UNIVERSITÉ DE LILLE NORD DE FRANCE
FACULTÉ DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES DE LILLE

THÈSE

Soutenue à Lille le
16 octobre 2009

Pour l'obtention du titre de
Docteur de l'Université de Lille Nord de France
Spécialité : Sciences Biologiques

Juliette FABURÉ

Étude de l'accumulation et des effets des composés organiques volatils (BTEX) chez les bryophytes

Directeur de thèse
Professeur Chantal VAN HALUWYN

Réalisée au sein de l'équipe d'accueil
EA2690 'Toxiques et Cancérogènes Professionnels et Environnementaux'

Membres du jury de soutenance de thèse :

Madame Paule VASSEUR : Professeur - Université de Metz	Rapporteur
Monsieur Jean-Pierre GARREC : Professeur – INRA de Nancy	Rapporteur
Madame Sandrine GOMBERT : Maître de Conférences – Université Bordeaux III	Examinateur
Monsieur Daniel MARZIN : Professeur – Institut Pasteur de Lille	Examinateur
Monsieur Hervé PLAISANCE : Professeur – École des Mines de Douai	Examinateur
Madame Chantal VAN HALUWYN : Professeur – Université de Lille Nord de France	Examinateur

REMERCIEMENTS

J'exprime toute ma gratitude et ma reconnaissance à Chantal Van Haluwyn, Professeur émerite de l'Université de Lille 2 et Directrice de cette thèse. Je lui adresse ma plus sincère reconnaissance, pour son aide, sa confiance, ses qualités humaines et scientifiques qui m'ont permis de mener à bien ce travail.

Je tiens à remercier Franck-Olivier Denayer, Maître de conférence de l'Institut Lillois d'Ingénierie de la Santé (ILIS) de l'Université de Lille 2 et co-directeur de cette thèse, pour ses conseils, ainsi que pour le temps précieux qu'il m'a accordé.

J'adresse mes remerciements au Professeur Damien Cuny du laboratoire de botanique de la faculté des sciences pharmaceutiques et biologiques de l'Université de Lille 2 pour m'avoir accueillie au sein de son équipe, pour ses conseils et l'intérêt scientifique qu'il a porté à mes recherches.

Je remercie également le Professeur Daniel Marzin de m'avoir accueillie au sein de l'équipe d'accueil EA2690 'Toxiques et Cancérogènes Professionnels et Environnementaux.

J'adresse ma reconnaissance au Professeur Régis Courtecuisse, directeur du laboratoire de botanique de la faculté des sciences pharmaceutiques et biologiques de l'Université de Lille 2 pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et avoir mis à ma disposition les moyens nécessaires à la réalisation de ce travail.

Mes remerciements s'adressent également au Professeur Alain Durocher pour m'avoir cordialement accueillie au sein de son établissement et de son équipe enseignante.

J'adresse mes remerciements au professeur Paule Vasseur de l'Université de Metz et au professeur Jean-Pierre Garrec de l'INRA de Nancy pour m'avoir fait l'honneur d'accepter d'être rapporteurs de cette thèse.

Je remercie également madame Sandrine Gombert et messieurs les professeurs Daniel Marzin et Hervé Plaisance, de me faire l'honneur d'examiner ce travail et d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

J'exprime toute ma gratitude à mes collaborateurs Hervé Plaisance, Joëlle Roukos, Fabrice Cazier, Agnès Delbende, Nadine Bernard et Daniel Gilbert, pour leur aide et leurs précieux conseils, ainsi que pour leur soutien et encouragements aux cours de ces années.

A tous mes collègues, Pierre-Arthur ,Régis, Chantal, Damien, Inès, un grand merci pour votre aide précieuse, votre disponibilité et votre sympathie.

Je remercie Annabelle Deram qui m'a permis de découvrir la recherche et pour les conseils qu'elle m'a prodigué.

J'exprime toute ma sympathie à mes compagnons de thèse : Stéphane, Marie Amélie et Nicolas, pour leur soutien précieux.

