



Université de Lille II

DIPLOME DE RECHERCHES TECHNOLOGIQUES

Mention : Ingénierie de la Santé et de l'Environnement
Spécialité : Bioenvironnement et Santé

par

Claudine AH-PENG

Titre

Mise au point d'un outil diagnostic basé sur l'utilisation de la mousse aquatique *Fontinalis antipyretica* Hedw. en culture pour l'estimation de la qualité des cours d'eau

Sous la direction de :

Dr. Franck-Olivier Denayer,
Dr. Catherine Rausch de Trautenberg,

Soutenu publiquement le 27 novembre 2003 devant le jury :

Pr. Brigitte Boniface
Pr. Annick Delelis
Dr. Franck- Olivier Denayer,
Dr. Annabelle Deram
Dr. Jean Prygiel
Dr. Catherine Rausch de Trautenberg,

« Nous n'héritons pas de la terre de nos ancêtres,
nous l'empruntons à nos enfants ».
Antoine de Saint Exupéry

REMERCIEMENTS...

J'adresse mes sincères remerciements à Madame **Brigitte Boniface**, de m'avoir acceptée au sein de la promotion du DRT Ingénierie de la Santé et de l'Environnement à l'I.L.I.S et de m'avoir fait confiance en tant que première étudiante de cette nouvelle formation

J'aimerais d'abord exprimer ma profonde reconnaissance à Madame **Catherine Rausch de Trautenberg** & Monsieur **Franck- Olivier Denayer**, mes directeurs de recherche, de m'avoir fait bénéficier de leurs compétences scientifiques et de leur investissement au cours de ces deux années de recherche

Vont à mes collègues et amis, **Sandrine Gombert**, **Sébastien Leblond** et **Amandine Allard** mes plus vifs remerciements pour leur accueil chaleureux, leur soutien et encouragement de chaque jour, ainsi que pour leur esprit d'équipe et d'entraide omniprésent au sein de la « Bryo Team »

Je souhaite particulièrement remercier Monsieur **Jacques Bardat**, de m'avoir transmis sa passion et fait découvrir l'univers des bryophytes

Je tiens à exprimer ma gratitude :

- au personnel du Laboratoire de Cryptogamie au Muséum National d'Histoire Naturelle, pour leur accueil bienveillant au sein des locaux depuis 2 ans et demi, particulièrement à **Claude Yéprémian**, **Alain Couté**, **Marie-Claude Mercier**, **Sandrine Lacoste**, **Simone Puiseux-Dao**, pour leur disponibilité et précieux conseils

- à l'Agence de l'Eau Artois Picardie pour leur soutien financier et logistique, plus particulièrement un grand Merci à **Jean Prygiel** et **Christophe Lesniak**

- au Laboratoire de Géochimie des Eaux (Paris VII), particulièrement à **Gérard Sarazin** et **Monique Pepe** pour leur contribution dans la réalisation des analyses chimiques et leur soutien

- aux **Fonds Européens de Développement Régional**, l'**A.N.V.A.R** d'avoir permis financièrement la réalisation de cette étude

- à la société **Tauw Environnement**, qui m'a offert le statut réglementaire pour réaliser ces recherches

Et 1000 Merci à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce travail.

SUMMARY

Since the 70s, aquatic bryophytes have been extensively used as bioindicator of water quality. Owing to their accumulation properties of pollutants, they give information about continuous or prompt pollution events. The subject of the present work is the development of an aquatic moss culture *Fontinalis antipyretica* Hedw. and its use as a standardized tool for biomonitoring studies on rivers.

The optimization of the culture permitted in a first time, to define the optimal parameters to get the biomass quickly and to avoid contaminations. The determined parameters are : irradiance of $20 \pm 3 \mu\text{mol.s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$, temperature of $12 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$, culture media composed of a Knop solution diluted 5 fold, NaHCO_3 (5 g.L^{-1}), $100 \mu\text{L.L}^{-1}$ of the modified solution Metal 49 ([Cu]/2), an airtight equipment (container in polypropylene, $V=10 \text{ L}$), a filtered aeration provided by a pump, a regular cut of the apical parts of mosses. In these conditions, the growth of the moss is evaluated at $1.12 \text{ cm. sem}^{-1}$, and 6 months are needed to obtain a transplant ($\sim 150 \text{ g}$ fresh weight).

In a second time, an experimental contamination with Cd^{2+} (3.8, 18.5 and 37 ppm) shows the uptake efficiency of the cultivated moss. The saturation concentration of Cd^{2+} has been valued to almost $10\,000 \mu\text{g.g}^{-1}$ of dry weight.

In a third time, a biomonitoring survey was conducted. Cultivated mosses was exposed at four sites in the North of France during 5 months, in order to follow the evolution of the concentrations of 13 trace metals (Al, Fe, Mn., Sb, Cd, Cu, Ni, Cu, Zn, Cr, Co, As, and V) in mosses and water. This study shows an uptake for all metals except for the Co. The stress index D665/D665a proportional to the concentration of chlorophyll a and its product of degradation, pheophytin a, has been used to control the health state the bioindicator.

Prior to make a diagnosis tool to assess metal contamination in continental waters, different calibrations remain to be carry out to improve this method, (adaptation of the present interpretation grid for autochthonous mosses to the cultivated organism), but the results obtained so far encouraged in this way. Furthermore this survey provides new perspectives in the biomonitoring of rivers, in adequation with French and European regulations, notably in the management of natural waters and the remaining of their ecological equilibrium.

KEY WORDS: *Fontinalis antipyretica*, Moss, Culture, Biomonitoring, Trace metals

LISTE DES PUBLICATIONS

- Ah-Peng C., 2001. Development of a diagnosis tool based on the use of an aquatic moss, *Fontinalis antipyretica* Hedw. stemming from a standardized culture for the estimation of rivers contamination by metals, In: Actes du VII ème congrès des étudiants au Muséum national d'Histoire naturelle, Paris 8-9 novembre, 4: 36.
- Ah-Peng C., Rausch de Traubenberg C. & Denayer F-O., 2003. Use of a moss culture as bioaccumulator for the biomonitoring of metal contamination in continental waters, Journal de Physique IV France 107: 25-28.
- Ah-Peng C. & Rausch de Traubenberg C., 2003. Bryophytes aquatiques biaccumulateurs de polluants et indicateurs écophysiologiques de stress: synthèse bibliographique, Cryptogamie-Bryologie (en révision).
- Rausch de Traubenberg C. & Ah-Peng C., 2003. A procedure to purify and culture in the long term a clonal strain of the aquatic moss *Fontinalis antipyretica* used as bioindicator for heavy metal, Archives of Environmental Contamination and Toxicology (sous presse).
- Ah-Peng C. & Leblond S., 2001. Les mousses bioindicatrices de la qualité de l'eau et de l'air, Poster présenté au Forum Connexion Environnement, Paris VII.

PLAN DU MEMOIRE

RESUME	1
SUMMARY	2
LISTE DES PUBLICATIONS	3
PLAN DU MEMOIRE	4
INTRODUCTION	9
CHAPITRE 1 ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE	12
I. Généralités sur les bryophytes	12
I.1. Systématique des bryophytes	12
I.2. Biologie des bryophytes	12
I.2.1. Morphologie	13
I.2.2. Cycle de vie	15
I.3. Ecologie des bryophytes	16
I.3.1. Les facteurs atmosphériques	16
I.3.2. Facteurs édaphiques	17
I.3.3. Les formes biologiques	18
I.4. Biogéographie	18
II. Utilisation des bryophytes comme bioindicateurs de la qualité des eaux	19
II.1. Les bryophytes aquatiques bioindicateurs	20
II.2. Bioaccumulation des polluants par les bryophytes	24
II.2.1. Les mécanismes de bioaccumulation des polluants métalliques	24
II.2.2. Les paramètres influant sur les mécanismes d'accumulation des métaux et radionucléides	36
II.2.3. Influence de l'acidité des eaux sur les phénomènes d'accumulation des ETM	38
II.3. Les phénomènes physiologiques de décontamination chez les bryophytes	40
II.3.1. Les polluants minéraux et les radionucléides	40
II.3.2. Les polluants organiques	42
II.4. Utilisation des bryophytes aquatiques pour la biosurveillance des cours d'eau	42
II.4.1. La biosurveillance passive	44
II.4.2. La biosurveillance active	45
II.4.3. Les intérêts et inconvénients liés à l'utilisation des bryophytes dans la biosurveillance des milieux aquatiques	46
II.5. Bioindication par l'utilisation des réponses physiologiques liées au stress chez les bryophytes aquatiques	47
II.5.1. Le stress oxydant	48
II.5.2. La synthèse chlorophyllienne et la respiration	49
II.5.3. Les changements de concentration et les changements dans la localisation des éléments essentiels au niveau cellulaire	50
II.5.4. Effets visibles de xénobiotiques sur les cellules	50
II.6. Les différents indices d'évaluation de la qualité des cours d'eau en relation avec les bryophytes aquatiques	51
II.6.1. Les indices écologiques	51
II.6.2. Les indices de contamination	55
II.7. Conclusion et perspectives	60
III. Cadre réglementaire : La Directive Cadre 2000	61
III.1. Un avenir durable pour l'eau en Europe ?	61
III.2. Bref historique de la politique de l'eau en Europe et en France.	62
III.3. Les objectifs fondamentaux	64

III.4. Les définitions clés de la DCE-----	64
III.5. Synthèse -----	65
III.6. Les difficultés de mise en oeuvre-----	67
III.7. Similitudes et apports de la DCE à l'organisation française de la gestion des ressources en eau -----	68
III.8. Calendrier général de la directive -----	70
III.9. Conclusion et perspectives -----	71
IV. Culture de bryophytes aquatiques : état des connaissances-----	72
IV.1. Difficultés rencontrées lors de cultures de bryophytes -----	72
IV.2. Procédures de culture -----	73
IV.2.1. Les substrats utilisés-----	73
IV.2.2. Les substances de croissance-----	74
IV.2.3. L'appareillage-----	74
IV.2.4. Les conditions de stérilité-----	74
IV.2.5. Les durées de culture-----	75
V. L'organisme étudié, la mousse <i>Fontinalis antipyretica</i> Hedw.-----	76
V.1. Caractéristiques biologiques et écologiques de cette espèce-----	76
V.1.1. Biologie-----	76
V.1.2. Physiologie -----	76
V.1.3. Forme de vie -----	77
V.1.4. Utilisation comme bioindicateur de la qualité des eaux -----	78
V.2. Caractéristiques de la culture de <i>Fontinalis antipyretica</i> -----	78
V.2.1. Origine -----	78
V.2.2. Variété intraspécifique -----	78
V.2.3. Traitements précédents -----	79
CHAPITRE 2 OBJECTIFS DES EXPERIENCES, MATERIELS ET METHODES, PRESENTATION DES SITES D'ETUDE -----	81
I. Techniques d'analyse utilisées-----	81
I.1. Méthodes de dosage des éléments métalliques dans les eaux et les bryophytes -----	81
I.1.1. Principe et appareillage -----	81
I.1.2. Protocole d'analyse des échantillons -----	84
I.1.3. Qualité de la mesure-----	86
I.2. Méthode de mesure de l'indice de stress D665/D665a -----	89
I.2.1. Principe -----	89
I.2.2. Méthodologie-----	89
I.3. Méthode de mesure de la croissance de la mousse -----	90
I.4. Méthode de mesure du stress oxydant -----	90
I.4.1. Extraction et dosage de la superoxyde dismutase (SOD)-----	90
I.4.2. Extraction et dosage du malondialdéhyde (MDA) -----	91
I.5. Méthode d'observation en microscopie photonique -----	91
II. Expériences en laboratoire-----	91
II.1. Méthodologie de culture -----	92
II.1.1. Chambre de culture -----	92
II.1.2. Appareillage -----	92
II.1.3. Méthodologie-----	94
II.2. Optimisation de la culture de <i>Fontinalis antipyretica</i> -----	96
II.2.1. Détermination de la dilution optimale du milieu de culture Knop-----	96
II.2.2. Estimation des niveaux de base en éléments traces métalliques dans la culture-----	97
II.2.3. Effet du CO ₂ sur la croissance de la mousse en culture-----	97
II.3. Impact d'une contamination de cadmium sur <i>F. antipyretica</i> -----	98
II.3.1. Objectifs -----	98
II.3.2. Protocole-----	99
II.4. Contrôle de l'état physiologique de <i>F. antipyretica</i> en utilisant l'indice de stress D665/D665a : impact de deux facteurs environnementaux -----	101
II.4.1. Suivi du rapport D665/D665a dans une culture-----	101
II.4.2. Impact d'un choc lumineux et d'une température élevée sur la mousse en culture -----	101

II.5. Estimation de la croissance de <i>F. antipyretica</i> en culture -----	102
II.5.1. Objectif-----	102
II.5.2. Protocole-----	102
II.6. Obtention de transplants pour la biosurveillance active -----	103
II.6.1. Objectif-----	103
II.6.2. Méthodologie-----	103
III. Expérimentations in situ -----	103
III.1. Choix et présentation des sites étudiés-----	103
III.1.1. Site de référence de Tortequesne -----	104
III.1.2. Site intermédiaire de Chocques -----	105
III.1.3. Site intermédiaire de Brebières -----	105
III.1.4. Site de qualité médiocre de Courrières-----	105
III.2. Méthodologie et appareillage pour la mise en place des transplants -----	106
III.2.1. Calendrier de la surveillance -----	106
III.2.2. Récolte des mousses-----	106
III.2.3. Les corbeilles d'exposition-----	106
III.2.4. Technique de transfert-----	107
III.3. Prélèvement, conditionnement et traitement des échantillons -----	107
III.3.1. Echantillonnage -----	107
III.3.2. Analyses physico-chimiques -----	108
III.3.3. Récapitulatif du calendrier d'exécution -----	108
IV. Traitements statistiques -----	108
CHAPITRE 3 RESULTATS ET DISCUSSIONS -----	109
I. Expériences en laboratoire-----	109
I.1. Justification du choix de l'appareillage de culture -----	109
I.1.1. Etanchéité de la culture -----	109
I.1.2. Influence du mode de culture sur la morphologie de l'organisme-----	109
I.2. Optimisation de la culture de <i>Fontinalis antipyretica</i> -----	110
I.2.1. Détermination de la dilution optimale du milieu de culture Knop-----	110
I.2.2. Effet du CO ₂ sur la croissance de la mousse en culture-----	113
I.2.3. Estimation de la croissance-----	114
I.3. Evaluation des niveaux de base en ETM dans la mousse en culture-----	115
I.4. Impact d'une contamination contrôlée de cadmium sur la mousse -----	119
I.4.1. Rappels des objectifs -----	119
I.4.2. Concentrations en cadmium dans les organismes -----	119
I.4.3. Facteurs de bioconcentration -----	122
I.4.4. Conclusions-----	127
I.5. Contrôle de l'état physiologique de la mousse en culture en utilisant l'indice de stress D665/D665a: impact de deux facteurs environnementaux-----	127
I.5.1. Rappels des objectifs -----	127
I.5.2. Suivi de l'état physiologique d'une culture-----	128
I.5.3. Influence du conditionnement des mousses en sacs plastique -----	129
I.5.4. Influence d'une température de 50°C sur le stress-----	129
I.5.5. Influence d'une forte luminosité -----	130
I.6. Discussion sur le mode actuel de culture -----	132
I.6.1. Cycle de culture -----	132
I.6.2. Culture en bio- réacteur ? -----	132
II. Expérimentation in situ : suivi de la contamination métallique des cours d'eau en utilisant la mousse en culture -----	133
II.1. Rappels des objectifs -----	133
II.2. Obtention de transplants -----	133
II.3. Concentrations initiales en ETM dans les transplants -----	134
II.4. Qualité physico-chimique des eaux sur les sites étudiés-----	134
II.5. Résultats de la biosurveillance active -----	135
II.5.1. Site 1 : Tortequesne -----	135
II.5.2. Site 2 : Chocques -----	136

II.5.3. Site 3 : Brebières-----	138
II.5.4. Site 4 : Courrières-----	141
II.5.5. Suivi de l'état de santé des transplants-----	142
II.5.6. Suivi du stress oxydant-----	142
II.5.7. Observations macroscopiques-----	143
II.6. Synthèse -----	144
DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSIONS -----	145
Pérennité de la culture de <i>F. antipyretica</i> -----	145
Propriétés indicatrices de la mousse en culture-----	145
Avantages et inconvénients liés à l'utilisation d'une mousse cultivée dans la biosurveillance active des cours d'eau -----	146
Améliorations de la méthode « Bryophytes»-----	146
Difficultés de terrain -----	147
Evaluation de l'état de santé de l'organisme bioindicateur-----	148
Conclusions et perspectives-----	148
LISTES DES TABLEAUX -----	150
LISTE DES FIGURES -----	152
BIBLIOGRAPHIE -----	154
ANNEXES -----	165
ANNEXE 1 : Recette pour 100 mL de solution Metal 49 -----	166
ANNEXE 2 : Photographies-----	167
ANNEXE 3 : Expérience KNOP-----	168
ANNEXE 4 : Contamination de la mousse <i>F. antipyretica</i> au Cd ²⁺ en laboratoire-----	169
ANNEXE 5 : Micropolluants minéraux sur eau brute-----	170
ANNEXE 6 : Données obtenues, site de Tortequesne -----	171
ANNEXE 7 : Données obtenues, site de Chocques-----	173
ANNEXE 8 : Données obtenues, site de Brebières -----	175
ANNEXE 9 : Résultats obtenus pour le suivi de l'indice de stress dans les transplants sur les sites d'étude -----	177
ANNEXE 10 : Publication relative à l'étape de purification de la culture (souche FA6VB) -----	178

INTRODUCTION

Le présent travail s'inscrit dans le cadre d'un programme de recherche tripartite entre le **Muséum national d'Histoire naturelle**, l'**Université de Lille 2** et la société **Tauw Environnement**. Son objectif est d'envisager le développement d'une culture de la mousse aquatique *Fontinalis antipyretica* Hedw. pour son utilisation dans la biosurveillance des milieux aquatiques.

∞ Justification du sujet de recherche

Depuis les années 70, les bryophytes sont largement utilisées pour l'estimation de la contamination en éléments traces métalliques dans les cours d'eau aussi bien en France que dans les pays étrangers (Belgique, Allemagne, Etats-Unis, Italie...).

Cette étude tient lieu d'étude de faisabilité, elle a pour objectif à court terme d'optimiser l'outil « mousse aquatique en culture » sous différents aspects au sein de l'équipe de Bryologie du Muséum National d'Histoire Naturelle à Paris. Cette mousse *Fontinalis antipyretica* Hedw., est couramment utilisée par les Agences de l'Eau françaises, pour la surveillance de la contamination des eaux courantes par les micropolluants organiques (Claveri & Mersch, 1998). Selon ses résultats à moyen terme, cette étude permettrait d'envisager des cultures standardisées pour l'estimation de la pollution en métaux traces dans les cours d'eau des bassins versants des 6 agences de l'eau françaises. L'utilisation d'une culture standardisée procurerait plusieurs avantages. Notamment une meilleure homogénéité des résultats recueillis, ce qui n'est pas encore le cas à l'heure actuelle, car le prélèvement d'espèces autochtones n'est pas toujours aisé (présence, abondance et reconnaissance des espèces indicatrices). Ainsi, une culture de mousse monospécifique ôterait ce doute à chaque prélèvement. De plus, l'utilisation d'une seule espèce de mousse et la même à chaque fois issue de culture standardisée, permettraient une meilleure comparaison des résultats entre les différentes agences sur l'ensemble du territoire. A long terme, une culture de bryophyte aquatique permettrait de suivre en routine aussi bien les éléments traces métalliques que d'autres polluants organiques ou nucléaires ; serait alors envisagée une normalisation de la technique suivie d'une extension sur tout le territoire.

∞ Contexte de l'étude

L'utilisation de mousses aquatiques comme bioaccumulateurs de polluants métalliques est généralisée au sein des réseaux de surveillance de la qualité des cours d'eau français. Mais cette méthode n'est pas applicable pour le bassin versant de l'Artois Picardie. En effet, il est

de plus en plus rare de trouver des mousses présentes en quantité suffisante pour réaliser le suivi des cours d'eau. Une méthode alternative existe, la surveillance active, en prélevant des mousses d'un autre cours d'eau « sain » où la mousse est présente et peut être transplantée sur le site d'étude. Mais pour des raisons pratiques (stock non épuisable de mousses dans les rivières, recherche de sites à proximité et pour le mieux non contaminés...), les réseaux de surveillance basés sur l'utilisation des bryophytes cessent (cas de l'Agence de l'Eau Artois Picardie). Ainsi, l'emploi de mousses issues de cultures standardisées en laboratoire permettrait de résoudre ces problèmes.

∞ **Problématiques**

- Comment permettre une obtention de biomasse rapide, quel est l'appareillage et le milieu de culture adéquat pour la mousse *F. antipyretica* ?
- Une culture de *F. antipyretica* au laboratoire est-elle viable et pérenne ?
- Cette culture peut-elle être utilisée en biosurveillance active ? La culture résistera-t-elle au transfert de la chambre de culture vers le milieu naturel non pollué ou contaminé ?
- Quelle méthode peut être utilisée pour l'évaluation de l'état de santé de l'organisme ?

∞ **Structure du mémoire**

Ce mémoire s'articule en trois chapitres :

- Un premier chapitre concerne **l'analyse bibliographique** qui rappelle le contexte de l'étude et se divise en :

une première partie où des généralités sur les bryophytes (systématique, biologie écologie et biogéographie) seront succinctement présentées ;

une deuxième partie est destinée à une synthèse bibliographique portant sur l'utilisation des bryophytes aquatiques en tant que bioindicateurs de la qualité des eaux,

une troisième partie traitant du cadre réglementaire de cette étude plus particulièrement de la Directive Cadre sur l'eau 2000. Cette synthèse a été réalisée pour la validation de la première année de DRT,

une quatrième partie décrivant brièvement les méthodes de cultures utilisant les bryophytes ;

une dernière partie clôture ce premier chapitre, par une description de la mousse aquatique *Fontinalis antipyretica* en culture.

- Une deuxième partie présente les **matériels et méthodes** utilisés lors de ces travaux
- Une troisième partie est destinée à la **présentation** et la **discussion des résultats** de l'étude.
- Une quatrième partie synthétise les résultats obtenus, traite des **modalités d'utilisation d'une mousse aquatique cultivée** dans la biosurveillance active des cours d'eau et des nouvelles perspectives que cette méthode offre.

Chapitre 1 : Analyse bibliographique

Chapitre 1 Analyse bibliographique

I. Généralités sur les bryophytes

I.1. Systématique des bryophytes

L'embranchement des bryophytes (du grec *bruos* : mousse et *phuton* : plante) comprend en grande majorité des végétaux chlorophylliens, sauf exception comme le genre *Cryptothallus*. Organismes de petite taille, elles ne possèdent ni racine, ni réel vaisseau conducteur. Les bryophytes sont des organismes généralement photo- autotrophes, elles colonisent tous les milieux terrestres et aquatiques à l'exception curieusement du milieu marin, où elles ne colonisent que les abords, comme l'espèce *Pottia heimii* (Hedw.) Fűrnr. qui se rencontre sur les pelouses subhalophiles, ou *Schistidium maritimum* (Turn.) Br. Eur. sur les roches sous embruns ou encore *Riella helicophylla* (Bory et Mont.) Mont., dans des eaux saumâtres (Com. Pers, Bardat, 2003).

On compte selon les auteurs entre 20000 et 23000 espèces dont 1260 en France qui peuvent être réparties en trois classes : Hépatiques, Anthocérotes et Mousses.

- Les **Hépatiques** sont généralement divisées en deux groupes majeurs les *Marchantiideae*, hépatique à thalle différencié et les *Jungermanniideae* comprenant les Metzgeriales, hépatiques à thalle peu différencié et les Jungermanniales hépatiques à tige feuillée, ces dernières représentent 85% des hépatiques (Crandall-Stotler & Stotler, 2000),

- Les **Anthocérotes** comprennent environ une centaine d'espèces,

- Les **Mousses** sont composées des *Bryopsideae*, *Andreaeopsideae*, *Sphagnopsideae*, et les *Takakiaopsideae* (Frahm, 2001).

Dernièrement, Crum subdivise les bryophytes en six classes: Hepatopsida, Anthocerotopsida, Andreaeopsida, Sphagnopsida, Takakiopsida et Bryopsida (Crum, 2001). Mais selon une approche cladistique ou phylogénique (Lecointre & Le Guyader, 2001), la classification diffère. On constate donc que la nomenclature des bryophytes demeure en constante évolution.

I.2. Biologie des bryophytes

Les Bryophytes, au sens large, sont le deuxième plus grand phylum de plantes terrestres, en nombre d'espèces après les Angiospermes et se rencontrent sur tous les continents. Au cours de leur cycle biologique elles présentent deux formes morphologiquement distinctes l'une haploïde, le gamétophyte (partie qui produit et porte les

gamètes), l'autre diploïde, le sporophyte (partie qui produit et porte les spores), ce dernier vivant en héli- parasite sur le gamétophyte.

I.2.1. Morphologie

Les bryophytes sont différenciées en fonction de la position du sporophyte sur le gamétophyte, on distingue (Bardat & Boudier, 2002):

- les mousses **acrocarpes** (*akros* : sommet ; *carpos* : fruit) et hépatiques **acrogynes**, dont les sporophytes sont terminaux. Ces plantes sont souvent en touffes serrées ou en coussinets permettant une meilleure rétention de l'eau entre les tiges

- les mousses **pleurocarpes** (*pleuros* : côté) et hépatiques **anacrogynes** dont les sporophytes sont latéraux. Il s'agit en général de mousses de grande taille à axes ramifiés.

I.2.1.1. Principaux types de tissus

Leur différenciation cellulaire est peu importante. La croissance s'élabore à partir d'une cellule initiale apicale qui se divise selon 3 directions. La plupart des cellules filles conservent un potentiel mitotique, constituant ainsi un véritable méristème qui se divise selon une rotation hélicoïdale. Les cellules mises en place peuvent se différencier pour former les tissus suivants :

Parenchyme : il présente des cellules de dimension variable et à parois minces.

Collenchyme : il est constitué de cellules allongées aux parois épaissies de couleur souvent jaune- brun appelées stéréides qui jouent un rôle de soutien

Des **tissus conducteurs** d'eau primitifs. Ceux-ci sont pourtant absents chez de très nombreuses espèces, on les retrouve essentiellement chez les *Polytrichaceae*. On distingue (*cf.* Figure 1) :

Les **hydroïdes** qui forment un faisceau axial de cellules allongées sans cytoplasme aux parois latérales minces et terminales obliques avec de nombreuses ponctuations. Ils jouent le rôle de trachéides des végétaux vasculaires primitifs, mais ils ne sont pas lignifiés.

Les **leptoïdes** sont des cellules allongées et renflées aux extrémités qui forment des îlots autour d'un faisceau axial d'hydroïdes. Ce sont des cellules vivantes ayant conservé leur cytoplasme. Leurs parois latérales sont épaisses, les extrémités sont obliques, plus minces, avec de nombreux plasmodesmes, cordons de cytoplasme qui relient les cellules entre elles. Elles jouent un rôle apparenté à celui des cellules criblées du phloème.

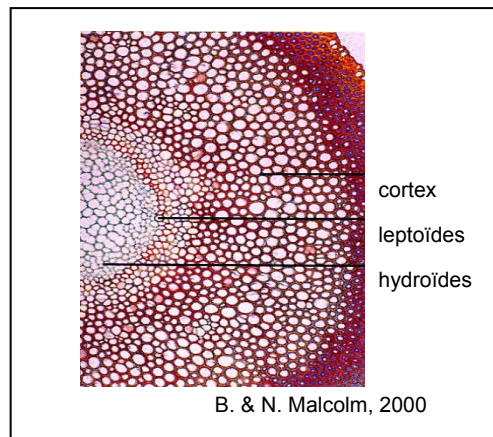


Figure 1: Photographie des tissus conducteurs primitifs de *Polytrichaceae* (Malcom & Malcom, 2000)

I.2.1.2. Morphologie du gamétophyte et du sporophyte

La phase haploïde est représentée par le gamétophyte. Celui-ci peut être soit **monoïque**, dans ce cas les archégonies et les anthéridies sont portés par le même individu, ces organes sexuels peuvent être positionnés de manière diverse sur la plante, ou bien **dioïque** : le gamétophyte est unisexué, il va comporter un seul organe sexué mâle ou femelle.

Le gamétophyte se présente sous deux grands types morphologiques :

- un type présentant un axe feuillé pour les Mousses et les Hépatiques à feuille : les feuilles sont généralement constituées d'une lame parenchymateuse unistrate (plus rarement pluristratifiée, comme chez certaines *Grimmiaceae*) avec pour les mousses éventuellement une nervure représentant une ligne centrale pluristratifiée renfermant dans les cas les plus complexes stéréides, leptoïdes et hydroïdes (*Polytrichaceae*).

- un type à thalle pour les Anthocérotes et les Hépatiques à thalle. On entend par thalle un appareil végétatif constitué d'une lame souvent de couleur verte et plus ou moins étalée sur le substrat. Le thalle est ici structuré d'une manière plus ou moins complexe ce qui le différencie de celui des algues (souvent composé de plusieurs assises de cellules avec la présence de chambres aérifères, de pores...)

Le gamétophyte est fixé au substrat par des rhizoïdes, fins filaments pouvant être formés d'une seule cellule (Hépatiques et Anthocérotes) ou de plusieurs cellules disposées en chaîne, sur un seul rang et dont les parois transversales sont obliques (Mousse et Andreae).

Le sporophyte se compose:

- d'un *pied* ou d'un *sucoir*, organe qui lui permet de rester fixé sur le gamétophyte et au niveau duquel sont assurés les échanges hydriques et chimiques,

- en prolongation duquel se trouve un axe nu nommé, *pédicelle*, *soie* ou *seta*, celle-ci pouvant être réduite ou absente,

- la soie porte en extrémité un organe plus ou moins renflé, où sont élaborées les méiospores. C'est la *capsule* des bryophytes, l'organisation de cette capsule est variable (cf. Figure 2).

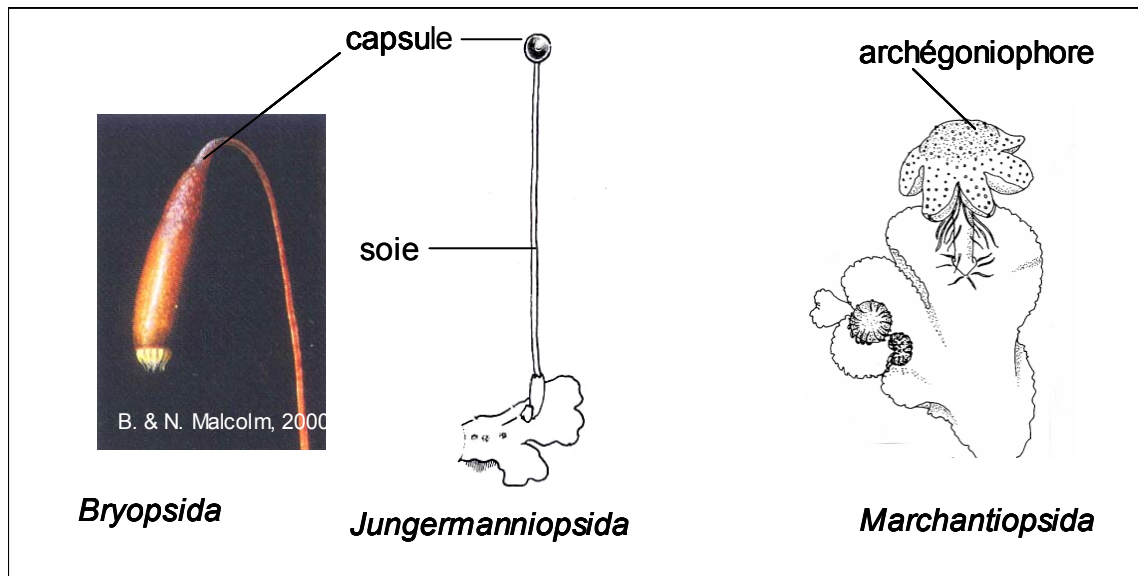


Figure 2 : Capsules d'hépatiques et de mousses (d'après site Internet)

I.2.2. Cycle de vie

Le cycle de vie des bryophytes est haplodiplophasique (cf. Figure 3), c'est une alternance de la phase haploïde (gamétophyte) et diploïde (sporophyte). En ce qui concerne, la reproduction sexuée, la présence d'eau est nécessaire à la fécondation, l'eau joue un rôle dans le transport des anthérozoïdes (gamète mâles) vers l'archégone. La spore, première cellule gamétophytique va pouvoir former un protonéma filamenteux ramifié qui donnera naissance à un gamétophyte feuillé. Ce dernier peut ensuite produire des propagules qui en germant formeront de nouveaux gamétophytes.

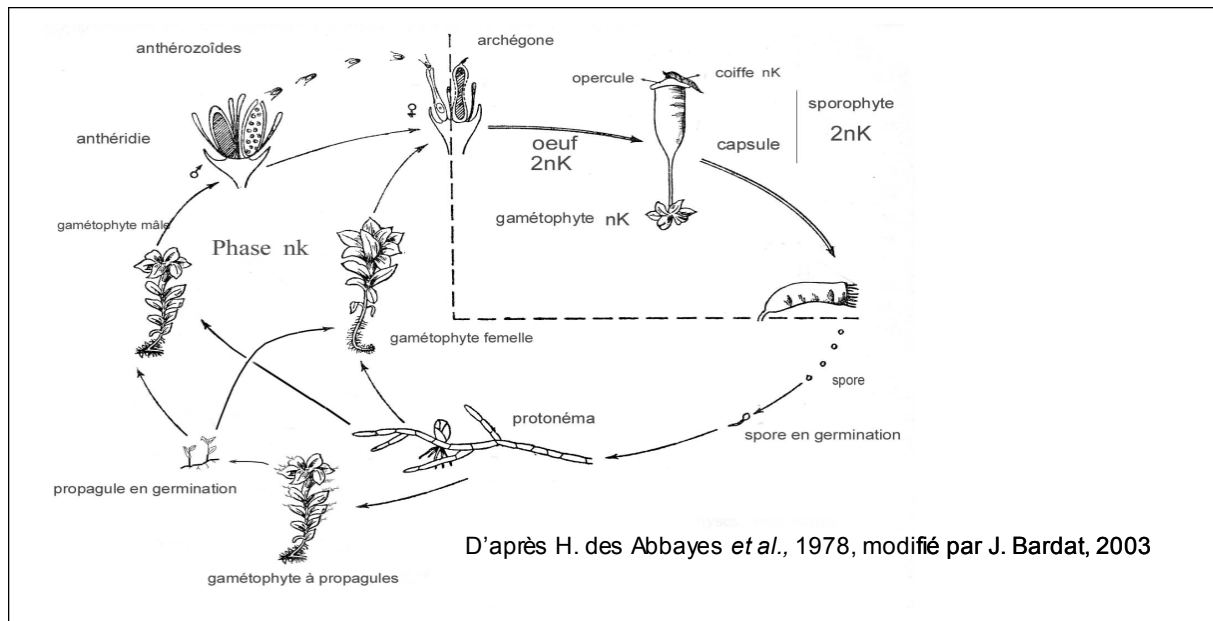


Figure 3: Cycle de reproduction des bryophytes

I.3. Ecologie des bryophytes

I.3.1. Les facteurs atmosphériques

I.3.1.1. L'humidité

D'une manière générale, la vie des bryophytes est très dépendante de l'eau et des mécanismes biologiques ou des dispositifs particuliers permettant son économie. Toute la plante a la capacité d'adsorber de l'eau et sa circulation au sein du végétal se réalise selon divers processus :

- par capillarité externe : une structure en touffe, des feuilles appliquées contre l'axe, la présence de tomentum (manchon de *nemata*), des parois cellulaires irrégulières sont autant d'éléments favorables à la circulation mais également à la rétention d'eau,

- par capillarité interne au sein des cellules mortes,

- par la structure même des parois (conduction apoplasmique, déplacement de substances par les parois cellulaires),

- par les hydroïdes et les leptoïdes qui ont souvent un rôle limité.

Cependant, il est important de rappeler, que ce sont des organismes sans racines, ni système vasculaire élaboré, ainsi les apports extérieurs (nutritifs ou aqueux) dépendent principalement du milieu atmosphérique ou aquatique dans lequel ils se situent.

En règle générale, les bryophytes utilisent l'eau par toute leur surface quand celle-ci est disponible et peuvent survivre à des périodes plus ou moins longues de dessiccation. On

peut noter un des paramètres d'adaptation remarquable, qui est la **reviviscence**, c'est-à-dire la capacité d'un individu de supporter la déshydratation très accentuée du protoplasme de ses cellules et de reprendre vie très rapidement lors du retour à des conditions favorables. De plus certains individus sont dits **xérophytes**, on les retrouvera dans des milieux secs, alors que d'autres sont inféodés aux milieux humides, ils sont aquatiques ou **hygrophiles** et dépendent du degré de saturation de la veine aqueuse.

I.3.1.2. La lumière

Les bryophytes, sauf rares exceptions, étant des végétaux chlorophylliens, autotrophes pour le carbone, la lumière solaire constitue pour elles le facteur énergétique fondamental. Chaque espèce possède ses propres exigences face à l'intensité d'éclairement, qui présente pour chacune d'elle, un minimum, un optimum et un maximum. Comme pour l'humidité, certaines espèces nécessitent une forte exposition lumineuse, comme les *Andreae*, ou au contraire colonisent des milieux très ombragés (espèces lucifuges), supportant de très faibles éclaircissements comme *Schistostega Pennata* (Hedw.) Web. & Mohr. ou *Pseudotaxiphyllum elegans* (Brid.) Z. Iwats.

I.3.2. Facteurs édaphiques

Ce sont les facteurs déterminés par les caractères du substrat et celui-ci est très varié, en ce qui concerne la flore muscinale.

I.3.2.1. La nature physique du substrat

Les bryophytes sont retrouvées sur différents types de substrats :

- sur des **roches** de diverses natures (calcaire, argile, sables, gneiss, granites, schistes, roches volcaniques...) comme les *Grimmiaceae*, *Andreae*,
- sur les différentes sortes d'**humus** ; sur les écorces des arbres (*Orthotricaceae*...); sur les **feuilles** des végétaux supérieurs (*Lejeuneaceae*...),
- dans l'**eau libre** ; sur les supports artificiels (ciment, béton, tuiles etc.),
- sur les matériaux organiques en décomposition d'origine animale (bouse, cadavre, pelote de déjection...), telle que les *Splachneaceae*. Elles se fixent aux moindres aspérités par leurs rhizoïdes.

I.3.2.2. Le pH

Les bryophytes trouvent dans leur support les ions minéraux nécessaires à leur nutrition. On distingue ainsi :

- pour des substrats riches en ions Ca^{2+} , la présence d'espèces calcicoles comme *Seligeria calcarea* (Hedw.) Br. Eur.,
- pour des substrats avec une dominance d'ions alcalins et alcalino-terreux, la présence d'espèces basophiles, par exemple *Thamnobryum alopecurum* (Hedw.) Nieuwl.,
- pour des substrats riches en ions H^+ , la présence d'espèces calcifuges ou acidophiles telles que *Grimmia patens* Hornsch., *Racomitrium heterostichum* (Hedw.) Brid.,
- pour des substrats riches en éléments métalliques (Cu, Pb, Mn...), comme par exemple le genre *Mielichhoferia* Hornsch.,
- pour des substrats riches en éléments azotés, les espèces nitrophiles, notamment *Brachythecium rutabulum* (Hedw.) Br.Eur.

I.3.3. Les formes biologiques

I.3.3.1. Les formes de vie : Life form et Growth form

The **Life form** : forme vitale ou biologique. C'est l'*habitus* de la plante qui est en harmonie avec ses conditions de vie (Bardat & Boudier, 2002)

The **Growth form** : correspond à l'ensemble des caractères externes de la plante, c'est la structure de croissance des individus, et non pas l'agencement des individus entre eux (Bardat & Boudier, 2002).

I.3.3.2. Les stratégies de vie

On peut distinguer des espèces éphéméroïdes, annuelles ou pérennes. Les premières ont un cycle de vie très court (de l'ordre de quelques semaines), les secondes bouclent le cycle complet en plusieurs mois, et les pérennes offrent des gamétophytes permanents, et ont une reproduction sexuée plus irrégulière.

I.4. Biogéographie

Les bryophytes sont présentes dans toutes les régions du globe, de l'équateur aux terres arctiques, et du littoral aux systèmes montagneux. Les espèces ayant des exigences strictes occupent des stations particulières dans des régions bien circonscrites du globe. Mais quelques unes sont présentes dans le monde entier telles que *Funaria hygrometrica* (Hedw.) ou *Ceratodon purpureus* (Hedw.) Brid., qui sont dites cosmopolites. Du fait de leur petite taille et de leur capacité à occuper et exploiter d'innombrables micro-stations, les aires de répartition des bryophytes sont beaucoup moins précises et pertinentes que celles des végétaux supérieurs. Toutefois certaines espèces sont inféodées à certains biotopes, il y a des

espèces exclusives des hautes montagnes, des régions arctiques ou tropicales... De plus, leur répartition est souvent liée à leur mode de dissémination par spores, propagules ou fragments végétatifs qui peuvent s'exprimer sur de longues distances.

Les bryophytes, organismes résistants au pouvoir colonisateur indéniable, peuvent être des indicateurs de variations passées mais plus couramment, elles sont utilisées en tant qu'indicatrices de l'état de santé des écosystèmes, aptitudes détaillées dans le paragraphe suivant.

II. Utilisation des bryophytes comme bioindicateurs de la qualité des eaux

Etant le réceptacle direct d'effluents industriels, recevant en plus les retombées atmosphériques et les pollutions diffuses provenant de sols contaminés, les systèmes aquatiques sont des milieux très exposés. Ces pollutions sont préjudiciables à l'équilibre écologique du milieu aquatique et présentent un risque environnemental et sanitaire.

La contamination de la biosphère en micropolluants métalliques est un fait admis dans les pays industrialisés. S'ajoutent à celle-ci, la pollution des milieux par des composés organiques répandus dans les écosystèmes par le biais de diverses sources (agriculture intensive, industrie électrique...) ainsi que la présence d'éléments radioactifs (radionucléides) émis par les centrales et les accidents nucléaires. Désormais, de plus en plus de micropolluants minéraux (cadmium, mercure, zinc...), de composés organiques (HAP, PCB...) et de radionucléides (^{137}Cs , ^{60}Co , ^{54}Mn ...) induisent une contamination chronique d'un nombre croissant d'écosystèmes aquatiques continentaux.

Divers compartiments biologiques et physiques susceptibles d'accumuler les ETM (éléments traces métalliques) ont été étudiés :

- les sédiments (André & Lascombe, 1985), qui par leur capacité de stockage des polluants présentent un danger pour les écosystèmes,
- les plantes phanérogames (Kovács, 1978; Kovács & Podani, 1986),
- les plantes cryptogames comme par exemple le lichen aquatique *Dermatocarpon luridum* (With.) Laundon (Chatenet & Botineau, 2001), cependant moins répandu que les bryophytes aquatiques dont une dizaine d'espèces sont proposées comme espèces bioindicatrices (Mouvet *et al.*, 1986b).

Dans les années 1970, des études ont mis en évidence que certains végétaux aquatiques accumulaient les éléments métalliques à de très fortes concentrations à proximité

de sites miniers (Burton & Peterson, 1979 ; Dietz, 1976 ; McLean & Jones, 1975 ; Whitton & Say, 1975). Cette propriété de bioaccumulation a suggéré l'utilisation des bryophytes aquatiques pour la surveillance des métaux traces dans l'eau (Empain, 1973). La mise en évidence de la bioaccumulation de composés organiques par les bryophytes aquatiques est plus récente, datant de 1981 (Frisque, 1981).

Ce chapitre porte essentiellement sur l'utilisation des bryophytes comme bioindicateurs des milieux aquatiques et plus particulièrement sur la bioaccumulation des polluants et sur la biosurveillance des eaux en France.

II.1. Les bryophytes aquatiques bioindicateurs

Les espèces utilisées pour la bioindication des milieux aquatiques appartiennent la plupart du temps à la classe des *Bryopsida*, mais certains chercheurs, utilisent aussi les Sphaignes et les Hépatiques comme bioaccumulateurs (Carballeira & Lopez, 1997 ; Everard & Denny, 1985; Lehtonen, 1989 ; Spearing, 1972). Glime & Vitt définissent les « bryophytes aquatiques » en fonction de leurs adaptations physiologiques aux fluctuations du niveau de l'eau. Ainsi, ils distinguent (Glime & Vitt, 1984):

- **les bryophytes aquatiques obligées** : constituées d'espèces qui tolèrent une étroite gamme de fluctuations du niveau de l'eau, ce sont des espèces strictement aquatiques ;

- **les bryophytes aquatiques facultatives** : composées d'espèces qui supportent des fluctuations importantes du niveau de l'eau ; ces espèces sont présentes dans des habitats la plupart du temps submergés, mais elles peuvent tolérer des périodes prolongées de dessiccation pendant les saisons de basses eaux ;

- **les bryophytes semi-aquatiques émergentes** : ces espèces tolèrent à la fois des périodes de totale immersion et/ou dessiccation.

L'utilisation des bryophytes aquatiques en tant que bioindicateurs des eaux et particulièrement des ETM dans la surveillance des systèmes aquatiques n'a cessé de croître depuis les premiers essais d'Empain en Belgique en 1973. Les espèces servant à la bioindication sont des bryophytes aquatiques obligées, la plupart du temps immergées, elles sont ainsi le reflet des eaux dans lesquelles elles se situent. D'après (Lopez *et al.*, 1997) et (Samecka-Cymerman *et al.*, 2000), ces organismes permettent d'obtenir une évaluation globale de la qualité environnementale du milieu (étude des réactions physiologiques liées au stress) et des concentrations environnementales de polluants particuliers (analyses des tissus). Cette dernière application est favorisée par le fait que de nombreuses bryophytes aquatiques

résistent à la toxicité de certains polluants (Frahm, 1976) et les accumulent dans leurs tissus ce qui en font de bons bioindicateurs (Empain, 1988 ; Mouvet, 1979 ; Pickering & Puia, 1969).

Un **polluant** ou contaminant est un produit chimique qui existe à un niveau jugé comme étant supérieur à celui qui doit se trouver normalement dans n'importe quelle composante de l'environnement. Ainsi, pour des produits synthétisés par l'Homme, tout niveau détectable est considéré comme anormal. Pour les substances naturelles, comme par exemple, les cyanotoxines libérées lors d'un bloom de micro-algues, il sera difficile d'établir la normalité car leur concentration varie d'un lieu à un autre et en fonction du temps.

Un **xénobiotique** est un composé étranger à un organisme particulier qui n'intervient pas dans le métabolisme normal. Il peut être naturel ou fabriqué par l'Homme.

La notion d'indicateur biologique a évolué d'années en années. Au départ, le terme de bioindicateur désignait tout organisme ou système biologique qui, par sa présence ou son absence, était caractéristique d'un milieu précis ou alors révélait l'incidence d'un facteur particulier. Un bioindicateur biologique est défini plus précisément de la façon suivante :

« Un indicateur biologique (ou bioindicateur) est un organisme ou un ensemble d'organismes qui - par référence à des variables biochimiques, cytologiques, physiologiques, éthologiques ou écologiques - permet de façon pratique et sûre de caractériser l'état d'un écosystème ou d'un écosystème et de mettre en évidence aussi précocement que possible leurs modifications, naturelles ou provoquées » (Blandin, 1986).

Nous considérons ici deux types de bioindication:

- l'étude des peuplements naturels, par la présence ou l'absence, la prolifération ou disparition d'espèces indicatrices renseigne sur la qualité globale du milieu. Cette approche ne sera pas développée dans cette synthèse
- l'étude des réponses physiologiques de certaines espèces indicatrices à des changements du milieu renseigne sur la qualité du milieu, de façon générale (études de la variation de la teneur en pigments, des réactions enzymatiques) et de façon précise (étude de la bioaccumulation des substances toxiques).

Ainsi de nombreuses études se sont succédées et ont mis en évidence la faculté des bryophytes à accumuler rapidement les polluants, particulièrement les métaux, et par conséquent à informer sur le niveau de contamination métallique des eaux. On entendra par le terme de **bioaccumulation**, l'addition de deux phénomènes, l'**adsorption** des polluants à la

surface de la plante et l'**absorption**, l'accumulation des polluants dans les cellules. Il est difficile de distinguer ces deux phénomènes lors d'une mesure de la concentration totale en un élément. Ainsi, les bryophytes, en accumulant les polluants au niveau de leurs parois et dans leurs cellules, vont les rendre plus facilement détectables dans l'environnement (Lopez & Carballeira, 1993 ; Mouvet, 1984b; Say & Whitton, 1983 ; Wehr & Whitton, 1983b ; Whitton *et al.*, 1982). Mais le recours à ces organismes vivants, ne se restreint pas seulement à une mesure de pollution comme le font les analyses chimiques sur sédiments ou dans l'eau, cette méthode apporte des informations sur un potentiel de biodisponibilité du polluant dans l'écosystème, la fraction biodisponible étant la part de la concentration totale d'un polluant à être captée par un organisme vivant. La fraction biodisponible d'une substance est difficile à appréhender et peu prévisible. En plus de sa dispersion dans les différents compartiments de l'environnement, la fraction biodisponible d'un polluant sera fonction de facteurs abiotiques (dégradation liée aux UV, aux processus chimiques...) et de facteurs biotiques (biodégradation par des microorganismes).

Ainsi la bioaccumulation est le processus par lequel les organismes vivants accumulent des substances chimiques directement à partir de l'environnement (air, eau, sol) et de leur nutrition. La bioaccumulation diffère en fonction des organismes.

Les bryophytes possèdent les qualités suivantes en tant que bioaccumulateurs de polluants :

- elles n'ont pas de racines, ce qui les préserve de l'influence de leur substrat et leur permet de refléter uniquement la qualité de l'eau en établissant un échange direct entre les feuilles et l'eau ; elles n'ont pas de système vasculaire, ce qui limite les transferts internes des polluants dans l'organisme ;

- elles se développent toute l'année et leurs peuplements sont très stables dans le temps et l'espace ; les espèces sont communes, abondantes et largement réparties géographiquement à travers l'Europe (Crum & Anderson, 1981 ; Smith, 1978).

- elles sont sédentaires, faculté utile dans les rivières, car retenues par leurs rhizoïdes à un support fixe (berges, pierres), ce qui permet d'étudier un site donné (Mouvet, 1985) ;

- elles résistent à de fortes concentrations en métaux et à des pollutions importantes. Elles possèdent une forte capacité d'accumulation des polluants : leurs facteurs de bioaccumulation sont souvent les plus élevés de tous les compartiments de l'écosystème aquatique (Mouvet, 1986) ;

- leur collecte, leur manipulation, leur transport et leur conservation sont aisés (les individus sont de taille réduite ce qui facilite l'échantillonnage)

- la corrélation entre les concentrations en métaux dans l'eau et dans les mousses est positive et quasi linéaire (Say & Whitton, 1983 ; Wehr & Whitton, 1983b ; Whitton *et al.*, 1982).

- elles accumulent très rapidement (de quelques heures à quelques jours) un grand nombre de micropolluants et se décontaminent (pour les métaux) en quelques semaines à quelques mois (Claveri *et al.*, 1994 ; Mersch, 1993 ; Vray *et al.*, 1992), ce qui permet la détection des pollutions accidentelles (Say *et al.*, 1981).

Les mousses aquatiques les plus utilisées pour leur faculté de bioaccumulation des polluants, et de par leur large répartition sont les suivantes :

- *Fontinalis antipyretica* Hedw., appartient à la famille des *Fontinalaceae*, et à l'ordre des Isobryales (Classification de Smith, 1978). Cette espèce des eaux courantes et stagnantes, fixée aux rochers, aux pierres et aux racines d'arbres, est commune et largement répartie en Europe. On la trouve également répartie en Asie (Japon), en Afrique du Nord et en Amérique du Nord (Smith, 1978).

- *Rhynchostegium riparioides* Hedw. est une *Brachytheciaceae*, de l'ordre des Hypnobryales (Classification de Smith, 1978), très commune en montagne dans les ruisseaux et les rivières ou certains habitats humides (falaises, carrières) répartie principalement en Europe et plus occasionnellement en Afrique du Nord (Algérie, Maroc), en Amérique du Nord, en Asie (Népal, Chine, Mandchourie, Japon) (Smith, 1978).

- *Cinclidotus riparius* (Brid.) Arnott. est une *Pottiaceae* de l'ordre des Pottiales. Cette espèce se fixe aux rochers, pierres ou racines dans les eaux courantes des ruisseaux et rivières d'Europe, d'Asie et d'Amérique du Nord (Smith, 1978).

- *Cinclidotus danubicus* Schiffn. & Baumg. est aussi une *Pottiaceae* de l'ordre des Pottiales. Moins fréquente que la précédente, cette bryophyte est répartie dans la zone eurasienne (Dierßen, 2001).

- *Amblystegium riparium* (Hedw.) B., S. & G. appartient également au groupe des Hypnobryales, famille des *Amblystegiaceae* (Classification de Smith, 1978). C'est une espèce fréquente et généralement distribuée dans les ruisseaux, les rivières, les étangs ou les habitats humides, le plus fréquemment en Europe, mais également en Asie (Sibérie, Tibet,

Vietnam, Japon), en Afrique du Nord (Algérie), en Amérique du Nord et Centrale, et en Australie (Smith, 1978).

II.2. Bioaccumulation des polluants par les bryophytes

II.2.1. Les mécanismes de bioaccumulation des polluants métalliques

II.2.1.1. Les polluants métalliques

∞ Généralités

Certains éléments métalliques comme le cuivre et le zinc agissent à faible concentration comme micro-nutriments pour la plante, mais lorsqu'ils sont en excès, ils peuvent inhiber la croissance de l'organisme. Ce sont des métaux dits hormétiques.

De nombreux travaux ont mis en évidence les propriétés accumulatrices des mousses pour les éléments traces métalliques : plomb, manganèse, cadmium, chrome et zinc (Burton, 1979 ; Mouvet, 1984a ; Say *et al.*, 1981), argent (Jones *et al.*, 1985), or (Jones, 1985), mercure (Roeck *et al.*, 1991), arsenic (Mouvet *et al.*, 1989), cuivre, cobalt, nickel et baryum (Wehr & Whitton, 1983a). D'autres études ont montré la corrélation entre ces concentrations en éléments dans les eaux et les concentrations en métaux mesurées dans les mousses (Goncalves *et al.*, 1994). De plus en plus d'écosystèmes sont contaminés par les métaux traces et les mousses représentent un point d'entrée des métaux dans la chaîne trophique pouvant mener à une amplification de ces éléments. Par ailleurs, il paraît important d'identifier la répartition des xénobiotiques (extracellulaire/intracellulaire) dans la cellule végétale afin d'évaluer les effets qu'un polluant peut engendrer sur l'organisme et de cette manière, permettre une meilleure interprétation des données de bioaccumulation recueillies lors d'études de biosurveillance des milieux. Ainsi depuis les années 1970, les phénomènes d'absorption, d'accumulation et de détoxification des métaux dans les mousses ont été beaucoup étudiés.

∞ Mécanismes et cinétiques d'adsorption et d'absorption cellulaire des éléments traces métalliques

Les concentrations en polluants dans les mousses indiquées dans la littérature, atteignent de telles valeurs qu'il semble impossible physiquement que tout le métal se situe dans les parties internes de la mousse. Cette aptitude vient du fait que la paroi cellulaire des bryophytes possède un grand nombre de groupements chimiques chargés négativement (groupes carboxyliques, polymères d'acides uroniques) contenant des protéines sulfurées, oxygénées et nitrogénées (Brown & Bates, 1990), qui sont des sites de fixation pour les

cations. Des réactions d'échange se produisent par le remplacement d'un cation lié à un site immobile extracellulaire chargé négativement, par un autre cation. Les liaisons électrostatiques qui se forment sont non sélectives et réversibles, le phénomène est rapide et passif. La surface des mousses se comporte ainsi comme une résine échangeuse d'ions.

Par ailleurs, les cations polyvalents ont une meilleure affinité que les cations monovalents (Clymo, 1963). A concentration molaire égale dans l'eau, les éléments à forte affinité comme le plomb et le cadmium sont accumulés de façon préférentielle par rapport aux éléments à plus faible affinité comme le calcium et le magnésium (Mouvet, 1986).

Les cinétiques d'échange d'ions entre l'eau et les bryophytes *Fontinalis antipyretica* et *Rhynchostegium riparioides* étudiées (Pickering, 1969 ; Maurel-Kermarrec *et al.*, 1983), ces études montrent que la fixation de plusieurs ETM s'effectue en quelques heures après le contact avec la solution, puis atteint un état stationnaire au bout d'un à trois jours.

