te	HgTe
9	F	AIF3	53	1	Not defined
10	Ne	Not defined	54	Xe	Not defined
11	Na	Jadeite	55	Cs	Not defined
12	Mg	MgO	56	Ва	BaSO4
13	Al	Al2O3	57	La	LaB6
14	Si	SiO2	58	Ce	CeO2
15	Р	GaP	59	Pr	PrF3
16	Si	FeS2	60	Nd	NdF3
17	CI	NaCl	61	Pm	Not defined
18	Ar	Not defined	62	Sm	SmF3
19	K	Ortho	63	Eu	EuF3
20	Ca	Wollastonite	64	Gd	GdF3
21	Sc	Sc	65	Tb	TbF3
22	Ti	Ti	66	Dy	DyF3
23	V	V	67	Но	HoF3
24	Cr	Cr	68	Er	ErF3
25	Mn	Mn	69	Tm	TmF3
26	Fe	Fe	70	Yb	YbF3
27	Co	Co	71	Lu	LuF3
28	Ni	Ni	72	Hf	Hf
29	Cu	Cu	73	Ta	Та
30	Zn	Zn	74	W	W
31	Ga	GaP	75	Re	Re
32	Ge	Ge	76	Os	Not defined
33	As	InAs	77	Ir	Not defined
34	Se	Se	78	Pt	Pt
35	Br	KBr	79	Au	Au
36	Kr	Not defined	80	Hg	HgTe
37	Rb	Not defined	81	TI	Not defined
38	Sr	SrF2	82	Pb	PbF2
39	Υ	Υ	83	Bi	Bi
40	Zr	Zr	84	Po	Not defined
41	Nb	Nb	85	At	Not defined
42	Мо	Мо	86	Rn	Not defined
43	Tc	Not defined	87	Fr	Not defined
44	Ru	Ru	88	Ra	Not defined
45	Rh	Rh	89	Ac	Not defined
46	Pd	Pd	90	Th	ThO2
47	Ag	Ag	91	Pa	Not defined
48	Cd	Cd	92	U	U

Annexe 2 : Inventaire des différents standards internes (témoins cachés) utilisés par le logiciel INCA (Oxford Instruments) afin de déterminer les concentrations des surfaces de pics obtenues pour les éléments chimiques compris entre le bore (B) et l'uranium (U). En dessous de Z=5 (B), les éléments chimiques ne sont pas identifiables par EDS, au delà de Z=92 (U), les éléments sont identifiables mais rares et n'ont ainsi pas été intégrés à cette liste.

Liste des abréviations et acronymes

ATP Adénosine triphosphate

CBC Cation Binding Capacity (Capacité de fixation cationique)
CEC Cation Exchange Capacity (Capacité d'échange cationique)

EDS Energy Dispersive Spectrometry (Spectrométrie à sélection d'énergie)

FAAS Flame Atomic Absorption Spectrometry (Spectrométrie par absorption

atomique dans la flamme)

GFAAS Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry (Spectrométrie par

absorption atomique à four en graphite)

ICP-MS Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometry (Spectrométrie de

masse à plasma couplé par induction)

ICP-AES Inductively Coupled Plasma - Atomic Emission Spectrometry

(Spectrométrie d'émission atomique à plasma couple par induction)

LA-ICP-MS Laser Ablation- Inductively Coupled Plasma (Spectrométrie de masse à

plasma couplée à une ablation laser)

LIBS Laser Induced Breakdown Spectroscopy (Spectroscopie sur plasma

induit par laser)

NAA Neutron Activation Analysis (Analyse par activation neutronique)

PIXE Particule Induced X-ray Emission (Emission de rayons x par particules

chargées)

SIMS Secondary Ion Mass Spectrometry (Spectrométrie de masse des ions

secondaires)

SXRF Synchrotron X-Ray Fluorescence (Fluorescence X sous rayonnement

synchrotron)

TXRF Total reflection X-Ray Fluorescence (Fluorescence X à réflexion totale)

WDS Wavelengh Dispersive Spectrometry (Spectrométrie à dispersion de

longueur d'onde)

Résumé

Cette thèse, via la composition chimique du bois ou dendrochimie, tente de répondre à certaines questions écologiques liées à la nutrition des arbres et à la bio-indication des conditions environnementales. Des méthodes basées sur la spectrométrie de rayonnements X telles que SXRF (Synchrotron X-Ray Fluorescence) et EDS (Energy Dispersive Spectrometry), encore ponctuellement utilisées en dendrochimie ont été testées.