Je tiens particulièrement à remercier Audrey Hayet, avec qui j'ai traversé cette épreuve de 3 ans et grâce à qui ce ne fût pas une épreuve. Je lui sais gré de son aide, de ses conseils et de son soutien.

Je me remercie également Noémie, Fanny, Pauline et Matthieu pour le travail qu'ils ont accompli dans le cadre de leur stage.

Merci à l'ensemble des enseignants de l'ILIS, Christian, Hervé, Ben, Guilène, Claudine, Pierre et Christian pour leurs conseils et leur sympathie.

Un grand merci à ceux qui ont participé, de prêt ou de loin, à ce travail : Aline , pour son aide précieuse sur le terrain; Julie, Amandine et Perrine,pour leur bonne humeur; Régina, pour son soutien

Mes sincères remerciements à l'ensemble du personnel de l'ILIS Sylvaine, Patricia, Élodie, Najim, Frédérique, Chantal, Roger, Jean, Hynde, et l'incontournable Ambroisine pour leur accueil et leur sympathie.

Sommaire

I. Introduction....7

II. Contexte scientifique de la thèse....13

A. La politique régionale de recherche en environnement industriel 13

B. Le littoral dunkerquois 15

1) L'agglomération dunkerquoise....15

2) État sanitaire de la population dunkerquoise....15

3) Les sources de COV sur le littoral 16

III. État de l'art....21

A. Les Composés Organiques Volatils 21

1) Généralités sur les COV 21

2) Les sources de COV 21

3) La toxicité des COV chez l'Homme 22

4) Les bryophytes et les composés organiques volatils 24

B. Biosurveillance de la qualité de l'air....24

1) Contexte général - l'écotoxicologie....24

2) La biosurveillance 26

3) Les bioaccumulateurs*....28

C. Intérêts des bryophytes pour l'étude de la qualité de l'air....28

1) Généralités sur les bryophytes....28

2) Intérêt du modèle bryophyte pour les études écotoxicologiques....38

3) L'accumulation de contaminants chez les bryophytes : les composés organiques....40

D. Composés Organiques Volatils et les végétaux....43

1) Composés Organiques Volatils et végétaux : état des connaissances pour les végétaux supérieurs – comparaison avec les bryophytes....43

2) Métabolisation des COV chez les végétaux....44

3) Effets des COV chez les végétaux....46

E. Le stress oxydant chez les végétaux 46

1) Généralités sur le stress oxydant....46

2) Les spécificités chez les végétaux....60

3) Les spécificités chez les bryophytes : répercussion du stress hydrique sur l'expression de biomarqueurs du stress oxydant....64

4) Usage de ces paramètres comme biomarqueurs 66

IV. Matériel et Méthodes.....77

A. Caractérisation des sites d'étude *in situ*.....77

1) Présentation et objectifs des expériences *in situ*.....77

2) Sites d'exposition.....77

3) Conditions météorologiques.....79

4) Caractérisation des profils atmosphériques en COV et teneurs en BTEX sur les sites d'exposition...82

B. Matériel biologique et protocole d'étude du stress hydrique chez les bryophytes.....88

1) *Ceratodon purpureus* (Hedw.) *Brid*. 89

2) *Pseudoscleropodium purum* (Hedw.) *Limpr*. 91

3) *Tortula ruralis* (Hedw.) *Gärtn. (= Syntrichia ruralis* (Hedw.) *F. Weber & D. Mohr)*.....93

4) Étude de l'impact du stress hydrique chez *Tortula ruralis* par l'expression des biomarqueurs du stress oxydant.....94

5) Efficacité du système d'hydratation adapté au matériel d'exposition des mousses.....98

6) Étude de l'influence de l'âge de *Tortula ruralis* sur l'expression des biomarqueurs du stress oxydant 103

C. Étude de l'accumulation et de la toxicité des BTEX chez les mousses.....104

1) Étude in situ de l'accumulation de BTEX chez des mousses 104

2) Protocole d'étude en conditions contrôlées de l'accumulation et de la toxicité des BTEX chez *Tortula ruralis*.....106