Par ailleurs, il semblerait qu'une partie des ETM parvienne à franchir la barrière que représente la paroi pecto- cellulosique des cellules.

En 1969, trois processus successifs d'absorption intracellulaire du zinc chez *Fontinalis antipyretica* ont été montrés (Pickering & Puia, 1969):

- une première étape, très rapide, correspond à l'absorption du zinc dans l'espace libre de la membrane cellulaire après un processus d'adsorption, appelée fraction intercellulaire (Brown, 1982) ; elle n'est pas influencée par la température et la lumière ;
- une seconde étape de 90 min environ représente la pénétration au travers de la zone externe du protoplasme, appelée fraction extracellulaire (Brown, 1982) ; elle est peu influencée par la lumière et la température ;
- une troisième étape, durant plusieurs jours, correspond à l'accumulation intracellulaire (énergie dépendante) du zinc dans la vacuole sous forme soluble ou insoluble (Brown & Avalos, 1991) ; elle est influencée par la température et la lumière, c'est la fraction intracellulaire (Brown, 1982).

Plus récemment, (Mouvet & Claveri, 1999) ont montré par une méthode d'élution séquentielle initialement mise en évidence par (Brown & Wells, 1988), l'existence de trois localisations principales de l'accumulation du cuivre. Une fraction intercellulaire (Cu_{int}) localisée dans le fluide contenu dans les parois qui entourent les cellules, une fraction échangeable (Cu_{exch}) ou extracellulaire (Brown, 1982) qui correspond aux métaux liés aux sites d'échanges à la surface de la paroi et une fraction résiduelle ou intracellulaire (Brown,

1982) située à l'intérieur de la cellule (Cu_{res}). Une expérience de laboratoire menée sur *Rhynchosstegium riparioides* a montré qu'à la fin de 21 jours d'exposition au cuivre ($2,96 \mu M$ Cu) la quantité de cuivre totale était répartie en 14% de Cu_{res} , 47% de Cu_{int} et 39% de Cu_{exch} . Pendant la phase d'élimination qui a suivi (14 jours, $0,14 \mu M$ Cu), 60% du cuivre total a été éliminé, la répartition du métal restant est différente, 23% est situé à l'intérieur de la cellule Cu_{res} . La phase d'élimination a majoritairement concerné le Cu_{exch} et dans une moindre mesure le Cu_{int} .

L'existence de cette fraction résiduelle conduit à la notion « d'effet mémoire » cellulaire, cette propriété confère aux mousses la capacité de conserver une empreinte d'une pollution accidentelle, même lorsque celle-ci n'est plus détectable dans l'eau (Mouvet *et al.*, 1993).

Des chercheurs (Vazquez *et al.*, 1999) émettent l'hypothèse que l'entrée d'ETM dans les différents compartiments intracellulaires et extracellulaires entraînent une perte d'éléments précédemment retenus dans ces compartiments (libération de K intracellulaire et de Mg extracellulaire), des phénomènes de compensation se mettant en place (*cf.* Chap 1, II.5.3)

Mais globalement les données sur l'absorption intracellulaire des ETM et leur devenir dans la cellule restent peu nombreuses.

∞ La bioconcentration

La bioconcentration est le processus par lequel les organismes vivants accumulent des substances chimiques directement à partir de l'environnement abiotique. Elle intervient lorsque la concentration moyenne d'une substance dans un organisme est plus forte que celle retrouvée dans l'environnement.

Le facteur de bioconcentration (BCF) permet de mesurer la capacité de concentration d'un élément par un organisme, il est encore appelé facteur d'enrichissement :

$$BCF = C_m / C_e$$

Où :

C_m est la concentration en métal dans la mousse en $\mu g \cdot g^{-1}$ de poids sec de la mousse

C_e est la concentration en métal dissous dans l'eau en $\mu g \cdot ml^{-1}$

Le Tableau 1 donne quelques exemples de facteurs de bioconcentration retrouvés dans les mousses lors d'expériences en laboratoire:

Tableau 1: Exemples de facteurs de bioconcentration obtenus en laboratoire

Métal	Espèce	Facteur de bioconcentration	Référence
Cu	<i>Fontinalis antipyretica</i> Hedw.	25 000 à 45 000	(Goncalves & Boaventura, 1998)
Cd	<i>Fontinalis dalecarlica</i> B., S. & G.	50 000 à 116 000	(Gagnon <i>et al.</i> , 1998)
Cd	<i>Rhynchostegium riparioides</i> Hedw. C. Jens.	59 000 à 200 000	(Gagnon <i>et al.</i> , 1998)
Cd	<i>Fontinalis antipyretica</i> Hedw.	24 000	(Lithner <i>et al.</i> , 1995)

Des chercheurs ont montré à partir de facteurs de bioconcentration obtenus lors d'une étude sur trois rivières en Angleterre un gradient d'accumulation préférentiel pour les métaux pour l'Hépatique *Scapania undulata* (L.) Dumort. : Zn<Cd<Cu<Mn<Pb<Al<Fe (Vincent *et al.*, 2001).

Par ailleurs, d'autres ont évalué les concentrations de fond naturelles dans des bryophytes aquatiques lors d'une étude dans les montagnes Sudety (37 sites en Pologne et République Tchèque) et dans les Alpes Suisses (10 sites). Les valeurs de BCF obtenues sont élevées, elles sont reportées ci-dessous (*cf.* Tableau 2) (Samecka-Cymerman & Kempers, 1998).

Tableau 2: Valeurs les plus élevées de BCF retrouvées dans les bryophytes aquatiques collectées dans les montagnes Sudety et les Alpes Suisses (Samecka-Cymerman, 1998)

	Ni	Cr	Co	V	Ba	Sr	Fe	Zn	Mn	Pb	Cu
Montagnes Sudety (Pologne et Rép. Tchèque)	33000	15000	6300	5600	30000	12000	8400000	376000	11250000	9800	44000
Alpes suisses	2000	1800	15000	1600	31000	17000	1938000	5200	48000	2400	13000

⌘ Localisation des métaux le long des brins de mousse

De nombreux auteurs ont montré que la concentration des éléments dans les mousses varie avec l'âge des tissus. (Siebert *et al.*, 1996) ont étudié la distribution d'accumulation des métaux lourds (Cd, Cu, Pb, Zn) dans la mousse *Fontinalis antipyretica* (*cf.* Figure 4).

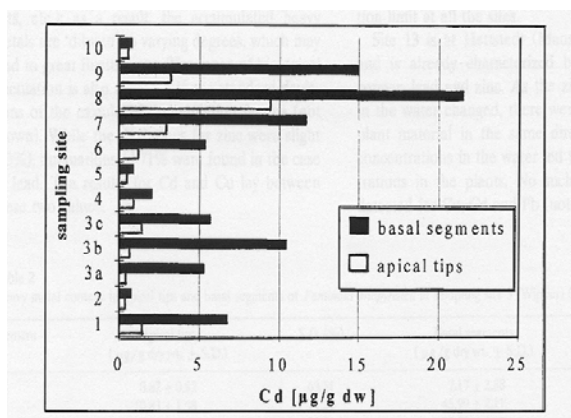


Figure 4 : Concentrations en cadmium dans les brins apicaux (2-3 cm) et dans les parties basales de *Fontinalis antipyretica*, issue de différents sites d'échantillonnage dans la partie Est des Montagnes Harz (Siebert *et al.*, 1996)

Cette étude a été réalisée sur des mousses autochtones du fleuve Elbe. Les auteurs ont déterminé que l'accumulation pour tous les métaux cités était plus importante dans les parties les plus anciennes de la mousse que dans les jeunes segments (2-3 cm apicaux), et plus particulièrement pour le cadmium. Ceci peut correspondre à deux phénomènes. Le premier est relatif à la présence d'une pellicule d'oxydes de manganèse et d'aluminium sur les parties les plus anciennes de la plante (Robinson, 1981 ; Siebert *et al.*, 1996) qui joue un rôle de surface d'adsorption pour les cations métalliques ; le deuxième peut être lié au fait que les segments basaux de la plante sont plus longtemps exposés aux concentrations en métaux lourds que les parties jeunes. De plus, les parties jeunes sont moins chargées en débris et reflètent plus vraisemblablement les événements récents de qualité des eaux (Vincent *et al.*, 2001). Ceci a été également montré pour l'accumulation des métaux (Al, Mn, Fe, Cu, Zn, Cd et Pb) chez *Scapania undulata* en comparant pour 10 échantillons prélevés sur 3 sites, l'analyse des métaux sur les deux premiers centimètres apicaux (200 parties apicales, ≈ 200 mg de poids sec) et sur toute la plante (Vincent *et al.*, 2001).

De nombreux travaux ont été réalisés sur l'utilisation des bryophytes aquatiques comme bioindicateurs des pollutions métalliques, ils ont montré que ces organismes possèdent une aptitude d'accumulation des ETM rapide et importante. Cependant, quelques points demandent à être approfondis par les chercheurs, comme le devenir intracellulaire des ETM, les mécanismes précis de défense et de résistance des cellules face aux polluants métalliques.

II.2.1.2. Les polluants organiques

Un premier travail portant sur l'utilisation des bryophytes aquatiques dans le domaine des micropolluants organiques a été mené pour les PCB et le lindane (Frisque, 1981). Cette première étude laissait entrevoir pour les bryophytes aquatiques des perspectives intéressantes.

La pollution organique englobe les effluents chargés en matière organique provenant de stations d'épuration ou d'industries ; elle comprend aussi les contaminations par micropolluants organiques, polluants organiques persistants (P.O.Ps).

La pollution organique libérée par les stations d'épuration d'eaux usées et ses effets sur les végétaux sont très peu connus. Un des effets principaux de la pollution organique dans l'eau est l'établissement d'un environnement appauvri en oxygène et l'anoxie est atteinte si la $DBO_5 > 10$ mg/l (demande biologique en oxygène). *Rhynchostegium riparioides* semble être particulièrement tolérante (Empain, 1974; Empain, 1976), *Fontinalis antipyretica* est relativement tolérante (Penuelas, 1984).

Empain a mis en évidence en 1978 sur la Sambre, la Meuse et la Somme qu'à proximité des grands centres de pollution organique, la plupart des bryophytes aquatiques et subaquatiques disparaissent, au profit de *Rhynchostegium riparioides* et parfois de *Bryum argenteum* Hedw. dans la zone émergée (Empain, 1978).

Martínez-Abaigar *et al.*, (1993) ont étudié les effets de la pollution organique sur les bryophytes aquatiques transplantées. Ils ont montré que la photosynthèse est plus rapidement touchée que la composition en pigments. En fait, la réduction de l'activité photosynthétique n'est pas principalement causée par la destruction de la chlorophylle mais par des altérations métaboliques et enzymatiques (Martínez-Abaigar *et al.*, 1993). De nombreux chercheurs ont montré qu'utiliser le rapport « chlorophylle/phaeopigments » comme méthode de suivi, est une méthode adaptée et sensible pour la surveillance de la pollution organique (Lopez & Carballeira, 1989; Penuelas, 1984) (*cf.* Chap 1, II.6.1).

Les travaux sur la bioaccumulation des composés organiques chez les bryophytes aquatiques (Frisque *et al.*, 1983 ; Hancock *et al.*, 1997 ; Mouvet *et al.*, 1986a ; Mouvet *et al.*, 1985b ; Roy & Hanninen, 1994) sont plus récents que ceux réalisés sur les ETM, ainsi les données sont moins nombreuses et les mécanismes d'accumulation et d'élimination de ces polluants sont moins détaillés.

La plupart des micropolluants organiques retrouvés dans les eaux continentales sont des pesticides. Les pesticides – étymologiquement "tueurs de fléaux"- sont des produits issus le plus souvent de la synthèse chimique qui permettent de lutter contre les parasites animaux et végétaux des plantes (cultures...) et de détruire les organismes indésirables présents dans les espaces végétalisés ou non (locaux de stockage de récoltes). Ces molécules (substances actives) au nombre de 800 environ (I.f.e.n, 2000) présentent, en sus de leurs effets ciblés sur les parasites visés, des effets non désirés sur l'Homme (cancérogénécité, perturbateurs endocriniens...) et sur l'environnement. Parmi les pesticides, on trouve les insecticides (pyrethrinoides, carbamates, lindane...) et les herbicides (triazines...).

En plus des pesticides d'autres micropolluants organiques sont susceptibles d'être déversés dans la nature :

- la famille des polychlorobiphényles (PCB) qui compte 209 composés (arochlor, dioxines...), ils sont essentiellement utilisés comme fluide isolant et caloporteur dans les installations électriques, leur usage étant désormais interdit en France (décret n° 2001-63 du 18 janvier 2001) ;

- la famille des hydrocarbures monoaromatiques (benzène, toluène...) et aromatiques polycycliques (Benzo(a)pyrène et Benzo(a)anthracène) utilisés comme solvants ou issus de la combustion des composés organiques (fuel, charbon...) ;

- la famille des antibiotiques, comme l'acide oxolinique (AO), régulièrement administré par voie orale comme antibactérien. Cet AO est peu absorbé par les poissons, ainsi 60% à 85% de cet antibiotique atteint l'environnement (Delépée & Pouliquen, 2002).

Ces composés présentent un danger pour les écosystèmes : du fait de leur résistance aux agents chimiques et biologiques (faible biotransformation), ils vont avoir tendance à s'accumuler et à devenir rémanents dans les écosystèmes. Selon les données actuelles, les polluants organiques semblent s'accumuler dans la paroi cellulaire des mousses par le biais des sites de surface chargés négativement (Gallissot, 1988) et lors d'une absorption intracellulaire du fait de leur lipophilie, ils s'accumulent dans les compartiments lipidiques des cellules pour les moins polaires d'entre eux (Mouvet, 1985; Mouvet, 1986). Mais les mécanismes précis d'accumulation des micropolluants organiques sont encore méconnus et demeurent un champ de recherche peu exploité.

La masse lipidique contenue dans *Fontinalis antipyretica* représente environ 3,5% de sa matière sèche (Frisque *et al.*, 1983 ; Maiss, 1988), ce qui offre un réel potentiel pour l'accumulation de substances hydrophobes. Ainsi la concentration de ces micropolluants

devrait être généralement proportionnelle à la concentration en lipides de l'organisme. Cependant, (Mouvet *et al.*, 1986a) ont montré que bien que la teneur en lipides de *F. antipyretica* soit égale à 1,6 fois celle de *Rhynchostegium riparioides*, les lipides de *R. riparioides* accumulent 1,2 fois mieux que ceux de *F. antipyretica*. Ainsi, il est difficile de conclure à la prépondérance du facteur lipide en tant que paramètre essentiel dans les phénomènes d'accumulation. Cependant, il serait intéressant de mener des travaux sur la composition des lipides (stéroïdes, triglycérides...) chez les bryophytes aquatiques en relation avec l'accumulation des molécules organiques.

D'autres critères sont également à prendre en compte dans la bioaccumulation des molécules organiques par les bryophytes, tels que la surface d'adsorption disponible et la composition biochimique des parois cellulaires qui jouent probablement un rôle fondamental dans l'accumulation de micropolluants organochlorés (Gallissot, 1988). Roy, et al., (1994) montrent que l'accumulation du Benzo(a)anthracène (BaA) et du Benzo(a)pyrène (BaP), composés cancérogènes, se fait rapidement lors de la période d'exposition puis elle stagne entre 48 h et 168 h d'exposition. Une étude *in situ* menée par Mouvet a montré que les bryophytes aquatiques du genre *Cinclidotus* placées dans une rivière contaminée résistent très bien à une forte pollution organique chlorée, qu'elles accumulent très rapidement des quantités élevées en HCH et contiennent des quantités non négligeables de PCBs (Mouvet *et al.*, 1985b).

Gallissot a mis en évidence pour deux espèces de mousses (*Fontinalis antipyretica* et *Rhynchostegium riparioides*) *in vitro*, une accumulation rapide et importante en PCB, puisque 50% des concentrations à l'état stationnaire sont atteintes en 24 h (Gallissot, 1988). Le Tableau 3 présente quelques résultats obtenus ces vingt dernières années.

Tableau 3 : Exemple d'accumulation de molécules organiques par les bryophytes aquatiques

Composé organique	Concentration dans la mousse en $\mu\text{g.g}^{-1}$ de poids sec	Espèce	Lieu	Référence
PCP	0.45	<i>Rhynchostegium riparioides</i>	Brenne, France	(Mouvet <i>et al.</i> , 1993)
Lindane (γ -HCH)	0.0350	<i>Fontinalis antipyretica</i>	Corrèze, France	(Mouvet <i>et al.</i> , 1993)
HAP total	Max: 0.048 ± 0.002 Min: 0.005 ± 0.001	<i>Fontinalis antipyretica</i>	Lac Kallavesi, Finlande	(Roy <i>et al.</i> , 1996)
PCB	Max: 86.55 ± 1.99	<i>Cinclidotus danubicus</i>	Seine, France	(Mouvet <i>et al.</i> , 1986a)
PCB (Arochlor 1260)	149	<i>Fontinalis antipyretica</i>	Maizières-les-Metz, France	(Mouvet <i>et al.</i> , 1985a)
BaA	62.10 ± 2.94	<i>Fontinalis antipyretica</i>	Laboratoire	(Roy <i>et al.</i> , 1994)
BaP	41.14 ± 4.24	<i>Fontinalis antipyretica</i>	Laboratoire	(Roy <i>et al.</i> , 1994)

L'emploi des bryophytes aquatiques comme bioindicateurs de pollution organique demeure récente, les données sur les phénomènes d'accumulation et les paramètres influant sur ces derniers sont encore peu connus. Cependant, leur utilisation dans la surveillance des polluants organiques dans le milieu naturel va peut être se développer, notamment par le biais des réseaux de surveillance des Agences de l'Eau (Mouvet, 1994). Mais le problème qui subsiste lors du suivi de la pollution en micropolluants organiques concerne le choix des substances à surveiller, étant donné qu'annuellement l'industrie chimique met sur le marché entre 5000 et 10000 nouvelles substances (P. Empereur-Bissonet, Service des études médicales EDF & Gaz de France, Com. pers.).

II.2.1.3. Les radionucléides

Les radionucléides sont des isotopes radioactifs qui se désintègrent en produisant un nouvel atome du même élément ou d'un autre élément. Cette désintégration s'accompagne de l'émission de rayonnements α (noyau d'He constitué de deux protons et de deux neutrons), β (émission d'un électron) ou γ (émission d'un rayonnement électromagnétique). Parmi les 340 noyaux d'atomes différents présents dans la nature (appelés plus précisément "nucléides"), 70 sont radioactifs. L'utilisation croissante de l'énergie nucléaire a nécessité le développement des recherches radioécologiques. Ces expérimentations ont permis de connaître les modalités de transfert des radionucléides dans l'environnement. C'est le cas, en particulier, pour la détermination expérimentale de la capacité et des mécanismes de fixation des radioéléments par des bryophytes aquatiques (Maurel-Kermarrec *et al.*, 1983).

La radioécologie a pour objectif principal de comprendre et quantifier les mécanismes macroscopiques ou microscopiques qui gouvernent les transferts de radionucléides présents ou rejetés dans l'environnement en situation naturelle ou accidentelle. En France, les premiers travaux en radioécologie sont apparus vers la fin des années cinquante, ils ont été réalisés au Commissariat à l'Energie Atomique. Entre 1960 et 1962, des travaux s'amorcent sur la problématique du contrôle de l'eau et de son utilisation. En 1963, les résultats des premières expériences sur les transferts aux organismes tels que les bryophytes sont publiés. Ce type d'expérience prend un véritable essor à partir de 1969 (Hébrard & Foulquier, 1975 ; Hébrard *et al.*, 1969 ; Whitehead & Brooks, 1969). En France, les études en radioécologie sont menées par l'I.R.S.N (Institut de Radioprotection et de Sécurité Nucléaire).

Les radionucléides artificiels libérés dans l'environnement proviennent (Garnier - Laplace & Adam, 2001) :

- des tirs nucléaires :

bombe « A » (atomique) : ^{89}Sr , ^{95}Zr , ^{103}Ru , ^{131}I , ^{141}Ce , ^{35}S , ^{38}Cl , ^{24}Na , ^{45}Ca

bombe « H » (thermonucléaire) : ^{23}U , ^{144}Ce , ^{106}Ru , ^{103}Ru , ^{129}Te , ^{131}I , ^{132}Te , ^{147}Pm , ^{147}Ne , ^{91}Y , ^{141}Ce , ^{140}Ba , ^{95}Zr

- de rejets lors du fonctionnement normal d'un réacteur à eau pressurisée (R.E.P)
produits de fission : ^{137}Cs , ^{131}I , ^{133}Xe , ^{103}Ru , ^{106}Ru , ^{144}Ce .

produits d'activation : ^{16}N , ^{17}N , ^{17}Na , ^{38}Cl , ^3H , ^{56}Mn , ^{54}Mn , ^{51}Cr , ^{55}Fe , ^{59}Fe , ^{95}Zr , ^{60}Co , ^{58}Co , ^{124}Sb , $^{110\text{m}}\text{Ag}$

transuraniens : $^{238+239}\text{Pu}$, ^{241}Am

- de rejets après un accident, exemple de Tchernobyl (26/04/1986) :

les plus abondants : ^{134}Cs , ^{131}I , ^{132}Te , ^{140}Ba , ^{103}Ru et ^{106}Ru

- du cycle du combustible nucléaire.

La radioactivité naturelle est essentiellement due à ^{40}K , à la famille de l' ^{238}U , et à celle du ^{232}Th . Le ^7Be est parfois détecté. Le ^{210}Pb peut être apporté par la combustion d'énergie fossile et/ou lié à une émanation de radon.

Pour les rayonnements d'origine naturelle, ils proviennent de rayonnements cosmiques et de radiations d'origine terrestre.

Les bioindicateurs de radiocontamination sont des organismes ayant une forte aptitude à la bioconcentration de radioéléments. A l'heure actuelle, les hydrosystèmes fluviaux constituent un ensemble important d'écosystèmes recevant les effluents liquides faiblement radioactifs rejetés par les installations nucléaires et éventuellement soumis aux situations accidentelles.

Ainsi les bryophytes aquatiques sont utilisées pour surveiller les effluents des centrales nucléaires. Les concentrations de radionucléides retrouvées dans les eaux sont très faibles (*cf.* Tableau 4) (Baudin *et al.*, 1991 ; Beaugelin-Seiller *et al.*, 1994) ; c'est pourquoi l'organisme utilisé pour le suivi de ce type de pollution doit posséder des caractéristiques bioaccumulatrices importantes, pour que la radioactivité puisse être détectée.

Tableau 4 : ⁽¹⁾ Gamme de variation dans les bryophytes aquatiques pour le milieu aquatique continental, ⁽²⁾ Concentrations mesurées dans les bryophytes en aval de la centrale de Bugey en 1992 (données I.P.S.N)

En Bq.kg ⁻¹ de poids sec	⁴⁰ K	²³² Th	²³⁸ U	²¹⁰ Pb	⁷ Be
Bryophytes (1) Min - Max	28-595	4-239	2-450	29-971	12-455
	¹³⁷ Cs	⁵⁸ Co	⁶⁰ Co	^{110m} Ag	⁵⁴ Mn
Bryophytes (2)	38	62	171	13	-

De nombreuses études ont mis en évidence que les mousses aquatiques sont de meilleurs bioaccumulateurs de radionucléides que les sédiments, les phanérogames immergées et les poissons (Baudin *et al.*, 1991). Des études portant sur l'accumulation de ¹³⁷Cs (Hébrard, 1969 ; Hongve, 2002 ; Maurel-Kermarrec *et al.*, 1983), du ¹⁰⁶Ru (Vray *et al.*, 1992) et du ⁶⁰Co (Beaugelin-Seiller, 1995), montrent qu'un état stationnaire s'établit entre les concentrations en radionucléides dans les mousses et dans le milieu aquatique en quelques heures.

Les expériences en laboratoire de Beaugelin-Seiller *et al.*, (1995) ont mis en évidence deux phases successives de contamination des mousses : une première phase d'adsorption de surface et une deuxième phase d'absorption biologique. Les processus exacts de contamination des radionucléides chez les bryophytes n'ont pas été encore élucidés mais ils seraient quasi-identiques à l'accumulation des éléments traces métalliques.

Des études en laboratoire réalisées au C.E.A de Cadarache (Garnier - Laplace & Adam, 2001) ont comparé la bioaccumulation en radioéléments (⁶⁰Co, ⁵⁴Mn, ¹³⁷Cs, ^{110m}Ag, ¹³¹Na) de trois espèces de mousses (*Fontinalis antipyretica*, *Rhynchostegium riparioides*, *Cinclidotus aquaticus* (Hedw.) B.S.G) en fonction de plusieurs facteurs. Ils ont montré une phase de contamination rapide des mousses. Pour le ⁶⁰Co, elle est plus importante pour *F. antipyretica* que pour les deux autres espèces. Cette étude a mis en évidence que pour ce radionucléide le rapport [⁶⁰Co]feuilles/[⁶⁰Co]tiges est environ égal à 2, les feuilles sont ainsi deux fois plus contaminées que les tiges.

De plus, une émergence des mousses pendant quatre semaines diminue l'accumulation de tous les radio-éléments (Garnier - Laplace & Adam, 2001).

Maurel-Kermarrec, *et al.*, (1983) ont étudié les cinétiques de fixation d'un mélange de radioéléments (50% de ⁶⁰Co, 20% de ⁵¹Cr, 10% de ¹³⁷Cs, 10% ⁵⁴Mn, 10% de ²²Na) dans la mousse *Rhynchostegium riparioides*. Pour tous ces radioéléments, la fixation (phénomènes

d'adsorption et d'absorption) est très rapide. En effet, les mousses atteignent plus ou moins rapidement un niveau de radioactivité qui varie peu par la suite. Le Tableau 5 présente quelques valeurs de BCF rencontrées chez les bryophytes pour les radionucléides.

Tableau 5 : Exemples de facteurs de bioconcentration de radionucléides pour les bryophytes

Radionucléides	Espèce de mousse	Facteur de bioconcentration	Référence
⁶⁰ Co	<i>Rhynchostegium riparioides</i>	18 850	(Maurel-Kermarrec <i>et al.</i> , 1983)
	<i>Cinclidotus danubicus</i>	3300	(Kirchmann & Cantillon, 1971)
	<i>Fontinalis antipyretica</i>	171	(Garnier - Laplace <i>et al.</i> , 1992)
	<i>Fontinalis antipyretica</i>	62	(Garnier-Laplace <i>et al.</i> , 1992)
⁵¹ Cr	<i>Rhynchostegium riparioides</i>	1170	(Maurel-Kermarrec <i>et al.</i> , 1983)
¹³⁷ Cs	<i>Fontinalis antipyretica</i>	9198 à 206 000	(Hongve <i>et al.</i> , 2002)
	<i>Fontinalis dalecarlica</i>	3932 à 125 200	(Hongve <i>et al.</i> , 2002)
	<i>Fontinalis antipyretica</i>	38	(Garnier - Laplace <i>et al.</i> , 1992)
	<i>Rhynchostegium riparioides</i>	10 830	(Maurel-Kermarrec <i>et al.</i> , 1983)
^{110m} Ag	<i>Fontinalis antipyretica</i>	13	(Garnier - Laplace <i>et al.</i> , 1992)
⁵⁴ Mn	<i>Rhynchostegium riparioides</i>	6500 à 20 000	(Foulquier, 1978)
	<i>Rhynchostegium riparioides</i>	15	(Foulquier & Hébrard, 1976)
²² Na	<i>Rhynchostegium riparioides</i>	15	(Maurel-Kermarrec <i>et al.</i> , 1983)
	<i>Rhynchostegium riparioides</i>	15	(Maurel-Kermarrec <i>et al.</i> , 1983)

A partir d'une étude *in situ* en aval de la centrale nucléaire de Bugey (France), (Beaugelin-Seiller *et al.*, 1994) ont analysé dix radionucléides (^{110m}Ag, ⁵⁸Co, ⁶⁰Co, ¹³⁴Cs, ¹³⁷Cs, ¹³¹I, ⁵⁴Mn, ⁹⁵Nb, ¹²⁴Sb, ¹²⁵Sb) dans la mousse *Cinclidotus riparius*. Sur les dix radionucléides retrouvés dans les déchets liquides, cinq radionucléides (¹²⁴Sb, ¹²⁵Sb, ⁹⁵Nb, ⁵⁴Mn et ^{110m}Ag) n'ont pas été retrouvés dans les mousses. Plusieurs facteurs peuvent alors intervenir : leur trop faible concentration dans les effluents (⁹⁵Nb et ⁵⁴Mn), ou une capacité d'accumulation faible pour certains éléments malgré leur forte concentration dans les effluents (¹²⁴Sb, ¹²⁵Sb).

Dans le cas du ^{110m}Ag, une hypothèse explicative est donnée: 85 à 90% de ^{110m}Ag se trouverait sous forme de particules (Picat, 1987) et ne seraient ainsi donc pas biodisponibles pour les mousses. En effet, une massive adsorption de l'^{110m}Ag sur les particules en suspension a été largement démontré en laboratoire (Baudin *et al.*, 1989 ; Garnier - Laplace *et al.*, 1992 ; Garnier & Baudin, 1989).

II.2.2. Les paramètres influant sur les mécanismes d'accumulation des métaux et radionucléides

II.2.2.1. Les paramètres environnementaux et physico-chimiques

- Les conditions environnementales peuvent influencer sur l'accumulation des polluants telles que le climat (température, lumière...). Si (Wehr & Whitton, 1983b) ont montré que l'influence des saisons était négligeable pour l'accumulation des ETM par trois espèces de mousses, par comparaison avec la qualité de l'eau, d'autres ont démontré le contraire. D'après (Mouvet, 1979 ; Vray *et al.*, 1992) les conditions estivales améliorent la faculté d'accumulation des métaux par les mousses. En effet, l'influence de la saison a été testée sur la contamination des mousses. Pour le ^{60}Co et le ^{137}Cs les facteurs de bioconcentration obtenus sont plus élevés en été (Beaugelin-Seiller *et al.*, 1995), ainsi la température jouerait un rôle significatif sur l'accumulation des radionucléides. Cependant, aucune influence de la luminosité n'a été trouvée pour l'accumulation des radionucléides par les mousses. Par ailleurs, (Nunez-Olivera *et al.*, 2001) ont réalisé des mesures de concentrations en éléments (N, P, K, Ca, Mg, Fe, Na) pendant un an sur plusieurs espèces de bryophytes et trois affluents de la rivière Iregua (Espagne). Ils ont mis en évidence une tendance annuelle saisonnière des concentrations en éléments essentiels (N, P, Na et Fe) dans les bryophytes (mousse et hépatique). De plus, ces auteurs ont montré qu'elles étaient plus élevées dans ces organismes en automne qu'au printemps. Les faibles concentrations observées au printemps semblent résulter d'une dilution interne des éléments, en effet la croissance des tissus est alors plus importante que l'absorption des éléments (Glime, 1987 ; Kelly & Whitton, 1987). Cette étude a montré aussi que les bryophytes, en automne et en été, vont stocker en excès les éléments car la croissance est alors plus faible et la disponibilité des éléments dans l'eau est plus élevée. Núñez Olivera *et al.*, (2001) suggèrent que cette provision en éléments leur permet de croître dans des périodes plus défavorables et ainsi d'éviter des déficiences en sels nutritifs.

- La charge métallique : la concentration en éléments dans les eaux et leur biodisponibilité influent sur la bioaccumulation des polluants. Mais il peut arriver que pour une concentration en éléments élevée, la bioaccumulation soit peu importante. Ce fait semble dans certains cas s'expliquer par une action toxique des métaux vis-à-vis des bryophytes, liée à l'effet du pH sur la spéciation des éléments. Ainsi Al^{3+} , dont la solubilité augmente dans des conditions acides induit une diminution de la bioaccumulation (Engleman & McDiffett, 1996).

- Les matières en suspension (MES) : les matières en suspension, présentes dans les milieux aquatiques naturels, qu'elles soient organiques (phytoplancton...), ou minérales

(argiles, sables...), sont susceptibles d'adsorber une fraction importante de la micropollution et constituent souvent le vecteur principal de transport de ces dernières. Or ces particules se retrouvent retenues sur les tiges et feuilles des bryophytes. Les mesures d'accumulation réalisées sur les mousses aquatiques peuvent alors être perturbées par cette micropollution adsorbée sur les MES. Ainsi, pour en limiter l'importance, un lavage soigné des mousses lors du prélèvement apparaît indispensable (Ciffroy *et al.*, 1994).

- Les conditions physiques : transport des sédiments, vitesse du courant...(Croisette *et al.*, 2001) ont montré que la vitesse du courant n'a pas d'effet sur la bioaccumulation des métaux par les bryophytes, contrairement à ce qu'avaient auparavant montré d'autres études (André & Lascombe, 1987 ; Claveri & Mouvet, 1995 ; Gonçalves *et al.*, 1992).

- Le positionnement horizontal et vertical de l'échantillon dans la rivière induit intrinsèquement des variations environnementales intrinsèques (variation de la pénétration de la lumière, des temps d'immersion, proximité des sédiments) qui influent sur la bioaccumulation des polluants par les bryophytes (Lopez & Carballeira, 1993).

II.2.2.2. Les paramètres biologiques

- La physiologie des organismes : les cinétiques d'accumulation et de décontamination des polluants ainsi que la croissance des organismes sont des paramètres qui peuvent influencer les processus d'accumulation qui, eux-mêmes, dépendent des paramètres environnementaux (*cf.* Chap 1, II.2.2.1) (Lopez & Carballeira, 1993). Ces mécanismes dépendent de l'état physiologique de l'organisme d'où un effet positif sur la bioaccumulation de la lumière et des conditions estivales [Mouvet, 1979 #330 ; Vray, 1992 #86 ; (Gonçalves & Boaventura, 1998). (Siebert *et al.*, 1996) ont étudié, pour un même site, les fluctuations biologiques entre trois plants de *Fontinalis antipyretica* qui ont été prélevés afin d'observer les différences d'accumulation des métaux. Le coefficient de variation le plus faible est de 13% pour le zinc et le plus fort est de 71% pour le plomb, et les résultats pour le cadmium et le cuivre sont situés entre ces deux valeurs. Ces résultats semblent être liés à des variations dans les phénomènes d'adsorption sur les parois cellulaires et/ou dans le cas d'eaux fortement oxygénées à une adsorption supplémentaire de précipités d'oxyhydroxydes de manganèse et de fer sur les feuilles, qui eux-mêmes absorbent les ETM. Ainsi, dans les phénomènes d'accumulation, la concentration du métal dans l'eau joue un rôle moindre par rapport à l'espèce utilisée (Vazquez *et al.*, 1999).

- La variabilité interespèces : en fonction des espèces, l'accumulation des polluants diffère. C'est pourquoi il est préférable d'utiliser une seule espèce dans le cadre d'études de surveillance (Claveri & Mersch, 1998). Par ailleurs, (Say *et al.*, 1981) pensent que le principal facteur contrôlant les proportions des ETM dans les fractions intra/extracellulaires reste l'espèce utilisée. Par exemple, des études ont montré que *Rhynchostegium riparioides* est plus sensible aux changements en concentrations métalliques et accumule les métaux plus fortement que *Fontinalis antipyretica* (Say & Whitton, 1983).

II.2.3. Influence de l'acidité des eaux sur les phénomènes d'accumulation des ETM

Depuis le début de l'ère industrielle, de plus en plus de cours d'eau ont été exposés aux pluies acides, mais ce n'est que récemment que l'existence de ces rivières acidifiées a été mise en évidence en France par les impacts engendrés sur la faune et la flore, notamment dans les Vosges (Thiebaut *et al.*, 1998). Le pH détermine, en partie, la solubilité des éléments et par conséquent leur accumulation dans les organismes, et joue donc un rôle essentiel dans la biodisponibilité des métaux traces. La spéciation des métaux est régie par de nombreux paramètres physico-chimiques (UV, NO₃, PO₄, SO₄, pH...) (Mouvet, 1986). Par ailleurs, la biosorption des ETM est essentiellement fondée sur des mécanismes d'échange cationique. Or, certains ETM possèdent des formes non cationiques : il est de ce fait possible que certaines formes ne soient pas, ou moins bien, ou mieux accumulées par les mousses. A cet égard, il faut citer le chrome VI anionique et les formes organiques du mercure et de l'arsenic ; pour ces dernières la liposolubilité peut jouer un rôle prépondérant et faciliter leurs entrées intracellulaires. Le plus souvent l'acidification des cours d'eau s'accompagne d'une augmentation des concentrations en aluminium, manganèse, et plomb, lessivés des sols environnants. L'acidité des eaux influe de plusieurs manières sur les processus d'accumulation.

Ainsi, une compétition entre les protons et le pool de cations accumulés par la plante peut s'instaurer.

Des études ont porté sur l'impact de l'acidité de l'eau sur l'absorption et l'accumulation des métaux. En effet, des chercheurs ont montré qu'une augmentation de la concentration en ions hydrogène dans l'eau était associée à une diminution de la concentration des métaux dans les bryophytes (Caines *et al.*, 1985). De façon similaire, d'autres ont trouvé que *Scapania undulata* accumulait plus préférentiellement Al, Ca et Mn en milieu neutre qu'en milieu acide (Yoshimura *et al.*, 1998). Par ailleurs, Vincent, *et al.*,

(2001) ont mis en évidence que l'accumulation augmentait avec des valeurs de pH croissant. De la même manière, Engleman et Mc Diffet (1996) ont montré lors d'une étude *in situ* sur un bassin versant affecté par le drainage acide lié aux sites miniers que la plus forte accumulation de Fe dans les tissus de bryophytes correspondait au point d'étude où l'eau était la plus acide. Les résultats de cette étude indiquent que l'accumulation de Al chez la mousse *Eurhynchium riparioides* (Hedw.) Richs. et l'hépatique *Scapania nemorosa* L. Dumort. semble davantage être dépendante du pH (gamme optimale 4,5-6) que de la concentration en métal des sites respectifs étudiés (Engelmann & Weeks, 1985). D'autre part, dans une étude menée sur les massifs vosgiens, il a été mis en évidence que l'accumulation du Mn et de l'Al est inhibée par l'augmentation de la concentration en protons (Claveri *et al.*, 1993). Par ailleurs, les cations métalliques peuvent s'associer à des substances chélatrices (EDTA : acide éthylène diamine tétra acétique, acides humiques) et former des complexes, ce qui réduit leur biodisponibilité dans le milieu aquatique. A des pH acides, ces métaux sont dissous, ce qui les rend de nouveau disponibles pour les organismes, de ce fait le processus d'accumulation est augmenté.

Carballeira *et al.*, (2001) ont démontré que la libération du Cd des sites de fixation de la paroi cellulaire de la mousse *Fontinalis antipyretica* est contrôlée par le pH. En effet, à un faible pH une libération rapide de Cd est observable. Ils ont montré que les effets d'une acidité moyenne étaient plus clairement apparents dans le compartiment extra- cellulaire et pourraient être attribués au remplacement compétitif des ions Cd^{2+} par des ions H^+ sur les sites d'échange cationique de la paroi cellulaire et sur la surface externe de la membrane cellulaire. Ces sites de fixation semblent être dépendants de la concentration et de l'affinité relative de chaque élément.

Par contre, la libération des ions Cd^{2+} situés à l'intérieur de la cellule serait plutôt due à des altérations des mécanismes de transports membranaires liées au pH (Wells & Brown, 1990).

Il est difficile actuellement de déterminer, parmi les paramètres cités ci-dessus, quel est celui qui va avoir le plus d'impact sur les processus d'accumulation dans des milieux acidifiés. Néanmoins, on peut affirmer que les bryophytes des eaux de surface acidifiées ne sont plus des indicateurs adaptés pour surveiller les concentrations en métaux (Yoshimura, *et al.*, 1998) et les mousses doivent être utilisées avec prudence dans ces conditions (Claveri *et al.*, 1993). Cependant, il a été montré que les transplants restent efficaces dans ces conditions pour la détection de la pollution en plomb (Claveri, *et al.*, 1993). La capacité d'accumulation

des métaux dans les mousses peut être alors utilisée, non pas pour déterminer la contamination métallique des eaux, mais leur acidification. Ainsi des études menées en Angleterre par Wells & Brown, (1990) ont pour objet de proposer une technique de surveillance des phénomènes d'acidification sporadique des rivières. L'idée consiste à utiliser des mousses bioindicatrices, de les incuber avec un marqueur chimique, en l'occurrence le cadmium, et de les transplanter sur un site d'étude pendant une période donnée. Elles sont ensuite analysées en contenu du marqueur. Les événements d'acidification sont déduits sur la base de la diminution de la concentration en marqueur.

De plus, en conditions acides, la dissolution des éléments métalliques toxiques peut survenir. A pH faible, l'accumulation peut diminuer pour certains métaux suite à leur effet toxique sur les bryophytes. Les travaux de Crowder ont montré que l'accumulation d'Al par les bryophytes était la plus élevée. Pour des pH proches de 5 (4.9-5.6) et pour des pH < 5, les bryophytes commencent à montrer des effets toxiques de nécrose, induisant de ce fait une diminution de l'accumulation chez les bryophytes (Crowder, 1991).

II.3. Les phénomènes physiologiques de décontamination chez les bryophytes

II.3.1. Les polluants minéraux et les radionucléides

L'insertion dans le compartiment intracellulaire de composés métalliques chez les bryophytes a deux effets toxiques majeurs :

- des lésions membranaires (Brown & Whitehead, 1986),
- une réduction substantielle de la photosynthèse (Brown & Wells, 1990a).

Par ailleurs, les plantes répondent à la toxicité des métaux par divers mécanismes. Un des mécanismes de décontamination implique la chélation des ETM dans les cellules par une famille de ligands peptidiques, les phytochélatines (PC) qui sont capables de lier Cd^{2+} , Hg^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} et Ag^+ (Satofuka *et al.*, 2001).

Les phytochélatines sont formées d'assemblages de dipeptides de γ -Glu-Cys. Ces molécules sont les équivalents des méthallothionéines, protéines qui sont directement liées au phénomène de désintoxication des ETM chez les animaux (Bruns, et al., 1997). D'après des études récentes il semblerait que le glutathion (GSH), soit le précurseur de la synthèse des phytochélatines (Rauser, 1995).

Zenk (*cf.* Figure 5) a proposé une méthode pour la biosynthèse et le recyclage des complexes PC/ métal pour les plantes supérieures : les ions métalliques comme le Cd^{2+}

entrent dans la cellule du végétal à travers la paroi cellulaire perméable. La PC synthase qui catalyse la transformation de GSH en PC est alors activée. Le complexe Cd^{2+}/PC est entraîné dans la vacuole. A l'intérieur de la vacuole, le complexe Cd^{2+}/PC est éventuellement dissocié. Le métal est ensuite stocké à cet endroit pendant que le peptide PC est dégradé (Zenk, 1996).

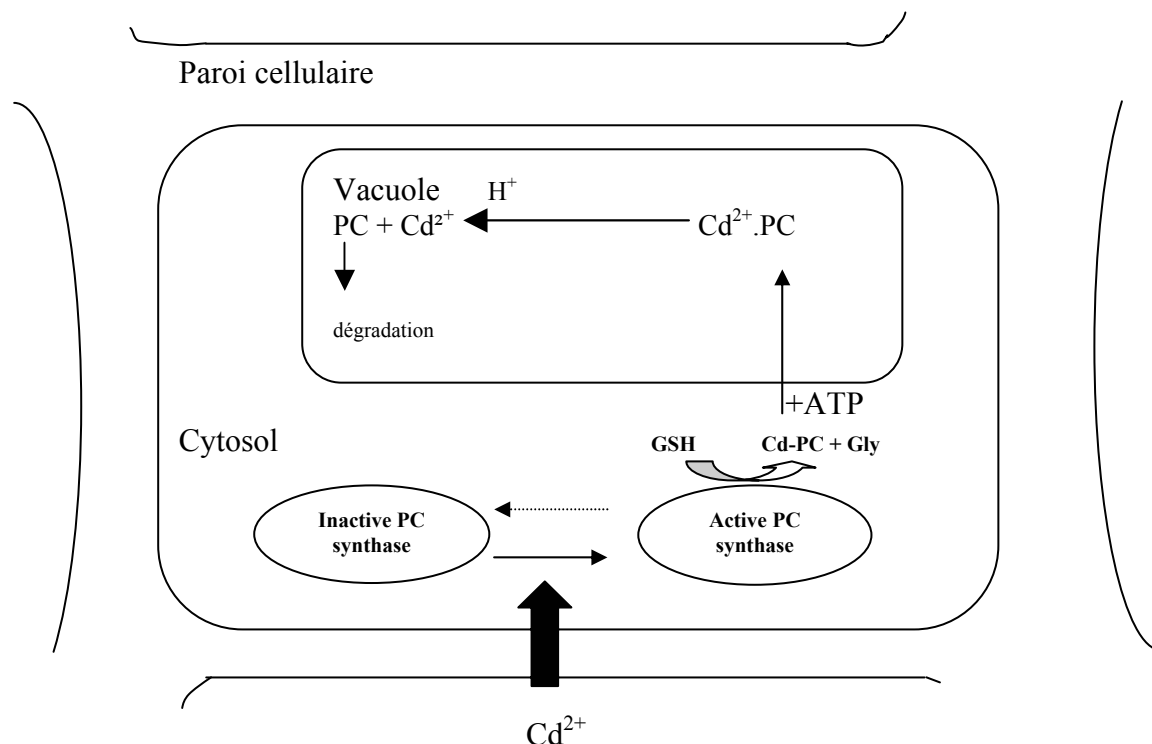


Figure 5 : Schéma de l'entrée du cadmium dans la cellule végétale (Zenk, 1996)

Mais dans plus de 20 mousses terrestres et aquatiques, (Bruns *et al.*, 1999) n'ont déterminé aucune synthèse de PC après un traitement pendant 10 jours avec 100 μM de Cd^{2+} en laboratoire. Par ailleurs, ces études qui ont porté sur plusieurs espèces de bryophytes ont montré que l'exposition à des ions Cd^{2+} causait une augmentation marquée de la concentration en GSH chez *Fontinalis antipyretica* et d'autres espèces de la classe des *Musci*.

L'hypothèse serait que le GSH se substitue aux PC pour la capture des ETM dans les mousses (Bruns, *et al.*, 1999) et joue ainsi un rôle essentiel dans la désintoxication des éléments métalliques pendant le transport des métaux à travers le cytoplasme (Bruns *et al.*, 2001).

De plus, les plantes peuvent limiter l'assimilation d'un métal toxique en maintenant des niveaux élevés en calcium intracellulaire (Angelone, 1993 ; Johnston & Proctor, 1977). En effet, selon (Jacobson *et al.*, 1960), le calcium modifie la perméabilité des surfaces cytoplasmiques, ce qui conduit à une diminution de l'accès de certains cations monovalents à divers sites d'absorption, et a pour conséquence de freiner la bioaccumulation des éléments

métalliques. Ce rôle protecteur a été également montré pour le magnésium chez les bryophytes (Samecka Cymerman & Kempers, 1994).

Par ailleurs, en utilisant la microscopie électronique à balayage (MEB), des dépôts de métaux insolubles (oxydes) irrégulièrement situés à la surface des feuilles de *Fontinalis antipyretica* contaminées par des effluents de mine ont été mis en évidence (Sergio *et al.*, 2000). De tels dépôts n'ont été identifiés que sur les cellules vivantes des feuilles, on présume qu'ils sont formés par une activité biologique de désintoxication de la plante.

II.3.2. Les polluants organiques

Les mousses aquatiques (genre *Fontinalis*, *Cinclidotus*, *Rhynchostegium*) accumulent rapidement de grandes concentrations de polluants et les libèrent très lentement (Mouvet, 1984b ; Mouvet *et al.*, 1986a). Pour *Fontinalis antipyretica*, l'élimination de polluants organiques est généralement lente et décroît avec le temps, par exemple après 24 h pour le Benzo(a)anthracène (BaA) et 48 h pour le Benzo(a)pyrène (BaP) (Roy *et al.*, 1994). Cette phase lente d'élimination des polluants organiques des tissus végétaux semble être liée à leur faible solubilité dans l'eau (Smith, 1991 ; Steen & Karickhoff, 1981). Cette élimination n'est jamais totale, comme pour les éléments métalliques une fraction résiduelle est observée après une période de décontamination (Gallissot, 1988). Elle correspond peut-être à un piégeage des polluants dans la cellule sous une forme ou à un niveau de concentration non toxique. De plus, pour les composés organiques, des processus de métabolisation peuvent être mis en œuvre chez les bryophytes ; chez ces dernières, on ne dispose pas à l'heure actuelle de données sur cette question.

Par ailleurs, la contamination de *Fontinalis antipyretica* par du BaP conduit à une augmentation du niveau global en glutathion (Roy *et al.*, 1994). Ce tripeptide semble être fortement impliqué dans la phase de désintoxication des polluants organiques, tels que les pesticides et PCBs (Alscher, 1989). D'une manière générale, le glutathion joue un rôle important dans les phénomènes de protection contre les stress oxydants, ce qui a été étudié chez divers végétaux (Bruns *et al.*, 2001).

II.4. Utilisation des bryophytes aquatiques pour la biosurveillance des cours d'eau

L'estimation d'un niveau de contamination par un polluant dans un milieu par l'utilisation d'organismes vivants est appelée "biosurveillance" (traduction française de biomonitoring). L'utilisation des bryophytes aquatiques dans des études de biosurveillance a été appliquée dans de nombreux pays européens comme la Belgique (Empain, 1976; Empain

et al., 1980), la Grande Bretagne (Say, 1981 ; Say, 1983 ; Wehr & Whitton, 1983a), la France (Mouvet, 1985), l'Allemagne (Herrmann, 1990 ; Bruns *et al.*, 1997), l'Italie (Cenci, 2000) et le Portugal (Goncalves *et al.*, 1992). Ils ont été utilisés pour identifier les apports métalliques des déchets miniers ou industriels ainsi que pour des prospections bio-géochimiques (Whitehead & Brooks, 1969). Mais on peut remarquer actuellement une absence de normalisation des méthodes de biosurveillance, notamment dans le choix de la quantité et de la nature de l'échantillon à analyser. En effet, certains chercheurs (Vazquez, 2000 ; Vincent, 2001 ; Carballeira, 1997 ; Satake, 1989 ; Kelly, 1987 ; Satake, 1984 ; Satake, 1983 ; Robinson, 1981) utilisent environ 75 apex de 2 cm qui représentent 150 mg en poids sec lors de leurs études, d'autres choisissent d'analyser la totalité de l'échantillon (Baudin *et al.*, 1991 ; Fink & Panten, 1993 ; Mouvet *et al.*, 1989 ; Samecka-Cymerman & Kempers, 1998 ; Samecka-Cymerman & Kempers, 2001). Le tableau 6 résume les raisons pour lesquelles les chercheurs choisissent d'utiliser les 2 cm apicaux de l'organisme.

Tableau 6 : Pourquoi choisir d'utiliser les 2 cm apicaux de la tige ?

Pourquoi choisir d'analyser les 2 cm apicaux de la tige ?	Référence
- Les concentrations en métaux augmentent considérablement de l'apex à la base, ce gradient est dû à l'âge des différentes parties, il est préférable d'utiliser les premiers cm de tige.	Satake <i>et al.</i>, 1983 Satake <i>et al.</i>, 1989 Satake & Miyasaka, 1984 Wehr <i>et al.</i>, 1983
- La procédure de lavage affecte davantage les résultats quand toute la plante est analysée que lorsque les 2 cm apicaux sont utilisés.	Mouvet, 1984
- Les parties anciennes de la plante sont recouvertes d'oxydes de Mn et de Fe ce qui provoque des phénomènes de co-précipitation et d'adsorption des métaux, donc une surestimation des résultats.	Robinson, 1981
- Les 2 cm apicaux reflètent uniquement des épisodes de pollution récents.	Wehr & Whitton, 1983

- Les corrélations entre la teneur en métaux de la mousse et celle de l'eau sont plus marquées quand on utilise les 2 cm apicaux de la plante.	
--	--

Mais l'emploi de ces apex entraîne une durée de préparation des échantillons 5 fois plus longue que pour les plantes entières, et le principal inconvénient concerne les limites de détection, car les concentrations y sont plus faibles que dans les plantes entières (Wehr & Whitton, 1983a). Le problème du choix de la fraction de mousse à analyser se pose surtout dans le cas de l'utilisation de matériel autochtone, car peu d'informations concernant l'organisme sont connues (âge, taux de croissance...). Ce problème de fraction de mousse à utiliser est le reflet d'une absence de standardisation actuelle de la méthode "mousse aquatique" concernant le choix des espèces, l'échantillonnage, le protocole d'analyses chimiques, ce qui est déploré par les utilisateurs (Thiebaut, 1998 ; Vanderpoorten, 1999).

Deux notions sont à prendre en compte dans la biosurveillance des cours d'eau, la biosurveillance active et la biosurveillance passive qui permettent de faire des suivis dans l'espace et dans le temps à l'échelle d'un cours d'eau ou d'un bassin versant.

II.4.1. La biosurveillance passive

La biosurveillance passive fait appel à des mousses issues de populations stables qui se développent naturellement sur un site. Le principal domaine d'application concerne les réseaux de surveillance de la qualité des eaux. En France, les réseaux de surveillance des milieux aquatiques sont menés par les Agences de l'Eau. Ils ont pour objet de suivre à moyen ou à long terme l'évolution (amélioration ou dégradation) du milieu aquatique. Un prélèvement annuel de bryophytes est réalisé en période d'étiage pour l'analyse des métaux traces et depuis peu, pour l'analyse des micropolluants organiques par certaines agences dans le cadre d'études ponctuelles. Il est à noter que peu d'attention est accordée à l'espèce prélevée (absence de standardisation de la méthode) ; tout dépend de son abondance sur les sites (J. Durocher, Agence de l'Eau Loire Bretagne, Com. Pers.) ce qui peut entraîner des erreurs dommageables pour l'utilisation et l'interprétation ultérieure des données. La méthode de biosurveillance passive nécessite un minimum de connaissances taxonomiques afin d'éviter certaines confusions. Actuellement, lors d'absence de bryophytes, les sédiments constituent le support utilisé (B. Picon, Agence de l'Eau Rhône Méditerranée Corse, Com. Pers.). Les données obtenues par ce type de réseau demeurent insuffisantes en raison de la fréquence des prélèvements et de l'espacement important entre les stations, mais elles permettent néanmoins

d'obtenir des tendances générales relatives à la qualité du milieu à l'échelle d'un bassin et d'identifier les zones à problème. La surveillance passive peut aussi s'appliquer dans le cas d'une pollution ponctuelle.

Les bryophytes (*cf.* Chap 1. II.2.) possèdent une cinétique rapide et un potentiel élevé d'accumulation, ce qui leur permet d'être un outil très intéressant lors d'épisodes de pollutions accidentelles (de forte intensité et de faible durée). En 1993, une équipe de recherche a montré que les mousses, par leur "effet mémoire" (Mouvet *et al.*, 1993), étaient capables de présenter dans leurs tissus des teneurs détectables de Cd, Zn, Hg, PCP et lindane, 13 jours après une contamination accidentelle. L'utilisation des mousses comme bioindicateurs présente donc un intérêt à la fois financier et technique par comparaison au suivi en continu des mesures physico-chimiques dans l'eau. Cependant, le problème majeur de l'utilisation de bryophytes autochtones est l'absence d'informations sur la période de contamination et l'âge des mousses, ce qui permet des conclusions limitées quant à la qualité de l'eau de l'aire étudiée. De plus, il peut arriver que l'espèce recherchée, ou toute espèce de mousse, soit absente sur un site d'étude, comme dans le cas de l'Artois Picardie. Ainsi le réseau "Bryophytes" de l'Agence de l'Eau Artois Picardie a été interrompu en raison d'une trop faible abondance voire d'une absence d'espèce sur les sites. Dans ce cas, la biosurveillance active, en utilisant des mousses transplantées, peut pallier cette absence et produire des résultats permettant des comparaisons statistiques grâce au contrôle du temps d'exposition.

II.4.2. La biosurveillance active

La biosurveillance active consiste à transférer des mousses issues d'un site de référence, non contaminé, vers un site d'étude. Les domaines d'application restent identiques à ceux énoncés pour la surveillance passive. Bien qu'actuellement aucune standardisation de la méthode n'ait été réalisée, l'une d'entre elles a été choisie pour de nombreuses études de biosurveillance des cours d'eau (Kelly *et al.*, 1987) ; les mousses à transplanter sont mises dans des paniers/sacs en grillage plastifié (en anglais « mesh bag ») d'une maille comprise entre 5 à 8 mm (4 mm pour (Carter, 1997 ; Nelson & Campbell, 1995)). Le grillage est découpé et relié par du fil de nylon de façon à former une corbeille de volume compris entre 0,5 et 1 L. La forme des corbeilles importe peu mais une forme cylindrique offre l'avantage d'une faible rétention vis à vis des particules en suspension et évite le colmatage des grilles.