Une première étude, par EDS, a permis de mettre en évidence que la composition chimique en Ca et Mn du bois et de l'écorce de hêtres (*Fagus sylvatica* L.) variait significativement en fonction du type de sol (calcaire ou acide). Le contenu en Mn était fortement relié au pH du sol. Ces résultats suggèrent que le Mn du bois et de l'écorce pourrait être utilisé comme un outil de diagnostic nutritionnel. Des différences significatives de concentrations entre bois de cœur et aubier ont été mesurées pour K. Pour Ca et Mn, ces différences devenaient significatives selon le type de sol supposant que le site d'origine peut influencer les tendances temporelles.

La composition chimique du bois obtenue par SXRF de *Rhizophora mucronata* Lam., une espèce tropical de mangrove du Kenya, nous a permis de détecter une cyclicité annuelle pour Br, Ca, Mn et Sr. Ces résultats, bien que préliminaires, sont prometteurs pour la datation des bois tropicaux.

La comparaison de hêtres fertilisés NPKCa avec des témoins, nous a montré un effet significatif et fort de la fertilisation sur les teneurs moyennes en Br, Ca, Hg et K du bois par SXRF. Hg et Br pourraient être des indicateurs de fertilisations passées des sols. La forte variabilité inter-arbre (Ca, K, Mn) au niveau des tendances temporelles et des concentrations, liée en partie au statut de dominance diminue les potentialités d'utiliser cette espèce comme indicatrice d'acidifications passées des sols.

D'un point de vue méthodologique, les deux méthodes utilisées ont présenté des résultats en accord avec des méthodes plus classiques telles que l'ICP.

Mots clefs: écorce, cerne, composition chimique, dendrochimie, fertilisation, nutrition, sol, tempéré, tropical

Summary

This thesis, by measuring wood chemical content called dendrochemistry, tries to respond to some ecological questions linked to tree nutrition and bio-indication of environmental conditions. Methods based on X-rays spectrometry like SXRF (Synchrotron X-Ray Fluorescence) and EDS (Energy Dispersive Spectrometry), which are still scarcely used in dendrochemistry have been tested.

First study, by EDS, showed that Ca and Mn wood and bark content of Beech (*Fagus sylvatica* L.) varied significantly with the soil type (calcareous vs acidic). Mn content was highly related to soil pH. These results suggest that wood and bark Mn content may be used as a nutritional proxy. Significant differences in wood chemical content between heart- and sapwood were measured for K. For Ca and Mn, these differences became significant depending on the soil type suggesting that the tree origin site could influence the temporal trends.

Wood chemical composition, obtained by SXRF, of *Rhizophora mucronata* Lam., a Kenyan mangrove species, allowed us to detect an annual cyclicity for Br, Ca, Mn et Sr. These results, as if preliminary, are promising for the datation of tropical woods.

The comparison of beech trees fertilized by NPKCa with controls showed a high significant effect of fertilization on wood mean concentrations in Br, Ca, Hg and K by SXRF. Hg and Br could be indicators of soil past fertilizations. The high inter-tree variability (Ca, K and Mn) at the temporal scale which is partly linked to differences in tree dominance status limits the possibilities to use this species as an indicator of past soils acidifications.

For methodological aspects, these two methods presented results in agreement with classical methods like ICP.

Keywords: bark, chemical composition, dendrochemistry, fertilization, nutrition, soil, tree ring, temperate, tropical