3) Protocoles d'étude de l'adsorption et de la désorption des BTEX chez *Tortula ruralis* en conditions contrôlées 114

4) Protocole d'exposition *in situ* de *Tortula ruralis* : accumulation des BTEX et expression des biomarqueurs du stress oxydant 118

D. Marqueurs biologiques.....120

1) Mesure du paramètre d'évaluation du stress hydrique : la teneur relative en eau ou Relative Water Content (RWC).....120

2) Dosage des activités enzymatiques de l'ascorbate peroxydase et du guaïacol peroxydase, et des protéines totales.....120

3) Dosage des concentrations en malondialdéhyde.....123

4) Dosage des concentrations en chlorophylles et indice de phéophytinisation.....124

E. Traitement statistique des données.....133

V. Résultats 137

A. Caractérisation de la contamination atmosphérique des sites lors des deux périodes d'exposition 137

1) 1ère expérimentation *in situ* (juin-juillet 2007) 137

2) 2nde expérimentation *in situ* (octobre 2008) 142

B. Etudes préliminaires des impacts du stress hydrique chez les bryophytes 146

1) Impacts du stress hydrique – étude de biomarqueurs de stress oxydant 146

2) Influence de l'âge de la mousse sur l'expression de biomarqueurs du stress oxydant 158

C. Etudes de l'accumulation des BTEX chez les bryophytes 161

1) Études de l'accumulation des BTEX *in situ* en conditions réalistes 161

2) Etudes de l'accumulation des BTEX en conditions contrôlées 178

3) Conclusions relatives à l'accumulation des BTEX chez *Tortula ruralis* 189

D. Étude de toxicité : influence du benzène et d'un stress environnemental sur l'expression de biomarqueurs du stress oxydant chez *Tortula ruralis* 190

1) Biomarqueurs de stress oxydant chez *Tortula ruralis* : effets de l'exposition au benzène en conditions contrôlées 190

2) Etude *in situ* de la réponse de biomarqueurs du stress oxydant chez *Tortula ruralis* exposée à un stress environnemental global 209

3) Conclusion sur l'expression des biomarqueurs de stress oxydant chez *Tortula ruralis* 213

E. Analyse croisée des conditions d'expositions, des teneurs en benzène et des réponses des biomarqueurs de stress oxydant chez *Tortula ruralis* - Synthèse 215

1) Synthèse sur les capacités accumulatrices des BTEX chez *Tortula ruralis* : études en conditions contrôlées et *in situ* 215

2) Expositions en conditions contrôlées : corrélation entre les concentrations en benzène et les réponses des biomarqueurs de stress oxydant chez *Tortula ruralis* 216

3) Expositions *in situ* : corrélation entre les paramètres environnementaux et les réponses des biomarqueurs de stress oxydant chez *Tortula ruralis* 218

4) Synthèse des réponses des biomarqueurs de stress oxydant aux différents facteurs de stress chez *Tortula ruralis* : part du stress hydrique et de l'âge dans l'expression des biomarqueurs 219

VI. Bilan et perspectives 225

VII. Références bibliographiques 233

VIII. Glossaire 255

IX. Liste des abbréviations 261

X. Table des matières.....265

XI. Tables des figures.....277

XII. Tables des tableaux.....287

XIII. Annexes.....291

XIV. Valorisation.....295

INTRODUCTION

I. Introduction

Les conséquences sanitaires et environnementales de la pollution atmosphérique sont devenues au cours des dernières décennies un des problèmes majeurs de notre société.

Sensibilisée à cette problématique, la région Nord Pas-de-Calais a soutenu et co-financé la fédération des compétences régionales en matière de recherche environnementale au sein du groupement d'intérêt scientifique intitulé : Institut de Recherches en Environnement Industriel (IRENI). Il convient également de préciser que la région Nord Pas-de-Calais a été l'une des premières régions à soutenir et à valoriser la biosurveillance végétale de la qualité de l'air.