La masse de l'échantillon est comprise entre 30 et 35 g de poids frais essoré. La mise en place de l'échantillon sur un site dépend de la profondeur du cours d'eau. Si elle est supérieure à 50 cm, la corbeille est placée alors à 20-30 cm sous la surface de l'eau de façon à

ce qu'elle puisse flotter dans la colonne d'eau. Son point d'ancrage est soit naturel (racine, bloc de pierre) ou artificiel (barre en chlorure de polyvinyle (P.V.C) ou polyéthylène (P.E) enfoncée dans la berge avec un fil plastifié). Si elle est inférieure à 50 cm, la corbeille de mousses est placée au fond du lit de la rivière reliée par du fil de nylon à la berge. La durée d'exposition varie de 8 jours jusqu'à 4 à 6 semaines (Mouvet, 1986).

Cette technique permet :

- des études dans des sites dépourvus de mousses
- la possibilité du choix du site
- la maîtrise de la durée d'exposition des mousses (intégration de la réponse)
- l'utilisation d'une seule espèce
- le contrôle de la mise en place des transplants.

Cette méthode est limitée par :

- la recherche du site de référence "propre" où les mousses sont abondantes
- le vandalisme des transplants
- le colmatage des transplants (paniers grillagés).

II.4.3. Les intérêts et inconvénients liés à l'utilisation des bryophytes dans la biosurveillance des milieux aquatiques

La biosurveillance des milieux aquatiques à l'aide de bryophytes aquatiques permet d'utiliser seulement quelques espèces de mousses pour couvrir l'ensemble d'un bassin versant. Aucune autre méthode ne peut garantir une meilleure homogénéité au niveau de la constitution de l'échantillon, ni les sédiments à cause des variations de granulométrie et de la teneur en matière organique, ni les poissons à cause des variations intra-espèces d'âges ou de sexe et dans ces deux cas le problème lié à la mobilité de l'échantillon. De plus, les bryophytes sont nettement moins influencées que les sédiments par le fond géochimique, ces derniers mettant fréquemment en évidence un niveau de concentration important d'origine naturelle, masquant les contaminations "anthropiques" (R.N.B.R.M.C., 2001). En particulier, l'incidence du fond géochimique est particulièrement marquée dans les bordures des Alpes et du Massif Central pour l'arsenic et le nickel et plus ponctuellement en Corse pour le nickel (R.N.B.R.M.C., 2001).

Une étude a mis en évidence quelques propriétés importantes des bryophytes en tant que bioindicateurs comme leur pouvoir d'accumulation élevé, leur résistance aux polluants

toxiques et leur utilisation au cours de l'année (Mouvet, 1984b). Par ailleurs, la facilité d'échantillonnage, de conservation, de traitement analytique des mousses aquatiques constitue un attrait supplémentaire face aux sédiments, poissons, plancton ou mollusques. Les principaux inconvénients de leur utilisation sont liés d'une manière classique aux variabilités dans les processus d'accumulation des organismes (*cf.* Chap. 1, II.2.1.) et dans une mauvaise connaissance des incertitudes au niveau de la procédure analytique (traitement de l'échantillon). Toutefois, cette méthode est à utiliser avec précaution dans le cas de cours d'eau acidifiés (*cf.* Chap 1, II.3.).

Cette biosurveillance par le biais de bryophytes aquatiques est déjà largement utilisée pour les ETM, les radionucléides, et tend à être développée pour le suivi des micropolluants organiques. Mais une autre application consisterait à suivre le niveau trophique des cours d'eau, non pas par des dosages en polluants mais par des méthodes enzymatiques. En effet, (Christmas & Whitton, 1998a; Christmas & Whitton, 1998b) ont suggéré une méthode, qui repose sur le suivi de l'activité enzymatique de la phosphomonoestérase (PMEase) dans les cellules. Ils ont montré pour deux espèces de bryophytes, *Fontinalis antipyretica* et *Rhynchostegium riparioides*, que l'activité de la PMEase est augmentée lorsque la concentration en P dans les 2 cm apicaux des organismes chute à 0,3% de poids sec de mousse. L'hypothèse serait que les mousses synthétisent la PMEase en réponse à une restriction en P dans leur environnement, ainsi une forte activité de la PMEase semble refléter une faible concentration en élément P dans l'eau. A terme, ces tests PMEase sur les bryophytes pourraient être utilisés lors de la surveillance de l'eutrophisation des rivières.

II.5. Bioindication par l'utilisation des réponses physiologiques liées au stress chez les bryophytes aquatiques

Le stress peut être défini comme l'ensemble des réactions non spécifiques (physiologiques, métaboliques, comportementales) à un agent physique/chimique agressif provoquant une réaction chez un organisme. Cet agent peut être anthropique ou non anthropique. Il peut provenir de pollutions organiques ou métalliques répétées ou chroniques. Aussi, il peut être lié à des phénomènes physiques. Pour les végétaux, provoquent un stress :

- un niveau de lumière trop élevé provoquant une photo-inhibition,
- des élévations ou des baisses de température brusques,
- un déficit en eau (le stress hydrique),
- des radiations en UVB,

- un manque ou un excès en éléments nutritifs,
- une sénescence naturelle.

Chez les bryophytes, les stress engendrent généralement des effets non détectables morphologiquement ainsi que des effets visibles. Les premiers correspondent à des réponses biochimiques, telles que l'induction d'enzymes de métabolisation ou des réponses physiologiques comme des altérations de la photosynthèse, de la respiration, des transports d'ions ou de métabolites. Ils peuvent être détectables très tôt. On parle alors de réponses précoces. Les effets visibles, tels que des changements de coloration, des lésions cellulaires, résultent d'un ensemble de perturbations métaboliques et sont considérés comme des réponses secondaires à plus ou moins long terme.

II.5.1. Le stress oxydant

Le stress oxydant provient des espèces réactives de l'oxygène (ERO). Ce terme de ERO est un terme collectif qui décrit à la fois les radicaux de l'oxygène ($O_2^{\cdot-}$, $OH^{\cdot}$, $ROO^{\cdot}$, $RO^{\cdot}$) et ses dérivés non radicalaires (H_2O_2 , $HOCl$, O_2 singulet, O_3). Ces ERO sont constamment produites chez les organismes vivants mais des sources exogènes telles que les radiations ionisantes et les polluants peuvent également générer ces ERO et imposer un stress oxydant supplémentaire aux systèmes biologiques (Denayer, 2000). Ainsi, les dommages oxydatifs résultent du déséquilibre entre la production d'ERO et leur élimination par les organismes. Les ERO peuvent ainsi causer des dommages permanents ou transitoires aux protéines, lipides et acides nucléiques. En réponse à ces dommages, divers composés qualifiés d'antioxydants sont synthétisés au niveau cellulaire ; ces molécules sont utilisées comme biomarqueurs de stress oxydant. Dans les écosystèmes aquatiques, la source majeure d'ERO, provient de molécules organiques (HAP) libérées par des huiles et carburants (fuel...) (Roy *et al.*, 1994).

Chez les êtres vivants, les systèmes antioxydants contribuent à éliminer le stress causé par les ERO, les enzymes impliquées dans ces mécanismes de protection sont les suivantes:

Superoxyde dismutase (SOD, E.C. 1.15.1.1), métalloprotéine, présente dans les chloroplastes et le cytoplasme. Elle joue un rôle dans les processus de défense contre des procédés oxydants incontrôlés, dans le but d'en diminuer les effets toxiques.

Peroxydase (POX, EC 1.11.1.7) et ascorbate peroxydase (AP, EC 1.11.1.11), sont deux enzymes majeures qui métabolisent le peroxyde hydrogène (H_2O_2)

Glutathion réductase (GR, EC 1.6.4.2), qui régénère le glutathion réduit (GSH) de sa forme oxydée (GSSG).

Les activités de ces enzymes peuvent servir de biomarqueur biochimique du stress oxydant, elles sont mesurées par des méthodes spectrophotométriques (Bruns, et al., 1997). Il existe aussi des mécanismes anti-oxydants non enzymatiques.

C'est ainsi que le glutathion (L- γ -glutamyl-L-cystéinyglycine), thiol ubiquiste, joue le rôle d'un piègeur réducteur. Une baisse de GSH ou bien le rapport GSH/GSSG peuvent indiquer un niveau de stress oxydant.

Ces différentes molécules sont utilisées comme biomarqueurs du stress oxydant. En effet, par définition, un biomarqueur révèle « un changement observable et/ou mesurable au niveau moléculaire, biochimique, cellulaire, physiologique ou comportemental induit par l'exposition présente ou passée d'un individu à au moins une substance chimique à caractère polluant » (Lagadic *et al.*, 1997). Ainsi certains biomarqueurs vont pouvoir indiquer des dysfonctionnements physiologiques ou même des lésions chez les espèces étudiées et permettre d'obtenir des indications sur l'état de santé des écosystèmes et de compléter les études de biosurveillance. Peu d'études font référence à l'utilisation de biomarqueurs du stress oxydant chez les bryophytes (Bruns *et al.*, 1995 ; Denayer, 2000 ; Roy *et al.*, 1994; Roy *et al.*, 1996) mais les résultats obtenus pour celles-ci ont montré que les biomarqueurs offrent un champ nouveau au développement d'outils diagnostics, comme des tests écotoxicologiques, ayant pour objet de mettre en évidence les relations de causes à effets et de suivi liées à l'exposition des bryophytes au stress oxydant (Denayer, 2000). Néanmoins, l'utilisation de bryomarqueur (biomarqueur chez les bryophytes) est encore au stade expérimental.

II.5.2. La synthèse chlorophyllienne et la respiration

Le suivi des processus physiologiques, tels que la synthèse chlorophyllienne et la respiration chez les bryophytes aquatiques, permet d'obtenir des informations sur l'état physiologique des espèces. Une équipe espagnole a montré que l'exposition à long terme de *Fontinalis antipyretica* à des températures modérément élevées (19,8 ou 24,9 °C, pendant 25 jours) ou une courte exposition à de fortes températures (30 °C pendant 2 jours) avaient des effets marqués sur la photosynthèse nette et la respiration. Ces deux paramètres fournissent des données rapides, efficaces et peu onéreuses sur l'état de santé des organismes végétaux (Carballeira *et al.*, 1998).

La photosynthèse est actuellement utilisée dans certaines études de biosurveillance utilisant des bryophytes aquatiques pour évaluer leur résistance aux polluants par le biais de

l'indice de stress, qui correspond au rapport de la chlorophylle sur son produit de dégradation, la phéophytine. Cette question est détaillée dans le Chap 2. II.6.1.3.

II.5.3. Les changements de concentration et les changements dans la localisation des éléments essentiels au niveau cellulaire

L'absorption des métaux traces dans les mousses mène à des pertes importantes en K (probablement dues aux propriétés de la membrane) et en Mg intracellulaire (probablement liées au remplacement des cations sur les sites de liaisons extracellulaires) (Brown & Wells, 1990b). Le potassium et le magnésium sont essentiels aux plantes car ils jouent un rôle important dans leur nutrition (Brown, 1982).

Le potassium est soluble dans la cellule, il est émis quand la perméabilité de la membrane plasmique est altérée: de cette manière il se comporte comme un indicateur des changements de perméabilité membranaire (Brown & Wells, 1988 ; Buck & Brown, 1979). Le magnésium est distribué de manière identique dans les compartiments intra/extracellulaire, qui dépendent des besoins de la cellule et des niveaux ambiants de magnésium (Brown, 1982). Brown et Wells démontrent que le magnésium intracellulaire est libéré en réponse aux changements de la perméabilité membranaire (Brown & Wells, 1990a).

Par ailleurs, (Samecka-Cymerman *et al.*, 2000) et (Markert & Wtorova, 1992) émettent l'hypothèse d'une accumulation de métaux directement associée à une exclusion du magnésium et du calcium. En effet, Samecka-Cymerman, *et al.*, (2000) ont montré des corrélations négatives entre ces cations divalents et les éléments traces métalliques dans la cellule.

De façon générale, l'accumulation d'un élément résulte souvent en la diminution d'un ou d'autre(s) élément(s) du fait de la capacité limitée de la plante à absorber les sels minéraux est limitée (Brooks, 1972).

Ainsi, les déplacements cationiques liés à l'entrée intracellulaire de xénobiotiques chez les bryophytes sont utilisés afin de déterminer l'état physiologique des espèces (Brown & Wells, 1988 ; Buck & Brown, 1979 ; Jacobson *et al.*, 1960).

II.5.4. Effets visibles de xénobiotiques sur les cellules

Des études s'intéressent à la qualité globale du milieu par l'observation macroscopique et microscopique des organismes. Ces études ne concernent que des polluants fortement toxiques ou présents à des concentrations élevées d'une part et des végétaux sensibles d'autre part. Elles sont considérées comme relevant vraiment de la bioindication (au sens restrictif)

(Garrec & Van Haluwyn, 2002). En 1976, Benson-Evans & Williams ont mené des travaux sur la surveillance des cours d'eau anglais à partir de deux espèces de mousses transplantées, *Fontinalis antipyretica* et *Rhynchostegium riparioides*, ils ont proposé une méthode à deux volets : étude de la qualité physico-chimique de l'eau du cours d'eau et en parallèle une observation des mousses échantillonnées (Benson-Evans & Williams, 1976). L'apparence macroscopique (couleur, présence de feuilles...) et microscopique (pourcentage de lésions des feuilles, couleur et structure des cellules, couleur des parois cellulaires...) est examinée. Les données sont intégrées sur une échelle de détérioration à cinq niveaux, ce qui conduit pour une étude spatio-temporelle d'un cours d'eau, à l'attribution d'un indice à chaque station. Cet indice de mesure du degré de détérioration ne permet généralement pas de déterminer la ou les causes de la détérioration. Certaines indications peuvent cependant donner des informations, par exemple une coloration brune des parois cellulaires résulte généralement d'une concentration élevée en fer dans l'eau (Benson-Evans & Williams, 1976).

De manière générale, les exemples cités ci-dessus mettent l'accent sur une approche de la surveillance des cours d'eau à l'aide de bryophytes aquatiques qui examine des réponses physiologiques au niveau microscopique et macroscopique. Dans le cadre d'études de biosurveillance, cette approche offre l'intérêt de surveiller l'état de santé des bioaccumulateurs dans le milieu naturel, lors d'exposition chronique ou ponctuelle à des polluants.

II.6. Les différents indices d'évaluation de la qualité des cours d'eau en relation avec les bryophytes aquatiques

A partir des méthodes précédemment décrites, l'utilisation des bryophytes comme bioindicateurs de la qualité des eaux a engendré plusieurs indices pour faciliter l'exploitation et l'homogénéité des résultats. Parmi ces indices, on distingue des indices basés sur la connaissance des espèces et de leur répartition, des indices de contamination métallique, un autre sur la comparaison entre deux compartiments (sédiment/bryophyte), et un indice de stress, méthode liée à l'analyse des pigments chlorophylliens et de leurs produits de dégradation.

II.6.1. Les indices écologiques

II.6.1.1. L'indice global de la qualité des eaux basé sur les peuplements bryophytiques

La caractérisation simple des cours d'eau répond à un besoin concret d'évaluation et de contrôle de la qualité globale des eaux de surface. Cet indice tient compte de la réponse (présence, absence, prolifération et disparition) des communautés et des facteurs écologiques qui sont étudiés de façon multivariable (Empain, 1978). En effet chaque espèce peut être

caractérisée par un coefficient de toxiphobie en considérant sa projection sur un gradient de pollution. Ce coefficient a été proposé à partir d'étude sur la répartition des espèces de bryophytes aquatiques en fonction de la qualité de l'eau. L'indice global de qualité des eaux peut être défini comme étant une fonction de chaque espèce présente et de son coefficient de toxiphobie. La fonction peut se représenter de façon générale sous la forme:

$$Ib = \sum ni = \sum RR_{jk} * i_j$$

Où RR_{jk} représente le recouvrement relatif de l'espèce j dans la station k

i_j est le coefficient de toxiphobie de l'espèce j ,

Ib comme indice bryophytique, est l'indice global de qualité des eaux basé sur les populations bryophytiques dans la station k

Cet indice a été créé à partir de données obtenues sur la Sambre et de la Meuse. Le Tableau 7 représente les coefficients de toxiphobie associés aux espèces de bryophytes.

Tableau 7 : Coefficients de toxiphobie attribués aux espèces de bryophytes les plus importantes dans la Sambre et la Meuse (Empain, 1978)

Espèces	Indice de toxiphobie
<i>Octodiceras fontanum</i> (B. Pyl.) Lindb.	5
<i>Cinclidotus nigricans</i> (Brid.) Arnott	5
<i>Cinclidotus fontilanoïdes</i> (Hedw.) Beauv.	5
<i>Fissidens crassipes</i> Wils. ex B., S. & G.	5
<i>Schistidium apocarpum</i> (Hedw.) B. & S.	5
<i>Cinclidotus danubicus</i> Schiffn. & Baumg	4
<i>Fontinalis antipyretica</i> Hedw.	4
<i>Dialytrichia mucronata</i> (Brid.) Broth.	4
<i>Orthotrichum cupulatum</i> Brid. ou <i>O. anomalum</i> Brid. non distingué car souvent stérile	4
<i>Didymodon spadiceus</i> (Mitt.) Limpr.	4
<i>Didymodon thophaceus</i> (Brid.) Lisa.	4
<i>Lunalaria cruciata</i> (L.) Lindb.	4

<i>Mniobryum delicatulum</i> (Hedw.) Dix.	4
<i>Cratoneuron filicinum</i> (Hedw.) Spruce.	4
<i>Funaria hygrometrica</i> Hedw.	4
<i>Hygrohypnum luridum</i> (Hedw.) Loeske	4
<i>Hygroamblystegium fluviatile</i> (Hedw.) Loeske	3
<i>Marchantia polymorpha</i> L.	3
<i>Bryum argenteum</i> Hedw.	3
<i>Bryum capillare</i> Hedw.	3
<i>Tortula muralis</i> Hedw.	2
<i>Rhynchostegium riparioides</i> Hedw.	1

L'indice Ib va de 1 pour l'espèce la plus généralement résistante (*Rhynchostegium riparioides*) à 5 pour la mousse la plus sensible (*Octodiceras fontanum*). Ainsi l'Ib varie de façon continue entre 1 et 5. On lui attribue la valeur 0 en cas de disparition de toutes les espèces. Cette méthode pose d'une part le problème de son utilisation dans d'autres régions, et d'autre part, l'absence de bryophytes n'est pas nécessairement un indice de dégradation.

II.6.1.2. Les indices macrophytiques en Rivière

Plus récemment, les macrophytes, végétaux visibles à l'œil nu (phanérogames, bryophytes, ptéridophytes, lichens...) ont été utilisés comme bioindicateurs des particularités morpho-physiques et hydrodynamiques des milieux aquatiques ainsi que de la qualité de l'eau (Haury, 1994). Les indices GIS (Groupement d'Intérêt Scientifique) Macrophytes des eaux continentales sont français et s'inspirent de différents indices antérieurs étrangers ainsi que de travaux de biotypologie des cours d'eau (Haury *et al.*, 2000).

Ces indices macrophytiques (Haury *et al.*, 1996) prennent en compte l'état et le fonctionnement d'un peuplement, la distribution et l'abondance des espèces, la composition et la richesse spécifique des peuplements, la structure et l'organisation des phytocénoses, la participation du compartiment au fonctionnement des cours d'eau (Haury, 1994). Comme pour l'Ib un coefficient de trophie est attribué à chaque espèce appelé ici, « cote spécifique », qui va de 0 (mauvaise qualité de l'eau) à 10 (bonne qualité). Cet indice s'intéresse à 245 taxons des zones aquatiques et supra-aquatiques, dont 49 bryophytes. Lorsqu'il ne prend en compte que la présence/absence des espèces, il se formule de cette façon :

$$GIS = 1/n(\sum_i CSi)$$

Où

n est le nombre d'espèces

i est l'indice de 1 à n

CSi correspond à la cote spécifique (de 0=mauvais à 10=bon)

Il existe plusieurs variantes des indices GIS, notamment si l'on considère seulement les espèces sténoèces du lit en eau ou l'ensemble des zones aquatiques et supra-aquatiques ; ou encore si l'on prend en compte la pondération par les recouvrements estimés par des coefficients d'abondance - dominance des espèces.

Une amélioration de ces indices GIS correspondant à l' I.B.M.R (Indice Biologique Macrophytique Rivières) est actuellement en cours de normalisation et de plus en plus utilisé en routine, après avoir été testé par les six Agences de l'Eau (dont Rhin-Meuse et Seine Normandie, en 2002), mais des recherches supplémentaires doivent encore être réalisées au niveau de l'écologie des espèces et de leur variabilité éco-régionale (J. Haury, Com. Pers.)

II.6.1.3. L'indice de stress

Cette méthode détaillée dans le Chap 2, II.2. a été proposée pour les végétaux par (Penuelas, 1984) ; elle est basée sur les réactions des pigments chlorophylliens provoquées par les stress. Les variations des rapports chl_a/chl_b ou DO430/DO665 (densité optique à 430 nm/densité optique à 665 nm) ont été tout d'abord prises en compte (Nieto, 1967). De telles mesures ont été appliquées à des bryophytes aquatiques pour évaluer un stress physiologique en cas de pollution (organique ou métallique) ou bien dû à des changements brusques de l'environnement (température de l'environnement, ensoleillement...). En fait, dans ce but, des chercheurs utilisent le rapport chl_a/phéophytine a ; cette dernière molécule, produit de dégradation de la chlorophylle a correspond à une chlorophylle ayant perdu son atome central de magnésium (Lopez & Carballeira, 1989).

Cette perte de l'atome de magnésium, altération la plus commune de la chlorophylle, peut être provoquée in vitro par des acides de manière rapide. Dans ces conditions cet indice, encore appelé D665/D665a, proportionnel au rapport chlorophylle a sur phéophytine a dans les mousses, correspond à un indice de stress physiologique (Lopez *et al.*, 1997). Les mesures sont réalisées sur des extraits en acétone acidifiée. Cet indice est le plus précis des rapports de pigments utilisés pour évaluer l'état de santé des bryophytes (Penuelas, 1984).

Pour ces mesures, une extraction des pigments est réalisée pour les brins de mousses dans l'acétone à 90%, puis l'extrait est ensuite centrifugé et analysé avec spectroscopie UV-Visible à 665 nm. L'addition d'HCl 1 M à l'échantillon, convertit toute la chlorophylle presque instantanément en phéophytine. L'absorbance de l'échantillon à 665 nm est réduite et la réduction de l'absorbance par l'acidification est proportionnelle au rapport initial chlorophylle/phéophytine. C'est cette propriété, apportée par la conversion de la chlorophylle en phéophytine qui est utilisée dans cette méthode (*cf.* Figure 6).

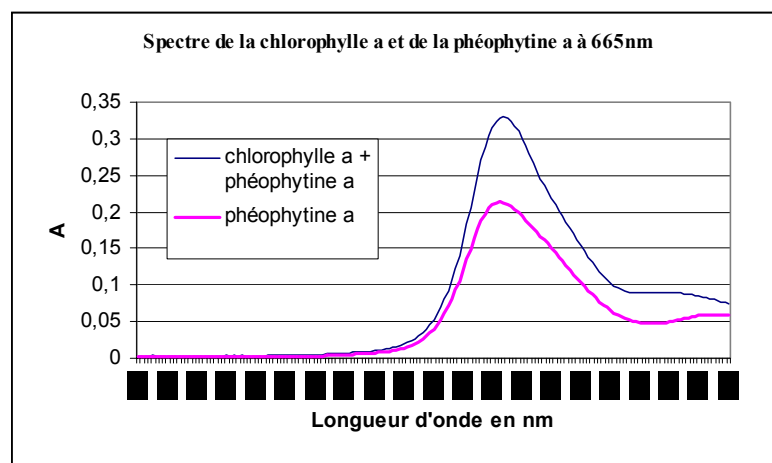


Figure 6 : Spectres superposés d'un extrait de mousse dans l'acétone à 90% (bleu) et du même extrait acidifié (rose) (Ah-Peng, 2001)

A partir d'une étude comparative sur le contenu en pigments et la réponse au stress de cinq espèces de bryophytes aquatiques, López & Carballeira (1989) ont déterminé les classes limites de qualité écophysiological pour *Fontinalis antipyretica* (*cf.* Tableau 8).

Tableau 8 : Classes de qualité écophysiological pour le rapport D665/D665a pour *Fontinalis antipyretica* (López & Carballeira, 1989)

Stress	Stress intermédiaire	Stress faible	Stress nul
$\leq 1,55$	$> 1,55 - \leq 1,60$	$> 1,60 - \leq 1,65$	$> 1,65$

II.6.2. Les indices de contamination

II.6.2.1. L'Indice de contamination métallique

L'indice de contamination (IC) s'exprime par le rapport entre la concentration maximale et minimale de l'élément étudié (Mouvet, 1984a) :

$$IC = \frac{\text{Concentration maximale}}{\text{Concentration minimale}}$$

L'indice de contamination permet de comparer sur un même site des niveaux de bioaccumulation. Prenons l'exemple du Tableau 9:

Tableau 9 : Comparaison des IC des sédiments et des mousses aquatiques dans 11 sites du bassin Rhin Meuse (Mouvet, 1984)

	Fe	Zn	Cu	Pb	Cr	Cd
IC sédiments	11	21	7	54	23	9
IC mousses	20	159	19	240	1500	48
IC mousses/IC sédiments	1.8	7.5	2.7	4.4	65	5.3

Ce tableau montre qu'une pollution au plomb provoque une augmentation des concentrations dans les mousses 4 fois supérieure à l'augmentation dans les sédiments. De ce fait, les mousses permettent de mettre en évidence des pollutions par le plomb 4 fois moins importantes que les sédiments. Une telle différence de bioaccumulation est encore plus nette pour le cas du zinc et du chrome. Cependant, il est intéressant de suivre les concentrations à la fois dans les bryophytes et dans les sédiments car ces derniers représentent une zone de stockage pour différents polluants, en particulier les éléments traces qui peuvent être libérés dans le milieu et devenir ainsi biodisponibles.

Remarque : dans le cas de l'utilisation de sédiments, une attention particulière devra être accordée à la nature du sédiment (composition, granulométrie, quantité en matière organique...).

II.6.2.2. Les classes d'indices de contamination métallique

∞ Cas de la biosurveillance passive

Les Agences de l'Eau françaises utilisent les mousses aquatiques pour la surveillance des cours d'eau en micropolluants métalliques. Une grille de qualité et un indice polymétallique ont été créés pour **exploiter les données obtenues dans les mousses autochtones** lors de surveillance passive des rivières. De plus, un protocole a été mis en place concernant l'échantillonnage et l'analyse des métaux (Mersch & Claveri, 1998).

La grille du Tableau 10 a été réalisée à partir de données obtenues avec les bryophytes autochtones (populations naturelles).

Tableau 10 : Grille de qualité et d'interprétation des concentrations métalliques dans les bryophytes. La précision du résultat à fournir est représentée par la présence ou non de décimales, valeurs en $\mu\text{g.g}^{-1}$ de poids sec.

	Classe 1<	<Classe 2 ≤	<Classe 3 ≤	<Classe 4 ≤	<Classe 5 ≤
Arsenic	4.5	9	27	54	
Cadmium	1.2	2.5	7	14	
Chrome total	11	22	65	130	
Mercure	0.15	0.30	0.85	1.70	
Nickel	22	45	135	270	
Plomb	27	55	165	330	
Cuivre	33	66	200	400	
Zinc	175	350	1050	2100	

Cette grille de qualité a été calculée à partir d'une valeur de référence définie comme la concentration pour un métal donné, correspondant à une situation non polluée. Elle provient des valeurs obtenues par les Agences de l'Eau françaises (Rhin-Meuse et Rhône-Méditerranée- Corse) ainsi que des données provenant de rivières de France, Belgique et d'Angleterre. Pour chaque métal, la valeur de référence a été définie à partir des médianes de l'ensemble des concentrations dont le coefficient de variation a été rendu proche de 60 % par élimination progressive des valeurs les plus élevées. De cette manière, la distribution des données est proche de la normalité. Cette valeur de référence permet ensuite le calcul des limites de classe : une progression géométrique de raison 2 (à l'exception de la limite de la classe 1- situation de référence- où elle a été fixée à 3). Ainsi, les limites de classes successives sont définies par 3 fois, 6 fois, 12 fois, 24 fois la valeur de référence pour chaque métal (Mouvet, 1986).

Les concentrations de référence définies préalablement sont reprises dans le Tableau 11 :

Tableau 11 : Concentrations repères dans les bryophytes autochtones

Métal	As	Cd	Cr	Cu	Hg	Ni	Pb	Zn
Concentration en $\mu\text{g.g}^{-1}$ p.s.	1.5	0.4	5	18	0.06	9	9	75

L'interprétation de la grille de qualité est représentée dans le Tableau 12.

Tableau 12 : Interprétation de la grille de qualité des concentrations métalliques dans les bryophytes

Classe de qualité	Interprétation
Classe 1	Situation de référence
Classe 2	Pollution possible
Classe 3	Pollution certaine
Classe 4	Pollution forte
Classe 5	Pollution très forte

Cette grille offre cinq niveaux d'interprétation. La classe 1 regroupe les concentrations métalliques dans une bryophyte aquatique en l'absence de contamination. La classe 2 définit une gamme de sécurité qui, en prenant compte de l'ensemble des variabilités inhérentes à la méthode, permet de distinguer de façon certaine une situation de non contamination par rapport à une situation de pollution avérée. Les classes 3, 4 et 5 traduisent un degré de contamination croissant d'une situation de pollution jugée certaine, forte et très forte.

∞ Indice de contamination polymétallique

Si la grille précédente permet d'apprécier le degré d'intensité d'une pollution pour chacun des métaux pris séparément elle ne donne en revanche, aucune indication synthétique de la présence d'un mélange complexe de plusieurs métaux susceptibles d'être rencontrés in situ. Ainsi, un indice polymétallique pour les bryophytes a été proposé (Claveri & Mersch, 1998).

L'indice polymétallique, IP, s'écrit comme suit :

$$IP = 100 \times [1 - (q_1^{1/n} \times q_2^{1/n} \times \dots \times q_n^{1/n})]$$

Avec n, le nombre de métaux pris en considération,

qi, la côte de qualité du i^{ème} paramètre définie selon le Tableau 13.

Tableau 13 : Correspondance entre les cinq classes de la grille de qualité et les côtes de qualité définies pour l'indice polymétallique

Classe de qualité	Côte de qualité (qi)
Classe 1	1
Classe 2	0.9
Classe 3	0.45
Classe 4	0.10
Classe 5	0.01

La Figure 7 donne les classes d'indice polymétallique.

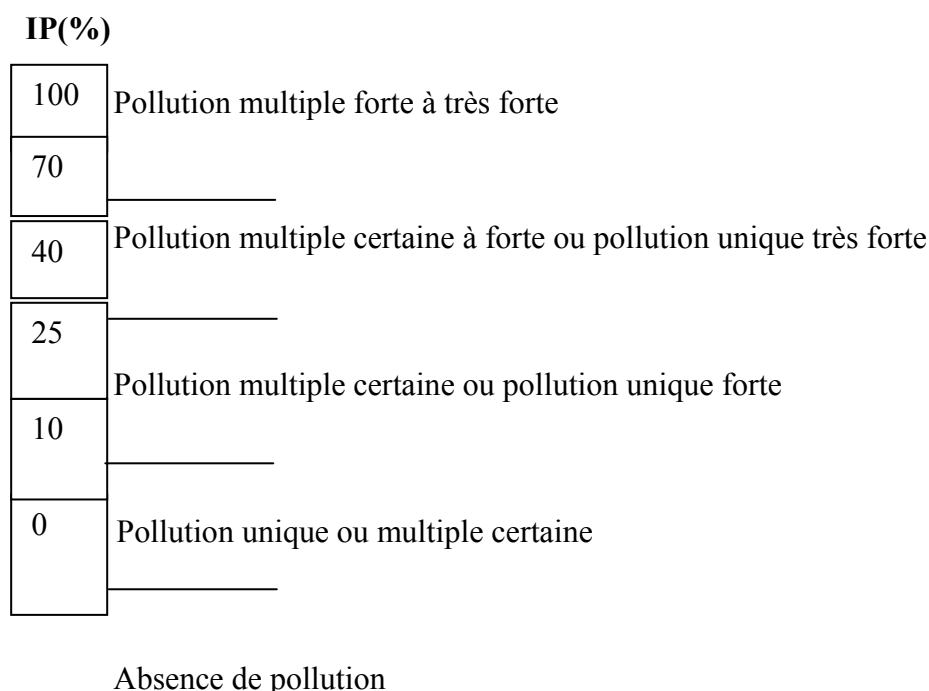


Figure 7 : Indice polymétallique

Une valeur de l'indice supérieure à 70% n'est rencontrée que dans le cas où l'on observe une pollution polymétallique forte à très forte. Plus le nombre de métaux appartenant à la classe 5 de la grille de qualité augmente, plus la valeur de l'indice se rapproche de 100.

∞ Cas de la biosurveillance active

Etant donné que les deux outils précédemment présentés ont été développés à partir d'indications obtenues avec des mousses autochtones, on est actuellement incapable de savoir s'il peut être appliqué au cas de la biosurveillance active (mousses transplantées).

Pour pallier ce manque d'information, les Agences de l'Eau françaises (Claveri & Mersch, 1998) ont proposé d'avoir recours à la notion de facteur de pollution, dont il existe deux cas :

- le **facteur de pollution ajoutée (FPA)**, qui compare la concentration d'un échantillon soumis à une pollution à celle d'un témoin placé en amont dans le cas d'une pollution dont la source est connue ou supposée (rejet)
- le **facteur de pollution standard (FPS)**, rapport entre la concentration observée et une valeur de référence standard pour le métal considéré (*cf.* Tableau 11).

II.7. Conclusion et perspectives

Cette analyse bibliographique a mis en évidence l'état des connaissances actuelles et les différentes méthodes relatives à l'utilisation des bryophytes pour la biosurveillance des milieux aquatiques. Les bryophytes nous apportent par leur faculté d'accumulation, leur réaction physiologique (stress), des indications précises sur la biodisponibilité des polluants. Elles fournissent des éléments d'appréciation sur l'état de santé des écosystèmes au côté des autres organismes aquatiques, autres macrophytes, invertébrés, poissons, diatomées... Mais l'utilisation des bryophytes qui s'est développée aussi bien dans les pays européens (France, Espagne, Allemagne, Finlande, Norvège, Suède) qu'américains (Etats-Unis, Canada) consiste à les employer comme supports biologiques intégrateurs des pollutions métallique, organique, et nucléaire. Cette méthode présente de nombreux avantages par rapport à une analyse limitée à celle de composantes inertes de l'environnement (sédiment, eau). En effet, les données recueillies avec ce type d'organismes permettent d'évaluer la biodisponibilité et le niveau de contamination d'un composé, son impact sur un organisme vivant et son entrée dans la chaîne trophique. Leur utilisation permet aussi de révéler des contaminations qui sont indétectables lors de mesures dans l'eau, principalement pour deux raisons, le polluant se trouve en concentration trop faible pour être détecté ou lors d'une pollution ponctuelle, où un prélèvement d'eau devient inefficace pour quantifier la pollution. Cependant, même si les études et les techniques d'analyses des échantillons portant sur la contamination métallique chez les bryophytes sont nombreuses, l'utilisation des mousses bioaccumulatrices de polluants organiques pour sa part, constitue une technique prometteuse mais qui demande encore des mises au point pour être développée. De plus, le devenir et les phénomènes de métabolisation des polluants après leur entrée intracellulaire ont été encore trop peu investigués, ces processus sont de toute importance car ils vont agir sur la capacité de l'organisme à accumuler et à tolérer de forts et/ou persistants épisodes de pollution.

A terme, les bryophytes aquatiques pourraient s'intégrer dans un système de bio-évaluation de la qualité des cours d'eau qui incluent déjà d'autres bioindicateurs (macro-invertébrés, diatomées, ciliés, oligochètes, poissons...), selon les recommandations de la

Directive Cadre européenne sur l'eau (2000/60/CE) portant en partie sur l'établissement de programmes de biosurveillance de l'état chimique et écologique des eaux de surface à l'aide de méthodes standardisées.

III. Cadre réglementaire : La Directive Cadre 2000

III.1. Un avenir durable pour l'eau en Europe ?

La Directive - Cadre communautaire dans le domaine de l'eau (DCE) est un instrument audacieux et résolument orienté vers le futur, elle devient un pilier aux vastes implications pour la gestion des ressources en eau et des écosystèmes aquatiques partout en Europe. Appliquée de manière rigoureuse et exhaustive, la DCE peut devenir la première directive de « développement durable » de l'Union Européenne.

Le concept de « développement durable » ou encore de « croissance soutenable » (traduction de *sustainable development*) a été pour la première fois utilisé en 1987, date de la publication d'un programme des Nations- Unies pour l'Environnement (PNUE). A l'origine de ce programme, Gro Harlem Brundtland, Premier ministre norvégien, a rédigé ce texte intitulé « Notre avenir pour tous » (traduction de « *Our common future* ») qui conclut à la nécessité d'assurer un développement qui réponde « aux besoins du présent sans compromettre les capacités des générations futures à répondre aux leurs ». En 1992, la Commission des Communautés européennes donna une définition complémentaire : « une politique et une stratégie visant à assurer la continuité dans le temps du développement économique et social, dans le respect de l'environnement, et sans compromettre les ressources naturelles indispensables à l'activité humaine ». En ce sens la DCE oblige les pays d'Europe à mettre en place une gestion intégrée au niveau des bassins hydrographiques : il s'agit essentiellement de concilier l'ensemble des processus naturels et des activités humaines qui influencent le cycle de l'eau dans un bassin hydrographique donné. La caractéristique principale qui détermine tous les autres éléments de la directive est l'utilisation de ces bassins hydrographiques en tant qu'unités de base de toutes les actions de planification et de gestion des ressources en eau. Ces bassins hydrographiques sont rattachés à des districts hydrographiques (art. 3) pour lesquels des plans de gestion sont créés avec l'objectif de bon état (art.4) à réaliser pour toutes les eaux de surface et souterraines européennes d'ici à 2015.

Cette partie présentera dans un premier temps les objectifs fondamentaux et les actions principales de la DCE ainsi que les difficultés rencontrées pour sa mise en œuvre. En second lieu sera traité la biosurveillance des milieux aquatiques en réponse à l'art. 8 de la présente

directive qui se rapporte à l'établissement de programmes de surveillance de l'état écologique et chimique des eaux de surface, associé au développement de méthodes normalisées.

Cette Directive - Cadre du 23 octobre 2000, issue du Parlement Européen et du Conseil, s'adresse aux 15 états membres européens, elle a pour objectif d'offrir un cadre pour une politique communautaire dans le domaine de l'eau. Elle est entrée en vigueur le jour de sa publication dans le Journal Officiel des Communautés Européennes, le 22 décembre 2000.

III.2. Bref historique de la politique de l'eau en Europe et en France.

L'eau douce est devenue un enjeu important du développement durable aussi bien pour la ressource que pour les écosystèmes. Ainsi les chefs d'Etats européens, réunis à Paris en mars 1998 sur ce sujet, se sont engagés à soutenir la promotion de « l'intégration de tous les aspects de l'aménagement, de la gestion et de la protection des ressources en eau ».

Les enjeux portant sur la protection des milieux aquatiques s'expriment dans la mise en place simultanée de plusieurs directives. Les principales directives adoptées par le Conseil des Communautés européennes sur l'eau au cours des 25 dernières années :

- Directive 75/440/CEE, du 16 juin 1975 concernait la qualité requise des eaux superficielles destinées à la production d'eau alimentaire dans les Etats membres.
- Directive 76/464/CEE, du 4 mai 1976, concernant la pollution causée par certaines substances dangereuses déversées dans le milieu aquatique de la Communauté ; elle a permis de développer des réglementations sur la limitation des rejets d'une trentaine de substances considérées comme dangereuses.
- Directive 76/160/CEE du 8 décembre 1975 sur les eaux de baignade établit les normes de qualité pour les eaux de baignade
- Directive 78/659/CEE du 18 juillet 1978 concernant la qualité des eaux douces ayant besoin d'être protégées ou améliorées pour être apte à la vie des poissons et favorable à la pêche.
- Directive 79/923/CEE du 30 octobre 1979 relative à la qualité requise des eaux conchylicoles.
- Directive 91/271/CEE du 21 mai 1991 relative au traitement des eaux résiduaires sert de cadre à la définition de programmes d'assainissement pour l'ensemble des agglomérations urbaines de l'Union Européenne.

- Directive 91/671/CEE du 12 décembre 1991 concernant la protection des eaux contre la pollution par les nitrates à partir de sources agricoles pose les principes d'une politique de prévention des pollutions diffuses pour le secteur agricole dont les effets se développeront dans les prochaines années.

Depuis 1991, aucune nouvelle directive n'avait été adoptée ; on constatait donc une absence d'outils à caractère économique et fiscal pourtant indispensables en matière d'eau, un grand nombre d'aspects de la gestion de l'eau n'étaient pas abordés : risques naturels, sécheresse, ressource en eau, gestion par bassin... Ainsi en 1995, le Parlement européen et le Conseil ont exprimé leur préoccupation sur la nécessité d'une révision de la politique communautaire de l'eau afin de concevoir une approche intégrée de la gestion des ressources hydriques. En réponse à cet appel, la Commission a élaboré une proposition de Directive-Cadre, présentée début 1997, dont l'enjeu est l'adoption d'une approche globale de la ressource en eau (milieu, ressource, support d'activité, etc.) et l'intégration de la gestion de l'eau dans les politiques publiques. En décembre 2000, la Directive- Cadre « Eau » est adoptée, son ambition est de structurer une politique de l'eau cohérente à l'échelle européenne.

En France, les fondements de la politique sur l'eau sont issus de :

- La Loi sur l'eau du 16 décembre 1964 qui a établi le régime et la répartition des eaux et la lutte contre leur pollution. Le territoire français a été partagé en 6 grands bassins hydrographiques correspondant à une agence financière de Bassin (rebaptisée Agence de l'Eau). Elle a été créée pour constituer l'organisme exécutif de la gestion des eaux, le territoire des agences résulte d'un découpage naturel suivant les lignes de partage des eaux.

- La Loi sur l'eau du 3 janvier 1992 qui relance la politique de l'eau. Il est décidé que l'eau fait partie du patrimoine de la nation. Sa protection, sa mise en valeur et le développement de sa ressource sont d'intérêt général.

- Le 20 mai 1998, le Conseil des Ministres propose une réforme des agences de l'eau, les objectifs sont les suivants :

Mieux associer le Parlement à la définition de la politique de l'eau,

Améliorer la transparence du secteur de l'eau et l'assainissement de renforcer le caractère démocratique du système des agences de l'Eau,

Elargir et mieux appliquer le principe général de « pollueur -payeur »,

Améliorer l'efficacité de la police des eaux.

III.3. Les objectifs fondamentaux

- o Etendre la protection des eaux à toutes les eaux, qu'elles soient de surface ou souterraines, y compris les zones côtières.
- o Faire en sorte que toutes les eaux soient en « bon état » d'ici à 2015 avec une diversité biologique accrue (meilleure gestion des habitats/espèces situés dans les zones aquatiques humides)
- o Gérer les eaux par bassins hydrographiques dont certains relèvent de plusieurs pays, membres ou non de l'Union Européenne.
- o Etablir et mettre en œuvre un programme intégré de mesures destinées à encadrer les émissions de polluants et à restaurer les milieux pour atteindre ce « bon état ».
- o Mettre en place une utilisation durable de l'eau (gestion et utilisation plus efficaces, politique des prix capables de contribuer à un usage raisonné de la ressource en eau).
- o Impliquer plus étroitement la société civile dans la politique publique en matière de gestion des eaux.
- o Mettre à jour et coordonner les législations nationales et européennes.

III.4. Les définitions clés de la DCE

La notion de masse d'eau est introduite comme unité d'action.

Masse d'eau artificielle : une masse d'eau de surface créée par l'activité humaine.

Masse d'eau de surface : une partie distincte et significative des eaux de surface telles qu'un lac, un réservoir, une rivière, un fleuve ou un canal, une partie de rivière, de fleuve ou de canal, une eau de transition ou une portion d'eaux côtières.

Masse d'eau souterraine : un volume distinct d'eau souterraine à l'intérieur d'un ou de plusieurs aquifères.

Masse d'eau fortement modifiée : une masse d'eau de surface qui, par suite d'altérations physiques dues à l'activité humaine, est fondamentalement modifiée quant à son caractère, telle que désignée par l'Etat membre conformément aux dispositions de l'annexe II.

L'état d'une eau de surface est défini de cette manière, c'est l'expression de l'état d'une masse d'eau de surface, déterminé par la plus mauvaise valeur de son état écologique et de son état chimique.

La DCE fait référence à l'état écologique (expression de la qualité de la structure et du fonctionnement des écosystèmes aquatiques associés aux eaux de surface) et au bon état écologique.

Le bon état écologique est défini selon trois éléments, la qualité biologique, physico-chimique et hydro- morphologique. L'annexe V de la DCE définit normativement les états écologiques « très bon », « bon » et « moyen », en ce qui concerne les masses d'eau. Le tableau en annexe 1 résume les éléments biologiques, physico-chimiques et hydro-morphologiques pris en compte pour chaque type de masse d'eau.

III.5. Synthèse

1. En vue de l'application de la DCE, les Etats membres doivent recenser tous les bassins hydrographiques qui se trouvent sur leur territoire et les rattacher à des districts hydrographiques. Les bassins hydrographiques qui s'étendent sur le territoire de plus d'un état seront intégrés au sein d'un district hydrographique international (art. 3). Au plus tard le 22 décembre 2003, une autorité compétente sera désignée pour chacun des districts hydrographiques.

2. Au plus tard quatre ans après la date en vigueur de la DCE, les Etats membres doivent faire une analyse des caractéristiques de chaque district hydrographique, une étude de l'incidence de l'activité humaine sur les eaux, une analyse économique de l'utilisation de celles-ci et un registre des zones qui nécessitent une protection spéciale (art. 5 et 6). Toutes les masses d'eau utilisées pour le captage d'eau destiné à la consommation humaine, fournissant plus de 10 m³ par jour ou desservant plus de 50 personnes, doivent être recensées (art.7).

3. Neuf ans après la date d'entrée en vigueur de la directive, un plan de gestion et un programme de mesures doivent être élaborées au sein de chaque district hydrographique en tenant compte des résultats et analyses prévues au point 2.

4. Les mesures prévues dans le plan de gestion du district hydrographique ont pour but de (art. 4) :

- **prévenir** la détérioration, améliorer et restaurer l'état des masses d'eau de surface, atteindre un bon état chimique et écologique de celles-ci, ainsi que de réduire la pollution due au rejets et émissions de substances dangereuses ;

- **protéger**, améliorer et restaurer les eaux souterraines, prévenir leur pollution, leur détérioration et assurer un équilibre entre leurs captages et leur renouvellement ;

- **préserver** les zones protégées.

5. Les objectifs précédents doivent être atteints quinze ans après l'entrée en vigueur de la directive, mais cette échéance peut être rapportée ou assouplie, tout en respectant les conditions établies par la directive (art. 5).

6. Les Etats membres encouragent la participation active de toutes les parties concernées par la mise en œuvre de cette directive, notamment en ce qui concerne les plans de gestion des districts hydrographiques (art. 13).

7. Une détérioration temporaire des masses d'eau ne constitue pas une infraction de la DCE si elle résulte des circonstances exceptionnelles et non prévisibles liées à un accident, une cause naturelle ou un cas de force majeure.

8. A partir de 2010, les Etats membres doivent assurer que la politique de tarification incite les consommateurs à utiliser les ressources de façon efficace et que les différents secteurs économiques contribuent à la récupération des coûts des services liés à l'utilisation de l'eau, y compris les coûts pour l'environnement et les ressources (art. 9).

9. La commission présente une liste de substances polluantes prioritaires sélectionnées parmi celles qui constituent un risque important pour ou via le milieu aquatique. Des mesures de contrôle relatives à ces substances, ainsi que des normes de qualité applicables aux concentrations de celles-ci, sont aussi présentées. Les premières visent à réduire, arrêter ou supprimer des rejets et des émissions et pertes des substances prioritaires (art. 16).

10. Deux ans après l'entrée en vigueur de la DCE, la Commission publie une proposition avec des mesures spécifiques pour prévenir et contrôler la pollution des eaux souterraines.

11. Au plus tard 12 ans après la date en vigueur de la directive et par la suite tous les 6 ans, la Commission publie un rapport sur la mise en œuvre de celle-ci (art. 18). La Commission convoque, au moment opportun, une conférence des parties concernées par la politique communautaire de l'eau, à laquelle participent les Etats membres, des représentants des autorités compétentes, du Parlement européen, des Organisations Non Gouvernementales, des partenaires sociaux et économiques, des consommateurs, des universitaires et autres experts.

12. La DCE prévoit que les Etats membres établissent des régimes avec des sanctions effectives, proportionnées et dissuasives applicables aux violations de ses dispositions (art. 23).

III.6. Les difficultés de mise en oeuvre

Une des difficultés rencontrées par cette directive, relève d'une imprécision à propos de la notion de "Bon état écologique" de l'eau évoquée à l'article 4. On peut s'inquiéter du flou entourant cette notion qui est primordiale, car les états membres se doivent de l'avoir atteint d'ici 2015. Il faudrait alors que ce "Bon état écologique" soit défini sur la base de critères biologiques, hydro- morphologiques, chimiques et physico- chimiques précis et d'un système d'évaluation uniforme dans les états membres. Cette critique a d'ailleurs été reportée dans une Résolution de la part de l'Assemblée nationale qui estime, en conséquence, que l'objectif, d'un retour à "un bon état écologique" d'ici le 31 décembre 2010 est irréaliste et que l'ensemble des échéances de la proposition de directive ne devrait être fixé qu'une fois les critères retenus et ce, dans un délai raisonnable.

Cette résolution (TA 157), dans un article unique, souhaite par ailleurs que:

- la mise en oeuvre de la proposition de la directive soit publiée plus fréquemment que tous les "six ans" ;
- la Commission européenne procède à une évaluation plus régulière de l'application de l'ensemble des directives dans le domaine de l'eau ;
- le gouvernement intervienne auprès de la Commission européenne pour qu'une étude "coûts - bénéfices" soit réalisée, avec le concours des autorités compétentes des états membres sur la mise en oeuvre de la directive - cadre et les textes à venir dans le domaine de l'eau ;
- l'établissement de districts hydrographiques internationaux (art. 3) ne doit pas conduire à la remise en cause des structures intergouvernementales existantes et que la coordination à l'intérieur d'un bassin international doit rester souple, chaque Etat restant maître d'œuvre des mesures de protection de la qualité de l'eau.

Comme l'ont montré les chapitres précédents, les objectifs de la DCE sont ambitieux, leur réalisation demandera un grand investissement auprès des autorités compétentes.

Au niveau local, à court terme pour chaque membre européen :

- il s'avère nécessaire de faire le point rapidement sur de nombreuses questions et d'organiser une coordination entre les communautés scientifiques concernées (Sciences des milieux naturels, Sciences de la Vie, Sciences de l'Homme et de la Société) et les gestionnaires ; ceci afin d'évaluer l'état actuel des connaissances scientifiques au niveau des équipes françaises de recherche qui pourraient être utiles et valorisées dans le cadre de l'application de la directive eau et par conséquent :

- d'identifier les domaines dans lesquels un effort de recherche est nécessaire, afin de rendre rapidement opérationnelles certaines méthodes de surveillance.

La difficulté de l'application de cette DCE, c'est une standardisation européenne des méthodes par le comité européen de normalisation.

L'Europe devient le terrain de jeu, il s'agit alors de se confronter à d'autres points de vue, d'autres cultures, de faire connaître l'expérience de chaque état membre, partager les décisions, de se résoudre aux compromis.

III.7. Similitudes et apports de la DCE à l'organisation française de la gestion des ressources en eau

La Directive- Cadre sur le domaine de l'eau en 2000 s'est inspirée de l'organisation française de la gestion de la ressource en faisant un modèle que les autres pays sont invités à suivre :

- elle raisonne en districts hydrographiques, clones de nos bassins hydrographiques ;
- elle impose l'élaboration d'un plan de gestion de district qui s'apparente globalement à nos actuels SDAGE (Schéma Directeur d'Aménagement et de Gestion des Eaux) ;
- elle prône le principe de récupération des coûts des services liés à l'eau et fait, de la même manière que la redevance à la française, un système de tarification modèle ;
- elle demande une surveillance des éléments biologique, physico-chimique et morphologique de la qualité de l'eau qui reprend le système d'évaluation français de la qualité des cours d'eau, les SEQ, composé du SEQ-EAU (qualité de l'eau), SEQ-BIO (qualité biologique) et le SEQ-PHYSIQUE (qualité du milieu physique) ;
- elle conserve la pratique de surveillance des milieux.

Le principal apport de cette DCE aux systèmes français, c'est qu'il ne faudra dorénavant plus seulement se préoccuper de la conformité de l'eau du robinet et en sortie de station d'épuration, mais également dans le milieu naturel. On s'intéressait au départ à la qualité de l'eau prélevée, maintenant il faut se préoccuper de la qualité de l'aquifère qui donne lieu à ce prélèvement.

Par ailleurs, plusieurs agences de bassin, comme l'agence de l'eau Artois Picardie s'occupent d'un bassin hydrographique qui s'étale sur plusieurs pays. Or, selon l'art.3, lorsqu'un bassin hydrographique s'étend sur le territoire de plus d'un état membre, il est intégré à un district hydrographique international, avec la création d'un plan de gestion transfrontalier.

La directive demande aux Etats membres de se coordonner, en vue de produire un seul plan de gestion district hydrographique international, en s'appuyant sur les structures existantes dérivées d'accords internationaux. Selon Alain Strebelle (directeur de l'Agence de l'Eau Artois Picardie) : *« c'est le chapitre le plus difficile à réaliser politiquement : tel ou tel de nos objectifs pourra être jugé insuffisant par nos voisins belges »*. Par ailleurs, cette directive invite à une meilleure collaboration avec les citoyens des Etats membres. En effet, des consultations du public sur le calendrier d'élaboration du plan de gestion sont à organiser sur l'identification des problèmes principaux et sur le projet de plans de gestion en lui-même.

Pour le reste, les rejets dans le milieu seront contrôlés (art. 10), une liste de substances prioritaires est à surveiller. En détecter dans une masse d'eau signifiera que les dispositions n'auront pas été prises ou respectées, ce qui vaudra au pays concerné une condamnation.

Le régime des sanctions est déterminé par les Etats membres. Ces sanctions sont applicables dans le cas de violations des dispositions nationales prises en application de la DCE. Les sanctions prévues doivent être effectives, proportionnées et dissuasives.

III.8. Calendrier général de la directive

Tableau 14 : Echancier de la Directive cadre 2000

Déc. 2003	Mise en place des dispositions législatives, réglementaires et administratives pour se conformer à la DCE (art.24) Désignation des autorités compétentes des districts hydrographiques (art.3)
Juin 2004	Communication à la Commission de la liste des autorités compétentes (art.3)
Déc. 2004	Achèvement de l'analyse des caractéristiques des districts hydrographiques (art.5) Etablissement du registre des zones protégées (art.6)
Déc. 2006	Mise en place opérationnelle d'un programme de surveillance de l'état des eaux (art.8) Publication du calendrier et du programme de travail du 1er plan de gestion (art.14) Mesures nationales de normes de qualité environnementales pour les substances prioritaires (art.16)
Déc. 2009	Etablissement des programmes de mesures (art.11) Publication du premier plan de gestion (art.13)
Fin 2010	Mise en place d'une politique de tarification incitative (art.9)
Déc. 2012	Mise en place de l'approche combinée (art.10) Mise en place opérationnelle des programmes de mesures (art.11) Rapport des mises en œuvre de la DCE par la Commission (art. 18)
Déc. 2013	Mise à jour de l'analyse des caractéristiques du district (art.5)
Déc. 2015	Réalisation de l'objectif de bon état des eaux (art 4.1) 1^{er} réexamen des programmes de mesures (art.11) Publication du deuxième plan de gestion (art.13)
Déc. 2019	Réexamen de la DCE par la Commission (art. 19)
Déc. 2027	Dernière échéance possible pour la réalisation des objectifs environnementaux (art.4)

III.9. Conclusion et perspectives

La directive 2000/60/CE du Parlement européen et du Conseil de l'union européenne du 23 octobre 2000 établit un cadre pour une politique communautaire dans le domaine de l'eau (eaux intérieures de surface, eaux de transition et eaux côtières). Elle est constituée de 26 articles. Elle a pour but de développer une utilisation "durable" de la ressource en eau à travers les Etats membres. Elle reconnaît que "l'eau n'est pas un bien marchand comme les autres mais un patrimoine qu'il faut protéger, défendre et traiter comme tel". Elle fixe un certain nombre d'objectifs à atteindre et un calendrier très précis pour les réaliser. Un des objectifs est d'harmoniser les techniques d'analyse des eaux à travers l'Europe peut être par le biais de la normalisation des techniques.

La normalisation est « la spécification technique approuvée par un organisme reconnu à activité normative pour application répétée ou continue dont le respect n'est pas en principe obligatoire ». L'intérêt de la normalisation des techniques utilisées (prélèvement/analyses), permet une reproductibilité, une comparaison et une justesse analytique des résultats entre les diverses organisations pour un même organisme.

Il existe différents types de normes d'un point de vue du contenu (terminologie, produits, essais) et d'un point de vue de la structure (résultats, moyens). L'identification d'une norme dépend de son référentiel s'il est international par ISO-Genève (NF ISO), européen par Bruxelles (NF EN) et national par AFNOR-Paris (NF).

Jusqu'ici la France possède une bonne implication dans les travaux européens et internationaux, notamment dans la biosurveillance des eaux (Indice Diatomée, Indice Biologique Global Normalisé...), mais elle nécessite d'être encore renforcée compte tenu de la multiplicité des sujets traités et de l'importance des enjeux.

Ainsi, beaucoup de progrès ont été réalisés en matière de protection de l'eau en Europe et chez chacun des membres de l'Union Européenne. Mais les « eaux européennes » ont encore besoin d'efforts pour qu'elles deviennent et restent propres. Après 25 ans de législation européenne en matière d'eau, la demande est exprimée, non seulement par la communauté scientifique et d'autres experts, mais d'une certaine mesure par un nombre croissant de citoyens européens et d'organisations oeuvrant en Environnement. Le défi de la protection des eaux peut être considéré comme un des plus grands enjeux de l'Union européenne pour ce nouveau millénaire.

Cette directive qui vise à établir un cadre pour la gestion et la protection des eaux par district hydrographique tant du point de vue qualitatif que quantitatif, est appelée à jouer un

rôle stratégique et fondateur en matière de politique de l'eau. Elle fixe en effet des objectifs ambitieux pour la préservation et la restauration de l'état des eaux superficielles et souterraines dans l'optique d'une pérennité de la ressource pour l'Homme.

IV. Culture de bryophytes aquatiques : état des connaissances

A l'heure actuelle, les méthodes décrivant les cultures de bryophytes demeurent rares et à notre connaissance aucune bibliographie ne fait référence à des cultures de bryophytes sur du long terme. Les bryophytes constituent pourtant un matériel pratique et intéressant pour des études de laboratoire nécessitées par des disciplines aussi différentes que la taxonomie, l'écologie, la physiologie ou la génétique (Corradini, 1996). En effet des cultures *in vitro* permettent d'obtenir en laboratoire des informations importantes sur ces disciplines difficilement accessibles avec du matériel naturel qui tend à se dégrader après la récolte. De plus, des cultures de bryophytes en laboratoire permettent de mener des études tout au cours de l'année même lorsque les conditions climatiques ne permettent pas de récolte, comme par exemple lorsque la neige recouvre les organismes. Ainsi, il n'est pas rare de trouver comme équipement des laboratoires de bryologie des chambres de culture aux conditions contrôlées, mais, malheureusement, les conditions de culture et les espèces cultivées sont rarement détaillées et publiées. La rareté des informations sur les méthodologies de culture est principalement liée au fait que les bryologues ne décrivent pas leurs méthodes de cultures.

Cependant, dans la littérature, on peut retenir notamment les travaux de (Basile & Basile, 1988) qui ont synthétisé les différentes méthodes utilisées par les chercheurs. Le plus souvent, les chercheurs ont mis en place des cultures de bryophytes dans le but de comprendre le développement et/ou la physiologie des espèces (Basile, 1965).

IV.1. Difficultés rencontrées lors de cultures de bryophytes

Les principaux inconvénients d'une culture de bryophyte selon Corradini (1996) sont reportés ci-dessous:

- les cultures de mousses sont chères et nécessitent du temps (Shaw, 1987),
- les techniques sont difficiles et font appel aux techniques microbiologiques de stérilisation (milieu de culture, substrat...) (McQueen, 1991), qui nécessitent du matériel important
- les contaminations fongiques et algales restent un handicap (Shaw, 1987),
- la morphologie des organismes est perturbée par les conditions de culture,

- la bibliographie et les méthodes standardisées sont rares.

Les principaux avantages (Rehe & Nimmo, 2001) sont:

- une source sûre et continue de matériel biologique indépendante de la saison de collecte,
- pas de perte de temps à la recherche de sites naturels et dans la collecte des bryophytes, ce qui diminue ainsi le temps des expérimentations,
- connaître l'histoire de la croissance de l'organisme,
- pouvoir utiliser l'organisme à son meilleur état de santé,
- appréhender le niveau de base des concentrations en éléments traces métalliques lors d'utilisation de ces organismes comme bioaccumulateurs.

La difficulté principale des cultures de bryophytes est d'obtenir des cultures débarrassées des micro- algues concomitantes, dans le but de mener des expériences dans des conditions contrôlées et assurer la reproductibilité de celles-ci.

IV.2. Procédures de culture

Les cultures de bryophytes peuvent être initiées de diverses façons, à partir de :

- parties apicales de la tige principale,
- de propagules,
- de fragments de gamétophytes,
- de spores.

IV.2.1. Les substrats utilisés

Corradini (1996) reporte pour la culture de bryophytes l'utilisation de :

- substrats liquides : méthode strictement axénique, elle n'est réalisée que dans des contenants équipés de filtre à air et contrôlés en lumière, température et pH. Parmi les substrats les plus utilisés on distingue les milieux KNOP, BOLD, NITSCH, BENECKE, HOAGLAND. Glime pour la culture de *F. duriei* conseille d'utiliser le milieu Knop dilué 5 fois (Glime, 1987). De plus, Bates remarque que par comparaison avec les plantes supérieures, les bryophytes nécessitent des milieux de culture dilués pour une croissance optimum (Bates, 2000).

- substrats gélosés : utilisés dans des boîtes de Pétri, cette méthode est strictement axénique,
- substrats souples : sur fibre de verre ou papier filtre,
- de substrats particuliers: vermiculite, perlite, sable, fibre de verre, agar-agar, où sont disposées des spores (dont la capsule a été préalablement stérilisée) et régulièrement irriguées par une solution nutritive (Schneider *et al.*, 1967). Les substrats sont préalablement stérilisés avant utilisation, ce qui réduit de façon importante les contaminations fongiques ou bactériennes mais aussi la contamination par d'autres bryophytes (Shaw, 1986).

IV.2.2. Les substances de croissance

Certaines molécules ont été testées afin d'améliorer la croissance des bryophytes en culture :

- L-arginine, L-histidine et L-acide glutamique sur l'hépatique *Scapania nemorosa* (Basile, 1965),
- La vitamine B-12 sur les hépatiques *Jungermannia leiantha* Grolle et *Gymnocolea inflata* (Huds.) Dum. (Basile *et al.*, 1985),
- L'engrais Miracle Gro (2 mL.L⁻¹) a été utilisé par une équipe américaine pour accélérer la croissance de la mousse *Hygrohypnum ochraceum* (Rehe & Nimmo, 2001), mais cette utilisation provoque la prolifération d'algues (Com. Pers, Del Nimmo, 2003)
- Le glucose (1% p/v) est ajouté systématiquement dans les cultures réalisées par (Basile & Basile, 1988), les bryophytes semblent stimulés par cette addition en glucose.

IV.2.3. L'appareillage

Les contenants utilisés pour les cultures des bryophytes varient. Ils sont fermés, soit en verre soit en plastique. Pour des cultures gélosées et stériles, l'emploi des boîtes de Pétri est privilégié. En ce qui concerne les substrats particuliers le choix de pots de jardin ou de barquettes est préféré. (Rasmussen & Rudolph, 1997) ont utilisé des bio-réacteurs avec un approvisionnement en continu (100 mL.h⁻¹) de milieu de culture pour leur culture axénique de *Sphagnum fallax* Klinggr.

IV.2.4. Les conditions de stérilité

Dans le cas d'utilisation de milieux liquides, ils sont autoclavés avant utilisation. Dans le cas de cultures de suspensions cellulaires de *Plagiochila ovalifolia* (Mitt.), des chercheurs ont prélevé des spores et les ont ensuite mis au contact d'une solution de NaOCl à 1%

V. L'organisme étudié, la mousse *Fontinalis antipyretica* Hedw.

Fontinalis antipyretica est une bryophyte aquatique. Les bryophytes aquatiques constituent un maillon important de nombreux écosystèmes aquatiques : elles sont une source d'oxygène et fournissent nourriture et habitat pour les poissons et macroinvertébrés (Glime & Clemons, 1972) elles jouent également un rôle actif dans la préservation et la lutte contre l'érosion des berges des rivières (Rehe & Nemmo, 2001). De par leur croissance clonale et de par la dominance de la phase haploïde dans leur cycle biologique, elles constituent un modèle de choix dans l'étude de la variabilité, de la génétique des populations et de l'action de la sélection naturelle (Corradini, 1996).

V.1. Caractéristiques biologiques et écologiques de cette espèce

V.1.1. Biologie

Les *Fontinalaceae* sont une petite famille de mousses hygrophiles qui incluent trois genres (*Dichelyma*, *Brachylema* et *Fontinalis*) et environ 26 espèces essentiellement situées dans l'hémisphère Nord (Shaw & Allen, 2000). Le genre *Fontinalis* appartient à la famille des mousses de fontaine (*Fontinalaceae*) qui regroupe une vingtaine d'espèces tempérées nordiques (Smith, 1978), divisées en trois groupes. Ces groupes sont déterminés en fonction de la forme de la feuille : carénée, concave et plane (Welch, 1960).

Fontinalis antipyretica appartient à la famille des *Fontinalaceae*, à la classe des Musci, sous-classe des Bryidae, à l'ordre des Isobryales (Classification de Smith, 1978). Cette mousse aquatique se présente sous forme de tiges ramifiées de façon irrégulière pouvant dépasser une longueur d'un mètre. Les feuilles sont implantées sur trois rangs le long de la tige, elles se recouvrent peu. Le limbe des feuilles est long (3 à 8 mm) ovale, concave et fortement replié selon l'axe longitudinal. Les feuilles sont composées d'une seule couche de cellules, ce qui permet des échanges directs avec le milieu extérieur (ou environnant), elles ne possèdent pas de nervures.

Les cellules sont allongées de formes hexagonales, grandes à parois fines, 10 à 15 fois plus longues que larges (Boulay, 1884).

V.1.2. Physiologie

V.1.2.1. La température

Glime a déterminé que 6 espèces de *Fontinalis* dont *F. antipyretica* possèdent une croissance maximum entre 10-15 °C (Glime, 1987).

V.1.2.2. La lumière

Cette mousse apprécie les zones ombragées. La turbidité de l'eau peut être un paramètre favorable dans des eaux peu profondes car elle réduit l'intensité lumineuse mais, associée à des particules abrasives, cela peut endommager les bourgeons et diminuer la reproduction (Glime & Vitt, 1984). Par ailleurs, il a été montré que la lumière rouge induisait une productivité plus importante chez *F. antipyretica* ; cette productivité est moins importante avec de la lumière blanche et encore moindre avec de la lumière bleue (Bode, 1940). Ainsi la lumière influe sur la composition en pigments de l'organisme. Bode en 1940, montre que la lumière rouge induit une concentration plus forte en chlorophylle a et b et moindre en xanthophylle, la lumière bleue favorise la production de xanthophylle et de carotène et la lumière blanche influe négativement sur la production de carotènes.

Le point de compensation de la lumière est dépendant de la température, (Plaetzer, 1917) montre que *Fontinalis* possède un point de compensation de $29,3 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ à 20°C et $7,8 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ à 5°C . De plus, selon Glime la luminosité optimale pour le développement de *F. antipyretica* est comprise entre 15 et $25 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (Glime, 1984).

Glime (1984) a comparé 2 colonies de *Fontinalis antipyretica*, une se trouvant très exposée à la lumière ($11718 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) de coloration rouge et une autre dans un environnement ombragé, de couleur verte. Ces observations montrent que la bryophyte répond à de fortes intensités lumineuses par une coloration rouge, une taille des feuilles plus grande, une concentration moindre en chlorophylle.

V.1.2.3. Assimilation du carbone

L'assimilation du CO_2 par *Fontinalis antipyretica* est augmentée quand le courant s'élève à plus de 3 cm.s^{-1} (Jenkins, 1982). Selon, James (1928), la productivité de *Fontinalis* est plus importante lorsqu'elle est au contact de NaHCO_3 plutôt que du CO_2 uniquement. (Ruttner, 1948) montre que *F. antipyretica* peut à la fois utiliser les bicarbonates et le CO_2 comme source de carbone.

V.1.3. Forme de vie

C'est une des mousses aquatiques les plus largement distribuées que l'on retrouve dans des biotopes variés, à la fois dans les lacs que les rivières, depuis la plaine jusqu'au delà de 2000 m. Peu rhéophile, elle se rencontre en eau courante et en eau stagnante sous forme de colonies, le plus souvent organisées en touffes flottantes vert foncé à vert noir (Boulay, 1884).

Cette espèce forme de longues tiges pouvant atteindre 1 m de longueur (Augier, 1966), dans le sens du courant, mais elle se rencontre aussi sous forme de touffes sur les rochers. Parfois émergées ou immergées les colonies sont souvent pérennes, *Fontinalis antipyretica* a été rarement observée fructifiée. Il semblerait que son mode de reproduction en milieu naturel soit essentiellement lié au mode végétatif. En effet, la dilution des anthérozoïdes de cette plante dioïque dans la veine aqueuse offre peu de chances de rencontrer l'archégone.

V.1.4. Utilisation comme bioindicateur de la qualité des eaux

Du fait qu'elle soit ubiquiste et tolérante à la pollution (Martínez-Abaigar & Núñez-Olivera, 1998), cette mousse a été largement utilisée dans la surveillance de la pollution organique, métallique et nucléaire (Bruns *et al.*, 1995 ; Cenci, 2001; Lopez *et al.*, 1994 ; Mersch & Kass, 1994 ; Mersch & Pihan, 1993 ; Siebert *et al.*, 1996), (*cf.* Chap 1, II.1). Les mécanismes d'accumulation des métaux (particulièrement le Zn) ont été étudiés par (Pickering & Puia, 1969), ils sont décrits dans le Chap. 1, II.2.

V.2. Caractéristiques de la culture de *Fontinalis antipyretica*

V.2.1. Origine

La mousse *Fontinalis antipyretica* (souche FA6VB) actuellement en culture au Muséum National d'Histoire Naturelle a été prélevée en 1998 dans le cours d'eau La Veyre (63), affluent du lac d'Aydat. Cette mousse a été maintenue en culture pendant plus de trois ans après avoir été traitée pour éradiquer la prolifération de microorganismes photosynthétiques contaminants. Cette étape de purification a fait l'objet d'une publication et se trouve en Annexe 10 (Rausch de Traubenberg & Ah-Peng, sous presse).

Cette culture a été initiée à partir d'un apex de quelques millimètres dans un substrat liquide (à base de KNOP). Cette partie apicale a donné lieu à une mousse – mère qui, par multiplication végétative, a donné naissance aux cultures suivantes.

V.2.2. Variété intraspécifique

Cette espèce appartient à la variété *antipyretica*, les feuilles de la tige principale et raméale sont sans nervure et fortement condupliquées. La valeur moyenne de la longueur d'une feuille en moitié de tige est de 4.9 mm ($\pm 0,6$ mm, n=120) et la valeur moyenne de la largeur est de 4.1 mm ($\pm 0,9$ mm, n=120). Les valeurs moyennes de la longueur et de la largeur des cellules en moitié de feuille sont respectivement 131.46 μ m ($\pm 21,3$ μ m, n=120) et 14.9 μ m ($\pm 2,8$ μ m, n=120). Cette mousse *Fontinalis antipyretica* var. *antipyretica* est une variété commune dans les cours d'eau européens.

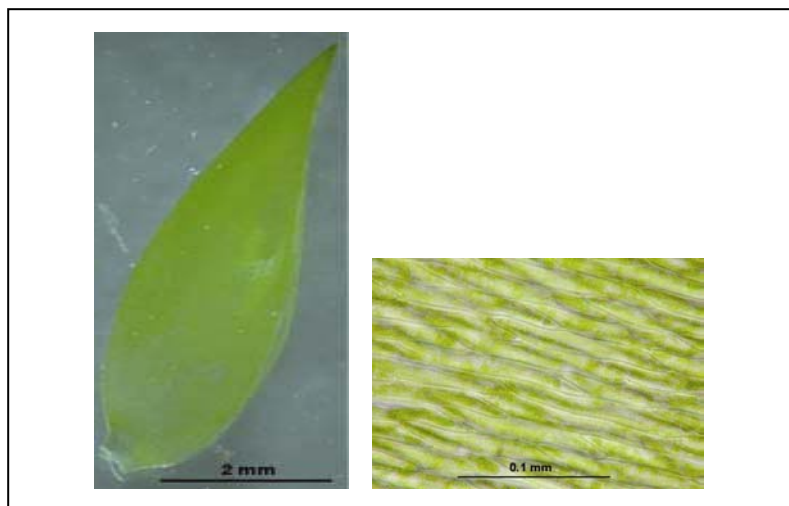


Figure 8 : Photographie d'une feuille et cellules de feuille de *Fontinalis antipyretica* en culture
(Photos Ah-Peng, 2001)

La feuille de *F. antipyretica* est allongée et carénée, elle est fortement repliée dans le sens de la longueur. La photographie ci-dessus ne montre que la moitié de la feuille, l'autre est sous jacente. Les feuilles en culture sont de couleur vert clair.

Les cellules de *F. antipyretica* sont allongées, les chloroplastes à forme lenticulaire occupent une grande partie de la cellule.

V.2.3. Traitements précédents

V.2.3.1. Appareillage de culture

La première partie de cette étude a consisté à s'interroger sur la méthodologie de culture et le matériel à utiliser. A cette période, un des problèmes majeurs était la contamination régulière des cultures par des microorganismes. Le matériel utilisé était alors des erlenmeyers en Pyrex® fermés par des bouchons en coton cardé, qui permettaient les échanges gazeux et freinaient les contaminations, mais pas suffisamment car ces dernières apparaissaient encore épisodiquement. La principale coupable était alors une micro- algue, *Clorocloster minimus* Pascher (Ah-Peng, 2001). Ainsi, pour cette étude, il a été envisagé de réduire au maximum le contact des cultures avec l'air ambiant et donc se mettre à la recherche du matériel adéquat parmi les fournisseurs existants.

V.2.3.2. Validation du milieu de culture

Une autre étape dans la culture de cette mousse a concerné l'amélioration du milieu de culture. Un travail préliminaire avait été réalisé pendant mon stage de maîtrise IUP et celui d'une autre étudiante (Ah-Peng, 2001 ; Albisty, 2001). Plusieurs solutions et produits avaient été testés pour optimiser cette culture. Les résultats sont reportés dans le tableau suivant :

Tableau 15 : Influence de solutions nutritives sur la croissance de *Fontinalis antipyretica* précédemment obtenus (Albisty, 2001 ; Ah-Peng, 2001)

Solution	Concentrations testées	Résultats sur la croissance	Perspectives
Glucose	0.01-6.25 mg.L ⁻¹	- Nuit à la croissance et au développement de l'organisme - Prolifération de micro-organismes	Ne sera pas utilisé dans la culture
Cyanocobalamine	0.625 -10 µg.L ⁻¹	- pas d'effet visible sur la croissance	Ne sera pas utilisé dans la culture
Metal 49 « Hutner »	10 µl.L ⁻¹ -10 mL.L ⁻¹	- une concentration de 100 µL.L ⁻¹ est optimale sur la croissance	Cette solution sera utilisée pour la culture (100 µL.L ⁻¹)

Chapitre 2 : Objectifs des expériences, matériels et méthodes, présentation des sites d'étude

Chapitre 2 Objectifs des expériences, matériels et méthodes, présentation des sites d'étude

I. Techniques d'analyse utilisées

I.1. Méthodes de dosage des éléments métalliques dans les eaux et les bryophytes

10 éléments métalliques (**vanadium, chrome, cobalt, nickel, cuivre, zinc, arsenic, cadmium, antimoine, plomb**) sont dosés en ICP/MS (Inductively Coupled Plasma – Mass Spectroscopy).

Le **manganèse, fer, aluminium** sont dosés en ICP/AES (Inductively Coupled Plasma - Atomic Emission Spectroscopy).

L'étape de traitement de l'échantillon (déshydratation, broyage et minéralisation) est réalisée au Muséum national d'Histoire naturelle (équipe Bryologie), la partie analytique (ICP/MS et ICP/AES) est prise en charge par Monique Pepe du Laboratoire de Géochimie des Eaux (Paris VII). Ce laboratoire possède une expérience et un savoir-faire en ce qui concerne la mesure des éléments traces métalliques.

I.1.1. Principe et appareillage

L'ICP/MS et l'ICP/AES sont deux techniques analytiques utilisant la torche à plasma.

I.1.1.1. Le plasma

Le plasma est un gaz partiellement ionisé (1 à 2 %) par des électrons (10^{18} /cm³), il est électriquement neutre. Il est généré par une décharge électrique (bobine de Tesla). Les électrons ainsi créés sont accélérés par un champ magnétique variable induit par un générateur de radiofréquences de 27 MHz et 1350 W. Les ions et les électrons décrivent alors une trajectoire circulaire à l'intérieur de la torche. Les collisions ionisent les molécules. Le milieu devient de plus en plus conducteur. L'énergie devient telle qu'une température de 4430-5538 °C peut être atteinte dans la partie centrale du plasma (2760 à 3871 °C à l'extrémité de la torche).

I.1.1.2. ICP/MS

C'est une technique sensible qui est utilisée pour l'analyse multi-élémentaire des éléments traces.

L'appareil est un VG Elemental (Fisons) PQ II+ dans sa version de base. Installé à Saclay dans une salle hors poussières, climatisée et en surpression, il est géré en commun par l'I.N.S.U, le B.R.G.M et le Laboratoire Pierre Sûe (CEA/CNRS).

∞ Principe

L'échantillon est aspiré par une pompe péristaltique (débit de $0.8 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$) et est introduit dans un nébuliseur pneumatique (type Meinhard). Le gaz de nébulisation, l'argon, produit une dispersion de l'échantillon en fines gouttelettes. Seules les plus fines (~ 1 à 2% de l'échantillon) sont entraînées puis injectées au centre du plasma. L'argon sert à la fois de gaz auxiliaire, de gaz de refroidissement et de gaz de nébulisation.

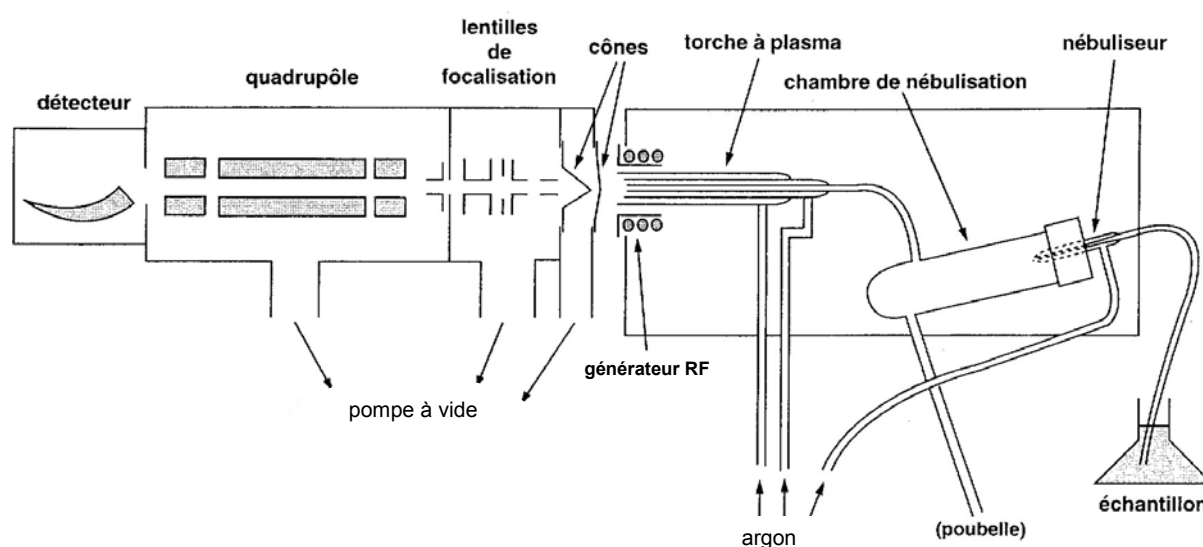


Figure 9 : Schéma simplifié de l'ICP/MS PQII+

Dans le plasma, l'aérosol est désolvaté, dissocié en atomes qui sont à l'état excité ou pour la plupart à l'état ionisé.

Les ions doivent alors être transmis du plasma (4428°C , $P \sim 1000 \text{ mbar}$) au spectromètre de masse ($T = 149^\circ\text{C}$, 10^{-6} bar). Cette interface est la partie délicate de l'appareil.

L'extraction des ions se fait en deux étapes. Les ions passent successivement à travers deux orifices d'échantillonnage. Un jeu de lentilles permet ensuite de focaliser le faisceau d'ions avant qu'ils atteignent le quadrupôle. Le spectromètre de masse joue ici un rôle d'analyseur. Ce dernier produit un champ électrique oscillant qui permet de donner des trajectoires stables à des ions ayant un rapport m/z bien défini. Il fonctionne comme un filtre de masse. Le vide y est très poussé ($2 \cdot 10^{-6} \text{ mbar}$) afin que les ions ne soient pas déviés et que la sensibilité reste bonne. Sa résolution est comprise entre 0.7 et 0.8 u.m.a. (définie comme la largeur du pic à 5% de sa hauteur).

pendant 10 min, pour les stériliser (Matsuo *et al.*, 1996). D'autres utilisent cette même solution pour stériliser des gemmes de *Funaria Hygrometica* Hedw., *Bryum dunense* A.J.E. SM. & H. Whitehouse et *Pleurochaete squarrosa* (Brid.) Lindb (Giordano et al., 1999).

Les substrats sont généralement stérilisés, mais pour maintenir les cultures axéniques, la méthode de culture doit préserver cette stérilité en gardant les cultures à l'abri de tout contact avec l'air ambiant. Ainsi, le matériel utilisé doit assurer une parfaite étanchéité aux gaz. De plus, pour les prélèvements en culture ou des renouvellements de substrats, il est fortement conseillé de manipuler sous hotte à flux laminaire allouant des conditions propres de travail.

IV.2.5. Les durées de culture

Les durées de culture sont rarement reportées dans les articles

- 20 semaines (Glime, 1987),

- 90 jours pour la mousse *Hygrohypnum ochraceum* (Wills. Loesk.) (Rehe & Nimmo, 2001), cette culture non axénique a duré un an (Com Pers, Del Nimmo, août 2003).

Le problème majeur des cultures réside dans leur maintien sur de longues périodes de temps (Basile, 1964).

Jusqu'ici les cultures citées dans la littérature ont été réalisées afin d'obtenir du matériel biologique frais et à portée de main pour des séances pédagogiques ou des études phylogénétiques (séquençage génétique) (Sargent, 1988). En 2001, une équipe américaine a publié ses premiers essais de culture de la mousse *Hygrohypnum ochraceum* sur du long terme dans le but d'avoir des cultures standardisées de mousse (Rehe & Nimmo, 2001).

De plus, peu d'articles traitent de l'état de santé des mousses en culture. Nimmo observe de manière visuelle que les mousses qu'il cultive semblent être en meilleur état de santé par comparaison à la population mère originelle sur le site de prélèvement (Com pers, Nimmo, 2003). Mais à notre connaissance, aucune étude n'a cherché à mettre en évidence si la méthode de culture était adéquate et optimale pour la croissance de l'organisme. Et dans ce cas quel indicateur de santé choisir ?

Des chercheurs ont observé des changements dans la morphologie des organismes en fonction du mode de culture, mais aucun n'a pu clairement énoncer un quelconque effet sur la croissance à court terme ou des modifications génétiques (dégénérescence, mutations...) à long terme de l'organisme.

La détection des ions sortant du quadripôle se fait par comptage après amplification du signal (multiplicateur d'électrons). Les signaux amplifiés fournis par le détecteur sont stockés dans un analyseur multi- canaux avant d'être enregistrés et traités par l'ordinateur. Le résultat d'une mesure par ICP/MS est donc un nombre de coups par seconde. Il faut donc calibrer la réponse du détecteur pour chaque rapport m/z avec des solutions étalons.

Les blancs et les échantillons doivent être à pH ~ 1 .

☞ Protocole et conditions opératoires

Chaque série d'analyse est composée de plusieurs étapes. Sont passés successivement dans l'appareil, 1 blanc de calibration (acide ultrapur +eau Milli-Q), étalons (1 à 6), 1 blanc de calibration, 1 échantillon de référence, 2 blancs de calibration, 1 blanc de minéralisation, 8 échantillons, 1 étalon de contrôle, 1 blanc de calibration. Si la valeur de l'étalon de contrôle est correcte, une nouvelle série d'échantillons est passée, s'il elle ne l'est pas la procédure est recommencée à zéro.

Des rinçages de 2 min suffisent entre chaque échantillon, car il n'y a pas d'effet mémoire sur les éléments analysés. Le temps d'acquisition de l'analyse est de 1 min. Les mesures sont faites 3 fois sur un même échantillon. Le résultat fourni est la moyenne de ces trois mesures.

1.1.1.3. ICP/AES

☞ Principe

A partir d'une certaine température tout élément devient émissif, ce qui permet de le caractériser et de l'analyser. La source d'émission utilisée dans cette technique est la torche à plasma. Elle permet d'atteindre des températures beaucoup plus élevées que dans les flammes conventionnelles. Ainsi, il est possible de doser un plus grand nombre d'éléments et ceci simultanément. C'est une technique sensible généralement utilisée pour l'analyse multi élémentaire des éléments traces.

L'ICP/AES utilisé est un Optima 3000 (Perkin Elmer). Il est situé en salle blanche à l'Université Paris 7 - Denis Diderot.

Les étapes de prélèvement, transport et introduction de l'échantillon dans le plasma sont analogues à celles de l'ICP/MS. Seule, l'étape de nébulisation diffère, un nébuliseur ultrasonique est utilisé en ICP/AES.

Les ions et atomes contenus dans le plasma émettent leurs radiations caractéristiques. Elles sont collectées dans le spectromètre où un réseau de diffraction les sépare. Pour repérer

les émissions spécifiques de l'élément à quantifier, un montage optique de grande qualité est nécessaire. Ce montage optique délicat est installé sur une table anti-vibration, l'enceinte est thermo statée à 38 °C et est à l'abri de l'humidité. Le système dispersif possède une résolution de 0,007 nm.

La détection des éléments est faite par SCD (Segmented array charge-Coupled Device), il est constitué de 224 adresses et 6000 pixels. Ce qui permet d'accéder ainsi à tous les éléments du tableau périodique qui correspond à environ 5000 raies. Le pouvoir de résolution est de 0.007 nm.

Protocole et conditions opératoires

Le choix de la longueur d'onde en ICP/AES est important car d'autres éléments peuvent créer des interférences. Il est nécessaire de choisir une raie exempte d'interférences. Pour les éléments qui nous intéressent, fer, aluminium et manganèse, les longueurs d'onde choisies sont respectivement 238.20 nm, 396.15 nm et 369.15 nm.

I.1.2. Protocole d'analyse des échantillons

L'ensemble des analyses a été découpé en 5 séries de 20 à 30 échantillons, incluant les échantillons de référence (3 par série) et les blancs de minéralisation traités (3 par série).

I.1.2.1. Traitement des échantillons

Les échantillons de mousse prélevés sont conservés à 4 +/- 2 °C dans des sachets « zippés » au maximum 24 h. Ils sont ensuite déshydratés (40 °C, ~15 h) dans une étuve salle propre (Classe 100) et broyés à l'aide d'un broyeur (Pulverisette 14, Fritsch). En raison, de la quantité de biomasse limitée, aucun répliquât n'a pu être réalisé.

Les échantillons d'eau sont d'abord filtrés avec des filtres seringues à 0.45 µm (Microstar®) puis acidifiés avec quelques gouttes d'acide nitrique 65% (Prolabo, Normapur), ils sont conditionnés dans des tubes de 10 ml en polypropylène (Falcon®).

I.1.2.2. Protocole de lavage du matériel avant analyse

Toute la vaisselle de laboratoire utilisée subit le même traitement après chaque minéralisation, les pots de digestion sont d'abord lavés à l'eau du robinet à l'extérieur de la salle propre, puis un premier bain d'une semaine est réalisé dans du DECON90® à 2%. Ce produit ne contient ni phosphates, ni enzymes, ni EDTA ou produits chlorés. Ensuite les pots de digestion sont rincés à plusieurs reprises avec de l'eau osmosée et sont placés dans un bain d'acide nitrique 60% (Prolabo Normapur, d =1.37) à 0.5% v.v avec de l'eau osmosée. Après une semaine, ils sont de nouveau rincés abondamment à l'eau osmosée et sont rentrés en salle

blanche où ils sont lavés à l'eau Milli-Q (5 fois) et séchés sous une hotte à flux laminaire. Ces pots de digestion sont ensuite remplis d'eau Milli-Q acidifiée (acide nitrique 65 % Prolabo Normapur) et sont ainsi stockés jusqu'à la prochaine utilisation.

1.1.2.3. Protocole de digestion

Environ 60 mg de mousse broyée sont pesés à l'aide d'une balance de précision (Sartorius®, CP 224S) et placés dans des pots à digestion en Teflon™ FEP (Savillex, 60 ml, 6 bar). 7 ml d'acide nitrique ultrapur dilué à 70 % sont ajoutés à l'aide d'un distributeur ultra propre (350 ml de la solution commerciale d'acide nitrique et 150 ml d'eau Milli-Q). Chaque pot est ensuite fermé de manière étanche et placé à l'étuve à 134 °C.

Après une nuit (environ 15 h) de digestion et après refroidissement du pot, l'intégralité de la solution d'attaque est transvasée dans un tube Greiner® sous hotte chimique et complétée à 50 ml d'eau Milli-Q (Millipore®). 10 ml de ce minéralisat sont filtrés à l'aide d'un filtre seringue à 0.45 µm (Microstar®), ils sont conservés dans un tube (Falcon®). Ensuite 200 µl d'indium à 500 ppb sont ajoutés dans cet échantillon ([In]≈10 ppb). Tous les volumes sont déterminés par pesée. Les échantillons certifiés minéralisés sont dilués environ 200 fois (dilution par pesée). Tous les échantillons sont conservés à 4 +/- 2 °C jusqu'à analyse.

Toutes ces manipulations sont réalisées sous la hotte à flux laminaire en salle blanche.

Les échantillons sont ensuite dosés en ICP/MS et en ICP/AES selon les éléments.

1.1.2.4. Etalonnage de l'appareil

∞ Fabrication des solutions d'étalonnage

Les solutions d'étalonnages destinées à la calibration externe de l'appareil ont été préparées à partir de solutions ultra pure Spex® à 1000 ppm. A partir de ces solutions mono élémentaires sont préparées 2 solutions concentrées SM1 (Co, V, As, Pb, Cd, Ni) et SM2 (Al, Cu, Zn) qui vont ensuite former une solution mère. Cette solution- mère est diluée (100, 33.3, 20, 14.3, 10 et 3.3 fois), afin d'obtenir les solutions E1, E2, E3, E4, E5, E6 qui servent pour étalonner l'appareil. Ces solutions sont réalisées en salle blanche, les contenants en téflon ayant subi la procédure de lavage décrite en 1.1.2.4. Les concentrations en éléments sont reportées ci-dessous (*cf.* Tableau 16).

Tableau 16 : Concentrations en éléments des solutions d'étalonnage

Elément (ppb)	E1	E2	E3	E4	E5	E6
Facteur de dilution	100	33.3	20	14.3	10	3.3
Cobalt (Co)	1	3	5	7	10	30
Vanadium (V)	0.40	1.2	2	3	4	12
Arsenic (As)	0.70	2.1	3.5	4.9	7	21
Plomb (Pb)	0.1	0.3	0.5	0.7	1	3
Cadmium (Cd)	0.050	0.1	0.25	0.35	0.5	1
Chrome (Cr)	0.3	0.9	1.5	2.1	3	9
Nickel (Ni)	0.7	2.1	3.5	4.9	7	21
Aluminium (Al)	2	6	10	14	20	60
Cuivre (Cu)	2	6	10	14	20	60
Zinc (Zn)	4	12	20	28	40	120

I.1.3. Qualité de la mesure

I.1.3.1. Qualité des produits utilisés.

Tous les réactifs doivent être de qualité analytique reconnue. L'acide nitrique utilisé est ultra pur (Carlo Erba, ultrapur 65%, pour analyses de traces). Il permet de réduire au maximum les risques de contamination des échantillons et d'assurer un résultat fiable. Au cours de l'analyse et pour la préparation des réactifs l'utilisation d'eau Milli-Q a été choisie.

I.1.3.2. Essai à blanc

La veille de la minéralisation des échantillons, un essai à blanc est réalisé ; les pots de digestion sont placés dans les mêmes conditions qu'une minéralisation normale à 134 °C pendant une nuit avec 5 ml d'HNO₃ 70 % ultrapur (Carlo Erba). Cette étape élimine les éventuelles particules qui pourraient encore être adsorbées sur les parois des pots, malgré l'étape de lavage. Ils sont ensuite rincés 3 fois à l'eau Milli-Q, séchés sous la hotte à flux laminaire et sont ensuite immédiatement utilisés.

1.1.3.3. Blancs de minéralisation

Par série d'analyse, trois blancs de minéralisation sont traités de la même manière que les échantillons de mousses ; ils contiennent 5 ml d'acide nitrique ultrapur à 70 %.

1.1.3.4. Limite de détection, reproductibilité et justesse

La correction de la **dérive** de l'appareil est calibrée par l'ajout d'un standard interne. Ainsi, une concentration de 10 ppb d'indium est ajoutée dans chaque échantillon avant dosage, il sert d'étalon interne pour évaluer et corriger les fluctuations à long terme du signal de l'appareil au cours du dosage.

La **justesse** des valeurs trouvées est confirmée par l'analyse de standards internationaux proches des échantillons analysés. Pour les échantillons d'eau à analyser, on utilise le **SLRS – 4** (Saint Laurent River Standard). Les valeurs de ce standard sont certifiées par le CNRC (Conseil National de Recherches au Canada). Pour les échantillons de mousses, le standard utilisé est le **BRC 061**, il correspond à une mousse aquatique *Rhynchostegium riparioides* provenant de l'I.M.M.R (Institut des Mesures et Matériaux de Référence). Cet échantillon est à chaque fois minéralisé trois fois par série d'analyse afin de contrôler la qualité des analyses. Ce matériel biologique est certifié pour les concentrations en cadmium, cuivre, manganèse, aluminium, nickel, arsenic, plomb et zinc.

La **réponse** de l'appareil varie d'un jour à l'autre, c'est pourquoi il est préférable de rassembler les échantillons en séries d'analyse et de les passer le même jour.

La **limite de détection** d'un élément (LD) est définie comme la concentration de l'élément qui donne un signal dont l'intensité est égale à 3 fois l'écart- type d'une série faite sur le blanc de minéralisation ($3 \cdot \sigma_{bl}$) en prenant un indice de confiance à 99%. Mais concrètement, les concentrations mesurées doivent être supérieures à 10 fois l'écart- type sur les blancs de minéralisation pour avoir des mesures fiables, c'est la **limite de quantification**.

L'ICP/MS ne tolère pas de solution trop concentrée, les solutions sont parfois diluées, ainsi, il faut tenir compte de la dilution des échantillons dans l'expression d'une limite de quantification. La limite de quantification sera d'autant plus élevée que le facteur de dilution est important.

La **limite de détection instrumentale** (LD_{appareil}) correspond à 3 fois l'écart- type sur les blancs de calibration (eau Milli-Q + acide nitrique suprapur) qui sont passés trois fois. Lorsque la limite de détection pour un élément n'a pu être déterminée, la limite de détection instrumentale a été choisie. Dans le Tableau 17 sont reportés la moyenne des blancs de

minéralisation et la limite de détection des éléments, qui ont été déterminées lors des séries analyses effectuées au cours de cette étude.

∞ ICP/MS

Tableau 17 : Limite de détection pour chaque élément et moyenne des blancs de minéralisation en ICP/MS au cours des séries d'analyse dans cette étude

Elément	Moyenne des blancs de minéralisation (n=9)	LD
en ng.g ⁻¹		
V	0.02	0.02
Cr	0,09	0,09
Cu	0,4	0,8
Ni	0.06	0.06
Zn	2	7
Co	0.004	0.004
As	0,7	0,5
Cd	0,002	0,009
Sb	0,014	0,003
Pb	0,1	0,2

Tableau 18 : Comparaison entre mesures et données certifiées pour Al, Ni, Cu, Zn, As, Cd, Pb (n=9)

Mesure sur BCR 061 (µg.g ⁻¹)	Al	V	Cr	Co	Sb	Ni	Cu	Zn	As	Cd	Pb
Mesuré	5465 ± 747	5.4 ± 1.24	439 ± 30	28 ± 10	1.49 ± 0.13	399 ± 28	674 ± 21	845 ± 192	< LD	1.68 ± 0.09	67 ± 13
Coef. Variation	32 %	23 %	7 %	35 %	8 %	7 %	3 %	23 %		5 %	20 %
Réel	10740 ± 240					420	720 ± 31	566 ± 13	7	1.07 ± 0.08	64.4 ± 3.5
Coef. recouvrement	49 %					5 %	6 %	- 49 %		- 57 %	- 4%

Pour les éléments V, Cr, Co et Sb, l'I.M.M.R ne propose pas de valeur certifiée. Le coefficient de variation indique la variation obtenue à la suite de 9 mesures pour chaque élément. Le coefficient de recouvrement indique la différence relative entre l'échantillon certifié et les valeurs mesurées pour l'échantillon certifié.

∞ ICP/AES

Les limites de détection des éléments et instrumentales ainsi que la moyenne des valeurs de blancs de minéralisation obtenus sont reportés dans le tableau suivant :

Tableau 19 : Limites de détection et moyenne des blancs de minéralisation mesurées en ICP/AES au cours des séries d'analyse de cette étude.

Elément en ng.g ⁻¹	Moyenne des blancs de minéralisation (n=9)	LD
Fe	4	8
Mn	0,04	0,04
Al	2,4	4,7

Le protocole est le même qu'en ICP/MS. L'indium n'est pas ajouté car il n'est pas utile pour cette technique. Une calibration externe est réalisée. Chaque échantillon est répété cinq fois.

La **justesse** des analyses est évaluée par rapport aux valeurs obtenues sur les standards internationaux : SLRS -4 (Référence eau) et BRC 061 (Référence mousse).

Tableau 20 : Comparaison entre mesure (n=8) et données certifiées pour le Mn, le Fe et l'Al

Mesures sur SLRS	Mn (µg.L ⁻¹)	Fe (µg.L ⁻¹)	Al (µg.L ⁻¹)
Mesuré	3.3 ± 0.2	108.6 ± 2,7	54.3 ± 2
Réel	3.4 ± 0.15	100 ± 5	54 ± 4

Les résultats obtenus sont exprimés en ng.g⁻¹ (ppb) ou en µg.g⁻¹ (ppm) de poids sec de mousse et en µg.L⁻¹ (ppb) ou en mg.L⁻¹ (ppm) pour les échantillons d'eau.

I.2. Méthode de mesure de l'indice de stress D665/D665a

I.2.1. Principe

La mesure de l'indice de stress correspond à une mesure du rapport de la chlorophylle a + phéophytine a sur la phéophytine a totale. Il est basé sur la transformation de la chlorophylle en son produit de dégradation la phéophytine.

I.2.2. Méthodologie

Le protocole utilisé est inspiré de la méthode de López & Carballeira (1989).

A chaque mesure, 5 brins de 2 cm de mousse avec apex (~ 230 mg en poids frais de mousse) sont prélevés et déposés dans des tubes Greiner® (50 mL) qui sont recouverts de papier d'aluminium les tenant ainsi à l'abri de la lumière. Ces tubes sont préalablement remplis avec 15 mL d'acétone à 90 % (pour analyses, Carlo Erba).

Pour un échantillonnage sur site d'étude, le transport des tubes se fait dans une glacière à 5 °C +/- 2 °C, les échantillons sont ensuite conditionnés au réfrigérateur au laboratoire.

Les cinq brins de chaque échantillon sont broyés à l'aide d'un mortier en céramique dans de l'acétone 90 % puis extraits pendant au minimum 24 h à l'obscurité à 5 °C. L'extrait est ensuite centrifugé à 3000 g pendant 10 min à 20 °C (centrifugeuse Eppendorf®).

Le réglage au spectrophotomètre (Prim Scan SECOMAM, précision de la mesure à 10 %) est réalisé à partir de la solution d'acétone 90 %. La densité optique des extractions est mesurée à 750 nm et 665 nm.

La conversion de la chlorophylle en phéophytine est réalisée par l'ajout de 10 µl d'HCl 1.5 M dans 3 ml d'extrait. Après deux minutes, une mesure de l'absorbance à 750 nm et 665 nm est de nouveau réalisée.

Le rapport étudié D665/D665a, qui est la densité optique de l'extrait de mousse à 665 nm acidifié et non acidifié doit être corrigé par la lecture à 750 nm : à cette longueur d'onde peu d'absorbance est liée à la chlorophylle ainsi, cette valeur sert de contrôle pour la clarté optique de la solution.

Ainsi le rapport étudié est le suivant:

$$\frac{(D665-D750)}{(D665a-D750a)}$$

I.3. Méthode de mesure de la croissance de la mousse

La méthode choisie pour estimer la croissance de la mousse est la mesure de l'allongement des brins de mousse. Pour chaque expérience, la croissance des brins apicaux mesurant initialement 2 cm est estimée. Au cours de l'expérience, la longueur du brin principal et des ramifications est mesurée à des intervalles réguliers à l'aide d'une loupe binoculaire et d'un micromètre. La mesure de la croissance se fait sous la hotte à flux laminaire.

I.4. Méthode de mesure du stress oxydant

Ces analyses sont réalisées par Franck- Olivier Denayer du Laboratoire de Botanique (Lille 2), les échantillons sont transportés à Lille dans de la carboglace. Les protocoles d'extraction et de dosage sont décrits ci-dessous (Denayer, 2000).

I.4.1. Extraction et dosage de la superoxyde dismutase (SOD)

Les mousses sont prélevées pendant l'expérience et sont gardées à - 80 °C, jusqu'à leur extraction. 2 ml de tampon phosphate pH=7 sont ajoutés aux 100 mg de mousse. L'échantillon est broyé à l'aide d'un mortier en céramique, puis centrifugé (3000g, 4°C, 10 min). Le surnageant est filtré puis mis dans des tubes Eppendorf®. Tous les tubes sont

congelés à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Le dosage de l'activité de la superoxyde dismutase est réalisé par méthode colorimétrique, coffret réactif RANSOD (laboratoire Randox, Crumlin, Co Antrim, Royaume Uni). La lecture est faite à 505 nm . Les résultats sont donnés en unités enzymatiques $\text{U.g de protéines}^{-1}$.

I.4.2. Extraction et dosage du malondialdéhyde (MDA)

30 mg de mousse sont prélevés pour les dosages du malondialdéhyde. 3 ml d'acétate d'éthyle et 1 ml d'HCl sont ajoutés. Après homogénéisation au vortex pendant 3 min, une centrifugation est réalisée (3000 g , 10 min). La phase organique est récupérée. Une nouvelle extraction est effectuée en ajoutant 3 ml d'acétate d'éthyle. Les phases organiques sont évaporées sous rampe d'azote à $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ et reprises dans $200\text{ }\mu\text{L}$ de méthanol. $700\text{ }\mu\text{L}$ d'acide phosphorique et $250\text{ }\mu\text{L}$ d'acide thiobarbiturique sont ajoutés à $50\text{ }\mu\text{L}$ d'échantillon. Le mélange est incubé à $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ pendant 30 min. Le dosage est réalisé en HPLC sur colonne Nucleosil® C18 ($5\text{ }\mu\text{m}$, $150*2,1\text{ mm}$) avec une phase mobile de 60 % de KH_2PO_4 50 mM à $\text{pH}=6.8$ et 40 % de méthanol. $50\text{ }\mu\text{L}$ de cette solution sont injectés. La détection est effectuée à 532 nm (Détecteur UV Jasco 975) et la lecture est réalisée par rapport à une gamme étalon variant de 0.4 à $400\text{ }\mu\text{mol.L}^{-1}$. Les résultats sont exprimés en mg.g^{-1} de protéines.

I.5. Méthode d'observation en microscopie photonique

Pour l'expérimentation portant sur la contamination au cadmium des mousses en culture, une observation des cellules de feuilles est réalisée. A chaque prélèvement une tige apicale de 2 cm est échantillonnée dans chaque milieu, 5 feuilles sont placées entre lame et lamelle et sont observées au microscope. Pour leur conservation, les préparations microscopiques sont fixées à l'aide d'une préparation à la glycérine, puis placées à l'étuve pendant 24 h à $40\text{ }^{\circ}\text{C}$.

II. Expériences en laboratoire

Les expériences en laboratoire ont d'abord concerné l'optimisation des cultures, avec pour objectifs principaux d'une part d'obtenir une biomasse suffisante de mousse pour des expériences *in situ* et d'autre part, d'améliorer la méthodologie de culture en vue d'une amélioration du rendement de production de biomasse. Les expériences ont également porté sur la physiologie de l'organisme en culture, notamment lors d'une expérience de contamination au cadmium et lors de tests menés pour l'évaluation de l'état de santé de l'organisme.

II.1. Méthodologie de culture

II.1.1. Chambre de culture

C'est une pièce de 8 m² environ, climatisée, où la température est maintenue à 12 ± 2 °C. La luminosité est de 20 ± 3 μmol. m⁻². s⁻¹ (Ah-Peng, 2001). Elle est régie par deux néons, l'un diffusant de la lumière blanche (Mazda fluor Prestiflux, jour 865, 18W), spectre de la lumière naturelle ; l'autre complétant celui-ci en lumière rouge (Sylvania GroLux 18W) favorable à la photosynthèse. Un cycle d'alternance 16 h jour / 8 h nuit est imposé.

II.1.2. Appareillage

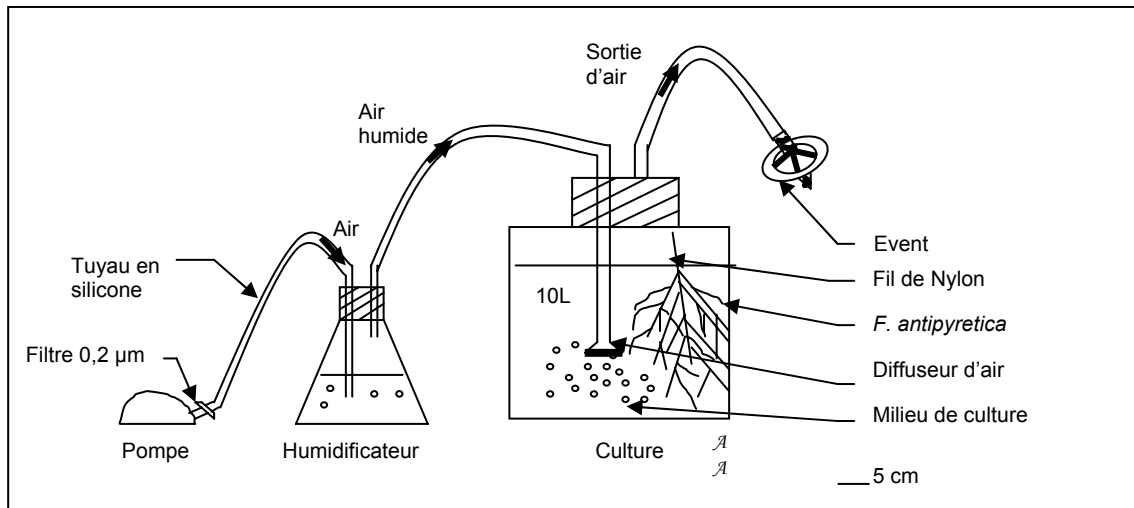
Deux types d'appareillages ont été testés pour la culture de *F. antipyretica* :

∞ Appareillage avec diffusion d'air par un bulleur

Le matériel de culture utilisé est principalement constitué de polycarbonates (Nalgène®), de verre Pyrex®, de silicone, de téflon.

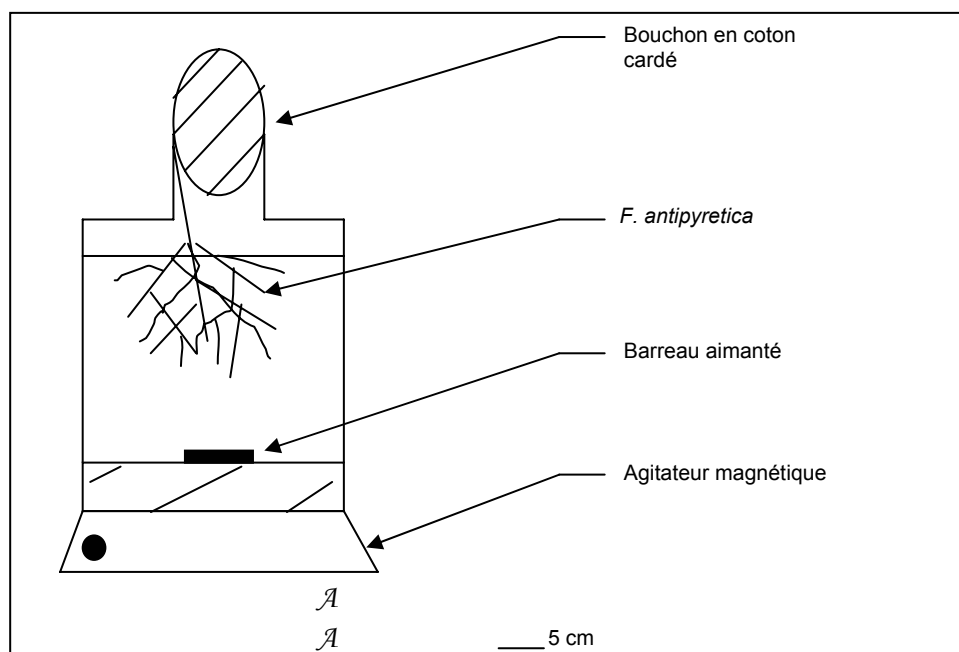
Des pompes pour aquarium (Rena® Air 400, 800) sont utilisées afin de créer un bullage à l'intérieur du récipient permettant d'insuffler de l'oxygène et du dioxyde de carbone aux cultures et de remuer le milieu (Ah-Peng, 2001).

Le contenant de la culture est une bonbonne en polycarbonates (Nalgène®) dont le bouchon est percé à deux endroits (embouts cannelés) permettant une entrée d'air humidifié et une sortie d'air par un évent (Sartorius®). L'air insufflé par la pompe traverse un filtre hydrophobe 0.2 μm (Sartorius®, Minisart), passe dans un erlenmeyer à col fritté contenant de l'eau Milli-Q (Verfilco) et jouant le rôle d'humidificateur, entre dans la culture et bulle par le biais d'un diffuseur à gaz en verre (VS Technologies). L'envoi d'air humidifié dans la bonbonne évite l'évaporation du milieu de culture. La mousse est retenue par un fil de nylon (stérilisé par autoclave) permettant la récupération facile de l'organisme lors de prélèvements ou de renouvellement de milieu. Tous les raccords entre les tuyaux de silicone et le verre, notamment au niveau de l'humidificateur, sont entourés d'un film de téflon afin de ne permettre aucun contact avec l'extérieur. Le montage utilisé est présenté ci-dessous :

Figure 10 : Montage de culture de *F. antipyretica* avec diffuseur d'air

∞ Appareillage avec agitateur magnétique

Les cultures sont placées dans des bonbonnes en Pyrex (V=10 L), auxquelles est ajouté un barreau aimanté. L'ensemble est posé sur un agitateur magnétique et programmé à 300 rpm. La mousse est suspendue par un fil de nylon et la culture est fermée à l'aide d'un bouchon en coton cardé. Les bonbonnes en Nalgène n'ont pas pu être utilisées pour ce dispositif car le frottement du barreau aimanté libérait des particules en polycarbonates dans le milieu.

Figure 11 : Montage de culture de *F. antipyretica* avec agitateur magnétique

II.1.3. Méthodologie

II.1.3.1. Conditions de stérilité

L'autoclave (chaleur humide) et le four Pasteur (chaleur sèche) sont utilisés pour stériliser le matériel et milieu de culture. Au four Pasteur sont stérilisés : les bouchons en coton cardé et le matériel en verre Pyrex (erlens, cristallisoirs) utilisés lors des repiquages ou changements de milieux des cultures ; à l'autoclave, sont stérilisés : les milieux de culture, les pipettes, les contenants en polycarbonates (Nalgène®).