Les travaux scientifiques présentés ci-après s'inscrivent dans le domaine de « l'écotoxicologie » (axe de recherche développé au sein de l'IRENI) et plus particulièrement dans celui de la Biosurveillance Végétale de la qualité de l'air. Ils ont pour objectif d'étudier les phénomènes d'accumulation et les impacts des composés organiques volatils (COV) chez les bryophytes.

L'originalité du sujet réside dans l'étude des bryophytes en lien avec la problématique des composés organiques volatils. Jusqu'à présent, les recherches sur l'accumulation et les effets des polluants atmosphériques chez les bryophytes concernent principalement les éléments traces métalliques (*cf*. Onianwa, 2001, pour revue) mais plus rarement les composés organiques tels que les organochlorés et les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) (Lim *et al*., 2006 ; Vasseur & Cossu-Leguille, 2006 ; Ötvös *et al*., 2004). Les bryophytes sont reconnues comme d'excellentes matrices pour le dosage de ces contaminants. L'Agence Internationale de l'Energie Atomique (AIEA) inclut l'utilisation de « biomoniteurs » (mousses, lichens, végétaux) dans ses programmes d'action en santé-environnement. D'autre part, elle encourage l'utilisation des mousses (et des lichens) en tant que matrices pour l'analyse des éléments traces métalliques (Smodis & Parr, 1999). Des normes nationales (en France, en Allemagne…) et européennes ont été élaborées quant à leur utilisation en surveillance végétale de la qualité de l'air. Il ne faut pas oublier également le rôle important que les bryophytes jouent dans l'installation et le maintien de différents écosystèmes terrestres.

La connaissance des effets des polluants organiques chez les bryophytes est quasi inexistante, seuls les travaux de Roy *et al* (1996) abordent les effets des HAP chez la mousse aquatique *Fontinalis antipyretica*. On ne trouve aucune référence sur l'accumulation et/ou les effets des polluants organiques volatils tels que le benzène, le toluène, l'éthylbenzène et les xylènes (BTEX). Il faut également souligner que les BTEX ont été peu étudiés chez les végétaux (comparativement aux travaux chez les animaux et chez l'homme) (Hettche, 1971).

Les bryophytes sont depuis longtemps reconnues pour leur capacité d'intégration de la pollution atmosphérique métallique et organique car :

- elles possèdent un rapport élevé surface/volume ou surface/masse qui favorise le piégeage des grosses particules ;
- il n'y a pas de vaisseaux conducteurs ni un vrai système racinaire ce qui assure une exposition des organismes exclusivement à des polluants d'origine atmosphérique ;
- les bryophytes sont capables de filtrer les particules contaminées par des polluants organiques et d'absorber de grosses molécules, elles se révèlent donc être un bon modèle pour le dosage des polluants organiques persistants HAP, dioxines/furanes, PolyChloroBiphényles (PCB), pesticides...) dans le cadre d'une biosurveillance de pollution atmosphérique par exemple.

Etant donné la grande variabilité des profils environnementaux des COV en fonction de leurs sources d'émission et de la forte toxicité de certains d'entre eux, l'étude de leurs mécanismes d'absorption et de leurs effets chez les végétaux apparaît très importante. En effet, le développement de méthodes de biosurveillance des COV atmosphériques permettrait d'avoir une meilleure connaissance des expositions des populations. Parmi les COV, le benzène est un composé dont la toxicité s'exprime notamment par sa cancérogénicité. Son émission dans l'atmosphère est souvent associée à celle du toluène, de l'éthylbenzène et des xylènes, et provient notamment de divers process industriels, pétrochimie et métallurgie en particulier.

Les travaux de recherche sont principalement axés sur l'étude de l'accumulation (dépôts, adsorption, absorption, bioaccumulation) et des impacts des BTEX sur l'intégrité cellulaire, notamment au travers de la recherche de biomarqueurs biochimiques d'exposition et d'effets chez un modèle bryophytique.