Les manipulations avec les mousses sont effectuées en salle blanche sous une hotte à flux laminaire horizontal. Ces moyens mis en œuvre permettent d'éviter la contamination des cultures par des microorganismes.

II.1.3.2. Milieu de culture

Le milieu de culture de base utilisé est le milieu KNOP dilué cinq fois (K/5) et une solution d'oligo-éléments Hutner (Basile & Basile, 1988).

Tableau 21 : Composition en éléments (g.L⁻¹) recommandée par Basile & Basile (1988)

Milieu Knop (g.L ⁻¹)		Solution Hutner (Metal 49) (g.L ⁻¹)	
KNO ₃	0.125	Fe(NH ₄) ₂ SO ₄ .6H ₂ O	7
Ca(NO ₃) ₂ , 4 H ₂ O	0.5	MnSO ₄ .H ₂ O	3.04
MgSO ₄ , 7H ₂ O	0.125	ZnSO ₄ .7H ₂ O	2.2
KH ₂ PO ₄	0.125	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	0.0736
		CuSO ₄	0.394
		CoSO ₄ .7H ₂ O	0.238
		H ₃ BO ₃	0.572
		Na ₃ VO ₄ .16H ₂ O	0.0462

Etant donné que les milieux sont régulièrement préparés, des solutions concentrées « stock » sont fabriquées, K*100 pour le milieu Knop et Metal 49 pour la solution Hutner. Ces solutions sont stérilisées par autoclave et sont gardées plusieurs mois à 4 ° C.

Tableau 22 : Composition des solutions stocks pour la culture de *F. antipyretica*

Solution « stock »	Ingrédients	en g	Références des produits
K*100 V=1 L	KNO ₃	12,5	Rectapur™ AR PROLABO
	Ca(NO ₃) ₂ , 4 H ₂ O	50	Rectapur™ AR PROLABO
	MgSO ₄ , 7H ₂ O	12,5	R.P. Normapur™ AR PROLABO
	KH ₂ PO ₄	12,5	Rectapur™ AR PROLABO
Metal 49 V=100 mL	Fe(NH ₄) ₂ SO ₄ .6H ₂ O	0,7	PROLABO
	MnSO ₄ .H ₂ O	0,304	Rectapur™ AR PROLABO
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,22	R.P. Normapur™ AR PROLABO
	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .H ₂ O	0,00736	R.P. Normapur™ AR PROLABO
	CuSO ₄	0,0394	PROLABO
	CoSO ₄ .7H ₂ O	0,0238	PROLABO
	H ₃ BO ₃	0,0572	PROLABO
	Na ₃ VO ₄ .16H ₂ O	0,00462	SIGMA
	Acide sulfosalicylique à 0,05 %	13 mL	R.P. Normapur™ AR PROLABO

Le protocole pour la préparation de **100 mL** de solution Metal 49, est détaillé en Annexe 1.

Un tampon NaHCO₃ à 5 g.L⁻¹ (R.P. Normapur™ AR pour analyses PROLABO) a été rajouté au milieu Knop/5, il constitue une source de CO₂ pour les cultures. Le milieu final K'/5 peut être ainsi formulé :

$$K'/5 = K/5 + NaHCO_3$$

Pour 10 L de milieu préparé **20 mL de K*100** et **20 mL de NaHCO₃** ainsi que **1000 µL de la solution Hutner (Metal 49)** sont ajoutés à l'eau Milli-Q (Rausch de Trautenberg & Ah-Peng, sous presse).

Les milieux sont préparés dans des bonbonnes en Nalgène® et sont ensuite stérilisés en chaleur humide par autoclave à 121 °C pendant 20 minutes.

II.1.3.3. Multiplication végétative

La mousse *F. antipyretica* étant une espèce dioïque, la présence de deux gamétophytes de sexes opposés est nécessaire pour qu'il puisse y avoir reproduction sexuée. Ainsi toute la production de biomasse de cette culture se fait par multiplication végétative. Lorsqu'une culture remplit l'espace de la bonbonne elle est divisée en deux et ces dernières sont

transférées dans 2 bonbonnes différentes. Régulièrement les tiges apicales des mousses sont coupées, car il a été observé que cela favorisait la ramification de l'organisme et lui donnait une forme en « boule », plus adaptée pour la transplantation. Ces tiges sont mises dans des milieux de culture et servent au repiquage de nouvelles cultures.

II.1.3.4. Entretien des cultures

L'entretien des cultures demande du temps : il faut non seulement changer régulièrement les milieux (~ 3 mois), mais aussi faire les repiquages et préparer des milieux de culture à l'avance ainsi que prévoir du matériel propre, afin d'opérer rapidement en cas de contamination.

II.2. Optimisation de la culture de *Fontinalis antipyretica*

II.2.1. Détermination de la dilution optimale du milieu de culture Knop

II.2.1.1. Objectifs

Il a été envisagé de tester le milieu Knop dilué 5, 10, 20 fois sur la croissance de *F. antipyretica* et de vérifier quel milieu est le plus favorable à la croissance de l'organisme.

II.2.1.2. Méthodologie

∞ Préparation des milieux de culture

A partir d'une solution stock concentrée (K*100) 4 solutions sont préparées (K, K/5, K/10, K/20). La concentration optimale pour la solution d'oligo-éléments (Rausch de Trautenberg & Ah-Peng, sous presse) est gardée, à savoir 100 $\mu\text{L.L}^{-1}$. Un faible bullage est apporté pendant cette expérience. De l'eau Milli-Q est utilisée dans la fabrication des milieux.

Tableau 23 : Composition des milieux de culture pour cette expérience

Pour 800 mL	K*100	NaHCO ₃ à 10 mg.L ⁻¹	Métaux 49
K	8 mL	1.6 mL	80 μL
K/5	1.6 mL		
K/10	0.8 mL		
K/20	0.4 mL		

∞ Prélèvement de la mousse et suivi de la croissance

4 brins de 2 cm apicaux ont été prélevés dans une culture de mousse puis déposés dans chaque Erlenmeyer, et gardés dans les conditions de la chambre de culture. La longueur de la

mousse a été mesurée toutes les semaines pendant cinq semaines à l'aide la méthode décrite dans le Chap. 2 I.3. Le pH a été mesuré toutes les deux semaines afin de voir son évolution dans les milieux testés.

II.2.2. Estimation des niveaux de base en éléments traces métalliques dans la culture

II.2.2.1. Objectifs

L'objectif de cette expérimentation est d'estimer les concentrations en éléments métalliques dans cinq cultures : FA6VBA(2), FA6VBA(1), FA6VB1, FA6VB2, FA6VB3, âgées respectivement pour les trois premières de 4, 4, 8, 6 et 13 mois.

∞ Méthodologie

Chacun de ces échantillons se trouve dans une bonbonne Nalgène® et se trouve dans les conditions de culture décrites dans le Chap.2. II.1.3. L'appareillage choisi est celui avec diffuseur d'air.

Deux séries d'analyses sont menées à 6 mois d'intervalle. Entre ces deux séries, le cuivre a été supprimé des cultures (*cf.* Chap 3 I.3.1). Pour chaque série, environ 15 g de poids frais de mousse sont prélevés dans chaque culture. Le prélèvement est homogène et se fait indépendamment des tiges anciennes ou jeunes. Les analyses de métaux sont réalisées, le protocole utilisé pour le traitement et l'analyse de l'échantillon est celui décrit dans le Chap. 2. I.1.2.

II.2.3. Effet du CO₂ sur la croissance de la mousse en culture

II.2.3.1. Objectifs

L'objectif de cette expérience consiste à évaluer la capacité du dioxyde de carbone à accélérer la croissance de la mousse. L'ajout de CO₂ est une pratique commune pour des cultures d'algues et pour les aquariophiles pour augmenter le rendement de biomasse de leurs plantes.

II.2.3.2. Appareillage

Le matériel choisi est le CO₂ set Vario 500 (JBL Proflora) qui comprend :

- une bouteille de 500 g de CO₂, un pied stabilisateur pour la bouteille, un détendeur de haute précision, un système de diffusion, une vanne de sécurité et un tube de raccordement 4/6 mm.

L'expérience est menée dans des bonbonnes en Nalgène® de 10 L et se déroule dans les conditions de la chambre de culture. La bouteille de CO₂ libère le gaz pur dans la bonbonne qui diffuse au rythme d'une bulle par seconde à travers le diffuseur.

∞ Protocole

- 6 brins apicaux de mousse de 2 cm sont placés dans du milieu K⁺/5, avec 100 µL.L⁻¹ de solution Métaux 49 modifié ([Cu]/2, cf. Chap.2. II.1.3).
- La méthode d'évaluation de la croissance est celle décrite dans le Chap 2. I.3.
- Dans une autre bonbonne servant de témoin, 6 brins de 2 cm apicaux sont cultivés dans les conditions habituelles.
- Pour cette expérience les conditions de stérilité sont exceptionnellement négligées car le diffuseur de CO₂ ne peut être stérilisé.

II.3. Impact d'une contamination de cadmium sur *F. antipyretica*

II.3.1. Objectifs

La contamination expérimentale de *F. antipyretica* par le cadmium a pour objectif d'étudier, dans des conditions contrôlées, le processus d'accumulation du cadmium et le comportement de cet organisme vis-à-vis du métal toxique. Deux paramètres ont été testés : (1) des concentrations élevées, rarement retrouvées dans le milieu naturel (**B** : 3.8 ppm ; **C** : 18.5 ppm ; **D** : 37 ppm de Cd²⁺) ont été appliquées sur la mousse *F. antipyretica*. (2) l'expérience a été menée sur une mousse en culture.

L'impact de l'exposition du cadmium sur la physiologie de la mousse a été évalué à partir de :

- l'indice écophysologique D665/D665a,
- deux biomarqueurs d'effets de stress oxydant : un lipide le **malondialdéhyde (MDA)**, qui a pour origine la peroxydation par les ERO des acides gras poly-insaturés membranaires et une enzyme **superoxyde dismutase (SOD)**, métalloprotéine, qui occupe une place importante dans le système anti-oxydant parce que son activité détermine les concentrations de radicaux superoxydes et de peroxydes (cf., Chap 2. I.4.),
- l'observation cellulaire des feuilles de la mousse.

Les concentrations en Cd dans l'organisme et dans le milieu ont été mesurées en ICP/MS.

II.3.2. Protocole

∞ Mousse

Prélèvement de 2 mousses en culture **FA6VB3(1,1)3** et **FA6VB3(4,2)**.

Tableau 24 : Données sur les mousses utilisées pour cette expérience

Milieu testé	Mousse	Age	Masse de mousse (g de poids frais)
A	FA6VB3(1,1)3	5 mois	27.9
B	FA6VB3(1,1)3		47.1
C	FA6VB3(4,2)		43.5
D	FA6VB3(4,2)		43.9

L'échantillonnage sur cette mousse a été le suivant :

- 5 brins apicaux de 2 cm pour la mesure de l'indice écophysologique D665/D665a
- des tiges entières pour la mesure du cadmium total et pour les biomarqueurs, le poids de l'échantillon prélevé est évalué par pesée.

∞ Méthodologie

Toutes les solutions ont été préparées le jour même de l'expérience à partir d'une poudre de $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ (pour analyses, Carlo Erba) et d'une balance de précision.

La solution A étant le **témoin**, de l'eau osmosée a été utilisée. Les solutions B, C, D contiennent les concentrations reportées ci-dessous en $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ et en Cd^{++} **pour 3 L**.

Tableau 25: Concentration en cadmium testées ($M_{(\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O})} = 308.47 \text{ g.mol}^{-1}$, $M_{(\text{Cd})} = 112.4 \text{ g.mol}^{-1}$)

	$\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$	Cd^{++}
Solution B :	10 ppm	3.8 ppm
Solution C :	50 ppm	18.5 ppm
Solution D :	100 ppm	37 ppm

Deux mousses sont prélevées le jour même et divisées en 4 échantillons. Pour chaque test, environ $40,6 \pm 8,6 \text{ g}$ poids frais de mousse sont mis dans chaque cristalliseur en verre contenant 3 L de solution et sont incubés en chambre de culture ($T=12^\circ\text{C}$, $\text{Lum}=19\text{-}25 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). Les mousses sont déposées sur un grillage plastifié, le milieu est homogénéisé à l'aide d'un barreau aimanté et d'un agitateur magnétique (*cf.* Figure 12).

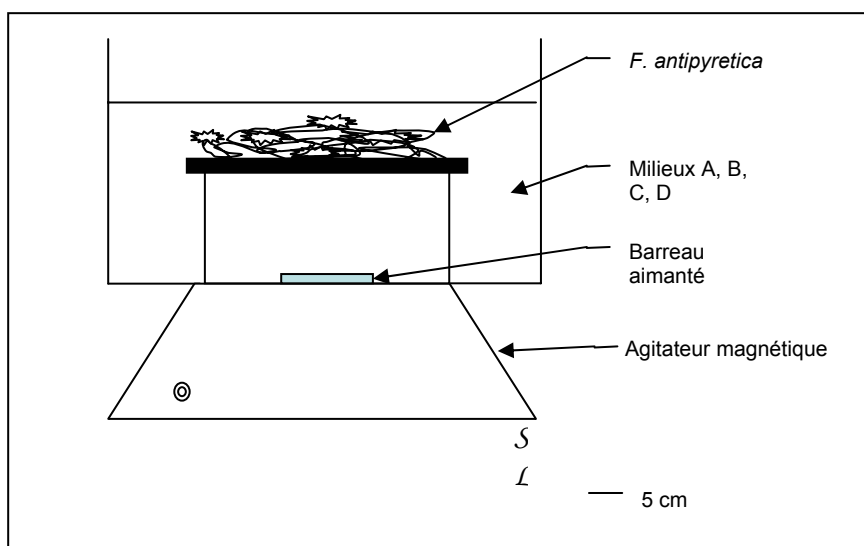


Figure 12 : Montage expérimental pour l'expérience de contamination de *F. antipyretica* au cadmium

A $T_1=0$, $T_2= 1$ h, $T_3= 2$ h30, $T_4= 4$ h30, $T_5= 20$ h, sont prélevés successivement dans chaque milieu:

- 3 * 5 brins apicaux de 2 cm pour l'indice D665/D665a,
- environ 3 g de poids frais de mousse pour le dosage des biomarqueurs de stress,
- 1 brin apical de mousse composé de 5 feuilles pour l'observation microscopique de ces limbes,
- 3 g de poids frais de mousse pour l'analyse du cadmium total,
- un échantillon d'eau de 20 ml pour la détermination de la concentration en cadmium du milieu.

Une observation visuelle a été effectuée une semaine après le début de l'expérience (~ 216 h).

∞ Analyses chimiques

La méthodologie est la même que celle décrite en Chap 2, II.1. à l'exception du broyage effectué dans un mortier en agate, en raison de la faible quantité de matériel végétal. Pour les mesures de stress oxydant, réalisées ultérieurement, les échantillons sont conditionnés à -80 °C.

II.4. Contrôle de l'état physiologique de *F. antipyretica* en utilisant l'indice de stress D665/D665a : impact de deux facteurs environnementaux

Ces expériences ont été menées en collaboration avec Lydie Denis (stage IUP Licence) et Sébastien Leblond (étudiant en thèse).

II.4.1. Suivi du rapport D665/D665a dans une culture

II.4.1.1. Objectifs

L'indice D665/D665a a été suivi pendant plusieurs mois dans une culture de *F. antipyretica*. Cette expérience a pour objectif d'évaluer l'état de santé de l'organisme et de connaître les valeurs de base pour cet indice dans des conditions considérées comme optimales pour la mousse.

II.4.1.2. Protocole

Trois prélèvements de 5 brins de mousses sont réalisés toutes les 2 semaines dans la culture durant trois mois selon la méthode décrite dans le Chap 2. I.2.

II.4.2. Impact d'un choc lumineux et d'une température élevée sur la mousse en culture

L'impact d'un choc lumineux ($100 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) et d'une température de 50 °C est testé sur la mousse *F. antipyretica* en culture. L'évaluation de l'impact de ces stress est estimée à l'aide de l'indice de stress D665/D665a.

II.4.2.1. Test du conditionnement lors de ces expériences

Le but de cette étape préliminaire est d'évaluer l'impact du conditionnement (sac zip) de la mousse au cours des expériences qui suivront.

Ainsi, une mousse en culture est prélevée et divisée en 5 sous échantillons. Ceux-ci sont mis dans des sacs en plastique zippés et sont placés à plat en salle de culture, dont les conditions sont décrites en Chap 2. I.2.

∞ Protocole

- L'indice de stress est mesuré au début de l'expérience **après prélèvement** du milieu de culture (t_0).
- Après **une semaine de conditionnement** dans les sacs zip dans les conditions de la chambre de culture, une deuxième mesure de l'indice de stress est réalisée ($t_0 + 7$ jours).

- **Juste après la mesure précédente** (soit après une semaine) une aspersion avec du milieu de culture est réalisée à l'aide d'un vaporisateur dans les sacs en plastique ($t_0 + 7$ jours).
- **Un jour après cette aspersion**, une mesure de l'indice est réalisée ($t_0 + 8$ jours).
- L'expérience dure une semaine et un jour.

II.4.2.2. Test de la lumière

∞ Protocole

- Une mousse en culture est prélevée et subdivisée en 8 sous- échantillons.
- 5 sous échantillons sont placés dans des sacs en plastiques dans une enceinte de culture pour micro- algues ou elles sont soumises à une luminosité de $100 \mu\text{mol.m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Une attention particulière sera apportée au problème de surchauffe des néons. Les 3 autres servent de témoin.
- A différents temps (0, 15, 30, 60, 120, 300 min), 5 brins de 2 cm sont prélevés dans chaque sac pour la mesure de l'indice de stress.

II.4.2.3. Test de la température

∞ Protocole

Une mousse en culture est prélevée et est divisée en 8 sous- échantillons. Ceux-ci sont mis dans des sacs en plastique zippés et sont mis à plat en salle de culture, dont les conditions sont décrites en Chap. 2. I.2.

- Ces sous- échantillons sont exposés à une température de 50°C dans une étuve. L'indice de stress est suivi en fonction du temps avec un pas de temps de 30 min, pendant 5 h.

II.5. Estimation de la croissance de *F. antipyretica* en culture

II.5.1. Objectif

Le but de cette expérience est de suivre le taux de croissance de *F. antipyretica* en culture.

II.5.2. Protocole

- 6 brins de 2 cm apicaux de mousses sont placés dans les conditions de culture avec diffuseur d'air (décrit en Chap. 2. II.1.). La solution Metal 49 a été modifiée : la concentration en cuivre a été divisée en 2. La mesure de la croissance est réalisée pendant 6 semaines selon la méthode décrite en Chap. 2. I.3.

- Parallèlement, une tige de mousse de 10 cm a été placée dans les mêmes conditions. La détermination du temps minimum nécessaire à l'obtention d'un transplant est visuelle (individu suffisamment ramifié occupant tout l'espace de la bonbonne).

II.6. Obtention de transplants pour la biosurveillance active

II.6.1. Objectif

L'objectif est de cultiver la mousse *F. antipyretica* afin d'obtenir suffisamment de biomasse pour les transplants. Ces transplants de mousses serviront à la biosurveillance active en milieu naturel de quatre sites du Nord de la France. Pour chaque site, 3 cultures de mousses seront exposées.

II.6.2. Méthodologie

Entre février et juin 2001, 12 cultures ont été initiées à partir de tiges de mousse de 10 cm. Elles sont cultivées avec un appareillage à diffusion d'air, selon les conditions décrites au Chap. 2. II.1.3.

III. Expérimentations in situ

Après avoir obtenu suffisamment de biomasse, des mousses en culture ont été transférées de mars 2003 à juillet 2003, sur quatre sites de la région Nord- Pas de Calais. Les objectifs de cette expérience sont:

- d'évaluer la résistance de l'organisme au transfert de la chambre de culture aux conditions contrôlées à des sites d'études, connus pour être plus ou moins contaminés en éléments métalliques,
- de suivre les concentrations en éléments traces métalliques dans les mousses et dans l'eau.

III.1. Choix et présentation des sites étudiés

Quatre sites ont été choisis. Ils sont localisés dans le département du Nord- Pas de Calais et appartiennent au réseau de surveillance de l'Agence de l'Eau Artois Picardie. Ils correspondent à des sites fléchés au niveau européen (F.E.D.E.R). Leur localisation géographique à l'échelle du bassin Artois Picardie est présentée en Figure 13 .

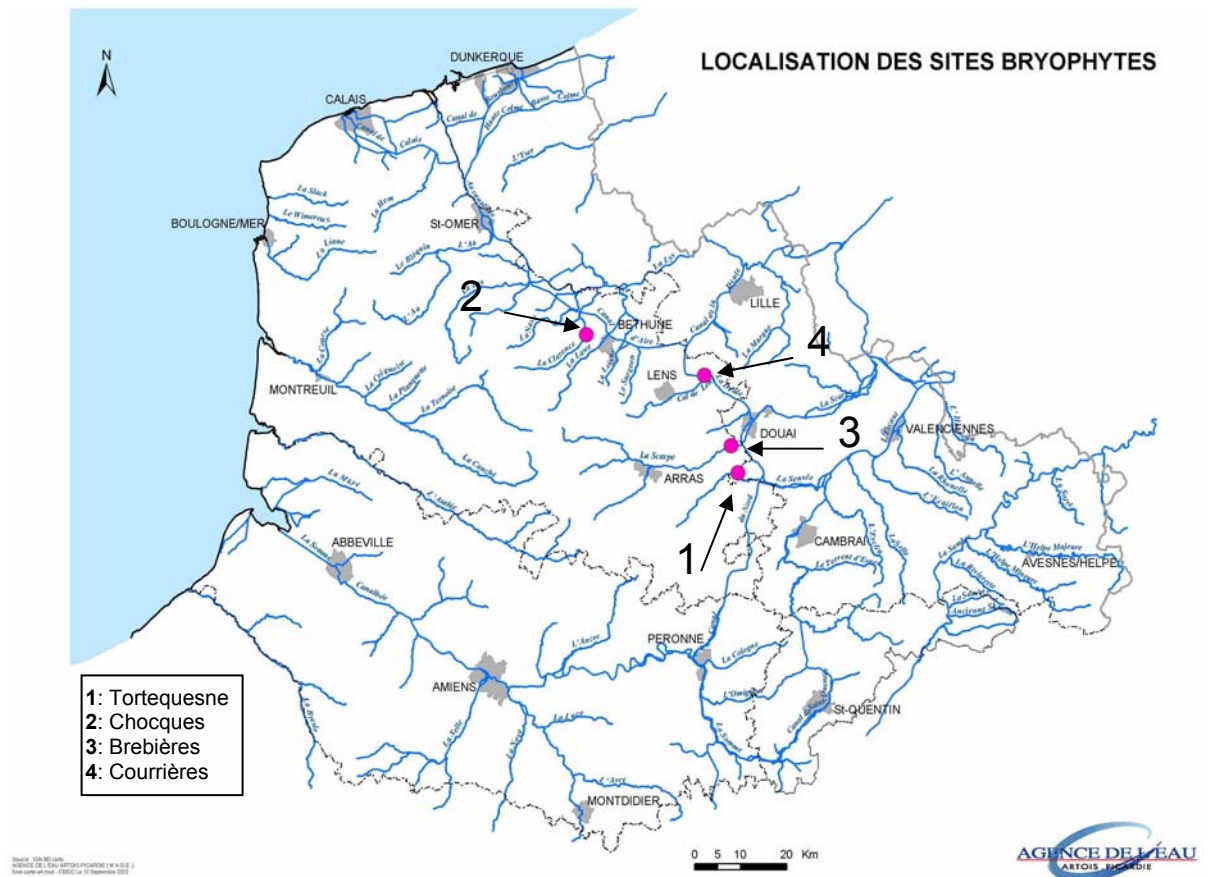


Figure 13 : Représentation géographique des sites d'étude (carte Agence de l'Eau Artois Picardie)

Ces sites ont été choisis en fonction de la qualité globale de l'eau. Ils correspondent à

- un site de référence (Tortequesne),
- deux sites de qualité intermédiaire (Chocques et Brebières),
- un site de qualité médiocre (Courrières).

III.1.1. Site de référence de Tortequesne

Point de surveillance Agence de l'Eau: n°045000

Appellation : La Marche navire

Rivière: la Sensée à Tortequesne

Département : 62

Cordonnées Lambert: X=650313 Y=1287646

Coordonnées GPS: Longitude= 3°02'33.4" Latitude=50°17'08.4"

Altitude : 83 m

Photographie : Annexe 2

Description : ce site est situé en retrait de la route à proximité d'habitations, les échantillons sont reliés à la rive par une corde attachée à un rondau de bois.

III.1.2. Site intermédiaire de Chocques

Point de surveillance Agence de l'Eau : n°069000

Appellation : La Clarence à Chocques

Rivière : La Clarence

Cordonnées Lambert : X=617412 Y=1316445

Coordonnées GPS : Longitude= 2°34'55.3" Latitude= 50°32'47.7"

Altitude : 68 m

Photographie : Annexe 2

Description : ce site est situé à coté d'une exploitation agricole et d'habitations, pour l'atteindre, un chemin non banalisé est utilisé. Les échantillons sont placés à proximité d'un pont qui limite leur visibilité aux yeux des passants.

III.1.3. Site intermédiaire de Brebières

Point de surveillance Agence de l'Eau : n°037000

Appellation : La Scarpe canalisée

Rivière : La Scarpe

Cordonnées Lambert: X=648779 Y=1293170

Coordonnées GPS: Longitude= 3°01'18.0" Latitude= 50°20'09.1"

Altitude : 46 m

Photographie : Annexe 2

Description : ce site est situé au niveau d'une écluse, les échantillons sont placés dans le déversoir de l'écluse. Pour les atteindre, il nécessaire de passer sur l'écluse, ce qui est formellement interdit aux riverains.

III.1.4. Site de qualité médiocre de Courrières

Point de surveillance Agence de l'Eau : n°078000

Appellation : La Deule canal à Courrières

Rivière : dérivation de la Scarpe + Deule

Cordonnées Lambert : X=642992 Y=1307917

Coordonnées GPS : Longitude= 2°56'30.0" Latitude= 50°28'08"

Altitude : 31 m

Photographie : Annexe 2

Description : ce site est situé sur un canal, en dessous d'un pont, dans une zone désaffectée. Comme le montre la photographie, ce canal est très emprunté par les péniches. Les échantillons sont reliés à la rive par plusieurs épaisseurs de fil de nylon, afin de rendre invisible les transplants.

III.2. Méthodologie et appareillage pour la mise en place des transplants

III.2.1. Calendrier de la surveillance

Sur chacun de ces sites, 3 cultures de mousses sont transplantées pendant cinq mois à partir du 6 mars 2003.

Pendant le premier mois de suivi, des échantillons de mousse sont prélevés toutes les deux semaines. Cette première étape (mars 2003) permet d'observer la capacité d'adaptation et la vitesse d'accumulation de la mousse cultivée.

Ensuite, ces échantillons seront prélevés au minimum une fois par mois d'avril à juillet. Cette deuxième étape permettra d'appréhender la faculté de résistance de l'organisme sur des sites anthropisés pendant une longue période et de suivre l'évolution de l'accumulation en polluants métalliques.

Des mesures de qualité des eaux (pH, conductivité, température, oxygène dissous) ainsi qu'un prélèvement d'eau seront effectuées à chaque visite des sites.

Un marqueur rouge (fil de couture) est placé à deux cm de l'apex sur un brin de mousse pour chaque transplant afin d'estimer la croissance de l'organisme au cours du suivi. Des observations visuelles de l'état des transplants seront réalisées.

III.2.2. Récolte des mousses

Les mousses sont prélevées de la chambre de culture la veille de la mise sur site. Elles sont maintenues avec du milieu de culture dans des sachets zippés, au frais (4 ± 2 °C) dans des glacières portables.

Avant mise sur site:

- Environ 15 g de poids frais de mousse sont prélevés avant leur transfert sur les différentes stations d'étude afin d'estimer les niveaux de base en ETM dans les transplants
- Des échantillons pour la mesure de l'indice de stress sont aussi prélevés, afin d'évaluer l'état physiologique de la mousse avant transplantation.

III.2.3. Les corbeilles d'exposition

Les mousses sont placées dans des paniers en grillage plastifié vert d'une maille 1 cm * 1 cm. Le grillage a été découpé puis ensuite relié avec du fil de nylon.

Les dimensions sont les suivantes L=25 cm, l=15 cm (Photographie en Annexe 2).

III.2.4. Technique de transfert

Dans chaque station, un échantillon de mousse (153 ± 52 g de poids frais de mousse) ainsi qu'un caillou ajouté comme lest sont introduits dans un panier d'exposition.

Pour des profondeurs inférieures à 50 cm, le dispositif est placé près du fond de la rivière dans une position qui assure un contact permanent avec l'eau.

Pour des profondeurs supérieures à 50 cm, la corbeille est placée à 20-30 cm sous la surface de façon à ce qu'elle puisse flotter librement dans l'eau (Claveri & Mersch, 1998).

Les corbeilles seront reliées à la rive à l'aide de cordes, ces dernières sont parfois reliées à plusieurs épaisseurs de fil de nylon quand le site est exposé à la vue des passants afin de dissimuler les transplants.

III.3. Prélèvement, conditionnement et traitement des échantillons

III.3.1. Echantillonnage

III.3.1.1. Prélèvement

Un échantillon d'environ 15 g de poids frais de mousse, estimé visuellement (quelques tiges), est prélevé pour l'analyse en ETM et du stress oxydant. Le prélèvement s'effectue en tirant délicatement sur quelques brins de mousse afin de les extraire de la touffe sans la détruire entièrement (Claveri & Mersch, 1998).

III.3.1.2. Lavage des échantillons in situ

Sur le terrain, les mousses sont lavées avec l'eau de la rivière afin d'en extraire au maximum des corps étrangers (invertébrés, sédiments, débris organiques, détritus). Pour cela, successivement plusieurs seaux d'eau sont utilisés, les mousses sont trempées et soigneusement agitées. Le lavage se poursuit jusqu'à ce que l'eau renouvelée soit claire.

III.3.1.3. Conditionnement et transport

L'échantillon nettoyé est placé dans un sachet zip et le transport des mousses s'effectue à l'état frais dans une glacière réfrigérée (4 ± 2 °C). Le temps de transport ne dépasse pas une demi-journée entre la fin du prélèvement et le retour au laboratoire.

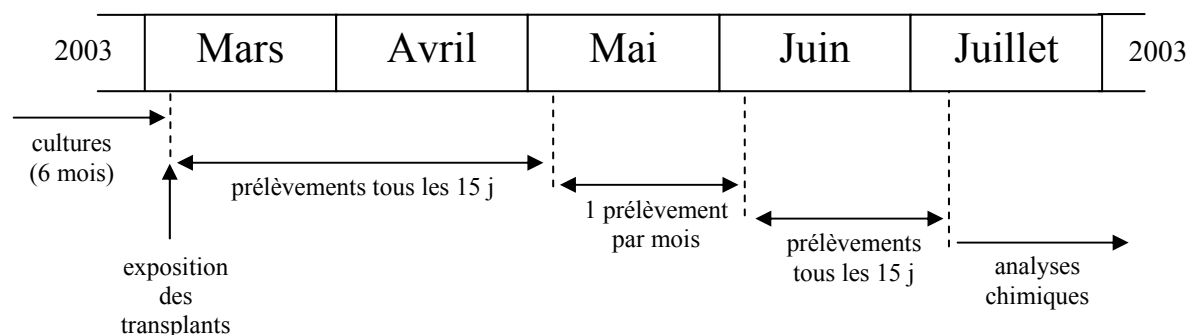
III.3.1.4. Traitement

Les échantillons prélevés sont traités selon le protocole décrit dans le Chap. 2. I.1.2.

III.3.2. Analyses physico-chimiques

Le pH, la quantité d'oxygène dissous, la température, et la conductivité de l'eau sont mesurés à l'aide de sondes de terrain (WTW).

III.3.3. Récapitulatif du calendrier d'exécution



IV. Traitements statistiques

Les analyses statistiques ont porté sur la variabilité de la biomasse produite et la significativité des courbes de croissance, sur les concentrations en éléments métalliques trouvées dans les mousses.

Les moyennes reportées dans ce rapport sont des moyennes arithmétiques.

La distribution normale des échantillons a été testée par le **test de Shapiro Wilk** ($n < 50$) (logiciel Origin.7 pour Windows) et l'homogénéité des variances a été testée par le test de **Fisher - Snedecor**. Pour les données suivant une loi normale et présentant des variances homogènes des tests paramétriques ont été utilisés.

Pour les comparaisons de moyennes, des **ANOVA** ont été réalisées (logiciel Statistica.6 pour Windows). Pour toutes les comparaisons des concentrations en éléments dans les mousses, des tests de corrélation (test de corrélation de Pearson et de Spearman) ont été effectués. Le niveau de signification adopté pour tous les tests est 0.05. Pour les échantillons ne décrivant pas une loi normale, des tests non paramétriques ont été utilisés.

Chapitre 3 : Résultats et discussion

Chapitre 3 Résultats et discussions

I. Expériences en laboratoire

I.1. Justification du choix de l'appareillage de culture

I.1.1. Etanchéité de la culture

Le choix du matériel de culture a été réalisé en tenant compte de plusieurs contraintes : des récipients au volume important (~10 L), des matières résistant à de nombreuses stérilisations en autoclave et transparentes pour laisser pénétrer la lumière dans les cultures, et surtout un appareillage complètement hermétique. Depuis un an, une seule contamination par micro- algues a été observée, malgré la proximité de la chambre de culture de l'équipe d'algologie ; ainsi on peut affirmer que ce montage respecte bien les conditions d'étanchéité souhaitées.

I.1.2. Influence du mode de culture sur la morphologie de l'organisme

Deux méthodologies de culture ont été testées (diffuseur d'air et agitateur magnétique). Ces deux méthodes ont mis en évidence, pour une même mousse, deux modes de développement différents estimés par des observations visuelles.

I.1.2.1. Appareillage avec diffuseur d'air

La mousse se développe rapidement, les tiges se ramifient, les feuilles sont généreuses (longueur > 4.6 mm), une faible production de rhizoïdes est observée. L'ensemble forme grossièrement une boule, qui occupe l'espace de la bonbonne. De plus, de nombreuses bulles d'air sont observées entre les feuilles, témoins des échanges gazeux, et de l'activité photosynthétique/ respiration de l'organisme.



Figure 14 : Photographie de la mousse en culture avec diffuseur d'air

I.1.2.2. Appareillage avec agitateur magnétique

Pour cette deuxième méthode consistant à faire subir à l'organisme un flux de 150 rpm, l'organisme croît en longueur, les tiges sont grêles, l'obtention de biomasse est faible, et la production de rhizoïdes est importante et semble être privilégiée. On peut supposer que la plante, soumise à un flux important, cherche à se fixer au détriment du développement des tiges et des feuilles. Ces rhizoïdes naissent à chaque début de ramification. De plus, le récipient utilisé permettant une agitation est en verre et fermé par un bouchon en coton cardé. Il n'est donc pas complètement étanche aux contaminations extérieures, même si aucune contamination n'a été observée à ce jour.



Figure 15 : Photographie de la mousse en culture avec agitateur

Ainsi, le mode de culture appliqué à l'organisme détermine sa morphologie. Notre objectif étant d'avoir des mousses destinées à être transplantées, une ramification en boule est la mieux adaptée pour la mise en corbeille.

Ainsi pour ces cultures la **méthode avec diffuseur d'air** est donc privilégiée.

I.2. Optimisation de la culture de *Fontinalis antipyretica*

L'objectif de cette partie est de déterminer les paramètres optimaux de culture, pour le développement et la croissance de la mousse *F. antipyretica*.

I.2.1. Détermination de la dilution optimale du milieu de culture Knop

I.2.1.1. Influence sur la croissance

La Figure 16 montre l'évolution de la croissance de 4 brins de *F. antipyretica* soumis des dilutions croissantes du milieu Knop (K, K/5, K/10 et K/20). Quelque soit le milieu de culture, on observe une croissance régulière des brins en fonction du temps.

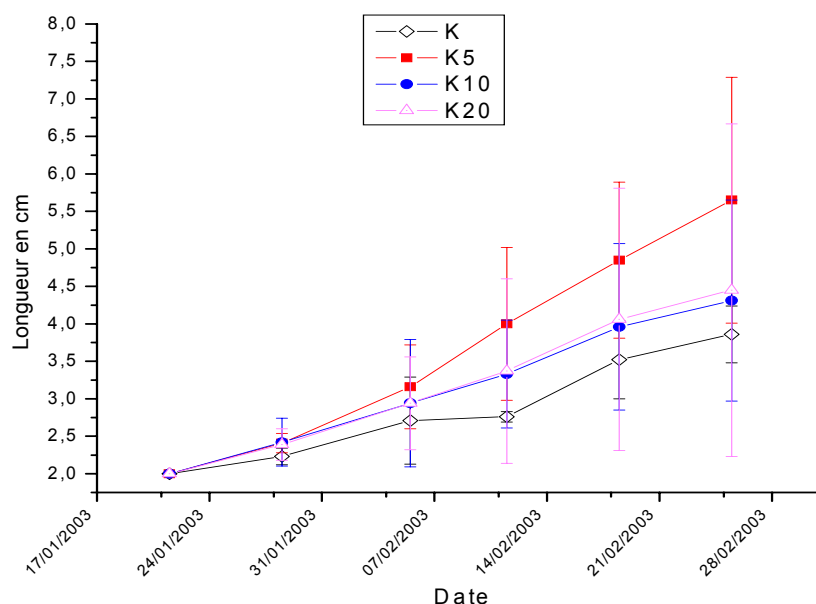


Figure 16 : Evolution de la croissance de la mousse *Fontinalis antipyretica* soumise à des dilutions différentes du milieu Knop : K, K/5, K/10, K/20 (Moy. $\pm$ ET, n=4)

Cette influence du temps et l'influence des différents milieux sur la croissance ont été testés par une ANOVA. Les résultats montrent un effet significatif ($p < 0,05$) de chacune de ces deux variables sur la croissance, sans effet couplé. Après avoir fait un test de comparaison de moyennes deux à deux (test-t), il apparaît que le couple K et K/5 est responsable de l'effet significatif du milieu sur la croissance. En effet, il apparaît que milieu K induit une croissance significativement plus faible que le milieu K/5. Peu de différences étant observées entre les milieux K/10 et K/20.

La croissance la plus forte observée est dans le milieu K/5, avec une longueur moyenne des brins à la fin de l'expérience de 5,65 ($\pm 1,64$) cm, soit une croissance de 3,65 cm en 6 semaines. Il semblerait donc que la croissance de l'organisme est influencée préférentiellement de cette manière $K < K/10 < K/20 < K/5$.

Par ailleurs, le pH a été suivi toutes les deux semaines dans les cultures, les valeurs sont reportées sur la Figure 17.

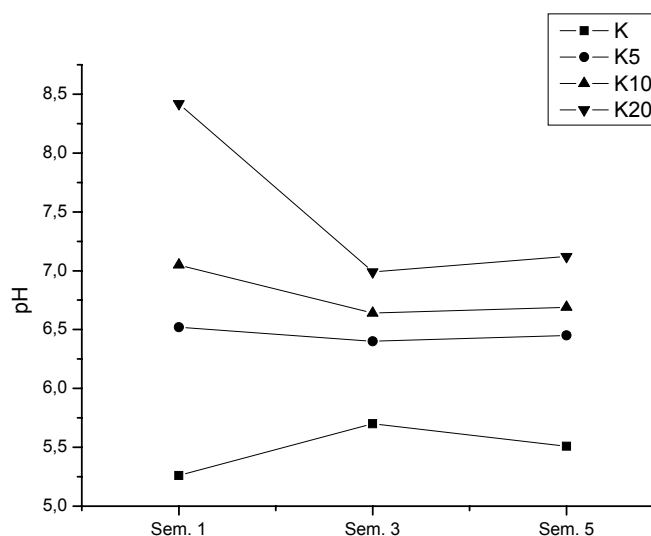


Figure 17 : Evolution du pH dans les milieux testés (K, K/5, K/10 et K/20) en fonction du temps

On remarque que dans chaque milieu testé, le pH tend à diminuer au cours de l'expérience pour les milieux K/10 et K/20. De plus les valeurs de pH sont croissantes selon le facteur de dilution du milieu Knop. Plus celui-ci est dilué, plus le pH est élevé. Il varie de 5.51 (acide) à 7.12 (neutre) de K à K/20. Le pH ne serait-il pas finalement le facteur déterminant pour la croissance de *F. antipyretica* qui influencerait davantage que la dilution du milieu Knop ? Aucune donnée de pH pour des cultures de *F. antipyretica* à notre connaissance n'est reportée dans la littérature.

Sur la Figure 16, on peut observer que les écart-types au départ faibles sur les valeurs moyennes augmentent avec le temps. Au départ de l'expérience les brins choisis sont exempts de ramifications. Dès la deuxième semaine d'observation, les premières ramifications commencent à apparaître, la multiplication et la croissance de ces dernières rendent la mesure des brins de plus en plus délicate. L'évolution comparée des taux de croissance obtenus pour le brin principal et les ramifications latérales dans chaque milieu testé est présentée en Figure 18.

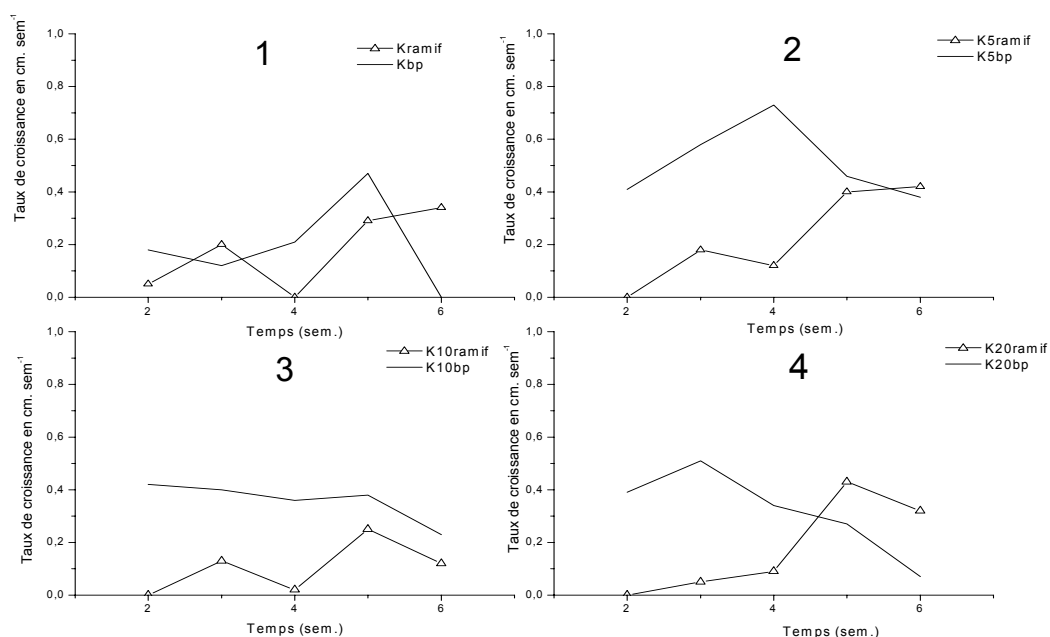


Figure 18 : Evolution comparée des taux de croissance moyens pour le brin principal (**bp**) et les ramifications latérales (**ramif**) dans les milieux testés K (**1**), K/5 (**2**), K/10 (**3**), K/20 (**4**) chez *F. antipyretica* (n=4)

On remarque que pour les milieux K et K/20, à la dernière semaine d'observation, la croissance du brin se fait préférentiellement par les ramifications voire exclusivement pour le milieu K. Mais au seuil $p < 0,05$, des tests de comparaison de moyennes n'ont pas montré de différences significatives pour le nombre de ramifications dans chaque milieu. L'augmentation des ramifications et la difficulté de la mesure, ne permettent pas de suivre la croissance au delà de 6 semaines. Le nombre de ramifications le plus élevé pour quatre brins observés se trouve dans le milieu K/5 (14 ramifications).

En conclusion, cette expérience montre que le milieu Knop dilué cinq fois influe positivement sur la croissance de *F. antipyretica* est le plus favorable pour la culture de cette mousse. A ce stade, le milieu de culture est composé de K*100 (20 mL.L⁻¹), NaHCO₃ à 5 g.L⁻¹ (20 mL.L⁻¹), et de la solution métaux 49 (100 µL.L⁻¹ de solution stock). Cependant des tests de comparaison de moyennes n'ont pas montré de différences significatives au seuil $p < 0.05$ pour le nombre total de ramifications obtenus dans chaque milieu testé.

I.2.2. Effet du CO₂ sur la croissance de la mousse en culture

I.2.2.1. Résultats et discussion

Le Tableau 26 montre qu'au bout d'une semaine le milieu où le CO₂ est injecté s'acidifie.

Tableau 26 : Données de pH dans le milieu avec ajout de CO₂ et dans le milieu témoin

Temps (sem.)	pH (Milieu avec CO ₂)	pH (Témoin)
Sem 1	6,76	6,76
Sem 2	4,70	6, 67
Sem 3	4,10	6,67

L'ajout de CO₂ dans les cultures a provoqué une acidification du milieu de culture, car celui en se dissolvant libère des ions H⁺ dans le milieu selon cette équation simplifiée :



NaHCO₃ généralement ajouté au milieu de culture n'a pas suffi à tamponner le milieu. Une fois de plus, la mousse *F. antipyretica* montre une certaine sensibilité à des pH faibles (*cf.* Chap. 3. I.2.).

Cette expérience n'a pu être réalisée à son terme car les brins de mousse sont morts en cours d'expérience : au bout d'une semaine d'expérimentation, les brins étaient décolorés (marron à transparent).

Ainsi l'impact du CO₂ sur la croissance n'a pu être estimé lors de cette expérience. Pour être reconduite, une expérience de ce type nécessiterait un appareillage plus sophistiqué, avec une mesure automatique régulière du pH, et si celui dépasse un seuil défini, une solution tampon serait directement injectée au milieu.

I.2.3. Estimation de la croissance

L'estimation de la croissance dans une culture a été réalisée avec la méthode déterminée au cours des expériences précédentes (appareillage, milieu de culture : K'/5, concentration en cuivre diminuée de moitié).

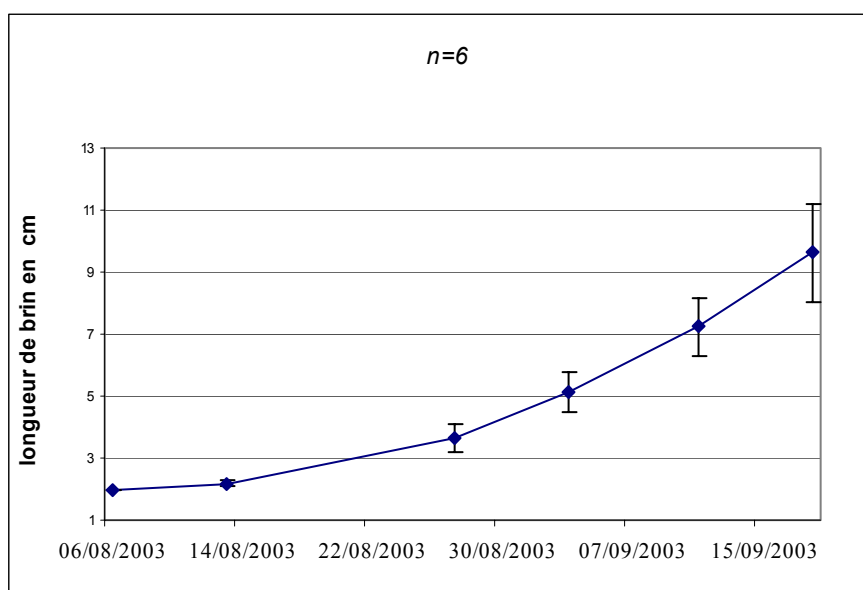


Figure 19 : Evolution de la croissance de *Fontinalis antipyretica* dans les conditions de culture, (Moy. $\pm$ ET)

Dans les conditions de culture déterminées, ce graphe montre que la croissance de *F. antipyretica* en culture est continue.

Tableau 27 : Données de croissance de *F. antipyretica* dans les conditions de culture

	Longueur de brin (cm)	Taux de croissance (cm/jr)
	Moy. $\pm$ EC	
06/08/2003	2 $\pm$ 0	0
13/08/2003	2,18 $\pm$ 0,1	0,03
27/08/2003	3,65 $\pm$ 0,47	0,11
03/09/2003	5,15 $\pm$ 0,64	0,21
11/09/2003	7,23 $\pm$ 0,92	0,26
18/09/2003	9,62 $\pm$ 1,59	0,34

La moyenne des taux de croissance obtenus au cours de ces six semaines est de **0.16** (0.03-0.34) cm.jr⁻¹ soit un taux de croissance moyen de **1.12 cm.sem⁻¹**.

Pour la culture initiée parallèlement dans les mêmes conditions, **6 mois** ont été nécessaires afin d'obtenir un transplant de mousse.

I.3. Evaluation des niveaux de base en ETM dans la mousse en culture

L'évaluation des niveaux de base dans la culture a été réalisée. L'objectif finalisé de cette culture étant son utilisation pour des études de biosurveillance active, il est primordial d'avoir des organismes contenant des niveaux de base en ETM les plus faibles possibles. Il est souhaitable que ces niveaux appartiennent à la gamme de référence (classe 1) donnée par les

agences de l'eau (cf. Tableau 10) de manière à obtenir une sensibilité maximum de l'outil mousse. Deux séries d'analyse :

- une première mesure des concentrations en éléments métalliques (**série 1**) dans les cultures a été réalisée en juin 2002, elle rend compte de la variation des concentrations métalliques dans les mousses dans les conditions de culture (cf. Tableau 28).

- une autre série de mesures des concentrations en éléments dans les cinq cultures (**série 2**), a été réalisée 4 mois après la première série, suite à un changement de milieu de culture (suppression de Cu) (cf. Tableau 30).

Tableau 28 : Concentrations en ETM chez *F. antipyretica* en culture pour la série 1, nd : donnée non disponible

ppm	FA6VBA(2)	FA6VBA(1)	FA6VB1	FA6VB2	FA6VB3	Moyenne	LD (Min-Max)	ET	Coef. de variation
V	0,46	1,14	0,95	2,27	1,56	1,21	(0,16-0,18)	0,68	57%
Cr	1,15	7,75	2,72	2,38	1,40	3,50	(1,64-1,77)	2,69	77%
Co	4,42	14,59	6,88	20,05	14,27	11,49	(0,03-0,04)	6,33	55%
Ni	3,00	8,10	3,12	3,38	2,57	4,40	(0,49-0,53)	2,29	52%
Cu	70	99,5	70,6	104,2	100,4	86,1	(0,8-0,9)	17,1	20%
Zn	70	124	206	228	217	157	(4,09-4,42)	69	44%
As	< 0,17	< 0,17	< 0,17	< 0,17	< 0,17	nd	nd	nd	nd
Cd	< 0,10	< 0,10	< 0,10	< 0,10	< 0,10	nd	nd	nd	nd
Sb	< 0,34	< 0,34	< 0,34	< 0,34	< 0,34	nd	nd	nd	nd
Pb	0,54	1,05	0,46	0,71	0,74	0,69	(0,20-0,22)	0,23	33%
Mn	80	231	130	268	267	177	(41-44)	86	48%
Fe	106	238	144	275	227	191	(0,60-0,62)	70,38	37%
Al	9	13	6	20	25	12	(19-20)	7,81	64%

Selon la grille d'interprétation des concentrations en ETM sur bryophytes des Agences de l'Eau (cf. Tableau 10), la gamme de référence (**classe 1, bleu**) rend compte de l'étendue des concentrations métalliques dans les mousses en cas d'absence de contamination métallique ; la gamme de sécurité (**classe 2, vert**) regroupe un ensemble de situations suspectes sans pouvoir affirmer qu'il s'agit d'une absence de contamination. La **classe 3 (jaune)** qualifie une pollution certaine. Cette grille est utilisée comme élément de comparaison, mais il faut tenir compte du fait qu'elle a été réalisée sur la base de mousses autochtones, il serait prématuré d'affirmer sa validité pour la mousse en culture.

Tableau 29 : Concentrations en Cr, Ni, Cu, Zn, As, Cd et Pb dans *F. antipyretica* pour la Série 1 (Moy. $\pm$ ET ; n=5), comparaison avec la grille de qualité des Agences de l'Eau

En ppm	Cr	Ni	Cu	Zn	As	Cd	Pb
Gamme de qualité	1,2 $\pm$ 0,5	4,4 $\pm$ 2,3	86,1 $\pm$ 17,1	157 $\pm$ 69	< 0,17	< 0,10	0,7 $\pm$ 0,2

On observe que les concentrations obtenues pour le Cr, Ni, Zn, Pb, As, Cd dans les mousses, sont inférieures à celles données par la limite inférieure de la classe 1 de la grille de qualité des Agences de l'eau (cf. Tableau 29). Ainsi, les concentrations de base mesurées dans les mousses en culture pour ces éléments sont représentatives d'un site considéré comme non contaminé en Cr, Ni, Zn, Pb, As, Cd. Par contre, la concentration mesurée pour le Cu dans les cultures se situe dans la classe 3, considérée par la grille de qualité comme une situation de pollution certaine. Ainsi il a été envisagé après cette première série de supprimer le cuivre dans les milieux de cultures de mousse.

Tableau 30 : Concentrations en en ETM chez *F. antipyretica* en culture pour la série 2, nd : donnée non disponible

ppm	FA6VBA(2)	FA6VBA(1)	FA6VB1	FA6VB2	FA6VB3	Moyenne	ET	LD (Min-Max)	Coef. de variation
V	0,77	2,05	0,35	1,26	0,93	1,11	0,64	(0,16-0,33)	58%
Cr	0,94	1,71	0,81	1,30	1,90	1,19	0,47	(1,62-3,27)	40%
Co	21,75	66,72	12,58	44,93	47,60	36,50	21,64	(0,03-0,07)	59%
Ni	4,79	6,72	2,47	5,30	5,93	4,82	1,61	(0,48-0,98)	33%
Cu	79,97	128,92	50,08	61,44	102,77	80,10	31,80	(0,81-1,64)	40%
Zn	222	392	130	334	321	270	104	(4-8)	38%
As	< 0,2	< 0,2	< 0,2	< 0,2	< 0,2	nd	nd	nd	nd
Cd	< 0,12	< 0,12	< 0,12	< 0,12	< 0,12	nd	nd	nd	nd
Sb	< 0,40	< 0,40	< 0,40	< 0,40	< 0,40	nd	nd	nd	nd
Pb	0,74	1,09	1,29	0,76	2,91	0,97	0,90	(0,20-0,41)	93%
Mn	113	298	90	292	219	198	97,6	(40-82)	49%
Fe	411,93	841,02	149,49	784,68	673,15	546,78	288,09	(0,57-1,15)	53%
Al	9	20	25	18	12	18	6	(19-38)	36%

Tableau 31 : Concentrations en Cr, Ni, Cu, Zn, As, Cd et Pb dans *F. antipyretica* pour la série 2 (Moy. $\pm$ ET ; n=5), comparaison avec la grille de qualité des Agences de l'Eau

En ppm	Cr	Ni	Cu	Zn	As	Cd	Pb
Gamme de qualité	3,5 $\pm$ 2,7	4,8 $\pm$ 1,6	80,1 $\pm$ 31,8	270 $\pm$ 104	< 0,2	< 0,12	0,97 $\pm$ 0,9

Après suppression du Cu dans les milieux de culture, une décoloration des parties apicales des mousses est observée, les apex prennent une couleur marron. Dans la littérature ces changements de couleur (vert à marron) reportés sont synonymes d'une carence en cuivre (Raven *et al.*, 2000).

De plus, on remarque que la concentration moyenne (n=5) est similaire entre les deux séries (~ 80 ppm). Cette dernière est toujours supérieure à la concentration de la gamme de référence Agence de l'eau. Il semblerait que la mousse retient le Cu dans ses tissus même après six mois suivant sa suppression dans le milieu de culture. Cependant il y a une forte

disparité entre les concentrations en Cu dans les cinq cultures observées (50,1-128,9 ppm ; coef. variation de 40 %).

Par ailleurs, on peut remarquer que la concentration moyenne en Zn (270 ppm) est supérieure à celle obtenue dans la série 1 et supérieure à celle donnée par la gamme de référence, sans qu'il n'y ait eu ajout de Zn dans les cultures. On note également une forte variabilité des concentrations en Zn entre les cinq échantillons (44 % pour la série 1 et 38 % série 2). De plus, il faut savoir que parmi tous les éléments analysés, les contaminations en zinc des échantillons au cours de leur traitement sont les plus probables, car beaucoup de matériel de laboratoire comporte du Zn. Une contamination en Zn n'est pas à exclure pour ces échantillons analysés en novembre 2002. Les contaminations en Zn sont souvent reportées dans l'analyse de traces, il est difficile de s'y soustraire, car cet élément intervient dans la composition de petits matériels de laboratoire couramment usités. Or l'analyse de l'échantillon certifié de référence indique une bonne précision (6% par rapport à la valeur certifiée) et une bonne reproductibilité (coef. de variation de 5 %, n=9) pour le Cu (cf. Tableau 18). Par contre, la précision est un peu plus faible pour le Zn (31 %).

En ce qui concerne la teneur en Cu, il a été alors décidé de rajouter du Cu dans le milieu de culture pour ne pas carencer l'organisme, mais de diminuer de moitié la concentration en cuivre conseillée et optimale pour *Fontinalis antipyretica* de la solution Hutner pour les cultures, mais pour el Zn, les concentrations conseillées ont été conservées.

Par ailleurs, les résultats indiquent des coefficients de variation importants pour des échantillons issus d'un même apex de mousse « mère » et cultivés dans les mêmes conditions (Tableau 28 et Tableau 30). importants sont observés. Il existe donc une variabilité intrinsèque dans l'accumulation des éléments chez la mousse *Fontinalis antipyretica* en culture.

Dans la littérature, de nombreux auteurs rapportent que les parties anciennes de mousses sont recouvertes d'oxydes de Fe et de Mn, ce qui provoque des phénomènes de co-précipitation, et d'adsorption d'autres métaux induisant une surestimation des résultats (cf. Chap.1 II.2). Dans notre cas, les mousses FA6VBA(1) et FA6VBA(2) ont le même âge et présentent pourtant les concentrations différentes en éléments. De plus, la comparaison de ces concentrations dans ces mousses avec celle des trois autres cultures plus âgées, ne montre pas non plus de différence marquée. L'âge de la culture ne semble pas être un facteur déterminant dans la teneur en éléments des tissus de la mousse.

Il serait intéressant d'évaluer la variabilité intrinsèque (au sein du même échantillon) et la variabilité temporelle (évolution des concentrations dans le temps) de la composition en éléments dans l'organisme.

I.4. Impact d'une contamination contrôlée de cadmium sur la mousse

I.4.1. Rappels des objectifs

Les objectifs de cette expérience sont multiples :

- Vérifier l'accumulation de la mousse dans des environnements très contaminés,
- Etudier la physiologie de l'organisme face à ces concentrations : activité photosynthétique, activité de désintoxication au niveau cellulaire (mécanismes de protection) par le stress oxydant, observer les modifications cellulaires,
- Evaluer le taux d'accumulation à saturation de Cd^{2+} sur la mousse *Fontinalis antipyretica* en culture,

I.4.2. Concentrations en cadmium dans les organismes

La Figure 20 montre l'évolution des concentrations en cadmium dans les mousses et dans l'eau pour les milieux A (témoin), B (3.8 ppm), C (18.5 ppm) et D (37 ppm).

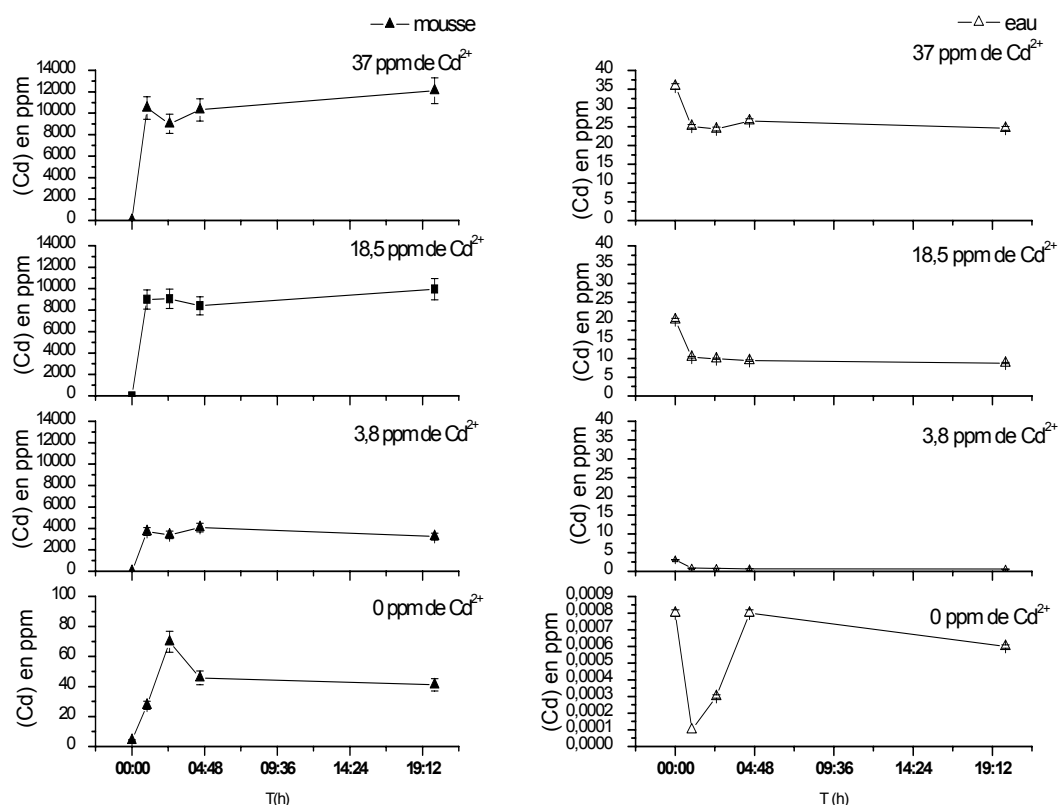


Figure 20 : Evolution des concentrations en cadmium chez *F. antipyretica* et dans les milieux A (témoin) B (3.8 ppm de Cd^{2+}), C (18.5 ppm de Cd^{2+}), D (37 ppm de Cd^{2+}) en fonction du temps

Dans le milieu témoin A, on remarque un enrichissement en Cd de l'eau (0.1-0.8 mg.L⁻¹), et qui est observable dans la mousse, par une accumulation en Cd (concentration de 0.004-0.10 µg.g⁻¹ de poids sec). Cette concentration dans le milieu A, même si elle est faible, (de l'ordre de quelques ppb), permet cependant une accumulation en Cd dans la mousse, dont le niveau de base initial est inférieur à la limite de détection. Cet apport externe de cadmium, pourrait être lié à la proximité des autres contenants fortement concentrés en Cd (non fermés). En effet, des projections liées à l'agitation des milieux ne sont pas à exclure.

Dans les milieux B, C et D, une rapide accumulation est observée et les valeurs maximales sont atteintes dès la première heure. Ces fortes concentrations se maintiennent pendant les 5 premières heures après l'introduction de l'organisme dans les milieux testés. Les concentrations en cadmium de la mousse sont fonction de la concentration en cadmium du milieu. Plus le milieu est concentré en cadmium, plus les valeurs retrouvées dans l'organisme sont élevées. A l'équilibre, les concentrations en métaux dans les mousses sont très élevées, de l'ordre de 12 110 µg.g⁻¹ pour le milieu D, et 9 960 µg.g⁻¹ pour le milieu C. Au bout de quelques heures (~5 h), les concentrations en Cd dans les mousses se stabilisent jusqu'à la fin de l'expérience (~19 h). Ainsi, l'accumulation dans les mousses est réalisée en un temps très court.

Dans le milieu, à l'inverse, on observe une diminution très rapide de la concentration en Cd dès la première heure, après introduction des végétaux. Le pourcentage de capture du Cd dans les mousses est calculé selon la formule suivante (Gjengedal & Steinnes, 1990) :

$$\% \text{ Capture de Cd} = ((c - c')/c) * 100$$

Avec

c : concentration initiale dans le milieu

c' : concentration après incubation aux différents temps de prélèvement

D'une certaine manière on peut estimer que la chute des concentrations de 72 % du cadmium initial contenu dans le milieu B, après 1 h d'incubation, est en majeure partie liée à l'introduction de la mousse dans le contenant et par conséquent à son accumulation dans l'organisme. La Figure 21 montre que cette accumulation du Cd dans la mousse après 1 h d'incubation est la plus importante dans le milieu B (72 %), puis le milieu C (50 %) et enfin le milieu D (30%).

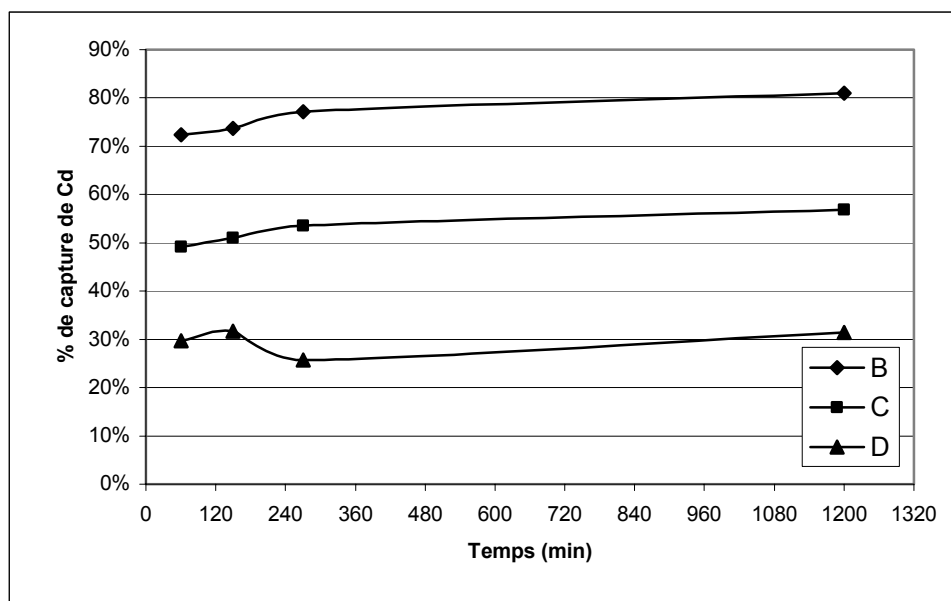


Figure 21 : Capture de métal dans *Fontinalis antipyretica* à partir de solutions contenant **B** (3.8 ppm de Cd^{2+}), **C** (18.5 ppm de Cd^{2+}), **D** (37 ppm de Cd^{2+}) en fonction du temps

Or les concentrations accumulées dans la mousse pour les milieux C et D sont les plus importantes, et sont comprises entre 8 000 et 12 000 $\mu\text{g.g}^{-1}$ (cf. Figure 22). On peut émettre l'hypothèse, que malgré une biodisponibilité du Cd dans ces milieux, le seuil de saturation en Cd de la mousse est atteint, l'ordre de grandeur est d'environ **10 000 $\mu\text{g.g}^{-1}$** en poids sec de mousse.

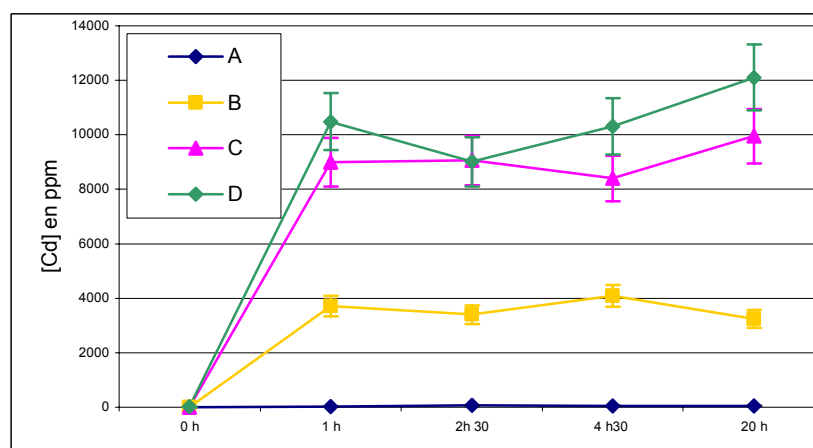


Figure 22 : Evolution des concentrations en Cd en fonction du temps chez *Fontinalis antipyretica* pour chaque concentration en $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ testée

En 2001, Carballeira et al., ont incubé pendant 30 h la mousse *F. antipyretica* récoltée dans un cours d'eau non contaminé avec une concentration de 100 $\mu\text{g.g}^{-1}$ de Cd^{2+} (Carballeira et al., 2001). Les concentrations de saturation retrouvées dans le compartiment extracellulaire pour deux solutions au pH de 6,86 et 7,23 sont égales à **11 240 $\mu\text{g.g}^{-1}$** . Cette valeur est du même ordre de grandeur que celle observée dans notre expérience pour la mousse *F.*

antipyretica en culture incubée avec des concentrations 2,5 à 5 fois moins élevée (cf. Figure 22). Ainsi, le seuil de saturation de la mousse en culture après une exposition à des concentrations élevées en cadmium (18,5 et 37 $\mu\text{g.g}^{-1}$) est comparable à celui d'une mousse récoltée en milieu naturel dans un site de référence. La mousse en culture semble donc posséder le même potentiel d'accumulation qu'une mousse issue de populations naturelles. De plus, Carballeira et al, (2001) ont montré que la plus grande quantité de Cd se trouve dans le compartiment extracellulaire. Ainsi, l'accumulation rapide et importante de Cd^{2+} observée et reportée pour *F. antipyretica* serait un **phénomène passif** lié à la fixation des ions Cd^{2+} sur les sites extracellulaires des parois.

Etant donné que nous avons observé une rapide accumulation dès la première heure d'incubation des mousses dans les milieux concentrés en cadmium, il serait intéressant de suivre la cinétique d'accumulation avec un pas de temps plus court (5- 15 min).

I.4.3. Facteurs de bioconcentration

Les facteurs de bioconcentration sont présentés en Figure 23 pour les quatre milieux A, B, C D. le facteur de bioconcentration (BCF) représente le coefficient de partage du cadmium entre la mousse et son milieu. Les valeurs des BCF sont reportées en Annexe 4.

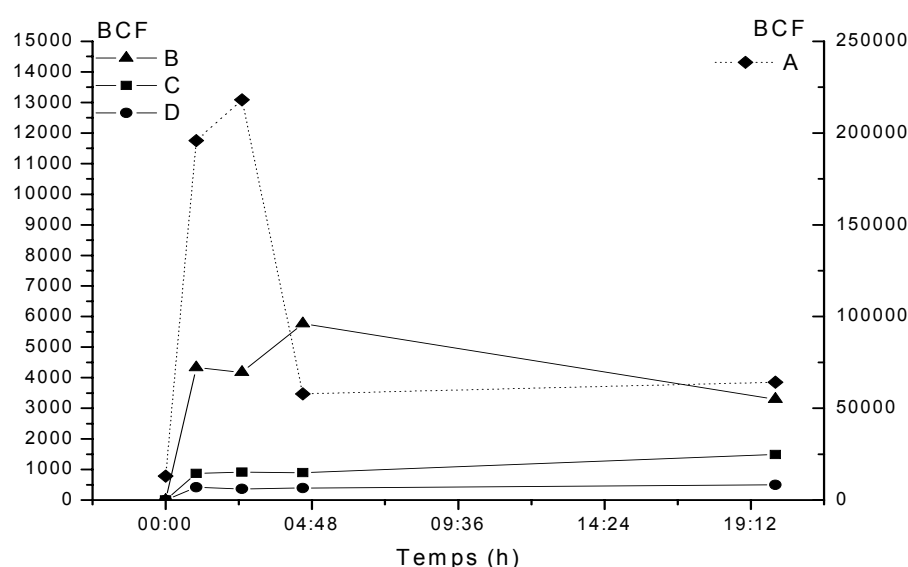


Figure 23 : Evolution des BCF au cours du temps pour les milieux **A** (témoin), **B** (3,8 ppm Cd^{2+}), **C** (18,5 ppm de Cd^{2+}), **D** (37 ppm Cd^{2+}) et la mousse *F. antipyretica*

Les BCF obtenus sont inversement proportionnels aux concentrations en cadmium du milieu. Les valeurs en BCF les plus élevées (13 063-218 000) sont observées dans le milieu A, qui contient des traces en Cd (0,0008-0,001 ppb). Ce fait confirme les observations de

chercheurs qui ont retrouvé des BCF 1000 fois plus élevé dans des milieux naturels de référence que dans des zones contaminées (Cf. Chap 1.II.2.1).

Cette expérience *in vitro* démontre donc l'aptitude de la mousse *F. antipyretica* qui possède l'aptitude d'accumuler le cadmium, même lorsque celui-ci se trouve à l'état de traces dans le milieu et qui sont donc difficilement détectable dans l'eau par des analyses en routine.

∞ Mesure du stress écophysologique D665/D665a

Le Tableau 32 représente l'évolution de l'indice D665/D665a dans les milieux A, B, C et D au cours du temps. Les valeurs moyennes de cadmium ne sont pas significativement différentes (test-t, $p < 0.05$). Les valeurs obtenues sont inférieures à la valeur considérée comme stressée de Lopez & Carballeira (1989). Ainsi aucun impact significatif des différentes concentrations en Cd n'est observé sur l'organisme.

Tableau 32 : Données portant sur la mesure de l'indice de stress au cours de la contamination au cadmium avec : témoin **A** (0 ppm de Cd^{2+}), **B** (3.8 ppm de Cd^{2+}), **C** (18.5 ppm de Cd^{2+}), **D** (37 ppm de Cd^{2+})

	n=3	0 h	1 h	2 h 30	4 h30	20 h
A	Moyenne	1,50	1,52	1,40	1,47	1,46
	EC	0,03	0,02	0,08	0,03	0,05
	Coef.var.	2%	1%	6%	2%	3%
B	Moyenne	1,25	1,38	1,42	1,50	1,51
	EC	0,20	0,23	0,08	0,04	0,03
	Coef.var.	16%	17%	5%	3%	2%
C	Moyenne	1,49	1,49	1,42	1,52	1,47
	EC	0,07	0,04	0,23	0,02	0,07
	Coef.var.	5%	2%	16%	1%	5%
D	Moyenne	1,54	1,53	1,54	1,46	1,49
	EC	0,02	0,03	0,03	0,08	0,01
	Coef.var.	1%	2%	2%	6%	1%

Les coefficients de variation obtenus sont assez faibles ($n=3$), les 5 brins de mousses pris au hasard sont donc représentatifs d'une bonne homogénéité de l'échantillonnage. Cependant dans la littérature il est reporté que les métaux toxiques influent sur la concentration en pigments chlorophylliens (Stobart *et al.*, 1985 ; Wong & Chang, 1991), or ce n'est pas le cas dans notre expérience. Pour confirmer ces observations, une dernière mesure de l'indice D665/D665a a été réalisée au bout de 216 h (2^{ème} graphe cf. Figure 24) soit 9 jours après le début de l'expérience. Les indices de stress obtenus pour les différents milieux sont très proches ($1,51 \pm 0,03$), et varient peu entre 20 h et 216 h indiquant le rapport D665/D665a est stable (cf. Figure 24). Or l'observation visuelle des organismes a montré que dans les milieux D et C, les organismes étaient fortement affectés par le cadmium (décoloration), ce qui n'apparaît pas avec les résultats de l'indice de stress. Cet indice semble donc peu

approprié pour des environnements très contaminés. Les résultats obtenus montrent que le cadmium n'aurait pas d'impact sur le processus transformation de la chlorophylle a en phéophytine a, mais cet élément toxique est stressant pour l'organisme, comme le montrent les observations visuelles. Quoiqu'il en soit, l'utilisation de tout indice de stress, doit être fait en réalisant au préalable une observation visuelle de l'organisme.

Il est possible que l'effet du Cd sur l'organisme soit davantage observé par le biais de l'activité des enzymes anti-oxydantes. Pour le vérifier, les échantillons ont été prélevés pour la mesure du stress oxydant, mais les résultats seront interprétés ultérieurement.

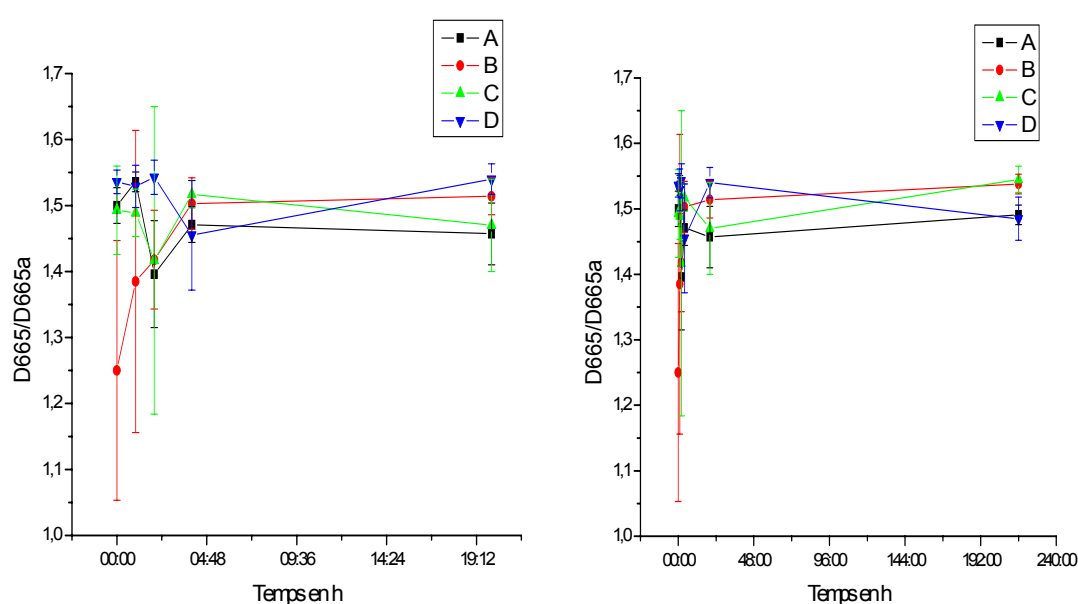


Figure 24: Evolution de l'indice de stress en fonction du temps chez *Fontinalis antipyretica* soumise à différentes concentrations de cadmium **A** (0 ppm de Cd²⁺), **B** (3.8 ppm de Cd²⁺), **C** (18.5 ppm de Cd²⁺), **D** (37 ppm de Cd²⁺)

⌘ Observations macroscopiques et microscopiques

Observation visuelle des mousses :

L'observation visuelle des mousses a été réalisée au cours de l'expérience. Pour les milieux A et B les mousses restent de couleurs vertes, il n'y a pas d'effets visibles au bout de 9 jours après le début de l'incubation. Dans les milieux les plus concentrés, une décoloration graduelle de l'organisme est observée au fil des jours. Cette décoloration est notamment visible au niveau des feuilles, de l'apex à la tige : des tiges apicales de la touffe de mousse (milieu C), et des tiges entières (milieu D). La couleur des tiges affectées est rouge transparente.

Cette perte de coloration verte, synonyme de perte de chlorophylle, est un symptôme de l'effet toxique des métaux généralement observé (Pandey & Sharma, 2002). L'observation visuelle, montre que les bryophytes des milieux C et D sont pratiquement mortes, bien que les résultats de l'indice de stress n'indiquent pas de différence entre les différents milieux.

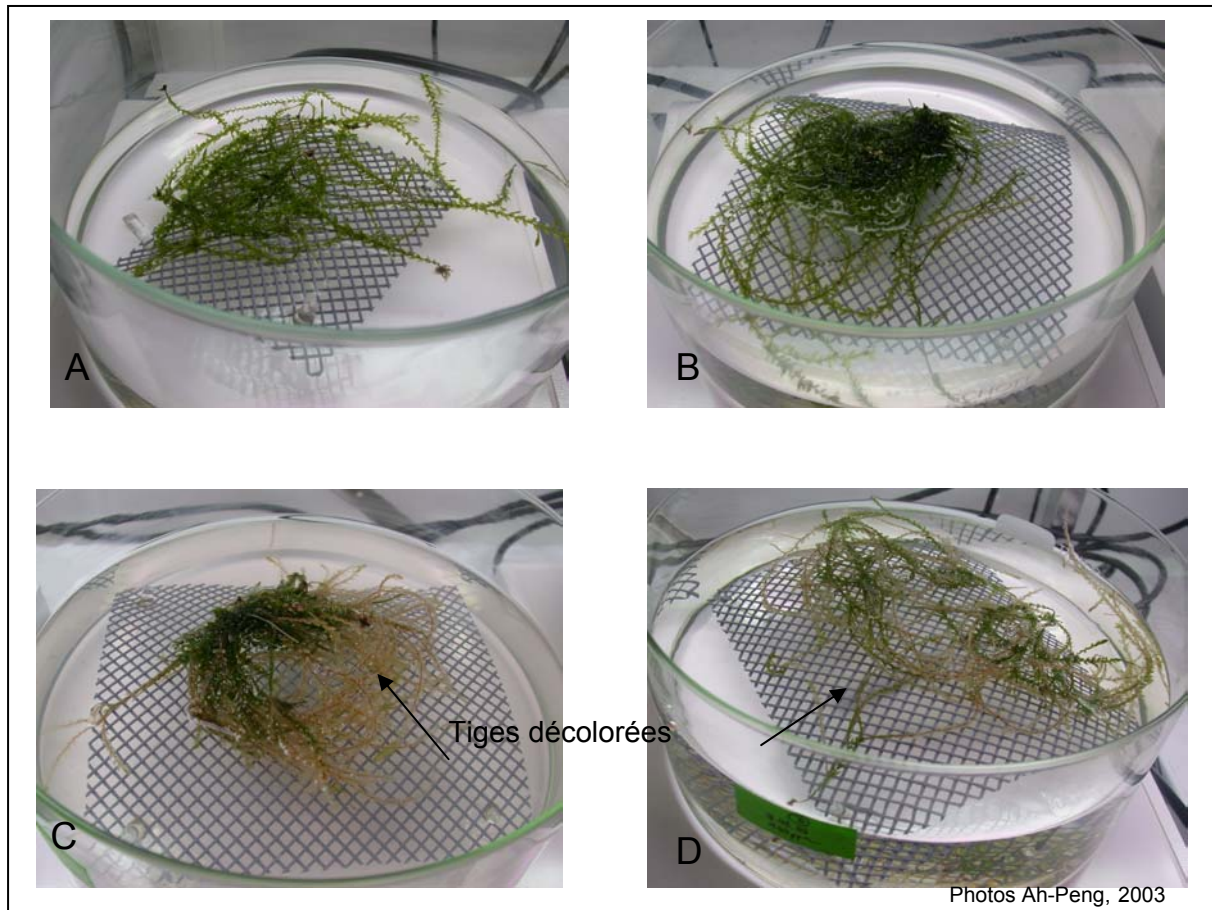


Figure 25: Photographie des mousses une semaine après le début de l'expérience de contamination au cadmium, 0 ppm (A), 3,8 ppm Cd^{2+} (B), 18,5 ppm Cd^{2+} (C) et 37 ppm Cd^{2+} (D)

Observation des cellules de l'organisme :

L'observation de cinq feuilles issues de tiges apicales de *F. antipyretica* dans les quatre milieux testés, montre, une séquence de dégradation cellulaire particulièrement pour les milieux C et D.

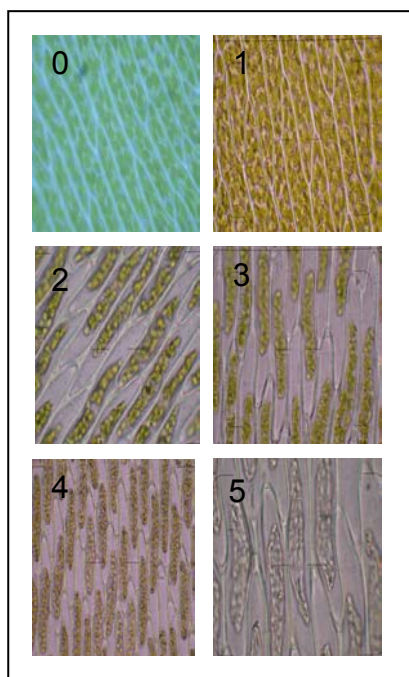


Figure 26 : Photographie illustrant la séquence de dégradation cellulaire de *F. antipyretica* soumise à 37 ppm de Cd, 0 h (0), 1 h (1), 2 h30 (2), 4 h30 (3), 20 h (4), 216 h (5)

- au début de l'expérience, les cellules sont de couleur verte, les chloroplastes sont nombreux, au contour bien défini, de forme lenticulaire. Ils occupent tout l'espace de la cellule,
- dès la première heure d'incubation avec les solutions concentrées en Cd^{2+} , des altérations sont observées, la forme des chloroplastes reste lenticulaire, mais leur contour n'est plus distinct.
- après 2 h30 d'incubation, les cellules sont endommagées, une masse fibrillaire foncée apparaît, elle se situe au centre de la cellule et occupe tout l'espace de la vacuole. La distinction entre les chloroplastes et ce corps central, n'est plus possible. Les feuilles sont de couleur vert -jaune. Certaines cellules sont plasmolysées, elles sont inégalement réparties sur les feuilles. A ce stade, les cellules donnent l'apparence d'une mosaïque aux feuilles de mousse.
- après 4 h30, est plus compact, la masse fibrillaire semble plus compacte, la couleur du corps central s'atténue
- après 20 h d'incubation, les cellules sont de plus en plus de transparentes, elles ont perdu leur couleur verte
- après 216 h, les cellules sont hyalines : elles sont mortes. Les feuilles et les tiges prennent une coloration rouge transparente.

Cette séquence de dégradation observée est rapide de l'ordre de quelques heures, ce qui montre le pouvoir toxique du cadmium au niveau cellulaire. Elle a été observée aussi pour *F. hypnoides* Hartm. (Gimeno & Pusche, 1999).

Il serait intéressant, dans le cadre d'une autre expérience de ce type, de quantifier le pourcentage de dommages cellulaires pour chaque feuille par une méthode de comptage en microscopie photonique, qui n'a pu être réalisé ici en raison du manque de matériel adéquat (lame spécifique). De plus, des observations en microscopie électronique à balayage pourrait aussi apporter des informations complémentaires, notamment au niveau des processus d'adsorption des ions Cd^{2+} sur les parois végétales.

I.4.4. Conclusions

- (1) : La mousse aquatique *F. antipyretica* en culture accumule de grandes concentrations en Cd.
- (2) L'accumulation est rapide, elle est effectuée dès la première heure d'incubation.
- (3) Plus les concentrations initiales sont élevées plus l'accumulation dans la mousse est importante.
- (4) La plus grande quantité de Cd accumulée (70 % de la concentration initiale du milieu) a été observée dans le milieu B (18,5 ppm).
- (5) La concentration de saturation en Cd^{2+} est élevée pour cette mousse en culture ($\sim 10\,000\ \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$).
- (6) Des effets visibles de l'effet du cadmium ont été observés sur les mousses, comme la perte de la coloration verte. De plus, au niveau cellulaire, des modifications, comme la modification de la forme, puis la disparition des chloroplastes dans la vacuole ont été observées.
- (7) L'indice de stress est peu valable pour estimer l'état de santé de l'organisme dans des environnement très contaminés (18.5 et 37 ppm de Cd).

I.5. Contrôle de l'état physiologique de la mousse en culture en utilisant l'indice de stress D665/D665a: impact de deux facteurs environnementaux

I.5.1. Rappels des objectifs

Cette expérience a été menée afin de tester l'indice de stress D665/D665a, comme indicateur de l'état de santé de l'organisme. Plusieurs aspects ont été analysés. Premièrement un suivi de l'indice de stress a été réalisé dans une culture une fois toutes les deux semaines

pendant 3 mois. Deuxièmement, deux paramètres environnementaux (température et luminosité) ont été testés sur *F. antipyretica* en culture.

I.5.2. Suivi de l'état physiologique d'une culture

La Figure 27 montre l'évolution de l'indice de stress dans une culture au cours du temps entre mai et juillet 2003. On observe que les valeurs moyennes de stress sont situées entre 1,55 et 1,61, bien qu'aucun changement des conditions de culture n'ait été appliqué. On remarque une augmentation significative (test-t pour échantillons appariés, $p < 0,05$) de l'indice au cours du temps, signe d'une amélioration de l'état de santé de l'organisme au cours du temps. Plus l'indice de stress est élevé, plus la quantité de chlorophylle a est importante par rapport à la quantité de phéophytine a, son produit de dégradation. Nous considérons alors, que la production de chlorophylle est synonyme d'activité photosynthétique par conséquent d'un bon état de santé du végétal. Selon la grille de qualité proposée par López & Carballeira (1989), pour les valeurs comprises entre 1,55 et 1,60, les mousses en culture se situent dans la gamme « stress intermédiaire ».

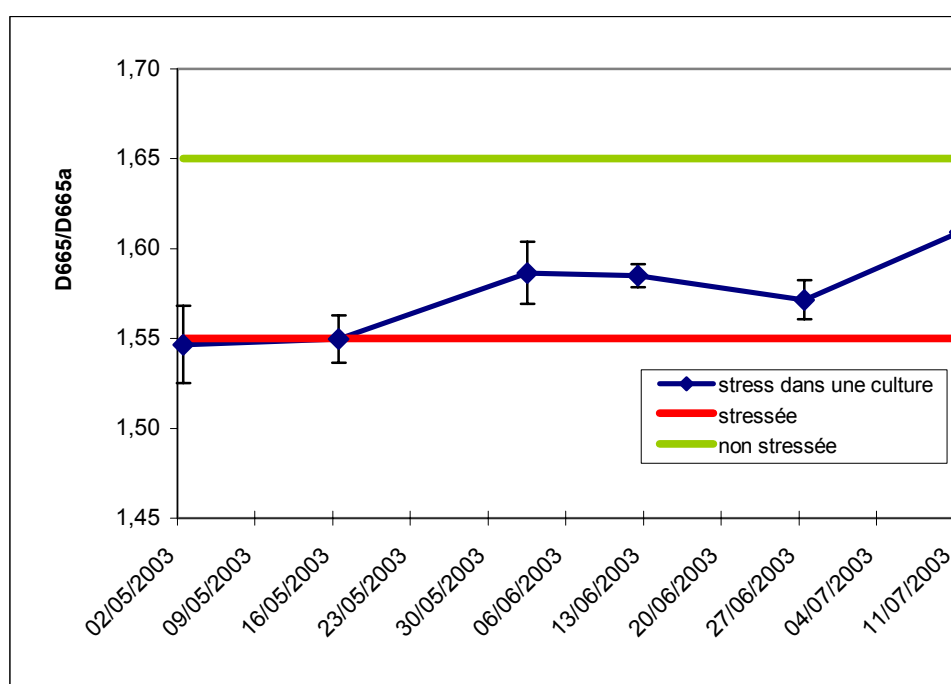


Figure 27 : Evolution de l'indice D665/D665a dans une culture en fonction du temps (Moy. ± ET ; n=5), Donnée Stressée et non stressée de López & Carballeira (1989)

Cet état de stress intermédiaire semble surprenant car les conditions appliquées sont considérées comme optimales à son développement. Ainsi, on peut émettre l'hypothèse que cette grille de qualité déterminée par López & Carballeira (1989) ne serait plus adaptée à l'organisme en culture. Il a alors été envisagé d'observer l'impact de deux facteurs environnementaux, la température et la lumière pouvant induire un stress sur l'organisme.

I.5.3. Influence du conditionnement des mousses en sacs plastique

L'impact du conditionnement (sac en plastique zippé) a été testé, et les résultats obtenus sont reportés dans le Tableau 33. Le conditionnement semble favoriser l'augmentation de l'indice de stress (de 1.47 à 1.57) et donc favoriser l'amélioration de l'état de santé de l'organisme. Ceci peut être dû à une meilleure homogénéité de l'échantillon vis-à-vis de la lumière. En effet, les sacs sont disposés à plat, permettant ainsi une pénétration de la lumière plus forte et identique sur l'ensemble de l'échantillon. Par ailleurs, la quantité des échantillons est plus faible (m~30 g poids frais) en comparaison aux organismes en culture (m~200 g poids frais). Dans les conditions de culture (organismes placés dans des contenants de 10 L) les tiges de mousses situées en périphérie de la touffe peuvent créer un barrage à la lumière pour les tiges composant le faisceau axial de l'organisme. De plus, Glime reporte que des conditions d'humidité saturante sont optimales pour le développement de cette mousse (Glime & Vitt, 1984).

La vaporisation des échantillons par du milieu de culture a été également testée (cf. Tableau 33). Cette vaporisation de milieu de culture dans les sacs n'influence pas l'indice. Ainsi ce mode de conditionnement est gardé pour la suite des expériences.

Tableau 33 : Indices de stress obtenus pour l'influence du conditionnement sur *F. antipyretica*

Temps écoulé	Conditions expérimentales	D665/D665a, n=5	ET	Coef. Var.
0	Avant conditionnement, (n=5)	1,47	0,019	1%
1 semaine	Après 1 semaine en sac zip (n=5)	1,57	0,022	1%
1 semaine + 1 jour	Conditionnement + vaporisation (n=3)	1,59	0,007	0%
	Conditionnement sans vaporisation, (n=2)	1,59	0,01	1%

I.5.4. Influence d'une température de 50°C sur le stress

Tableau 34 : Cinétiques de l'indice de stress de *F. antipyretica* soumise à une température de 50 °C pendant 300 min

Temps (min)	D665/D665a n=5	ET	Coef. Var.
0	1,61	0,01	1%
15	1,59	0,02	1%
30	1,59	0,01	0%
60	1,57	0,01	1%
120	1,37	0,05	3%
300	1,11	0,04	4%

La Figure 28 montre que le rapport D665/D665a stable pendant la première heure, diminue ensuite au cours du temps d'incubation à 50 °C. L'état de santé de la mousse semble être négativement influencé par une température de 50 °C. Au bout de 5 h le rapport D665/D665a est proche de 1. Cette diminution est représentée sur la Figure 29, avec les valeurs stressées et non stressées de López & Carballeira (1989), ainsi que la courbe de température de la mousse. L'expérience indique que la température de la mousse atteint 50 °C dès les 15 premières minutes.

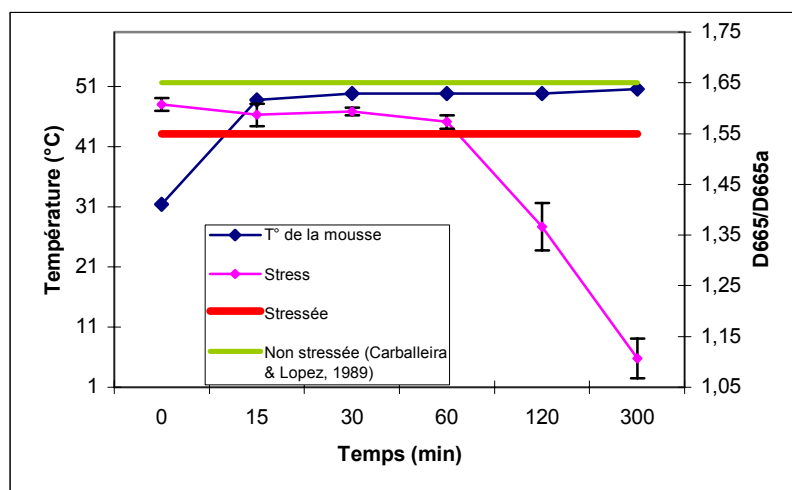


Figure 28 : Evolution de l'indice de stress chez *Fontinalis antipyretica* soumise à une température de 50 °C

De plus l'observation visuelle des mousses a montré que les brins étaient incolores à la fin de l'expérience, signes de leur morbidité. Ainsi une température prolongée (5 h) de 50 °C provoque la mort de l'organisme. *F. antipyretica* semble donc être très sensible à une température de 50 °C.

I.5.5. Influence d'une forte luminosité

Tableau 35 : Cinétique de l'indice de stress de *F. antipyretica* soumise à une luminosité de 100 $\mu\text{mol. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ pendant 288 min

Temps	D665/D665a (Moy., n=8)	ET	Coef. Var.
0	1,57	0,01	1%
15	1,57	0,03	1%
30	1,57	0,01	1%
70	1,56	0,02	1%
130	1,54	0,07	1%
200	1,57	0,16	3%
288	1,57	0,02	1%

Des variations au cours du temps de l'indice de stress moyen sont observées mais on ne peut pas conclure à un impact significatif d'une forte luminosité sur l'organisme sur l'organisme en culture (test de Wilcoxon, $p < 0,05$). Selon la grille de qualité, de López & Carballeira (1989), la mousse est considérée comme stressée à intermédiaire stressée.

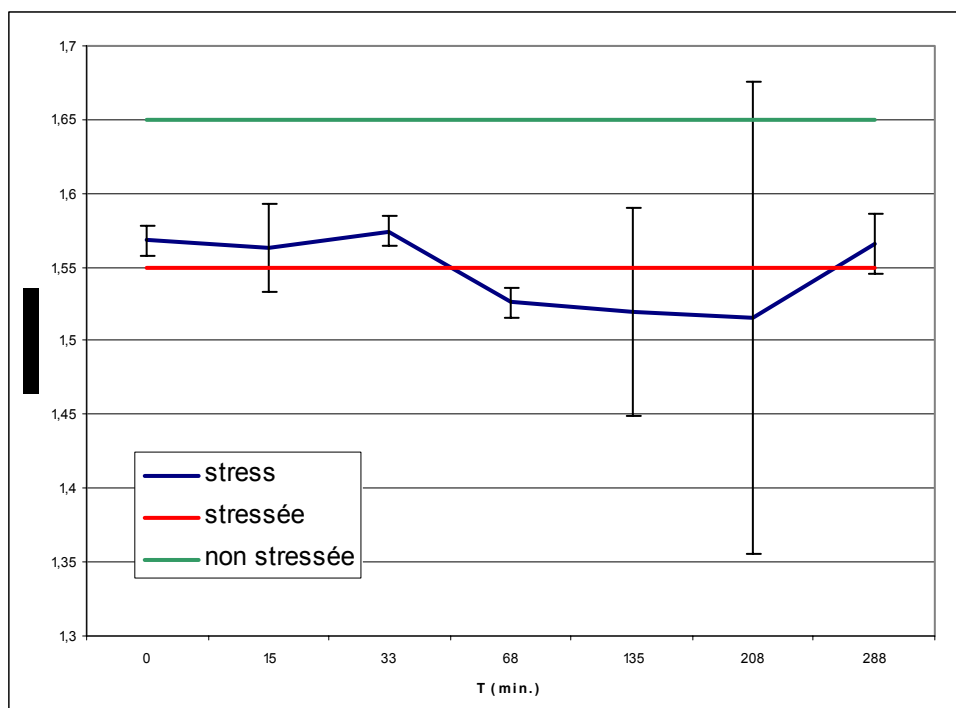


Figure 29 : Evolution de l'indice de stress chez *Fontinalis antipyretica* soumise à une luminosité de $100 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$

L'observation visuelle des mousses montre que les brins restent vert à la fin de l'expérience et semblent être en bonne santé (pas de signe de chlorose). Ces observations confirment que la mousse *F. antipyretica* en culture ne semble pas être affectée par une luminosité de $100 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

I.5.5.1. Conclusions

- (1) Un conditionnement en sac zippé n'a pas d'effet stressant sur *F. antipyretica*, cela semble même améliorer son état de santé. Ainsi, ce conditionnement sera utilisé pour le transport des échantillons sur les sites d'études.
- (2) Une température de 50°C a une influence négative sur *F. antipyretica*
- (3) Une luminosité de $100 \mu\text{mol. m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ n'a pas d'influence sur *F. antipyretica*
- (4) La grille de López & Carballeira (1989) ne semble pas être adaptée à la mousse en culture. Dans des conditions optimales de croissance et de développement, les valeurs obtenues sont situées dans la gamme stressée à intermédiaire stressée,

ainsi, la valeur de la borne inférieure semble trop basse (1.55). Il faudrait réajuster cette grille pour l'organisme en culture ou en tenir compte dans l'interprétation des indices de stress observés sur les sites d'études.

I.6. Discussion sur le mode actuel de culture

I.6.1. Cycle de culture

L'observation visuelle des cultures a mis en évidence que, lorsque l'organisme est en petite quantité dans une bonbonne, la croissance de la mousse *F. antipyrretica* était plus importante que lorsque l'organisme est déjà abondant. La mousse se comporte comme si elle cherchait à conquérir l'espace de la bonbonne : on remarque alors de nombreuses nouvelles pousses vert clair, des bulles entre les feuilles signes d'activité photosynthétique intense. Au contraire lorsque la mousse abonde dans le contenant, les pousses nouvelles sont plus rares, la mousse forme une touffe épaisse, laissant difficilement pénétrer la lumière en son centre. Ce qui peut être un paramètre limitant à son développement. C'est pour cela qu'il est préférable non seulement de diviser les mousses régulièrement et de les mettre dans des nouveaux milieux de culture neufs à cette occasion, mais aussi, de tailler les parties apicales. Cette taille de quelques cm semble améliorer la croissance de l'organisme et provoquer la ramification des tiges, donnant à l'organisme un aspect « boule ». Cet aspect « boule », semble plus adapté à la transplantation pour la mise en cage de transfert plutôt qu'une forme allongée. Les tiges apicales coupées sont récupérées et sont placées en chambre de culture pour le repiquage des mousses lors de nouvelles séries de mise en culture.

I.6.2. Culture en bio- réacteur ?

Dans le mode actuel de culture, des bonbonnes pouvant contenir 10 L de milieu sont utilisées. Des cultures dans des volumes plus importants comme en bio- réacteur par exemple, permettraient d'obtenir de la biomasse plus rapidement en offrant plus d'espace, mais les contaminations seraient moins facilement gérables. Ainsi notre mode de culture unitaire (V=10 L) permet actuellement de garder une culture monoclonale et monospécifique et de gérer sur du long terme la prolifération d'organismes. Il nous semble donc le plus adéquat même pour une culture en masse.

II. Expérimentation in situ : suivi de la contamination métallique des cours d'eau en utilisant la mousse en culture

II.1. Rappels des objectifs

Après un an de culture, 12 transplants ont été obtenus. Ces mousses ont été transplantées sur quatre sites situés dans le Nord-Pas-de-Calais, pendant au minimum deux mois. Deux fois par mois un échantillonnage sur ces sites a été effectué pour mesurer la concentration en certains éléments métalliques de la mousse et l'état physiologique de l'organisme.

Les objectifs de cette expérimentation sont multiples :

- Utiliser pour la première fois en France d'une mousse en culture comme bioindicateur de qualité des eaux
- Etudier la résistance de la mousse cultivée sur des sites naturels anthropisés
- Utiliser de la méthode de stress pour évaluer l'état de santé de l'organisme.
- Suivre la contamination des éléments métalliques suivants : Co, V, As, Pb, Cd, Cr, Al, Cu, Zn, Mn, Fe, Sb et Ni.
- Etudier les variations en éléments dans la mousse et dans l'eau
- Evaluer la capacité de cette mousse cultivée en tant qu'un bioindicateur.

II.2. Obtention de transplants

12 transplants ont été obtenus pour cette étude *in situ*.

Tableau 36 : Références des transplants et masses associées

Culture	Masse (en g poids frais)	Culture	Masse (en g poids frais)
FA6VB3(1,1)	149,5	FA6VB2(2,1)	59,8
FA6VB3(3,2)	193,9	FA6VB3(4,2)	99,8
FA6VB3(1,2)	245,5	FA6VB2(5,2)	178,5
FA6VB2(2,2)	79,3	FA6VB2(5,1)	130,5
FA6VBA	164,1	FA6VB3(5,2)	172,8
FA6VB3(3,1)	207,6	FA6VB3(5,1)	146

On observe une variabilité élevée en poids frais de mousse entre les différents transplants ($152 \pm 52,9$ g poids frais).

II.3. Concentrations initiales en ETM dans les transplants

Les concentrations en éléments ont été mesurées dans les transplants, l'échantillonnage a été effectué sur le site avant leur installation. Les résultats obtenus montrent que les mousses ne contiennent pas, ou en quantité de traces, les éléments suivants : V, Cr, Ni, As, Cd, Sb, Pb (*cf.* Figure 30). Par comparaison avec les données de concentration repère des Agences de l'eau (*cf.* Tableau 11), les concentrations pour l'As, Cd, Cr, Cu, Ni, Pb, Zn obtenues sont en dessous des concentrations de référence. Le Mn, Fe et Co sont des éléments essentiels pour l'organisme, les concentrations retrouvées sont inférieures à 10 ppm.

Ainsi, cette mousse en culture peut être considérée comme un organisme issu d'un site de référence.

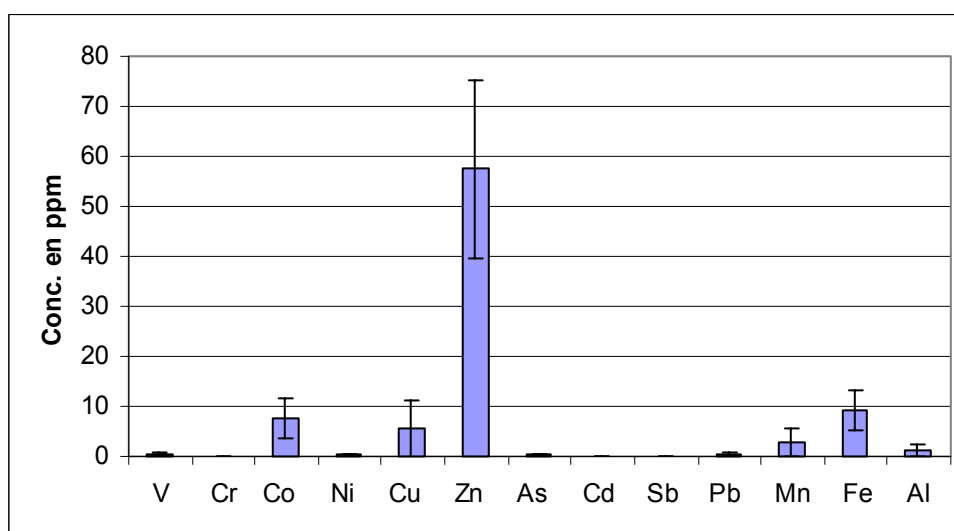


Figure 30 : Concentrations initiales en éléments dans les transplants après transport et avant installation sur site (Moy. $\pm$ ET, n=12)

II.4. Qualité physico-chimique des eaux sur les sites étudiés

Les eaux des quatre sites échantillonnés possèdent des pH neutre à alcalins. Elles sont bien oxygénées, mais par contre avec des fortes conductivités ($600-800 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$). De manière générale, ce sont des eaux de bonne qualité par rapport aux paramètres physico-chimiques mesurés (*cf.* Tableau de données en Annexe 6, 7, 8).

II.5. Résultats de la biosurveillance active

II.5.1. Site 1 : Tortequesne

Ce site n'a été suivi que durant un mois (du 3 mars au 4 avril 2003), car les échantillons ont disparu dès la troisième visite. Les échantillons attachés à un rondau de bois, dissimulés par les herbes hautes semblent avoir été enlevés suite à un fauchage des berges.

II.5.1.1. Bioaccumulation des polluants

Les concentrations en **V**, **Ni**, **Cu**, **Zn**, **As**, **Cd** et **Pb**, augmentent dans la mousse après leur installation sur site (*cf.* Figure 32). Seule la concentration en **Co** diminue. Cet élément, considéré comme essentiel au développement de l'organisme est ajouté au milieu de culture. La concentration moyenne dans les transplants au cours de ce suivi est de 3 ± 1 ppb. La concentration la plus élevée concerne le Zn. Celle-ci est stable entre les trois prélèvements ($55 \pm 6 \mu\text{g.g}^{-1}$). Les concentrations retrouvées dans les transplants et dans l'eau sont très faibles voire inférieures à la limite de détection pour le **Sb** et le **Cr**. Le **Mn**, **Fe**, et **Al** n'ont pu être dosés.

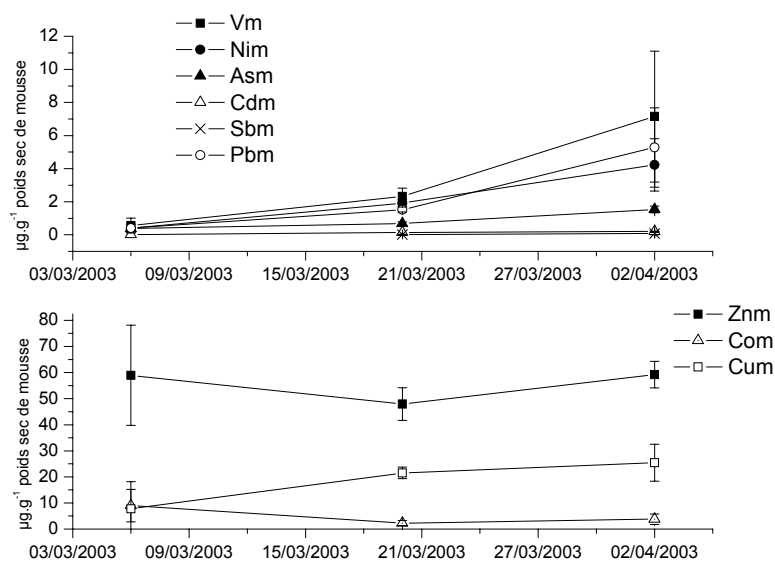


Figure 31 : Evolution des ETM dans les transplants sur le site de Tortequesnes, (Moy. $\pm$ ET, n=3)

Les concentrations en éléments dans les eaux sont reportées dans le Tableau en Annexe 6. La grille d'interprétation de l'analyse des micropolluants métalliques sur eau brute est reportée en Annexe 5. Cette grille servira d'outil d'interprétation pour les concentrations en ETM retrouvées dans les eaux de rivière.

Pour les deux prélèvements effectués, la qualité des eaux en micropolluants est de qualité médiocre (classe 3), les métaux déclassant la qualité de l'eau pour ce site sont, le **Ni**, **Cu** et **Zn**.

Tableau 37 : Comparaison des données obtenues avec la grille de qualité des Agences de l'Eau pour analyse de micropolluants sur eau brute pour le site de Tortequesne

Eau	20/03/2003	02/04/2003
Ni	Classe 2	Classe 3
Cu	Classe 3	Classe 3
Zn	Classe 3	Classe 3
As	Classe 1	Classe 2
Cd	Classe 2	Classe 2
Cr	<LD	<LD
Pb	Classe 1	Classe 1

Les valeurs minimale et maximale des concentrations obtenues dans les mousses au cours du suivi ont été comparées avec la grille de qualité des Agences de l'Eau françaises, pour les analyses de micropolluants sur bryophytes (*cf.* Tableau 10). Ainsi, les concentrations obtenues dans les mousses en **Ni**, **Cu**, **Zn**, **As**, **Cd**, **Pb**, classent ce site comme un **site de très bonne qualité** (classe 1).

On observe une contradiction entre les résultats obtenus dans les eaux et dans les mousses. Cette contradiction peut être expliquée par le fait que les prélèvements d'eau sont ponctuels et représentatifs de la qualité de l'eau à un instant t, alors que les concentrations dans les mousses représentent une intégration dans le temps. Ainsi ces dernières semblent être plus représentatives d'une qualité globale du milieu que les prélèvements d'eau. Cependant il serait utile de comparer les concentrations observées dans les mousses transplantées avec celles de mousses autochtones, et d'effectuer des échantillonnages d'eau et de mousse à des intervalles de temps rapprochés afin de mieux comprendre ces observations.

II.5.2. Site 2 : Chocques

La surveillance sur le site de Chocques a duré du 3 mars au 6 juin 2003.

II.5.2.1. Bioaccumulation dans les transplants

De la même manière que sur le site précédent après introduction des mousses dans la rivière, une augmentation de certains éléments (**V**, **Ni**, **Cu**, **Zn**, **As**, **Cd**, **Pb**) est observée dans la mousse. La concentration en **Co**, comme sur le site précédent diminue dans un premier temps puis se stabilise au cours du suivi ($5 \pm 1 \mu\text{g.g}^{-1}$), la concentration moyenne initiale en **Co** dans les transplants est de $5,6 \mu\text{g.g}^{-1}$. Comme sur le site de Tortequesne, les concentrations

retrouvées dans les transplants et dans l'eau sont très faibles voire inférieures à la limite de détection pour le **Sb** et le **Cr**. Le **Mn**, **Fe**, et **Al** n'ont pu être dosés pour ce site.

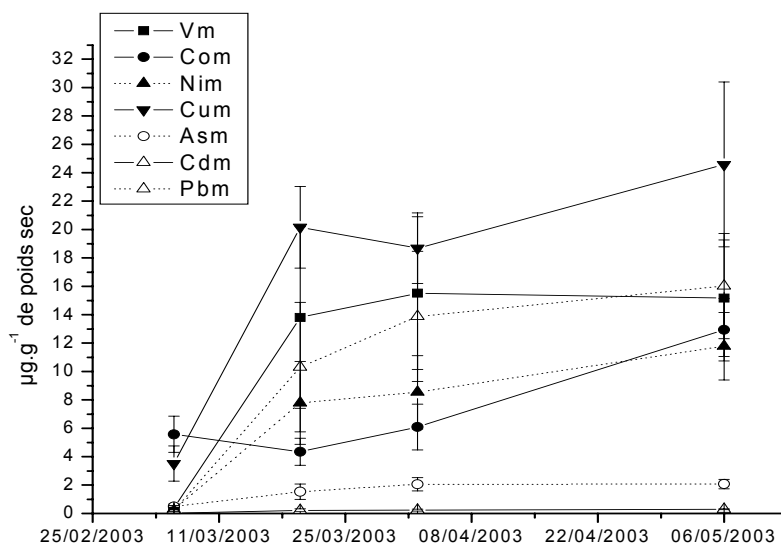


Figure 32 : Evolution des ETM dans les transplants sur le site de Chocques (Moy. $\pm$ ET, n=3)

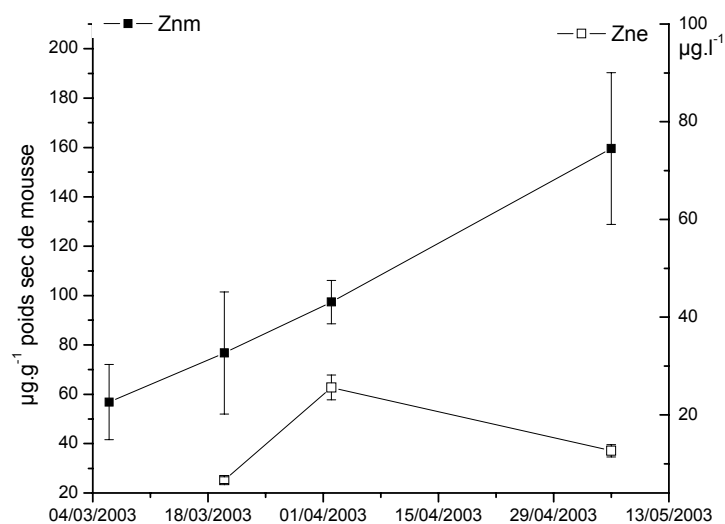


Figure 33 : Evolution de la concentration en Zn dans l'eau et dans les transplants (Moy. $\pm$ ET, n=3)

Le profil de contamination ci-dessus, montre une augmentation linéaire du Zn (160 $\mu\text{g.g}^{-1}$ en poids sec), pour des concentrations en Zn mesurées, comprises entre 7 et 26 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Cette accumulation croissante dans les mousses n'est observée que pour le Zn.

Tableau 38 : Comparaison des données obtenues avec la grille de qualité des Agences de l'Eau pour analyse de micropolluants sur eau brute pour le site de Chocques

$\mu\text{g.L}^{-1}$	20/03/03	02/04/03	06/05/03
Ni	Classe 2	Classe 2	Classe 2
Cu	Classe 3	Classe 3	Classe 3
Zn	Classe 3	Classe 3	Classe 3
As	Classe 2	Classe 2	Classe 1
Cd	Classe 2	Classe 3	Classe 2
Cr	<LD	<LD	<LD
Pb	Classe 2	Classe 2	Classe 2

Pour les trois prélèvements effectués, la qualité des eaux en micropolluants est de qualité médiocre (classe 3), les métaux déclassant la qualité de l'eau pour ce site sont, le **Cu**, **Zn**, et **Cd**.

Par comparaison avec la grille de qualité (*cf.* Tableau 10), les concentrations obtenues pour le **Ni**, **Cu**, **Zn**, **As**, **Cd**, **Pb** dans les mousses classent ce site en un **site de très bonne qualité** (classe 1). Le Hg n'a pu être suivi dans les mousses car cet élément se dose mal avec les techniques d'analyses utilisées dans cette étude. Comme sur le site de Tortequesne, à partir des concentrations dans l'eau et dans les mousses deux estimations de qualité sont obtenues.

II.5.3. Site 3 : Brebières

II.5.3.1. Bioaccumulation dans les transplants

Après introduction des mousses dans l'eau, l'augmentation dans la mousse de la concentration pour tous les éléments surveillés sauf le Co est observée. La concentration en **Co**, comme sur les sites précédents diminue après introduction de la mousse dans la rivière, puis elle se stabilise à $1 \pm 0,1 \mu\text{g.g}^{-1}$, au cours des deux derniers mois du suivi, la concentration moyenne initiale en Co dans les transplants étant de $10,3 \mu\text{g.g}^{-1}$. La concentration dans l'eau en Co, Sb, Cr et Cd sont faibles parfois inférieure à la limite de détection. Les concentrations les plus élevées retrouvées dans les mousses correspondent au **Mn**, **Fe**, **Al** et **Zn**, elles sont de l'ordre de la centaine de $\mu\text{g.g}^{-1}$.

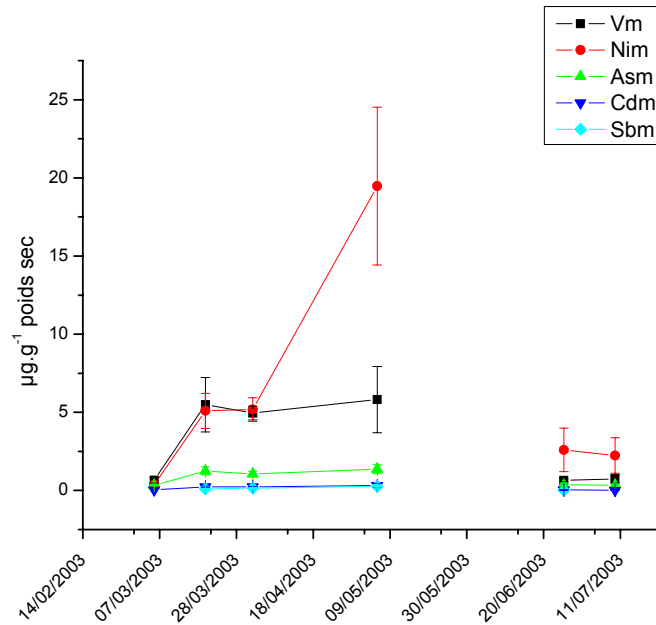


Figure 34 : Evolution des concentrations en V, Ni, As, Sb et Cd dans les transplants de mousse à Brebières (Moy. $\pm$ ET, n=3)

Tableau 39 : Comparaison des données obtenues avec la grille de qualité des Agences de l'Eau pour analyse de micropolluants sur eau brute pour le site de Brebières

eau	20/03/2003	02/04/2003	06/05/2003	12/06/2003	26/06/2003	10/07/2003
Ni	Classe 2	Classe 2	Classe 2	Classe 2	Classe 1	Classe 1
Cu	Classe 3	Classe 3	Classe 3	Classe 3	Classe 2	Classe 3
Zn	Classe 3	Classe 3	Classe 3	Classe 2	Classe 2	Classe 2
As	Classe 1	Classe 1	Classe 1	Classe 1	<LD	<LD
Cd	Classe 2	Classe 2	<LD	<LD	Classe 2	Classe 2
Cr	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
Pb	Classe 2	Classe 2	Classe 2	Classe 2	Classe 1	Classe 1

Les éléments traces métalliques déclassant la qualité de l'eau sur ce site en qualité moyenne, au cours de ce suivi, sont le **Cu** et le **Zn**. Les concentrations obtenues dans les mousses classe ce site de bonne qualité (classe 2), le **Zn** et le **Pb** sont les éléments déclassant.

II.5.3.2. Profils de contamination pour les mousses et pour l'eau

∞ Cas du Fe, Mn et Al

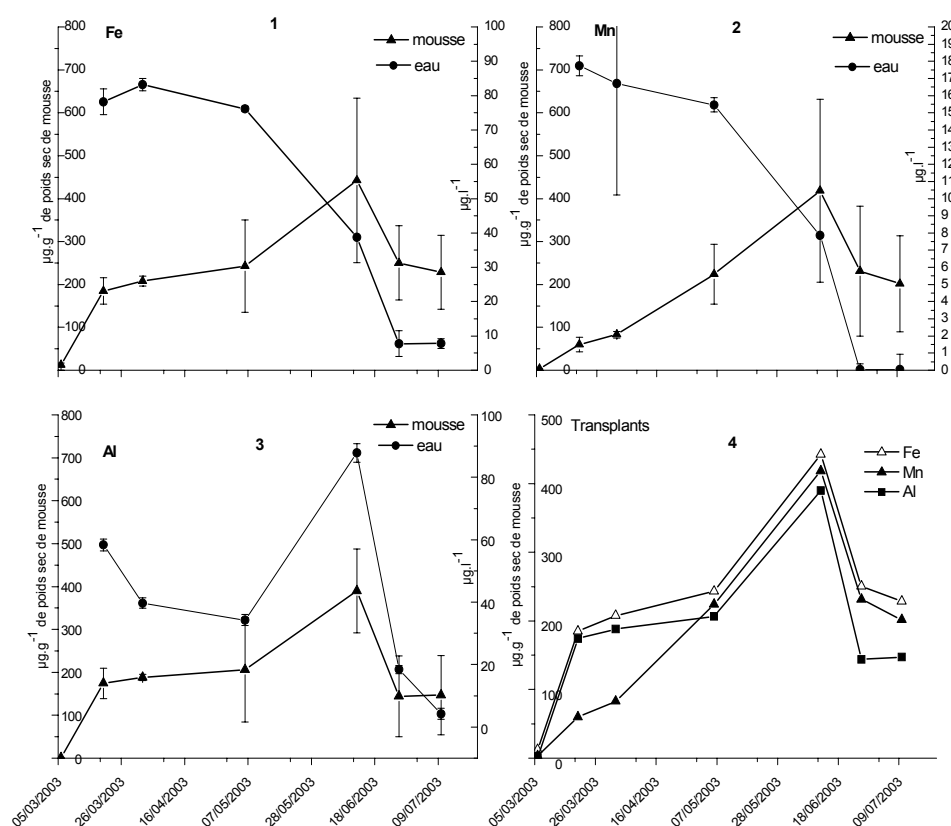


Figure 35 : Evolution des concentrations en Fe (1), Mn (2), et Al (3) dans les mousses et dans les eaux. (4) Evolution du Fe, Mn et Al dans les transplants.

Les concentrations en de **Fe** et **Mn** suivent le même profil dans les eaux, elles diminuent au cours du temps. Ces concentrations sont corrélées (Coef. de Spearman : 0,8857, $p < 0,05$).

Les concentrations en Fe et Mn dans les mousses suivent aussi le même profil, elles augmentent au cours du temps. Les concentrations dans les eaux et dans les mousses semblent être négativement corrélées, mais à $p < 0,05$, elles ne sont pas significativement corrélées. Ainsi, il semblerait que lorsque le Mn et le Fe sont présents dans les eaux, même en quantité faible, ces éléments sont captés par l'organisme, il s'agirait alors d'un phénomène actif de la mousse, le Mn et le Fe étant des éléments essentiels. A l'inverse, pour l'Al, les concentrations suivent le même profil dans l'eau et dans la mousse, ainsi quand l'aluminium est présent il est capté par la mousse, quand les concentrations dans l'eau diminuent, elles baissent également dans la mousse. Ainsi on peut supposer une accumulation passive de l'Al. Par ailleurs, ces trois éléments (Al, Mn, Fe) suivent la même évolution dans l'organisme au cours du temps.

∞ Cas du Cu, Zn et Pb

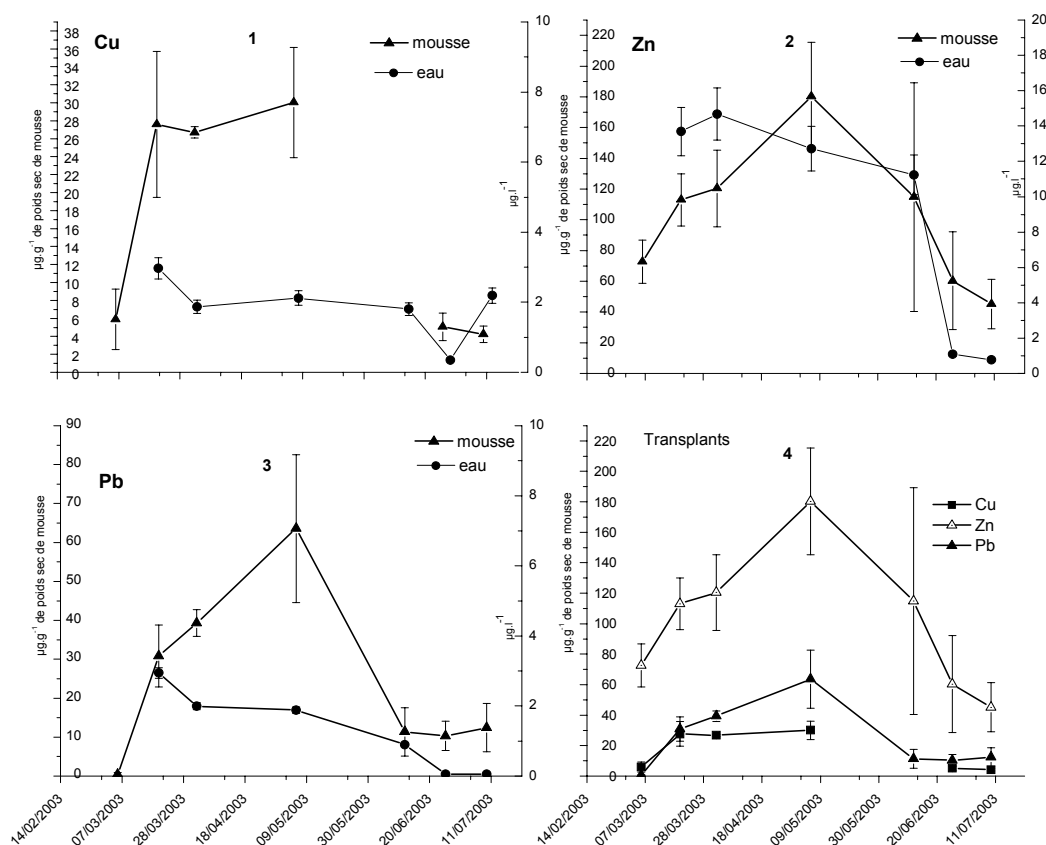


Figure 36: Evolution des concentrations en Cu (1), Zn (2), et Pb (3) dans les mousses et dans les eaux. Evolution du Cu, Zn et Pb dans les transplants (4).

Les concentrations en **Zn**, **Cu**, et **Pb** dans les mousses et dans l'eau, suivent le même profil, mais à des concentrations différentes. Les concentrations les plus élevées pour ces éléments sont de l'ordre de 30 $\mu\text{g.g}^{-1}$ (Cu), de 60 $\mu\text{g.g}^{-1}$ (Pb) et de 180 $\mu\text{g.g}^{-1}$ (Zn).

II.5.4. Site 4 : Courrières

Ce site n'a pas pu être suivi, car au bout de la deuxième visite les échantillons avaient disparus. Les fils de nylon semblaient avoir été sectionnés, ce qui ne serait pas étonnant étant donné la proximité des échantillons et de la zone de passage des promeneurs. Cependant, ce canal est emprunté fréquemment par de nombreuses péniches, et les remous formés au niveau des rives auraient pu engendrer la perte des échantillons. Ainsi aucun résultat n'a été obtenu sur ce site.

II.5.5. Suivi de l'état de santé des transplants

II.5.5.1. Suivi de l'indice de stress D665/D665a

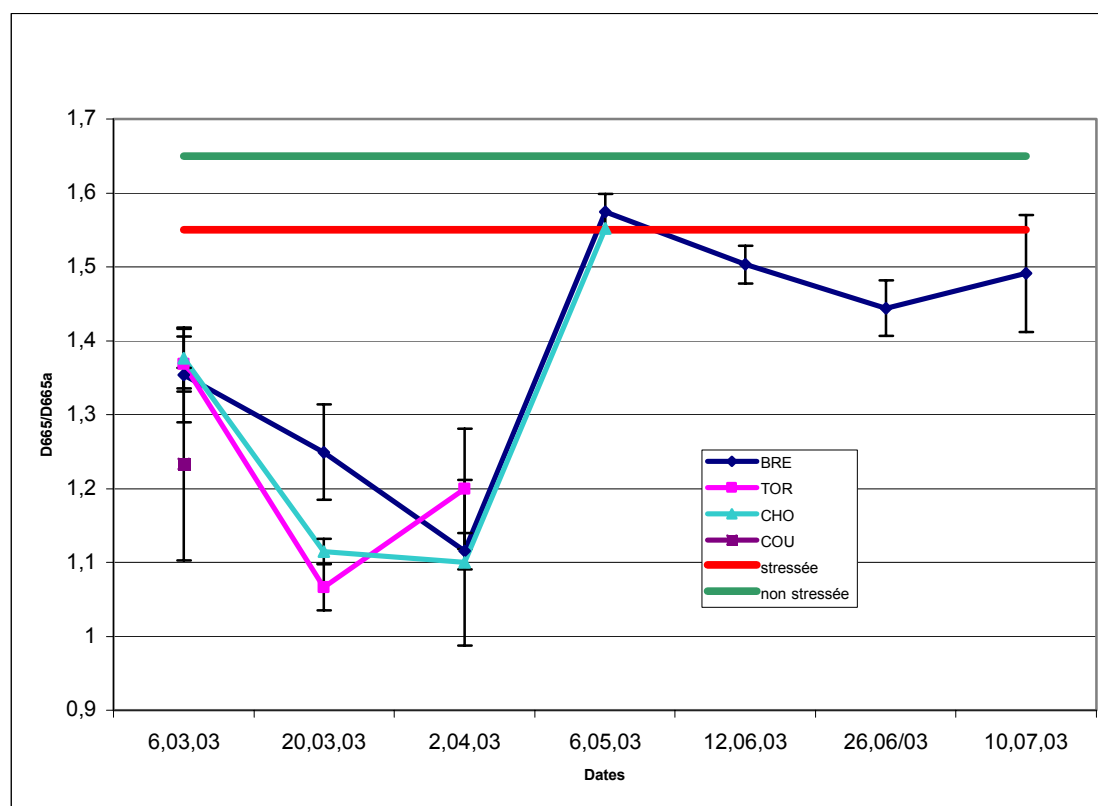


Figure 37 : Evolution de l'indice de stress au cours du temps sur quatre sites surveillés Brebières, Tortequesne, Choques (n=3 ; la grille de qualité de López & Carballeira (1989) est reportée.

La Figure 37 montre l'évolution de l'indice de stress D665/D665a mesuré dans les transplants sur les sites surveillés. On observe qu'au début du suivi, cet indice évolue de manière identique sur les trois sites étudiés. Cet indice relativement faible au début du suivi, peut être expliquer en partie par le stress du à la transplantation (passage des conditions optimales de la chambre de culture à un site naturel). Pour le site de Brebières où le suivi a pu être réalisé de mars à juillet 2003, on observe une augmentation de l'indice qui peut être liée à une adaptation de l'organisme à son milieu, puis cet indice semble se stabiliser. Selon la grille de qualité de López & Carballeira (1989), les transplants sont considérés comme stressés.

II.5.6. Suivi du stress oxydant

Les données de stress oxydant seront présentées ultérieurement.

II.5.7. Observations macroscopiques

Le site de Brebières étant le seul où le suivi a été réalisé pendant 5 mois (mars- juillet 2003), les observations visuelles des échantillons transplantés sur ce site, sont présentées en détail dans le Tableau 40. Un marqueur (fil de couture) a été placé sur un brin à deux cm de l'apex, la croissance de ce brin est reportée, pour les 3 transplants du site (BRE1, BRE 2, BRE3).

Tableau 40 : Observations visuelles de l'état des transplants sur le site de Brebières

Date de visite	Etat général	Transplant BRE 1	Transplant BRE 2	Transplant BRE 3
20 mars 2003 :	mousse de couleur vert foncé, avec de la matière organique sur les feuille et tiges	Pas de croissance		
2 avril 2003 :	présence de quelques nouvelles pousses vert clair	Pas de croissance	Croissance de 0.1 cm de l'échantillon BRE 2	Pas de croissance
6 mai 2003 :	pousses vert clair récentes dans la partie supérieure des paniers de transplants	Croissance de 0,5 cm	Pas de croissance	Pas de croissance sur le brin principal mais nouvelles ramifications
12 juin 2003 :	amas de feuilles autour des échantillons, pas de luminosité, échantillons fortement abîmés, présence de macro-invertébrés	pas de croissance, tiges mangées par invertébrés, poissons, échantillon de couleur marron, présence de quelques apex verts donc actifs	pas de croissance, des tiges vertes plus abondantes par comparaison avec le précédent	pas de croissance
26 juin 2003 :	présence d'un amas de plantes autour des cages retenues par la corde des transplants	Pas de croissance, pratiquement plus d'échantillon	pas de croissance	croissance 1 cm
10 juillet 2003 :	présence d'un amas de plantes autour des cages retenues par la corde des transplants échantillon en mauvais état	Pas de croissance, échantillon entièrement prélevé pour l'analyse	pas de croissance sur le brin mesuré, cependant croissance sur d'autres brins verts	pas de croissance

Les observations visuelles ont montré un changement de coloration de l'organisme dès les premières semaines après transfert. Les mousses ont pris une coloration vert foncé. De plus, par comparaison avec la croissance de l'organisme en culture, la croissance *in situ* a été faible au cours de ces mois de suivi. Cependant de nouvelles pousses, identifiables à leur couleur vert clair ont été observées. Au bout du quatrième mois de suivi, les échantillons étaient fortement abîmés, de la matière organique recouvraient les feuilles et les tiges, des

macro- invertébrés colonisaient les transplants, de plus, les feuilles semblaient être mangées par les poissons. Par ailleurs, des débris végétaux s'accumulaient au niveau de la corde retenant les transplants à la rive ce qui a sans doute une influence sur la pénétration de la lumière. Il serait nécessaire dans les futures études de régulièrement nettoyer les cages pour ôter ces débris et éviter leur colmatage. A la fin du suivi, les échantillons étaient fortement abîmés.

A partir des observations visuelles, il est donc conseillé pour de futures études de biosurveillance :

- (1) de ne pas poursuivre un suivi plus de trois mois,
- (2) dans le cas d'un suivi à long terme à long terme de réapprovisionner les sites.

II.6. Synthèse

Cette étude *in situ* à l'aide de mousses cultivées a montré :

- (1) La résistance de l'organisme en culture pendant ces mois de suivi,
- (2) Une accumulation dans les mousses pour tous les éléments étudiés (**V, Ni, Cu, Zn, As, Cd, Sb, Cr, P, Mn et Fe**) sauf le **Co** après deux semaines de mise en place sur le terrain,
- (3) Les teneurs mesurées en éléments trace métalliques dans les mousses classent les sites de Chocques et Tortequesne en Classe 1 (**très bonne qualité**), et le site de Brebières en classe 2 (**bonne qualité**),
- (4) Les mesures des ETM dans l'eau de ces sites, ont montré que la qualité de l'eau estimée à partir des concentrations en ETM était déclassée pour ces éléments : Cu, Zn, Cd et Ni.
- (5) La principale difficulté rencontrée lors de cette étude de bioindication est la perte des échantillons de terrain
- (6) Une culture d'environ 100 g de poids frais a permis la réalisation d'un suivi de cinq mois.

Discussion générale et conclusions

Discussion générale et conclusions

Ce chapitre est consacré à la proposition d'un **catalogue de modalités pratiques** de l'utilisation de la culture de la mousse *F. antipyretica* dans la biosurveillance des milieux aquatiques, en vue de l'exploitation optimale de l'outil « mousse aquatique en culture ».

Pérennité de la culture de *F. antipyretica*

La culture de la mousse aquatique *F. antipyretica* (souche FA6VB) a été initiée en 1998 à partir d'un apex. Une étape de purification a permis de débarrasser d'organismes contaminants (champignons, micro-algues) (Rausch de Traubenberg & Ah-Peng, sous presse). Depuis, la culture obtenue est monoclonale et monospécifique. La pérennité de cet organisme est assurée par multiplication végétative, le rendement d'obtention d'un transplant étant de 6 mois. L'aspect visuel de cet organisme (feuilles généreuses, ramifications importantes, taux de croissance élevé), montre que la mise en culture a été réussie et peut être considérée comme viable. A ce jour, aucune donnée bibliographique ne rapporte l'existence d'une culture de mousse aquatique sur du long terme.

Par ailleurs, la culture de mousse aquatique est coûteuse, car elle nécessite des infrastructures lourdes : chambre de culture climatisée, matériel de stérilisation (autoclave), matériel spécifique, hotte à flux laminaire pour le renouvellement des milieux et le repiquage des organismes dans des conditions stériles. En plus de l'investissement financier initial, une autre forme d'investissement est nécessaire qui concerne le personnel et le temps.

En effet, une culture de mousse demande beaucoup d'attention, elle nécessite de vérifier régulièrement les dispositifs de culture (étanchéité, contamination, niveau d'eau des humidificateurs...). Elle demande du temps dans l'entretien de la culture principalement dans le renouvellement des milieux de culture (3 mois) (préparation, stérilisation). Ainsi, en conditions idéales, une personne à temps plein est nécessaire à la gestion d'une telle culture.

Propriétés indicatrices de la mousse en culture

Le seuil de saturation en cadmium pour la mousse *F. antipyretica* en culture a été évalué par une expérimentation en laboratoire, cette concentration est d'environ 10000 µg.g⁻¹. Elle est du même ordre de grandeur que la concentration retrouvée dans la littérature pour une mousse *F. antipyretica* traitée au Cd issue d'un site naturel (Carballeira *et al.*, 2001).

La biosurveillance réalisée sur site pendant 5 mois a mis en évidence une accumulation des éléments dans la mousse dès les premières semaines après son transfert dans la rivière, même pour des concentrations en micropolluants minéraux se trouvant à l'état de traces.

Avantages et inconvénients liés à l'utilisation d'une mousse cultivée dans la biosurveillance active des cours d'eau

Améliorations de la méthode « Bryophytes »

En plus des avantages que procure la biosurveillance active par rapport à la biosurveillance passive (*cf.* Chap 1. II.4.3), l'utilisation de transplants de mousse cultivée dans la biosurveillance active des cours d'eau apporte des améliorations à la méthode préexistante.

En effet, elle limite la recherche de sites de références non contaminés où les mousses seraient récoltées pour leur transplantation sur site. C'est un gain de temps et d'énergie pour les utilisateurs, qui facilite la mise en place des études de biosurveillance. Par ailleurs, elle évite la dégradation de tels sites de référence, par des prélèvements réguliers et abondants. De plus, dans certaines régions comme l'Artois Picardie, les mousses aquatiques sont de plus en plus rares, et souvent difficilement accessibles (murs d'écluses, de canaux).

La détermination des bryophytes n'est pas aisée. Elle nécessite souvent l'observation microscopique des feuilles pour l'identification de l'espèce, ainsi une mousse en culture limiterait les erreurs liées à cette détermination.

Par ailleurs, l'espèce en culture a été largement utilisée comme bioindicateur pour ses propriétés d'accumulation, de résistance, de caractérisation de pollutions de types différents (métallique, nucléaires, organique), c'est un bioindicateur polyvalent, « multi-pollution ».

Utiliser cette mousse aquatique cultivée dans la biosurveillance des cours d'eau français permettrait une meilleure homogénéité des résultats, notamment dans la variabilité interspécifique, et limiterait la variabilité intraspécifique. Ainsi, cela faciliterait le travail des gestionnaires de la qualité de l'eau, en leur fournissant un outil « clé en main ».

De plus, la durée d'exposition des organismes peut être contrôlée. De par sa rapide faculté d'intégration des polluants (moins d'une heure pour atteindre une concentration à

saturation pour un environnement contaminé en Cd), la biosurveillance d'un site à l'aide de bryophytes peut être effectuée soit sur du **court terme** avec des intervalles de temps courts (quelques heures à quelques jours) pour caractériser une pollution et étudier la disponibilité des polluants. La biosurveillance active peut également être menée sur du **long terme** avec des prélèvements bimensuels. De par leur capacité à accumuler une partie intracellulaire des polluants, les mousses sont caractérisées par un effet mémoire (*cf.* Chapitre 1 II.2.1.1. informant d'une pollution ponctuelle même lorsque celle-ci n'est plus détectable dans l'eau (caractère éphémère).

Ainsi cette culture de mousse par sa pérennité, constitue une source de mousse de référence pour la biosurveillance active des cours d'eau.

Difficultés de terrain

Les difficultés de terrain sont les principaux inconvénients de cette méthode.

La première difficulté concerne **la perte des échantillons** lors d'un suivi, qui est le point noir des études de bioindication (Mersch, 1993). Cette perte du dispositif peut être liée soit à la force du courant, soit au vandalisme des échantillons. Pour le premier cas, il est conseillé de surveiller régulièrement le dispositif. Pour le deuxième cas, même si une discrétion rigoureuse a été effectuée lors du suivi sur quatre sites dans le Nord, les échantillons ont été perdus pour 3 sites sur 4. Pour un site seulement (Site de brebières), le suivi a pu être réalisé jusqu'à la fin de l'étude, car les échantillons se trouvaient au niveau d'une écluse, et l'accès à cette écluse est réglementé. Ainsi, le choix du site est déterminant dans une étude de surveillance. Il est préférable de choisir un site où une permanence est assurée (écluse, local de gestionnaire de rivière) ou placer les échantillons à des endroits inaccessibles au public.

La deuxième difficulté rencontrée au cours du suivi concerne le **dépôt de matériels solides** (particules organiques, végétaux) qui participe au colmatage des grilles et par conséquent crée un barrage à la lumière, ce qui influe sur l'activité photosynthétique des bryophytes. Ainsi un entretien régulier des transplants est primordial pour le bon déroulement de l'étude.

L'observation des mousses pendant le suivi *in situ* a montré que celles-ci étaient colonisées après quelques semaines d'exposition par des macro- invertébrés (*Chironomidae*, *Gammaridae*...) et semblent servir de nourriture aux poissons (feuilles mangées). Ainsi, il est intéressant de suivre l'état de santé de l'organisme bioindicateur, cette information renseignant sur la qualité de la bioindication fournie par l'organisme.

Evaluation de l'état de santé de l'organisme bioindicateur

En tant qu'indicateur de la qualité des eaux, le suivi de l'état de santé du bioindicateur est important et joue un rôle prépondérant dans la qualité de la mesure obtenue. L'utilisation de **l'indice de stress D665/D665a** a été proposée pour caractériser l'état de santé de l'organisme. Un rapport élevé ($>1,55 - 1,65$), signifie que la concentration en chlorophylle a est plus importante que son produit de dégradation (phéophytine a) et par conséquent, est synonyme d'une activité photosynthétique élevée donc d'un bon état de santé de l'organisme. C'est un indice très précis qui détecte bien les variations fines. De plus, est observé un faible coefficient de variation entre sous- échantillons. Ainsi, l'indice semble être représentatif de l'état de santé de l'organisme donc également de la qualité du milieu. Cependant, lorsque le milieu est trop perturbé, cet indice n'est plus applicable (*cf. exp. Cd*). En effet, l'expérience de contamination au cadmium a montré que des solutions concentrées en Cd^{2+} n'influe pas sur la transformation de la chlorophylle en phéophytine, mais une autre hypothèse peut être que la chlorophylle a est dégradée en d'autres produits de dégradation, ce qui expliquerait le fait que le rapport D665/D665a ne varie reste stable au cours du temps lors de l'expérience sur le Cd.

López & Carballeira (1989) ont proposé une grille de qualité pour interpréter les valeurs de stress. Ces bornes de qualité définies semblent ne pas convenir ni à la mousse cultivée ni à la mousse transplantée. Il serait donc intéressant de re-définir ces bornes, à l'aide d'autres indicateurs, tels que des observations visuelles des organismes.

Par ailleurs, des données de stress oxydant viendront compléter les résultats obtenus au cours de cette étude et permettront d'expliquer au niveau cellulaire le comportement de l'organisme aussi bien au contact de concentrations élevées en Cd que en milieu naturel ou contamination est multi-élémentaire.

Conclusions et perspectives

Cette étude a montré que la mousse aquatique *Fontinalis antipyretica* en culture est un outil adapté pour la biosurveillance active des cours d'eau. Le potentiel d'accumulation de la mousse a été vérifié par une contamination *in vitro* au cadmium. De plus, l'accumulation d'éléments traces métalliques a été suivie sur des mousses cultivées transférées ont été étudiées sur un site d'étude naturel. Cette expérimentation *in situ* a montré que la mousse a résisté au transfert de la chambre de culture où les conditions sont considérées comme optimales, à un site naturel. Les résultats obtenus ont mis en évidence une accumulation des

éléments métalliques dans les mousses, même lorsque ces derniers se trouvent à l'état de traces dans l'eau. Cette culture de mousse nécessite encore des recherches appliquées, il serait par exemple intéressant de mener une étude de surveillance avec des mousses (espèce *F. antipyretica*) autochtones, cultivées, et autochtones transplantées.

Cette culture de mousse offre de nouvelles perspectives à l'utilisation des bryophytes aquatiques en tant que bioindicateur de la qualité des eaux naturelles.

Dans les perspectives, **à court terme**, il serait important :

- d'adapter, la grille actuelle de qualité et d'interprétation des concentrations métalliques dans les bryophytes des Agences de l'Eau françaises à la mousse en culture,
- d'envisager et de développer des moyens financiers et humains pour favoriser le développement de cette culture et permettre une production de masse,
- de réaliser des expériences en laboratoire et *in situ* pour la détection de pollution organique et nucléaire dans les eaux naturelles,
- de développer des outils techniques pour l'évaluation de l'état de santé du bioindicateur,
- de standardiser la méthode.

Dans les perspectives, **à long terme**, il serait important :

- de généraliser son utilisation à l'échelle du territoire français, aux différents réseaux de surveillance des métaux dans les bryophytes, et ainsi obtenir ainsi une banque de données comparables,
- d'étendre son utilisation aux pays européens dans le cadre d'une politique de l'eau commune.

En effet, depuis une cinquantaine d'années, l'utilisation des bioindicateurs s'est de plus en plus en plus développée au niveau européen. Jusqu'à présent les bioindicateurs utilisés étaient généralement issus de populations autochtones. Ainsi, « l'Ecole française de l'eau » innove avec l'utilisation d'une **culture de mousse aquatique viable et pérenne** dans la biosurveillance des milieux aquatiques. Cet outil « mousse cultivée » s'intègre parfaitement avec la Directive Cadre sur l'eau pour standardiser les méthodes d'étude, dans une perspective de surveillance, de préservation, et de protection de la ressource en eau, en tant que patrimoine mondial.

Listes des Tableaux

Tableau 1: Exemples de facteurs de bioconcentration obtenus en laboratoire	27
Tableau 2: Valeurs les plus élevées de BCF retrouvées dans les bryophytes aquatiques collectées dans les montagnes Sudety et les Alpes Suisses (Samecka-Cymerman, 1998)	27
Tableau 3 : Exemple d'accumulation de molécules organiques par les bryophytes aquatiques.....	31
Tableau 4 : ⁽¹⁾ Gamme de variation dans les bryophytes aquatiques pour le milieu aquatique continental, ⁽²⁾ Concentrations mesurées dans les bryophytes en aval de la centrale de Bugey en 1992 (données I.P.S.N)	34
Tableau 5 : Exemples de facteurs de bioconcentration de radionucléides pour les bryophytes	35
Tableau 6 : Pourquoi choisir d'utiliser les 2 cm apicaux de la tige ?	43
Tableau 7 : Coefficients de toxiphobie attribués aux espèces de bryophytes les plus importantes dans la Sambre et la Meuse (Empain, 1978)	52
Tableau 8 : Classes de qualité écophysologiques pour le rapport D665/D665a pour <i>Fontinalis antipyretica</i> (López & Carballeira, 1989)	55
Tableau 9 : Comparaison des IC des sédiments et des mousses aquatiques dans 11 sites du bassin Rhin Meuse (Mouvet, 1984)	56
Tableau 10 : Grille de qualité et d'interprétation des concentrations métalliques dans les bryophytes. La précision du résultat à fournir est représentée par la présence ou non de décimales, valeurs en $\mu\text{g.g}^{-1}$ de poids sec.....	57
Tableau 11 : Concentrations repères dans les bryophytes autochtones	57
Tableau 12 : Interprétation de la grille de qualité des concentrations métalliques dans les bryophytes	58
Tableau 13 : Correspondance entre les cinq classes de la grille de qualité et les côtes de qualité définies pour l'indice polymétallique	59
Tableau 14 : Echancier de la Directive cadre 2000	70
Tableau 15 : Influence de solutions nutritives sur la croissance de <i>Fontinalis antipyretica</i> précédemment obtenus (Albisty, 2001 ; Ah-Peng, 2001).....	80
Tableau 16 : Concentrations en éléments des solutions d'étalonnage.....	86
Tableau 17 : Limite de détection pour chaque élément et moyenne des blancs de minéralisation en ICP/MS au cours des séries d'analyse dans cette étude	88
Tableau 18 : Comparaison entre mesures et données certifiées pour Al, Ni, Cu, Zn, As, Cd, Pb (n=9)	88
Tableau 19 : Limites de détection et moyenne des blancs de minéralisation mesurées en ICP/AES au cours des séries d'analyse de cette étude.	89
Tableau 20 : Comparaison entre mesure (n=8) et données certifiées pour le Mn, le Fe et l'Al.....	89
Tableau 21 : Composition en éléments (g.L^{-1}) recommandée par Basile & Basile (1988)	94
Tableau 22 : Composition des solutions stocks pour la culture de <i>F. antipyretica</i>	95
Tableau 23 : Composition des milieux de culture pour cette expérience.....	96
Tableau 24 : Données sur les mousses utilisées pour cette expérience	99
Tableau 25: Concentration en cadmium testées ($M_{(\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O})} = 308.47 \text{ g.mol}^{-1}$, $M_{(\text{Cd})} = 112.4 \text{ g.mol}^{-1}$)	99
Tableau 26 : Données de pH dans le milieu avec ajout de CO_2 et dans le milieu témoin.....	114
Tableau 27 : Données de croissance de <i>F. antipyretica</i> dans les conditions de culture	115

Tableau 28 : Concentrations en ETM chez <i>F. antipyretica</i> en culture pour la série 1, nd : donnée non disponible.....	116
Tableau 29 : Concentrations en Cr, Ni, Cu, Zn, As, Cd et Pb dans <i>F. antipyretica</i> pour la Série 1 (Moy. $\pm$ ET ; n=5), comparaison avec la grille de qualité des Agences de l'Eau	116
Tableau 30 : Concentrations en en ETM chez <i>F. antipyretica</i> en culture pour la série 2, nd : donnée non disponible	117
Tableau 31 : Concentrations en Cr, Ni, Cu, Zn, As, Cd et Pb dans <i>F. antipyretica</i> pour la série 2 (Moy. $\pm$ ET ; n=5), comparaison avec la grille de qualité des Agences de l'Eau	117
Tableau 32 : Données portant sur la mesure de l'indice de stress au cours de la contamination au cadmium avec : témoin A (0 ppm de Cd ²⁺), B (3.8 ppm de Cd ²⁺), C (18.5 ppm de Cd ²⁺), D (37 ppm de Cd ²⁺).....	123
Tableau 33 : Indices de stress obtenus pour l'influence du conditionnement sur <i>F. antipyretica</i>	129
Tableau 34 : Cinétiques de l'indice de stress de <i>F. antipyretica</i> soumise à une température de 50 °C pendant 300 min	129
Tableau 35 : Cinétique de l'indice de stress de <i>F. antipyretica</i> soumise à une luminosité de 100 μ mol. m ⁻² . s ⁻¹ pendant 288 min	130
Tableau 36 : Références des transplants et masses associées	133
Tableau 37 : Comparaison des données obtenues avec la grille de qualité des Agences de l'Eau pour analyse de micropolluants sur eau brute pour le site de Tortequesne.....	136
Tableau 38 : Comparaison des données obtenues avec la grille de qualité des Agences de l'Eau pour analyse de micropolluants sur eau brute pour le site de Chocques.....	138
Tableau 39 : Comparaison des données obtenues avec la grille de qualité des Agences de l'Eau pour analyse de micropolluants sur eau brute pour le site de Brebières.....	139
Tableau 40 : Observations visuelles de l'état des transplants sur le site de Brebières	143

Liste des Figures

Figure 1: Photographie des tissus conducteurs primitifs de <i>Polytrichaceae</i> (Malcom & Malcom, 2000)	14
Figure 2 : Capsules d'hépatiques et de mousses (daprès site Internet)	15
Figure 3: Cycle de reproduction des bryophytes	16
Figure 4 : Concentrations en cadmium dans les brins apicaux (2-3 cm) et dans les parties basales de <i>Fontinalis antipyretica</i> , issue de différents sites d'échantillonnage dans la partie Est des Montagnes Harz (Siebert <i>et al.</i> , 1996)	28
Figure 5 : Schéma de l'entrée du cadmium dans la cellule végétale (Zenk, 1996)	41
Figure 6 : Spectres superposés d'un extrait de mousse dans l'acétone à 90% (bleu) et du même extrait acidifié (rose) (Ah-Peng, 2001)	55
Figure 7 : Indice polymétallique	59
Figure 8 : Photographie d'une feuille et cellules de feuille de <i>Fontinalis antipyretica</i> en culture (Photos Ah-Peng, 2001)	79
Figure 9 : Schéma simplifié de l'ICP/MS PQII+	82
Figure 10 : Montage de culture de <i>F. antipyretica</i> avec diffuseur d'air	93
Figure 11 : Montage de culture de <i>F. antipyretica</i> avec agitateur magnétique	93
Figure 12 : Montage expérimental pour l'expérience de contamination de <i>F. antipyretica</i> au cadmium	100
Figure 13 : Représentation géographique des sites d'étude (carte Agence de l'Eau Artois Picardie)	104
Figure 14 : Photographie de la mousse en culture avec diffuseur d'air	109
Figure 15 : Photographie de la mousse en culture avec agitateur	110
Figure 16 : Evolution de la croissance de la mousse <i>Fontinalis antipyretica</i> soumis à des dilutions différentes du milieu Knop : K , K/5 , K/10 , K/20 (Moy. $\pm$ ET, n=4)	111
Figure 17 : Evolution du pH dans les milieux testés (K , K/5 , K/10 et K/20) en fonction du temps	112
Figure 18 : Evolution comparée des taux de croissance moyens pour le brin principal (bp) et les ramifications latérales (ramif) dans les milieux testés K (1), K/5 (2), K/10 (3), K/20 (4) chez <i>F. antipyretica</i> (n=4)	113
Figure 19 : Evolution de la croissance de <i>Fontinalis antipyretica</i> dans les conditions de culture, (Moy. $\pm$ ET)	115
Figure 20 : Evolution des concentrations en cadmium chez <i>F. antipyretica</i> et dans les milieux A (témoin) B (3.8 ppm de Cd^{2+}), C (18.5 ppm de Cd^{2+}), D (37 ppm de Cd^{2+}) en fonction du temps	119
Figure 21 : Capture de métal dans <i>Fontinalis antipyretica</i> à partir de solutions contenant B (3.8 ppm de Cd^{2+}), C (18.5 ppm de Cd^{2+}), D (37 ppm de Cd^{2+}) en fonction du temps	121
Figure 22 : Evolution des concentrations en Cd en fonction du temps chez <i>Fontinalis antipyretica</i> pour chaque concentration en $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ testée	121
Figure 23 : Evolution des BCF au cours du temps pour les milieux A (témoin), B (3,8 ppm Cd^{2+}), C (18,5 ppm de Cd^{2+}), D (37 ppm Cd^{2+}) et la mousse <i>F. antipyretica</i>	122
Figure 24: Evolution de l'indice de stress en fonction du temps chez <i>Fontinalis antipyretica</i> soumise à différents concentrations de cadmium A (0 ppm de Cd^{2+}), B (3.8 ppm de Cd^{2+}), C (18.5 ppm de Cd^{2+}), D (37 ppm de Cd^{2+})	124
Figure 25: Photographie des mousses une semaine après le début de l'expérience de contamination au cadmium, 0 ppm (A), 3,8 ppm Cd^{2+} (B), 18,5 ppm Cd^{2+} (C) et 37 ppm Cd^{2+} (D)	125

Figure 26 : Photographie illustrant la séquence de dégradation cellulaire de <i>F. antipyretica</i> soumise à 37 ppm de Cd, 0 h (0), 1 h (1), 2 h30 (2), 4 h30 (3), 20 h (4), 216 h (5)	126
Figure 27 : Evolution de l'indice D665/D665a dans une culture en fonction du temps (Moy. $\pm$ ET ; n=5), Donnée Stressée et non stressée de López & Carballeira (1989)	128
Figure 28 : Evolution de l'indice de stress chez <i>Fontinalis antipyretica</i> soumise à une température de 50 °C	130
Figure 29 : Evolution de l'indice de stress chez <i>Fontinalis antipyretica</i> soumis à une luminosité de 100 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$	131
Figure 30 : Concentrations initiales en éléments dans les transplants après transport et avant installation sur site (Moy. $\pm$ ET, n=12)	134
Figure 31 : Evolution des ETM dans les transplants sur le site de Tortequesnes, (Moy. $\pm$ ET, n=3) .	135
Figure 32 : Evolution des ETM dans les transplants sur le site de Chocques (Moy. $\pm$ ET, n=3)	137
Figure 33 : Evolution de la concentration en Zn dans l'eau et dans les transplants (Moy. $\pm$ ET, n=3)	137
Figure 34 : Evolution des concentrations en V, Ni, As, Sb et Cd dans les transplants de mousse à Brebières (Moy. $\pm$ ET, n=3)	139
Figure 35 : Evolution des concentrations en Fe (1), Mn (2), et Al (3) dans les mousses et dans les eaux. (4) Evolution du Fe, Mn et Al dans les transplants.	140
Figure 36: Evolution des concentrations en Cu (1), Zn (2), et Pb (3) dans les mousses et dans les eaux. Evolution du Cu, Zn et Pb dans les transplants (4).	141
Figure 37 : Evolution de l'indice de stress au cours du temps sur quatre sites surveillés Brebières, Tortequesne, Choques (n=3 ; la grille de qualité de López & Carballeira (1989) est reportée. .	142

Bibliographie

BIBLIOGRAPHIE

- Ah-Peng, C., 2001.** Mise en place d'un outil diagnostic basé sur l'utilisation d'une mousse aquatique en culture pour l'estimation de la contamination des cours d'eau, Muséum National d'Histoire Naturelle Université Paris VII, Paris.
- Albisty, M., 2001.** Optimisation d'une culture de *Fontinalis antipyretica* Hedw. en laboratoire, Muséum national d'Histoire naturelle, Paris.
- Alscher, R.G., 1989.** Biosynthesis and antioxidant function of glutathione in plants. *Physiologia plantarum*, 77: 457-646.
- André, B. & Lascombe, C., 1985.** Comparaison de deux traceurs de la pollution métallique des cours d'eau: les bryophytes et les sédiments, Agence de Bassin Rhône Méditerranée Corse, Pierre Bénite.
- André, B. & Lascombe, C., 1987.** Comparaison de deux traceurs de la pollution métallique des cours d'eau: les sédiments et les Bryophytes. *Revue des Sciences de l'Eau*, 6(2): 225-247.
- Augier, J., 1966.** Flore des Bryophytes, morphologie, anatomie, écologie, distribution géographique. éditions Paul Lechevalier, Paris, 702 pp.
- Bardat, J. & Boudier, P., 2002.** Ecologie des bryophytes: phytosociologie, mésologie et dynamique, Centre de la Nature montagnarde, Château des Rubins, Sallanches.
- Basile, D.V., 1964.** New procedure of bryophyte culture which permit alteration of the culture medium during the life cycle. *The Bryologist*, 67: 141-146.
- Basile, D.V., 1965.** Growth, development, and gemma formation in the liverwort *Scapania nemorosa* as influenced by L-arginine, L-histidine, and L-glutamic acid. *Amer. Jour. Bot.*, 52(5): 443-454.
- Basile, D.V., Basile, M.R., Li, Q.-Y. & Corpe, W.A., 1985.** Vitamin B12-stimulated growth and development of *Jungermannia leiantha* Grolle and *Gymnocolea inflata* (Huds.) Dum. (Hepaticae). *The Bryologist*, 88(2): 77-81.
- Basile, V. & Basile, M.R., 1988.** Procedures used for the axenic culture and experimental treatment of bryophytes. In: J.M. Glime (Editor), *Methods in Bryology*. The Hattori Botanical Laboratory, Houghton, pp. 1-16.
- Bates, J.W., 2000.** Mineral nutrition, substratum ecology, and pollution. In: A.J. Shaw & B. Goffinet (Editors), *Bryophyte Biology*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 248-311.
- Baudin, J.P., Garnier - Laplace, J., Lambrechts, A. & Foulquier, L., 1989.** Données expérimentales sur les formes physico-chimiques de l'antimoine 125 et de l'argent 110m et sur les transferts à un poisson dulçaquicole, la carpe, CEA-R-5476, Saclay, France.
- Baudin, J.P., Lambrechts, A. & Pally, M., 1991.** Utilisation des mousses aquatiques comme bioindicateurs de contamination radioactive. *Hydroécologie Appliquée*, 3(2): 209-240.
- Beaugelin-Seiller, K., 1995.** Caractérisation de mousses dulçaquicoles comme indicateurs de contamination radioactive, Université de Montpellier II, Montpellier, 231 pp.
- Beaugelin-Seiller, K., Baudin, J.P. & Brottet, D., 1994.** Use of aquatic mosses for monitoring artificial radionuclides downstream of the nuclear power plant of Bugey (River Rhone, France). *Journal of Environmental Radioactivity*, 24(3): 217-233.
- Beaugelin-Seiller, K., Baudin, J.P. & Casellas, C., 1995.** Experimental study of the effects of various factors on the uptake of ⁶⁰Co by freshwater mosses. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 28(1): 125-133.
- Benson-Evans, K. & Williams, P.F., 1976.** Transplanting aquatic Bryophytes to assess river pollution. *Journal of Bryology*, 9: 81-91.

- Blandin, P., 1986.** Bioindicateur et diagnostic des systèmes écologiques. Bulletin d'Ecologie, T.17(4): 1-309.
- Bode, O., 1940.** Assimilation , Atmung, und Plastidenfarbstoffe in verschiedenfarbigen Licht aufgezogener *Fontinalis* Pflanzen. Jb. Wiss.Bot, 89: 208-244.
- Boulay, A., 1884.** Muscinées de la France - Première Partie - Mousses, Paris.
- Brooks, R.R., 1972.** Geobotany and Biogeochemistry in Mineral Exploitation. Harper and Row, New-York, 290 pp.
- Brown, D.H., 1982.** Mineral nutrition. In: A.J.E. Smith (Editor), Bryophyte Ecology. Academic Press, London, pp. 383-443.
- Brown, D.H. & Avalos, A., 1991.** Chemical control of cadmium uptake by *Peltigera*. Symbiosis, 11: 299-311.
- Brown, D.H. & Bates, J.W., 1990.** Bryophytes and nutrient cycling. Botanical Journal of Linnean Society, 104: 129-147.
- Brown, D.H. & Wells, J.M., 1988.** Sequential elution technique for determining the cellular location of cations. In: J.M. Glime (Editor), Methods in Bryology. The Hattori Botanical Laboratory, pp. 227-233.
- Brown, D.H. & Wells, J.M., 1990a.** The extracellular and intracellular uptake of inorganic chemicals by bryophytes. In: H.D.Z.a.R. Mues (Editor), Bryophytes: their Chemistry and Chemical Taxonomy. Clarendon press, Oxford, pp. 299-318.
- Brown, D.H. & Whitehead, A., 1986.** The effect of mercury on the physiology of *Rhytidiadelphus squarrosus* (Hedw.) Warnst. Journal of Bryology, 14: 367-374.
- Brown, H. & Wells, J.M., 1990b.** The extracellular and intracellular uptake of inorganic chemical by bryophytes. In: H.D. Zinsmeister & R. Mues (Editors), Bryophytes Their chemistry and chemical taxonomy. Oxford Science Publication, Oxford, pp. 299-335.
- Bruns, I., Friese, K., Markert, B. & Krauss, G.J., 1997.** The use of *Fontinalis antipyretica* L. ex Hedw. as a bioindicator for heavy metals. 2. Heavy metal accumulation and physiological reaction of *Fontinalis antipyretica* L. ex Hedw. in active biomonitoring in the river Elbe. The Science of the Total Environment, 204(2): 161-176.
- Bruns, I., Friese, K., Markert, B. & Krauss, G.-J., 1999.** Heavy metal inducible compounds from *Fontinalis antipyretica* reacting with Ellman's reagent are not phytochelatins. The Science of the Total Environment, 241: 215-216.
- Bruns, I. et al., 1995.** Analysis of heavy metals and sulphur-rich compounds in the water moss *Fontinalis antipyretica* L. ex Hedw. Fresenius' Journal of Analytical Chemistry, 353(1): 101-104.
- Bruns, I., Sutter, K., Menge, S., Neumann, D. & Krauss, G.-J., 2001.** Cadmium lets increase in glutathione pool in bryophytes. Journal of Plant Physiology, 158: 79-89.
- Buck, G.W. & Brown, D.H., 1979.** The effect of desiccation or cation location in lichens. Annals of Botany, 44: 265-277.
- Burton, M.A.S., 1979.** Studies on zinc localization in aquatic bryophytes. The Bryologist, 82(4): 594-598.
- Burton, M.A.S. & Peterson, P.J., 1979.** Metal accumulation by aquatic bryophytes from polluted mine streams. Environmental Pollution, 19(1): 39-46.
- Caines, L.A., Watt, A.W. & Wells, D.E., 1985.** The uptake and release of some trace metals by aquatic bryophytes in acidified waters in Scotland. Environmental Pollution (series b), 10: 1-18.
- Carballeira, A., Diaz, S., Vazquez, M.D. & Lopez, J., 1998.** Inertia and resilience in the responses of the aquatic bryophyte *Fontinalis antipyretica* Hedw. to thermal stress. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 34(4): 343-349.
- Carballeira, A. & Lopez, J., 1997.** Physiological and statistical methods to identify background levels of metals in aquatic bryophytes - dependence an lithology. Journal of Environmental Quality, 26(4): 980-988.

- Carballeira, A., Vazquez, M.D. & Lopez, J., 2001.** Biomonitoring of sporadic acidification of rivers on the basis of release of preloaded cadmium from the aquatic bryophyte *Fontinalis antipyretica* Hedw. *Environmental Pollution*, 111(1): 95-106.
- Cenci, R.M., 2000.** The use of aquatic moss (*Fontinalis antipyretica*) as monitor of contamination in standing and running waters: limits and advantages. *Journal of Limnology*, 60(Suppl.1): 53-61.
- Cenci, R.M., 2001.** I muschi acquatici utilizzati come indicatori e accumulatori di metalli: limiti e vantaggi. *Bollettino della Società Italiana della Scienza del Suolo*, 50(3): 633-639.
- Chatenet, P. & Botineau, M., 2001.** Utilisation des lichens dans la mise en évidence des éléments traces présents dans les cours d'eau. *Cryptogamie Mycologie*, 22(3): 225-237.
- Christmas, M. & Whitton, B.A., 1998a.** Phosphorus and aquatic bryophytes in the Swale-Ouse river system, north-east England - 1 - relationship between ambient phosphate, internal N:P ratio and surface phosphatase activity. *The Science of the Total Environment*, 210(1-6): 389-399.
- Christmas, M. & Whitton, B.A., 1998b.** Phosphorus and aquatic bryophytes in the Swale-Ouse river system, north-east England - 2 - Phosphomonoesterase and phosphodiesterase activities on *Fontinalis antipyretica*. *The Science of the Total Environment*, 210/211: 401-409.
- Ciffroy, P., Vazelle, D. & Claveri, B., 1994.** Méthode de mesure de micropolluants biodisponibles basée sur l'utilisation de bryophytes en milieu contrôlé et sur un modèle numérique d'interprétation quantitative: dossier technique. HE-31/94/14, EDF, Chatou.
- Claveri, B., Guérol, F. & Pihan, J.C., 1993.** Acidification des ruisseaux du massif Vosgien et contamination métallique (Al, Mn, Pb, Cd): mise en évidence dans l'eau et dans les bryophytes aquatiques. *Hydroécologie Appliquée*, 5(1): 111-125.
- Claveri, B. & Mersch, J., 1998.** Les bryophytes comme outil de surveillance de la qualité des eaux courantes par les micropolluants métalliques: Concept, méthodologie et interprétation des données, Université de Metz, Agences de l'Eau, Metz.
- Claveri, B., Morhain, E. & Mouvet, C., 1994.** A methodology for the assessment of accidental copper pollution using the aquatic moss *Rhynchostegium riparioides*. *Chemosphere*, 28(11): 2001-2010.
- Claveri, B. & Mouvet, C., 1995.** Temperature effects on copper uptake and CO₂ assimilation by the aquatic moss *Rhynchostegium riparioides*. *Archives of Environmental Contamination & Toxicology*, 28(3): 314-320.
- Clymo, R.S., 1963.** Ion exchange in Sphagnum and its relation to bog ecology. *Annals of Botany*, 27: 309-324.
- Corradini, P., 1996.** Aide à la décision dans le choix des méthodes de culture des Bryophytes: revue bibliographique critique. *Cryptogamie, Bryol. Lichénol.*, 17(2): 103-117.
- Crandall-Stotler, B. & Stotler, R.E., 2000.** Morphology and classification of the Marchantiophyta. In: A.J. Shaw & B. Goffinet (Editors), *Bryophyte Biology*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 21-70.
- Croisetiere, L., Hare, L. & Tessier, A., 2001.** Influence of current velocity on cadmium accumulation by an aquatic moss and the consequences for its use as a biomonitor. *Environmental Science and Technology*, 35(5): 923-927.
- Crowder, A., 1991.** Acidification, metals and macrophytes. *Environmental Pollution*, 71: 171-203.
- Crum, H., 2001.** Structural Diversity of Bryophytes. The University of Michigan, Michigan, 379 pp.

- Crum, H.A. & Anderson, L.E., 1981.** Mosses of Eastern North America. Columbia University Press, New York, 1328 pp.
- Delépée, R. & Pouliquen, H., 2002.** Determination of oxolinic acid in the bryophyte *Fontinalis antipyretica* by liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography B*, 775(1): 89-95.
- Denayer, F.O., 2000.** Ecotoxicité des éléments traces métalliques chez les bryophytes., Université de Metz, Metz, 231 pp.
- Dierßen, K., 2001.** Distribution, ecological amplitude and phytosociological characterization of european bryophytes, Band 56. *Bryophytorum Bibliotheca*, Berlin, Stuttgart, 289 pp.
- Dietz, F., 1976.** Estimation de la pollution par métaux lourds dans la Somme par l'analyse des bryophytes aquatiques. *Bulletin Français de Pisciculture*, 48: 138-142.
- Empain, A., 1973.** La végétation bryophytique aquatique et subaquatique de la Sambre Belge, son déterminisme écologique et ses relations avec la pollution des eaux. *Lejeunia*, 69: 1-58.
- Empain, A., 1974.** Relations quantitatives entre les Bryophytes de la Sambre Belge et leur fréquences d'émersion: distribution verticale et influence de la pollution. *Bulletin de la Société Royale Botanique de Belgique*, 107: 361-374.
- Empain, A., 1976.** Les bryophytes aquatiques utilisés comme traceurs de la contamination en métaux lourds des eaux douces. *Memoirs Société Royale Botanique Belge*, 7: 141-156.
- Empain, A., 1978.** Relations quantitatives entre les populations de bryophytes aquatiques et la pollution des eaux courantes. Définition d'un indice de la qualité des eaux. *Hydrobiologia*, 60: 49-74.
- Empain, A., 1988.** A posteriori detection of heavy metal pollution of aquatic habitats. In: J.M. Glime (Editor), *Methods in Bryology*. Hattori Bot. Lab., Mainz, pp. 213-220.
- Empain, A., Lambinon, J., Mouvet, C. & Kirchmann, R., 1980.** Utilisation des Bryophytes aquatiques et subaquatiques comme bioindicateurs biologiques de la qualité des eaux courantes. In: P. Pesson (Editor), *La pollution des eaux continentales- Incidences sur les biocénoses aquatiques* (2è éd.). Bordas, Paris, pp. 195-223.
- Engelmann, M. & Weeks, T., 1985.** An analysis of the effects of strip mining disturbance on bryophytes species diversity. *The Bryologist*, 88(4): 344-349.
- Engleman, C.J. & McDiffett, W.F., 1996.** Accumulation of aluminium and iron by bryophytes in streams affected by acid-mine drainage. *Environmental Pollution*, 94(1): 67-74.
- Everard, M. & Denny, P., 1985.** Flux of lead in submerged plants and its relevance to a freshwater system. *Aquatic Botany*, 21: 181-193.
- Fink, U. & Panten, T., 1993.** Biomonitoring von Radionukliden in der Mosel bei Cattenom mit dem aquatischen Moos *Fontinalis antipyretica*- Bewertung von ersten Messergebnissen, Greenpeace Luxembourg.
- Foulquier, L., 1978.** Etude des processus d'adsorption et de désorption de radionucléides par des végétaux dulçaquicoles. Données synthétiques sur les publications de radiohydrobiologie de la section radioécologie, 229: 14-53.
- Foulquier, L. & Hébrard, J.-P., 1976.** Etude expérimentale de la fixation et de décontamination du sodium 22 par une mousse dulçaquicole *Platyhypnidium riparioides* (Hedw.). *Oecologia Plantarum*, 11: 267-276.
- Frahm, J.P., 1976.** Weitere Toxizitätsversuche an Wassermoosen. *Gewässer und Abwässer*, 60/61: 113-123.
- Frahm, J.-P., 2001.** Biologie der Moose. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 357 pp.

- Frisque, G., 1981.** Accumulation par des bryophytes aquatiques de la Meuse de deux micropolluants: les polychlorobiphényles et le gamma-HCH, Université de Liège, Liège.
- Frisque, G.E., Galoux, M. & Bernes, A., 1983.** Accumulation de deux micropolluants (les polychlorobiphényles et le gamma -HCH) par des bryophytes aquatiques de la Meuse. Med. Fac. Landbouww. Rijksuniv. Gent., 48(4): 971-983.
- Gagnon, C., Vaillancourt, G. & Pazdernik, L., 1998.** Influence of water hardness on accumulation and elimination of cadmium in two aquatic mosses under laboratory conditions. Archives of Environmental Contamination & Toxicology, 34(1): 12-20.
- Gallissot, B., 1988.** Mise en évidence du potentiel bioaccumulateur des bryophytes aquatiques vis-à-vis des PCB et des pesticides organochlorés, Université de Metz, Metz, 273 pp.
- Garnier - Laplace, J. & Adam, C., 2001.** Radioécologie: concepts de base et analyse écotoxicologique des rejets de radionucléides sur les écosystèmes aquatiques continentaux, DEA National de Toxicologie- option toxicologie de l'environnement, Paris, pp. 28.
- Garnier - Laplace, J., Baudin, J.P. & Foulquier, L., 1992.** Experimental study of ^{110m}Ag transfer from sediment to biota in a simplified freshwater ecosystem. Hydrobiologia, 235/236: 396-406.
- Garnier, J. & Baudin, J.P., 1989.** Accumulation and depuration of ^{110m}Ag by a planktonic alga, *Scenedesmus obliquus*. Water Air and Soil Pollution, 45: 287-299.
- Garrec, J.P. & Van Haluwyn, C., 2002.** Biosurveillance végétale de la qualité de l'air: Concepts, méthodes et applications. Lavoisier, Paris, 117 pp.
- Gimeno, C. & Pusche, F., 1999.** Chlorophyll content and morphological changes in cellular structure of *Rhynchostegium riparoides* (Hedw.) Card. (Brachytheciaceae, Musci) in response to water pollution and transplant container on Palancia river (East, Spain). Nova Hedwigia, 68(1-2): 197-216.
- Gjengedal, E. & Steinnes, E., 1990.** Uptake of metal ions in moss from artificial precipitation. Environmental Monitoring and Assessment, 14: 77-87.
- Glime, J.M., 1984.** Theories on adaptation to high light intensity in the aquatic moss *Fontinalis*. Journal of Bryology, 13: 257-262.
- Glime, J.M., 1987.** Growth model for *Fontinalis duriaei* based on temperature and flow conditions. Journal of the Hattori Botanical Laboratory, 62: 101-109.
- Glime, J.M. & Clemons, R., 1972.** Species diversity of stream insects on *Fontinalis* spp. compared to diversity on artificial substrates. Ecology, 53(3): 458-463.
- Glime, J.M. & Vitt, D.H., 1984.** The physiological adaptation of aquatic Musci. Lindbergia, 10: 41-52.
- Goncalves, E., Boaventura, R. & Mouvet, C., 1992.** Sediments and aquatic mosses as pollution indicators for heavy metals in the Ave river basin (Portugal). The Science of the Total Environment, 114(0): 7-24.
- Goncalves, E., Soares, H., Boaventura, R., Machado, A. & Dasilva, J., 1994.** Seasonal variations of heavy metals in sediments and aquatic mosses from the Cavado river basin (Portugal). The Science of the Total Environment, 142(3): 143-156.
- Goncalves, E.P. & Boaventura, R.A.R., 1998.** Uptake and release kinetics of copper by the aquatic moss *Fontinalis antipyretica*. Water Research, 32(4): 1305-1313.
- Hancock, P.M., Yasin, M., Baugh, P.J., Bonwick, G.A. & Davies, D.H., 1997.** Optimization of high quality analytical methods for the monitoring of pyrethroid moth proofing agents by gas chromatography mass spectrometry operated in negative-ion chemical ionization mode. International Journal of Environmental Analytical Chemistry, 67(1-4): 81-95.

- Haury, J., 1994.** The macrophytes, indicators of river quality. In: C. éditions (Editor), Etat de santé des écosystèmes aquatiques - Les variables biologiques comme indicateurs. Ministère de l'environnement & GIS sur les hydrosystèmes, Paris, pp. 195-213.
- Haury, J. et al., 2000.** Les macrophytes aquatiques bioindicateurs des systèmes lotiques-Intérêts et limites des indices macrophytiques. Synthèse bibliographique des principales approches européennes pour le diagnostic biologique des cours d'eau, UMR INRA-ENSA EQHC Rennes & CREUM-Phytoécologie Univ. Metz. Agence de l'eau Artois Picardie.
- Haury, J. et al., 1996.** Des indices macrophytiques pour estimer la qualité des cours d'eau français: premières propositions. *Ecologie*, 27(4): 233-244.
- Hébrard, J.-P. & Foulquier, L., 1975.** Introduction à l'étude de la fixation du manganèse-54 par *Platyhypnidium riparioides* (Hedw.) Dix. *Revue Bryologique et Lichénologique*, 41(1): 35-53.
- Hébrard, J.-P., Foulquier, L. & Grauby, A., 1969.** Aperçu sur les modalités de la contamination d'une mousse dulcicole, *Platyhypnidium riparioides* (Hedw.) Dix. par le césium-137 et le strontium-90. *Revue Bryologique et Lichénologique*, 36: 219-242.
- Hongve, D., Brittain, J.E. & Bjørnstad, H.E., 2002.** Aquatic moss as a monitoring tool for ¹³⁷Cs contamination in streams and rivers - a field study from central southern Norway. *Journal of Environmental Radioactivity*, 60: 139-147.
- I.f.e.n., 2000.** Les pesticides dans les eaux. Bilan 1997-1998, Institut français de l'environnement, Orléans.
- Jacobson, L., Hannapel, R., Moore, D. & Schaedle, M., 1960.** Influence of calcium on selectivity of ion absorption process. *Plant Physiology*: 58-61.
- Jenkins, J.T., 1982.** Effects of flowrate on the ecology of aquatic bryophytes. PhD Thesis, Exeter, Exeter.
- Johnston, W. & Proctor, J., 1977.** Metal concentration in plants and soils from two british serpentine sites. *Plant Soil*, 46: 275-278.
- Jones, K.C., 1985.** Gold, silver and other elements in aquatic bryophytes from a mineralised area of North Wales, U.K. *Journal of Geochemical Exploration*, 24: 237-246.
- Jones, K.C., Peterson, P.J. & Davies, B.E., 1985.** Silver and other metals in some aquatic bryophytes from streams in the lead mining district of Mid-Wales, Great Britain. *Water Air Soil and Pollution*, 24: 329-338.
- Kelly, M.G., Girton, C. & Whitton, B.A., 1987.** Use of moss-bags for monitoring heavy metals in rivers. *Water Research*, 21(11): 1429-1435.
- Kelly, M.G. & Whitton, B.A., 1987.** Growth rate of the aquatic moss *Rhynchostegium riparioides* in Northern England. *Freshwater Biology*, 18: 461-468.
- Kirchmann, R. & Cantillon, G., 1971.** Comportements, en rivière, des radiocobalts et du radiomanganèse provenant d'effluents d'une centrale PWR. In: C.o.t.E. Communities (Editor), Symposium International Radioécologie Applied to the Protection of Man and his Environment, Roma, Italia, pp. 22.
- Kovács, M., 1978.** The element accumulation in submerged aquatic plant species in lake Balaton. *Acta Botanica Academiae Scientiarum hungaricae*, 24: 273-283.
- Kovács, M. & Podani, J., 1986.** Bioindication: a short review on the use of plants as indicators of heavy metals. *Acta Biologica Hungarica*, 37(1): 19-29.
- Lagadic, L., Caquet, T. & Amiard, J.C., 1997.** Biomarqueurs en écotoxicologie: principes et définitions. In: C.T. Lagadic L, Amiard J.C, Ramade, F. (Editor), Biomarqueurs en écotoxicologie: Aspects Fondamentaux. Masson, Paris, pp. 1-10.
- Lecointre, G. & Le Guyader, H., 2001.** Classification phylogénétique du vivant. BELIN, Paris, 543 pp.
- Lehtonen, J., 1989.** Effects of acidification on the metal level in aquatic macrophytes in Espoo, S. Finland. *Annales Botanici Fennici*, 26: 39-50.

- Lithner, G., Holm, K. & Borg, H., 1995.** Bioconcentration factors for metals in humic waters at different pH in the Ronnskar area (Sweden). *Water, Air, & Soil Pollution*, 85(2): 785-790.
- Lopez, J. & Carballeira, A., 1989.** A comparative study of pigment content response to stress in five species of aquatic Bryophytes. *Lindbergia*, 15: 188-194.
- Lopez, J. & Carballeira, A., 1993.** Interspecific differences in metal bioaccumulation and plant-water concentration ratios in five aquatic bryophytes. *Hydrobiologia*, 263(2): 95-107.
- Lopez, J., Retuerto, R. & Carballeira, A., 1997.** D665/D665a index vs frequencies as indicators of bryophyte response to physicochemical gradients. *Ecology*, 78(1): 261-271.
- Lopez, J., Vazquez, M.D. & Carballeira, A., 1994.** Stress responses and metal exchange kinetics following transplant of the aquatic moss *Fontinalis antipyretica*. *Freshwater Biology*, 32(1): 185-198.
- Maiss, M., 1988.** Mousses aquatiques comme bioindicateurs de la pollution par les pesticides et les PCBs dans les cours d'eau luxembourgeois ainsi que dans les eaux de percolation d'une décharge sarroise, Fondation Universitaire Luxembourgeoise, Arlon, Belgique.
- Malcom, B. & Malcom, N., 2000.** Mosses and other bryophytes, an illustrated glossary. Micro-Optics press, Nelson, New Zealand.
- Markert, B. & Wtorova, W., 1992.** Inorganic chemical investigations in the Forest Biosphere Reserve near Kalinin. Part 3. Comparison of the multielement budget with a forest ecosystem in Germany-aspects of rejection indication and accumulation of chemicals elements. *Vegetatio*, 98: 43-58.
- Martínez-Abaigar, J. & Núñez-Olivera, E., 1998.** Ecophysiology of photosynthetic pigments in aquatic Bryophytes. In: J.W. Bates, N.W. Ashton & J.G. Duckett (Editors), *Bryology for the Twenty-first Century*. British Bryological Society, pp. 277-292.
- Martinez-Abaigar, J., Nuñez-Olivera, E. & Sanchez-Diaz, M., 1993.** Effects of organic pollution on transplanted aquatic bryophytes. *Journal of Bryology*, 17(4): 553-566.
- Matsuo, A., Hamasaki, K. & Nozaki, H., 1996.** Phaeophytins from a cell suspension culture of the liverwort *Plagiochila ovalifolia*. *Phytochemistry*, 42(2): 427-430.
- Maurel-Kermarrec, A., Pally, M., Foulquier, L. & Hébrard, J.P., 1983.** Cinétique de la fixation d'un mélange de césium 137, de chrome 51, de cobalt 6, de manganèse 54 et de sodium 22 par *Platyhypnidium riparoides* (Hedw.) Dix. *Cryptogamie, Bryologie et Lichénologie*, 4(4): 299-313.
- McLean, R.O. & Jones, A.K., 1975.** Studies of tolerance to heavy metals in the flora of the rivers Ystwyth and Clarach, Wales. *Freshwater Biology*, 5: 431-444.
- McQueen, C.B., 1991.** Laboratory and greenhouse culture and the experimental taxonomic of bryophytes. *Advances in Bryology*, 4: 103-120.
- Mersch, J., 1993.** Modalités d'utilisation de la moule zébrée *Dreissena polymorpha* en tant qu'indicateur biologique de la contamination des écosystèmes d'eau douce par les métaux lourds comparaison avec un autre type d'organismes sentinelles, les mousses aquatiques, Université de Metz, Metz, 213 pp.
- Mersch, J. & Claveri, B., 1998.** Les bryophytes aquatiques comme outil de surveillance de la contamination des eaux courantes par les micropolluants métalliques: concept, méthodologie et interprétation des données. Etude Inter-Agence n°55, Agences de l'Eau, Ministère de l'Environnement, Université de Metz, Paris.
- Mersch, J. & Kass, M., 1994.** La mousse aquatique *Fontinalis antipyretica* comme traceur de la contamination radioactive de la Moselle en aval de la centrale de Cattenom. *Bull. Soc. Nat. Luxemb.*, 95: 109-117.

- Mersch, J. & Pihan, J.C., 1993.** Simultaneous assessment of environmental impact on condition and trace metal availability in zebra mussels *Dreissena polymorpha* transplanted into the Wiltz River, Luxembourg: Comparison with the aquatic moss *Fontinalis antipyretica*. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 25: 353-364.
- Mouvet, C., 1979.** Utilisation des bryophytes aquatiques pour l'étude de la pollution des cours d'eaux par les métaux lourds et les radioéléments. Revue de Biologie et d' Ecologie méditerranéenne, 6(3-4): 193-204.
- Mouvet, C., 1984a.** Métaux lourds et mousses aquatiques. Spéciations physico-chimiques, bioaccumulation et toxicité, Université de Liège, Belgique, 157 pp.
- Mouvet, C., 1984b.** Mousses aquatiques et micropollution, Agence de bassin Rhône Méditerranée Corse, Laboratoire d'Ecologie, Université de Metz, Metz.
- Mouvet, C., 1985.** The use of aquatic bryophytes to monitor heavy metals pollution of freshwaters as illustrated by case studies. Verh. Internat. Verein. Limnol., 22: 2420-2425.
- Mouvet, C., 1986.** Métaux lourds et mousses aquatiques: Synthèse méthodologique, Université de Metz, Agence de l'Eau Rhin-Meuse, Agence de l'eau Rhône Méditerranée Corse, Metz.
- Mouvet, C., 1994.** Métaux lourds et mousses aquatiques ; Standardisation des aspects analytiques; 2ème phase: calibration multilaboratoires. Etude Inter-Agences N°34, Les Agences de l'Eau.
- Mouvet, C. & Claveri, B., 1999.** Localization of copper accumulated in *Rhynchostegium riparioides* using sequential chemical extraction. Aquatic Botany, 63(1): 1-10.
- Mouvet, C., Couturieux, N. & Morhain, E., 1989.** Mousses aquatiques et métaux lourds en Loire-Bretagne campagne 1988, Agence de l'eau Loire Bretagne, B.R.G.M, Orléans/Metz.
- Mouvet, C., Gallissot, B. & Cordebar, P., 1985a.** Micropolluants organochlorés et mousses aquatiques, Rapport de contrat à l'Agence Financière de Bassin Rhin-Meuse, Moulins-lès-Metz.
- Mouvet, C. et al., 1986a.** Dosage de PCBs et de métaux lourds dans les mousses aquatiques de la Seine entre Melun et Port Jérôme, Laboratoire d'écologie- Université de Metz Agence financière de bassin Seine/Normandie, Metz.
- Mouvet, C., Galoux, M. & Bernes, A., 1985b.** Monitoring of polychlorinated biphenyls (PCBs) and hexachlorocyclohexanes (HCH) in freshwaters using the aquatic moss *Cinclidotus danubicus*. Science of the Total Environnement, 44: 253-267.
- Mouvet, C., Morhain, E., Sutter, C. & Couturieux, N., 1993.** Aquatic mosses for the detection of follow-up of accidental discharges in surface waters. Water, Air and Soil Pollution, 66: 333-348.
- Mouvet, C., Pattee, E. & Cordebar, C., 1986b.** Utilisation des mousses aquatiques pour l'identification et la localisation précise de sources de pollution métallique multiforme. Acta Oecologia, Oecologia Applicata, 7: 77-91.
- Nelson, S.M. & Campbell, S.G., 1995.** Integrated assessment of metals contamination in a lotic system using water chemistry, transplanted bryophytes, and macroinvertebrates. Journal of Freshwater Ecology, 10(4): 409-420.
- Nieto, M., 1967.** Los pigmentos como indicadores ecologicos de las aguas corrientes del centro de Espana, Universidad de Madrid, Madrid.
- Nunez-Olivera, E., Garcia-Alvaro, M.A., Beaucourt, N. & Martinez-Abaigar, J., 2001.** Changes in element concentrations in aquatic bryophytes over an annual cycle. Archiv fur Hydrobiologie, 152(2): 253-277.
- Pandey, N. & Sharma, C.P., 2002.** Effects of heavy metals Co^{2+} , Ni^{2+} and Cd^{2+} on growth and metabolism of cabbage. Plant Science, 163: 753-758.

- Penuelas, J., 1984.** Pigment of aquatic mosses of the river Muga, NE Spain, and their response to water pollution. *Lindbergia*, 10: 127-132.
- Picat, P., 1987.** Effluents liquides. In: S.f.d.r.d. Sud-Est (Editor), Impacts dans l'environnement des centrales électronucléaires. Programme de recherche EDF, CEN Cadarache, France, pp. 22.
- Pickering, D.C. & Puia, I.L., 1969.** Mechanism for the uptake of zinc by *Fontinalis antipyretica*. *Physiologia plantarum*, 22: 653-661.
- Plaetzer, H., 1917.** Untersuchungen über die Assimilation und Atmung von Wasserpflanzen. *Physik. Medizin. Gesellsch.*, 45: 31-101.
- R.N.B.R.M.C., 2001.** Qualité des cours d'eau - Résultats 2000, D.I.R.E.N Rhône-Alpes Agence de l'Eau Rhône-Méditerranée-Corse, Lyon, France.
- Rasmussen, S. & Rudolph, H., 1997.** Isolation, purification and characterization of UDP-glucose: cis-p-coumaric acid beta-D-glucosyltransferase from *Sphagnum fallax*. *Phytochemistry*, 46(3): 449-453.
- Rausch de Traubenberg, C. & Ah-Peng, C., sous presse.** A procedure to purify and culture a clonal-strain of the aquatic moss *Fontinalis antipyretica* for use as a bioindicator of heavy metals. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*.
- Rauser, W., 1995.** Phytochelatins and related peptides. *Plant Physiology*, 109: 1141-1149.
- Raven, P.H., Evert, R.F. & Eichhorn, S.E., 2000.** Biologie végétale. De Boeck Université, Bruxelles, 927 pp.
- Rehe, W.G. & Nimmo, D.W.R., 2001.** Culturing the bryophyte *Hygrohypnum ochraceum* for use as an instream monitor of metals. *Journal of Freshwater Ecology*, 16(3): 375-379.
- Robinson, G.D., 1981.** Adsorption of Cu, Zn and Pb near sulfide deposits by hydrous manganese-iron oxide coatings on stream alluvium. *Chemical Geology*, 33: 65-79.
- Roeck, U., Trémolières, M., Exinger, A. & Carbiener, R., 1991.** Les mousses aquatiques, bioindicateurs du niveau de pollution chimique. Utilisation des mousses aquatiques dans une étude sur le transfert du mercure en tant que descripteur du fonctionnement hydrologique (échanges cours d'eau - nappe) en plaine d'Alsace. *Hydroécologie Appliquée*, 3(2): 241-256.
- Roy, S. & Hanninen, O., 1994.** Pentachlorophenol: uptake, elimination and metabolism in aquatic plants, *Eichhornia crassipes*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 13: 763-773.
- Roy, S., Pellinen, J., Sen, C.K. & Hanninen, O., 1994.** Benzo(a)anthracene and benzo(a)pyrene exposure in the aquatic plant *Fontinalis antipyretica* - uptake, elimination and the responses of biotransformation and antioxidant enzymes. *Chemosphere*, 29(6): 1301-1311.
- Roy, S., Sen, C.K. & Hanninen, O., 1996.** Monitoring of polycyclic aromatic hydrocarbons using 'moss bags': Bioaccumulation and responses of antioxidant enzymes in *Fontinalis antipyretica* Hedw. *Chemosphere*, 32(12): 2305-2315.
- Ruttner, F., 1948.** Zur Frage der Karbonatassimilation der Wasserpflanzen. II. Des Verhalten von *Elodea canadensis* und *Fontinalis antipyretica* in Lösungen von Natrium- bzw. Kaliumbikarbonat. *Oesterr. Bot. Z.*, 95: 208-238.
- Samecka Cymerman, A. & Kempers, A.J., 1994.** Macro- and microelements in bryophytes from serpentinite and greenstone streams. *Pol. Arch. Hydrobiol.*, 41: 431-449.
- Samecka-Cymerman, A. & Kempers, A.J., 1998.** Comparison between natural background concentrations of heavy metals in bryophytes from the Sudety mountains and swiss Alps. *Chemosphere*, 36(12): 2661-2671.
- Samecka-Cymerman, A. & Kempers, A.J., 2001.** Concentrations of heavy metals and plant nutrients in water, sediments and aquatic macrophytes of anthropogenic lakes (former

- open cut brown coal mines) differing in stage of acidification. *Science of the Total Environment*, 281(1-3): 87-98.
- Samecka-Cymerman, A., Kempers, A.J. & Kolon, K., 2000.** Concentrations of heavy metals in aquatic bryophytes used for biomonitoring in rhyolite and trachybasalt areas: a case study with *Platyhypnidium rusciforme* from the Sudety Mountains. *Annales Botanici Fennici*, 37: 95-104.
- Sargent, 1988.** A guide to the axenic culturing of a spectrum of bryophytes. In: J.M. Glime (Editor), *Methods in bryology*. The Hattori Botanical Laboratory, Nichinan, pp. 17-24.
- Satofuka, H., Fukui, T., Takagi, M., Atomi, H. & Imanaka, T., 2001.** Metal-binding properties of phytochelatin-related peptides. *Journal of Inorganic biochemistry*, 86: 595-602.
- Say, P.J., Harding, J.P.C. & Whitton, B.A., 1981.** Aquatic mosses as monitor of heavy metal contamination in the river Etherow, Great Britain. *Environmental pollution*, (serie b) 2: 285-307.
- Say, P.J. & Whitton, B.A., 1983.** Accumulation of heavy metals by aquatic mosses. 1: *Fontinalis antipyretica* Hedw. *Hydrobiologia*, 100: 245-260.
- Schneider, M.J., Voth, P.D. & Troxler, R.F., 1967.** Methods of propagating bryophytes plants, tissues and propagules. *Bot. Gaz. (Chicago)*, 128: 169-174.
- Sergio, C., Figuera, R. & Viegas Crespo, A.M., 2000.** Observation of heavy metal accumulation in the cell walls of *Fontinalis antipyretica*, in a Portuguese stream affected by mine effluent. *Journal of Bryology*, 22: 251-255.
- Shaw, A.J., 1987.** Effect of experimental pretreatment on tolerance to copper and zinc in the moss *Funaria hygrometrica*. *American Journal of Botany*, 74(10): 1466-1476.
- Shaw, A.J. & Allen, B., 2000.** Phylogenetic Relationships, Morphological Incongruence, and Geographic Speciation in the Fontinalaceae (Bryophyta). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 16(2): 225-237.
- Shaw, J., 1986.** A new approach to the experimental propagation of bryophytes. *Taxon*, 35(4): 671-675.
- Siebert, A., Bruns, I., Krauss, G.J., Miersch, J. & Markert, B., 1996.** The use of the aquatic moss *Fontinalis antipyretica* L. ex Hedw as a bioindicator for heavy metals 1-Fundamental investigations into heavy metal accumulation in *Fontinalis antipyretica* L. ex Hedw. *The Science of the Total Environment*, 177: 137-144.
- Smith, A.J.E., 1978.** The moss flora of Britain and Ireland. Cambridge University Press, Cambridge, 706 pp.
- Spearing, A.M., 1972.** Cation-exchange capacity and galacturonic acid content of several species of *Sphagnum* in Sandy Ridge Bog, Central New York State. *The Bryologist*, 75(2): 154-158.
- Steen, W.C. & Karickhoff, S.W., 1981.** Biosorption of hydrophobic organic pollutants by microbial populations. *Chemosphere*, 10: 27-32.
- Stobart, A.K., Griffith, W.T., Bukhari, I.A. & Sherwood, R.P., 1985.** The effect of Cd²⁺ on the biosynthesis of chlorophyll in leaves of barley. *Physiologia plantarum*, 63: 293-298.
- Thiebaut, G., Vanderpoorten, A., Guerold, F., Boudot, J.P. & Muller, S., 1998.** Bryological patterns and streamwater acidification in the Vosges mountains (N.E. France): an analysis tool for the survey of acidification processes. *Chemosphere*, 36(6): 1275-1289.
- Vanderpoorten, A., 1999.** Aquatic bryophytes for a spatio-temporal monitoring of the water pollution of the rivers Meuse and Sambre (Belgium). *Environmental Pollution*, 104(3): 401-410.

- Vazquez, M.D., Lopez, J. & Carballeira, A., 1999.** Uptake of heavy metal to the extracellular and intracellular compartment in tree species of aquatic bryophytes. *Ecotoxicology and Environment Savety*, 44: 12-24.
- Vincent, C.D., Lawlor, A.J. & Tipping, E., 2001.** Accumulation of Al, Mn, Fe, Cu, Zn, Cd and Pb by the bryophyte *Scapania undulata* in three upland waters of different pH. *Environmental Pollution*, 114(1): 93-100.
- Vray, F., Baudin, J.P. & Svaclenkova, M., 1992.** Effects of some factors on uptake and release of ruthenium-106 by a freshwater moss, *Platyhypnidium riparioides*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 23(2): 190-197.
- Wehr, J.D. & Whitton, B.A., 1983a.** Accumulation of heavy metals by aquatic mosses. 2: *Rhynchostegium riparioides*. *Hydrobiologia*, 100: 261-284.
- Wehr, J.D. & Whitton, B.A., 1983b.** Accumulation of heavy metals by aquatic mosses. 3: Seasonal changes. *Hydrobiologia*, 100: 285-291.
- Welch, W.H., 1960.** A monograph of the Fontinalaceae. Martinus Nijhoff, The Hague, 348 pp.
- Wells, J.M. & Brown, D., 1990.** Ionic control of intracellular and extracellular Cd uptake by the moss *Rhytidiadelphus squarrosus* (Hedw.) Warnst. *New Phytologist*, 116: 541-553.
- Whitehead, N.E. & Brooks, R.R., 1969.** Aquatic bryophytes as indicators of uranium mineralization. *The Bryologist*, 72: 501-507.
- Whitton, B.A. & Say, P.J., 1975.** Heavy metals. In: B.A. Whitton (Editor), *River Ecology*. Blackwell Sci. Publ., Oxford, pp. 286-311.
- Whitton, B.A., Say, P.J. & Jupp, B.P., 1982.** Accumulation of zinc, cadmium and lead by the aquatic liverwort *Scapania*. *Environmental Pollution (serie b)*, 3: 299-316.
- Wong, P.K. & Chang, L., 1991.** Effects of copper, chromium and nickel on growth, photosynthesis and chlorophyll a synthesis of *Chlorella pyrenoidosa*. *Env. Pollution*, 72: 1299-1307.
- Yoshimura, E. et al., 1998.** Accumulation of metals and cellular distribution of aluminium in the liverwort *Scapania undulata* in acidic and neutral streams in Japan. *Journal of Environmental Science & Health Part A Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering*, 33(4): 671-680.
- Zenk, M.H., 1996.** Heavy metal detoxification in higher plants- a review. *Gene*, 179: 21-30.

ANNEXES

ANNEXE 1 : Recette pour 100 mL de solution Metal 49

2 solutions concentrées sont préparées

Solution A :

- Peser les poudres de Fe, Mn, Zn, Cu, Co, B, les verser dans un bécher de 20 ml.
- Ajouter 8 mL d'acide sulfosalicylique
- Mélanger en chauffant
- Verser la solution dans l'éprouvette
- Compléter à 8 mL avec de l'eau Milli-Q
- Compléter à 11 mL avec l'acide sulfosalicylique

Solution B :

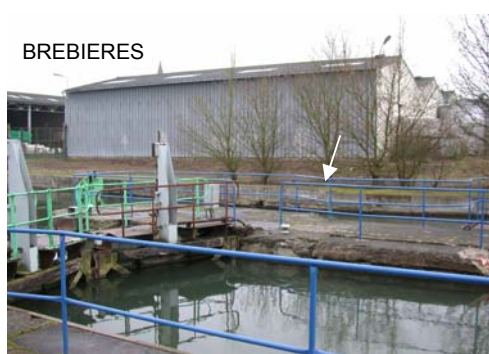
- Peser les poudres Mo (0,0736 g) et V (0,0462 g)
- Les verser dans un bécher de 15-20 mL
- Ajouter 7 mL de solution sulfosalicylique
- Remuer en chauffant
- Verser la solution dans l'éprouvette
- Compléter à 10 mL avec l'acide sulfosalicylique.

Pour 100 mL de solution Metal 49 :

- Prélever 1 mL de la solution B
- Le verser dans la solution A
- Ajouter 1 mL d'acide sulfosalicylique
- Verser le tout dans une éprouvette de 100 mL
- Compléter avec de l'eau Milli-Q.

ANNEXE 2 : Photographies

Sites d'étude dans le Nord-Pas-de-Calais



Ah-Peng, 2003

Cage des transplants



ANNEXE 3 : Expérience KNOP

Croissance de *F. antipyrretica* pour quatre dilutions du milieu Knop testées (n=4 ; Moy. $\pm$ ET)

	K	K/5	K/10	K/20
22/01/2003	2,00	2,00	2,00	2,00
29/01/2003	2,23 $\pm$ 0,11	2,41 $\pm$ 0,13	2,42 $\pm$ 0,32	2,39 $\pm$ 0,21
06/02/2003	2,55 $\pm$ 0,31	3,16 $\pm$ 0,56	2,94 $\pm$ 0,85	2,94 $\pm$ 0,62
12/02/2003	2,76 $\pm$ 0,07	4,00 $\pm$ 1,02	3,33 $\pm$ 0,72	3,37 $\pm$ 1,23
19/02/2003	3,52 $\pm$ 0,52	4,85 $\pm$ 1,04	3,96 $\pm$ 1,11	4,06 $\pm$ 1,75
26/02/2003	3,86 $\pm$ 0,38	5,65 $\pm$ 1,64	4,31 $\pm$ 1,34	4,45 $\pm$ 2,22

Données sur le pH dans les milieux testés.

pH	K	K/5	K/10	K/20
22,01,03	5,26	6,52	7,05	8,42
06,02,03	5,7	6,4	6,64	6,99
19,02,03	5,51	6,45	6,69	7,12

Données sur les taux de croissance du brin principal et des ramifications latérales de *F. antipyrretica* (Moy., n=4 brins)

cm.sem ⁻¹	K_bp	K_ramif	K/5_bp	K/5_ramif	K/10_bp	K/10_ramif	K/20_bp	K/20_ramif
29/01/2003	0,18	0,05	0,41	0,00	0,42	0,00	0,39	0,00
06/02/2003	0,12	0,20	0,58	0,18	0,40	0,13	0,51	0,05
12/02/2003	0,21	0,00	0,73	0,12	0,36	0,02	0,34	0,09
19/02/2003	0,47	0,29	0,46	0,40	0,38	0,25	0,27	0,43
26/02/2003	0,00	0,34	0,38	0,42	0,23	0,12	0,07	0,32

ANNEXE 4 : Contamination de la mousse *F. antipyretica* au Cd^{2+} en laboratoire

Concentrations en cadmium dans la mousse *F. antipyretica*, dans l'eau, facteurs de bioconcentration associés, **A** (témoin), **B** (3,8 $\mu\text{g.g}^{-1}$), **C** (18,5 $\mu\text{g.g}^{-1}$), **D** (35 $\mu\text{g.g}^{-1}$)

Incertitude sur les données d'eau : 2 %, Incertitude sur les données mousses : 10 %

		Cd ($\mu\text{g.g}^{-1}$)				
		0 h	1 h	2h30	4h30	20 h
mousse	A	4,2	27,4	69,8	45,7	41,10
	B	< 0,02	3708,3	3400,8	4087,3	324,2
	C	0,6	9000,6	9063,5	8401,4	12982,3
	D	12,2	10482,5	9012,7	10309,2	770,1
		Cd (mg.L^{-1})				
eau	A	0,00032	0,00014	0,00032	0,0008	0,0006
	B	3,09	0,86	0,81	0,71	0,59
	C	20,29	10,31	9,93	9,41	8,74
	D	35,75	25,12	24,40	26,58	24,54
		0 h	1 h	2h30	4h30	20 h
BCF	A	13063	195929	218125	57899	64219
	B	0,006	4336	4178	5770	551
	C	0,03	873	912	893	1485
	D	0,3	417	369	388	31

Valeur initiale et finale de pH dans les milieux testés

	pH initial	pH final
A	7,92	8,16
B	7,02	7,77
C	6,42	6,68
D	6,25	7,01

ANNEXE 5 : Micropolluants minéraux sur eau brute

$\mu\text{g.L}^{-1}$	Très bonne	Bonne	Moyenne	Médiocre	Mauvaise
Arsenic	1	10	100	270	
Cadmium	0,004	0,04	0,37	1,3	
Chrome total	0,18	1,8	18	350	
Cuivre	0,1	1	10	15	
Nickel	0,62	6,2	62	360	
Plomb	0,52	5,2	52	250	
Zinc	0,43	4,3	43	98	

Données Agence de l'eau

ANNEXE 6 : Données obtenues, site de Tortequesne

Tableau de données physico-chimique du cours d'eau, ND : donnée non disponible, données
Agence de l'Eau Artois Picardie

			COND. A	MES T	OD	% SAT.	DBO5	DCO	N	NH4+	NO2-	NO3-	PO4-- -	P
			20 °C (μ S.cm -1)	(mg.l -1)	(mg/l- 1)	EN O2	(mg/l- 1)	(mg/l- 1)	KJEL- DAHL (mg/l- 1)	(mg/l- 1)	(mg/l- 1)	(mg/l- 1)	(mg/l- 1)	TOT.(mg/l- 1)
	PH	T (°C)												
10/01/ 2003	7,65	ND	733	48	10,4	85	2	10	ND	0,1	0,22	34	0,1	ND
26/02/ 2003	7,75	ND	714	48	10,5	93	2	7	ND	0,19	0,08	36	0,1	ND
06/03/ 2003	7,65	9,5	685	ND	9,5	84	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
07/03/ 2003	7,75	ND	714	30	ND	ND	3	13	ND	0,3	0,1	34	0,1	ND
20/03/ 2003	7,67	8,4	745	ND	9,1	77	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
02/04/ 2003	7,73	8,9	730	ND	8,7	77	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
07/04/ 2003	7,95	ND	704	18	11,7	101	3	6	1	0,1	0,09	36	0,1	0,05
05/06/ 2003	7,75	ND	680	6	10,6	103	1	5	1	0,3	0,24	35	0,1	0,05
Min	7,65	8,4	680	6	8,7	77	1	5	1	0,1	0,08	34	0,1	0,05
Max	7,95	9,5	745	48	11,7	103	3	13	1	0,3	0,24	36	0,1	0,05

Tableau de concentrations retrouvées dans les transplants (Moy. $\pm$ ET, n=3), ND : donnée
non disponible

Mousse μ g.g ⁻¹	06/03/2003	20/03/2003	02/04/2003
V	0,57 $\pm$ 0,44	2,33 $\pm$ 0,49	7,15 $\pm$ 3,95
Co	9,02 $\pm$ 6,25	2,29 $\pm$ 0,95	3,79 $\pm$ 2,04
Ni	0,4 $\pm$ 0,2	1,9 $\pm$ 0,2	4,23 $\pm$ 1,58
Cu	7,8 $\pm$ 10,4	21,5 $\pm$ 2,2	25,4 $\pm$ 7,1
Zn	59 $\pm$ 19	48 $\pm$ 6	59 $\pm$ 5
As	0,37 $\pm$ 0,08	0,68 $\pm$ 0,10	1,54 $\pm$ 0,20
Cd	<LD	0,140 $\pm$ 0,004	0,21 $\pm$ 0,02
Sb	<LD	0,02 $\pm$ 0,36	0,08 $\pm$ 0,07
Cr	<LD	2,68 $\pm$ 0,36	7,61 $\pm$ 0,36
Pb	0,4 $\pm$ 0,3	1,5 $\pm$ 0,2	5,3 $\pm$ 2,4
Mn	4,1 $\pm$ 5,3	ND	ND
Fe	9 $\pm$ 4	ND	ND
Al	1,08 $\pm$ 0,48	ND	ND

Tableau de concentrations retrouvées dans l'eau (Incertitude 10 %)

$\mu\text{g.L}^{-1}$	20/03/2003	02/04/2003
V	1,03	2,64
Co	0,48	1,46
Ni	2,87	8,64
Cu	2,41	4,64
Zn	7,67	16,27
As	0,95	4,63
Cd	0,02	0,04
Sb	0,05	0,15
Cr	<LD	<LD
Pb	1,10	0,79
Mn	35,45	36,87
Fe	232,53	237,44
Al	72,25	86,29

ANNEXE 7 : Données obtenues, site de Chocques

Données physico-chimiques (AEAP, 2003), les dates **en gras** sont les mesures effectuées lors du prélèvement de mousses sur site.

	PH	T (°C)	COND. A 20 °C (µS.cm- 1)	MEST (mg.l- 1)	OD (mg/l- 1)	% SAT. EN O2	DBO5 (mg/l- 1)	DCO (mg/l- 1)	N KJELDA HL (mg/l-1)	NH4+ (mg/l-1)	NO2- (mg/l- 1)	NO3- (mg/l- 1)	PO4-- - (mg/l- 1)	P TOT.(mg/l- 1)
10/01/2003	7,85	ND	695	7	13,2	102	4	7	ND	0,1	0,17	40	0,1	ND
04/02/2003	7,8	ND	736	9	11,4	99	3	7	ND	0,62	0,23	42	0,33	ND
26/02/2003	7,9	ND	677	6	11,6	103	2	5	ND	0,39	0,18	42	0,28	ND
06/03/2003	7,9	10,2	645	ND	11,3	102	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
07/03/2003	7,9	ND	676	10	ND	ND	3	10	ND	0,46	0,23	39	0,1	ND
20/03/2003	8	9,9	705	ND	10,3	91	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
21/03/2003	7,8	ND	676	6	11,5	103	2	5	ND	0,33	0,24	40	0,18	ND
02/04/2003	8,23	10,5	701	ND	10,5	96	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
07/04/2003	8,15	ND	664	9	11,6	103	4	11	1	0,2	0,24	40	0,1	0,08
06/05/2003	8,13	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
14/05/2003	7,9	ND	670	6	10,9	105	3	16	1	0,4	0,44	38	0,76	0,2
05/06/2003	8	ND	657	6	10,3	106	2	8	1	0,58	0,82	38	0,55	0,26
12/06/2003	8,16	16,9	721	ND	9,8	101	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
26/06/2003	8,13	17,4	708	ND	10,3	109	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
30/06/2003	8,1	ND	656	3	9,2	100	2	8	1	0,1	0,89	37	0,46	0,17
10/07/2003	8,07	17,8	719	ND	9,9	102	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Min	7,8	9,9	645	3	9,2	91	2	5	1	0,1	0,17	37	0,1	0,08
Max	8,23	17,8	736	10	13,2	109	4	16	1	0,62	0,89	42	0,76	0,26

Tableau de concentrations retrouvées dans les transplants (Moy. ± ET, n=3), ND : donnée non disponible

µg.g ⁻¹	06/03/2003	20/03/2003	02/04/2003	06/05/2003
V	0,38 ± 0,03	13,81 ± 6,39	15,53 ± 5,37	15,17 ± 4,10
Co	5,57 ± 1,27	4,34 ± 0,96	6,08 ± 1,61	12,94 ± 2,20
Ni	0,29 ± 0,02	7,79 ± 2,93	8,54 ± 2,59	11,79 ± 2,38
Cu	3,5 ± 1,3	20,2 ± 2,9	18,7 ± 2,5	24,6 ± 5,9
Zn	57 ± 15	77 ± 25	97 ± 9	160 ± 31
As	0,49 ± 0,06	1,53 ± 0,54	2,05 ± 0,47	2,06 ± 0,34
Cd	0,021 ± 0,001	0,22 ± 0,10	0,23 ± 0,07	0,30 ± 0,02
Sb	< D,L,	< D,L,	< D,L,	< D,L,
Cr	< D,L,	< D,L,	< D,L,	< D,L,
Pb	0,20 ± 0,06	10,30 ± 4,56	13,88 ± 4,58	16,02 ± 3,70
Mn	1,30 ± 0,18	ND	ND	ND
Fe	7,66 ± 1,6	ND	ND	ND
Al	0,93 ± 0,48	ND	ND	ND

Tableau de concentrations retrouvées dans l'eau (Incertitude 10 %)

µg.L⁻¹	20/03/03	02/04/03	06/05/03
V	1,80	2,39	1,72
Co	0,81	0,86	0,58
Ni	4,72	3,63	3,01
Cu	2,2	3,7	1,9
Zn	7	26	13
As	1,47	1,07	0,90
Cd	0,01	0,05	0,01
Sb	0,07	0,15	0,08
Cr	<LD	<LD	<LD
Pb	1,03	2,28	0,80
Mn	56,88	85,67	65,64
Fe	146,43	518,49	142,42
Al	70,08	297,12	80,90

ANNEXE 8 : Données obtenues, site de Brebières

Données physico-chimiques (AEAP, 2003), les dates **en gras** sont les mesures effectuées lors du prélèvement de mousses sur site.

			COND. A 20 °C (µS.cm- 1)	MEST (mg.l- 1)	OD (mg/l- 1)	% SAT. EN O2	DBO5 (mg/l- 1)	DCO (mg/l- 1)	N KJELDAHL (mg/l-1)	NH4+ (mg/l- 1)	NO2- (mg/l- 1)	NO3- (mg/l- 1)	PO4-- - (mg/l- 1)	P TOT.(mg/l- 1)
	PH	T (°C)												
15/01/2003	8	ND	692	33	10,6	91	4	16	ND	0,68	0,36	38	0,3	ND
05/02/2003	8	ND	694	21	10,9	91	3	10	ND	0,3	0,27	35	0,3	ND
03/03/2003	8,05	ND	712	8	10	89	5	13	ND	1,8	0,42	35	0,26	ND
06/07/2003	7,96	9,4	728	ND	8,7	77	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
07/03/2003	7,9	ND	761	15	ND	ND	6	13	ND	1,9	0,5	34	0,81	ND
20/03/2003	8,22	7,8	798	ND	10,2	86	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
24/03/2003	8,15	ND	696	8	13	121	3	42	ND	0,57	0,42	36	0,24	ND
02/04/2003	7,99	8,3	700	ND	8,4	72	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
10/04/2003	8,2	ND	772	6	12,8	112	3	14	1	0,99	0,38	36	1,1	0,42
15/05/2003	8,1	ND	708	7	10,5	96	2	7	1	0,1	0,29	35	0,4	0,2
10/06/2003	8,3	ND	735	4	10,7	111	2	14	1,1	1,1	1,4	29	1,1	0,36
01/07/2003	7,9	ND	608	6	6,8	70	3	20	1	0,19	0,83	29	0,5	0,22
Min	7,9	7,8	608	4	6,8	70	2	7	1	0,1	0,27	29	0,24	0,2
Max	8,3	9,4	798	33	13	121	6	42	1,1	1,9	1,4	38	1,1	0,42

Tableau de concentrations retrouvées dans les transplants (Moy. $\pm$ ET, n=3), ND : donnée non disponible

µg.g ⁻¹	06/03/2003	20/03/2003	02/04/2003	06/05/2003	12/06/2003	26/06/2003	10/07/2003
V	0,66 $\pm$ 0,17	5,49 $\pm$ 1,74	4,96 $\pm$ 0,44	5,82 $\pm$ 2,12	< D,L,	0,65 $\pm$ 0,09	0,74 $\pm$ 0,27
Co	10,27 $\pm$ 2,27	5,13 $\pm$ 0,55	5,81 $\pm$ 1,01	8,15 $\pm$ 2,46	1,27 $\pm$ 0,75	1,10 $\pm$ 0,58	1,08 $\pm$ 0,60
Ni	0,4 $\pm$ 0,1	5,10 $\pm$ 1,12	5,18 $\pm$ 0,76	19,47 $\pm$ 5,05	< D,L,	2,60 $\pm$ 1,39	2,24 $\pm$ 1,14
Cu	5,9 $\pm$ 3,4	27,6 $\pm$ 8,1	26,69 $\pm$ 0,63	30,03 $\pm$ 6,14	< D,L,	5,07 $\pm$ 1,54	4,24 $\pm$ 0,93
Zn	73 $\pm$ 14	113 $\pm$ 17	121 $\pm$ 25	181 $\pm$ 35	115 $\pm$ 74	60 $\pm$ 32	45 $\pm$ 16
As	0,33 $\pm$ 0,05	1,25 $\pm$ 0,26	1,05 $\pm$ 0,15	1,37 $\pm$ 0,28	< D,L,	0,36 $\pm$ 0,12	0,34 $\pm$ 0,07
Cd	0,04 $\pm$ 0,04	0,24 $\pm$ 0,05	0,24 $\pm$ 0,02	0,31 $\pm$ 0,12	< D,L,	0,04 $\pm$ 0,02	0,03 $\pm$ 0,02
Sb	< D,L,	0,11 $\pm$ 0,03	0,16 $\pm$ 0,02	0,27 $\pm$ 0,10	< D,L,	< D,L,	< D,L,
Cr	< D,L,	6,58 $\pm$ 1,18	6,89 $\pm$ 1,28	6,79 $\pm$ 2,85	< D,L,	< D,L,	< D,L,
Pb	0,43 $\pm$ 0,45	30,85 $\pm$ 7,93	39,30 $\pm$ 3,46	63,55 $\pm$ 19,04	11,34 $\pm$ 6,22	10,30 $\pm$ 3,77	12,43 $\pm$ 6,18
Mn	3,37 $\pm$ 1,34	60 $\pm$ 17	83 $\pm$ 7	224 $\pm$ 70	419 $\pm$ 213	231 $\pm$ 152	202 $\pm$ 112
Fe	12 $\pm$ 5	185 $\pm$ 31	208 $\pm$ 12	243 $\pm$ 107	443 $\pm$ 191	250 $\pm$ 86	229 $\pm$ 86
Al	1 $\pm$ 1	175 $\pm$ 35	188 $\pm$ 7	206 $\pm$ 122	390 $\pm$ 97	144 $\pm$ 94	147 $\pm$ 92

Tableau de concentrations retrouvées dans l'eau (Incertitude 10 %)

$\mu\text{g.L}^{-1}$	20/03/2003	02/04/2003	06/05/2003	12/06/2003	26/06/2003	10/07/2003
V	0,93	1,02	1,09	1,05	<LD	<LD
Co	0,48	0,45	0,46	0,42	<LD	<LD
Ni	2,90	2,93	3,11	2,91	0,10	0,49
Cu	2,97	1,87	2,12	1,80	0,35	2,19
Zn	13,69	14,68	12,72	11,24	1,09	0,77
As	0,64	0,61	0,67	0,67	<LD	<LD
Cd	0,02	0,01	0,00	<LD	0,10	0,02
Sb	0,13	0,12	0,12	0,18	<LD	<LD
Cr	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
Pb	2,94	1,99	1,88	0,90	0,06	0,06
Mn	17,74	16,71	15,46	7,86	0,05	0,04
Fe	78,18	83,23	76,14	38,75	7,77	7,79
Al	58,33	39,68	34,25	87,78	18,40	4,20

ANNEXE 9 : Résultats obtenus pour le suivi de l'indice de stress dans les transplants sur les sites d'étude

Mesure de l'indice de stress D665/D665a, dans 3 transplants de *F. antipyretica* sur 4 sites
d'études ND : non déterminé

	06/03/2003	20/02/2003	02/04/2003	06/05/2003	12/06/2003	26/06/2003	10/07/2003
BRE1	1,36	1,30	1,18	1,55	1,47	1,47	1,44
BRE2	1,42	1,20	1,05	1,59	1,52	1,40	1,58
BRE3	1,29	1,24	1,12	1,59	1,52	1,46	1,46
Moy. BRE	1,35	1,25	1,12	1,57	1,50	1,44	1,49
ET	0,064	0,052	0,064	0,025	0,026	0,038	0,079
Coef. Variation	5%	4%	6%	2%	2%	3%	5%
TOR4	1,38	1,08	1,15	ND	ND	ND	ND
TOR5	1,40	1,05	1,33	ND	ND	ND	ND
TOR6	1,32	1,07	1,12	ND	ND	ND	ND
Moy. TOR	1,37	1,07	1,20	ND	ND	ND	ND
ET	0,04	0,02	0,11	ND	ND	ND	ND
Coef. Variation	3%	2%	9%	ND	ND	ND	ND
CHO7	1,33	1,08	1,02	1,57	ND	ND	ND
CHO8	1,40	1,11	1,19	1,58	ND	ND	ND
CHO9	1,40	1,15	1,09	1,51	ND	ND	ND
Moy. CHO	1,38	1,11	1,10	1,22	ND	ND	ND
ET	0,04	0,03	0,08	0,04	ND	ND	ND
Coef. Variation	3%	3%	7%	3%	ND	ND	ND
COU10	1,18	ND	ND	ND	ND	ND	ND
COU11	1,38	ND	ND	ND	ND	ND	ND
COU12	1,14	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Moy. TOR	1,23	ND	ND	ND	ND	ND	ND
ET	0,130	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Coef. Variation	11%	ND	ND	ND	ND	ND	ND

ANNEXE 10 : Publication relative à l'étape de purification de la culture (souche FA6VB)

RESUME

Les bryophytes aquatiques sont largement utilisées depuis les années 70, comme bioindicateurs de la qualité des eaux. Grâce à leurs propriétés bioaccumulatrices de polluants, elles renseignent sur des événements de pollutions continues ou ponctuelles. Ce présent travail est basé sur le développement d'une culture de la mousse aquatique *Fontinalis antipyretica* Hedw. et de son utilisation comme outil standardisé dans des études de biosurveillance des cours d'eau.

L'optimisation de la culture a permis dans un premier temps, de définir les paramètres optimaux permettant d'obtenir de la biomasse rapidement et d'éviter des contaminations. Les paramètres sont : une luminosité de $20 \pm 3 \mu\text{mol. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, une température à $12 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$, un milieu de culture composé d'une solution Knop dilué 5 fois, NaHCO_3 à 5 g.L^{-1} , $100 \mu\text{L.L}^{-1}$ de la solution Metal 49 modifiée ($[\text{Cu}]/2$), un appareillage étanche (contenant en polypropylène, $V=10 \text{ L}$), un bullage régulier par diffuseur d'air, une taille régulière des parties apicales. Dans ces conditions, la croissance de la mousse est de 1.12 cm.sem^{-1} , et le temps minimum d'obtention d'un transplant de mousse ($\sim 150 \text{ g}$ de poids frais) est de 6 mois. Dans un deuxième temps, une contamination en laboratoire en Cd^{2+} (3.8, 18.5 et 37 ppm) a mis en évidence la concentration de saturation en Cd^{2+} pour la mousse cultivée, elle a été évaluée à $\sim 10\,000 \mu\text{g.g}^{-1}$ de poids sec.

Dans un troisième temps, une étude de biosurveillance a été menée sur quatre sites dans le Nord de la France. Elle a consisté à transplanter la mousse cultivée sur site pendant 5 mois, afin de suivre l'évolution des concentrations en 13 éléments traces métalliques (Al, Fe, Mn, Sb, Cd, Cu, Ni, Cu, Zn, Cr, Co, As, et V) dans les mousses et dans l'eau de rivière. Cette étude a mis en évidence l'accumulation dans les mousses de tous les métaux mesurés excepté le Co. L'indice de stress D665/D665a proportionnel à la concentration en chlorophylle a et de son produit de dégradation, la phéophytine a, a été utilisé afin de contrôler l'état de santé du bioindicateur.

En vue de créer un outil standardisé à partir d'une mousse cultivée pour l'estimation de la contamination métallique des cours d'eau, des calibrations restent à être faites (adaptation de la grille d'interprétation actuelle pour mousses autochtones à l'organisme cultivé), mais les résultats obtenus jusqu'ici encouragent en ce sens. De plus cette étude offre de nouvelles perspectives à la biosurveillance des cours d'eau, cette méthode utilisant un outil standardisé répond notamment aux attentes de la législation Française et Européenne dans la gestion de la qualité des eaux naturelles et du maintien de leur équilibre écologique.

MOTS- CLES : *Fontinalis antipyretica*, mousse, culture, biosurveillance, élément trace métallique