Les objectifs de ces travaux de recherche sont :

- de mieux comprendre les mécanismes d'accumulation des BTEX chez les bryophytes ;
- d'étudier les relations dose-effets en conditions contrôlées d'exposition au benzène ;
- de rechercher différents biomarqueurs d'exposition et d'effet (ascorbate et guaïacol peroxydases; malondialdéhyde (MDA), chlorophylles et indice de phéophytinisation) en relation avec la caractérisation des composés absorbés, et d'identifier d'éventuelles interactions entre ces biomarqueurs.

Pour répondre à la problématique de ce sujet, les recherches mises en place se développent autour de deux axes : le premier axe concerne l'étude de l'accumulation des benzène, toluène, ethylbenzène et xylènes (BTEX) par des études menées *in situ* sur le littoral dunkerquois, et en conditions contrôlées. Il s'agit d'établir s'il existe un lien entre les teneurs en BTEX détectées chez des mousses et les concentrations

atmosphériques du milieu dans lequel elles sont exposées ; le second axe concerne l'étude des effets, au niveau cellulaire, du benzène chez la mousse, par la recherche de relation doses-effets et l'analyse des réponses cellulaires en fonction des durées d'exposition au contaminant.

Les expérimentations se sont déroulées en trois phases.

Dans un premier temps, des études préliminaires *in situ* ont permis de définir l'espèce bryophytique la plus performante pour l'étude des BTEX.

Dans un second temps, des expositions en conditions contrôlées ont été menées avec différentes concentrations de benzène pendant différentes durées d'exposition. Ces expérimentations ont permis d'une part, de définir les relations entre les concentrations d'exposition, les concentrations accumulées chez la mousse et les effets sur l'expression de biomarqueurs de stress oxydant et d'autre part, d'étudier la cinétique de cette accumulation et de l'évolution de l'expression des biomarqueurs.

Dans un troisième temps, le modèle bryophytique a été exposé en conditions réalistes *in situ* afin d'infirmer ou de confirmer les hypothèses émises lors des expériences en laboratoire et pour étudier les biomarqueurs en conditions de stress environnemental global.

CONTEXTE SCIENTIFIQUE

II. Contexte scientifique de la thèse

A. La politique régionale de recherche en environnement industriel

La pollution atmosphérique est devenue en quelques décennies un des problèmes majeurs de notre société. Par la nature et l'étendue de son impact, le rejet d'un grand nombre de polluants dans l'atmosphère représente une grave menace pour la santé humaine mais aussi pour l'environnement. Le XXème siècle a vu évoluer les phénomènes de pollution de l'air, passant d'épisodes de pollutions massives monopolluantes en pollutions plus diffuses de polluants en mélange. Cette évolution s'est accompagnée de l'émergence de certains contaminants, notamment les composés organiques volatils.

En France, près de 1400 kt de COV sont émis annuellement, dont 30 % par le secteur industriel.

De par sa forte industrialisation, la région Nord Pas-de-Calais présente des émissions industrielles de COV de près de 12 000 tonnes pour l'année 2007, dont environ 30% sont émis par des sources localisées sur le littoral dunkerquois.

C'est pourquoi, la région a co-financé et souhaité une fédération des compétences régionales en matière de recherche. Ainsi, le contrat de plan État-Région 2000-2006 a inscrit la création de l'Institut de Recherche en Environnement Industriel (IRENI), récemment converti en groupement d'intérêt scientifique (GIS). Ce dernier s'organise suivant le tableau ci-dessous :

Axes de recherche	Actions développées dans chaque axe
Axe 1 : Qualité de l'air	Action 1 : Gaz Action 2 : Aérosols Action 3 : Remédiation
Axe 2 : Impacts de la qualité de l'air sur la Santé Publique	Action 1 : Etude en population Action 2 : Toxicologie expérimentale Action 3 : Ecotoxicologie
Axe 3 : Impacts socio-économiques et juridiques	Action 1 : Approche socio-économique Action 2 : Approche juridique

Tableau 1: Axes de recherche du Groupement d'Intérêt Scientifique de l'Institut de Recherche en Environnement Industriel

L'axe 2 s'intéresse aux impacts de la qualité de l'air sur la santé et regroupe un ensemble de compétences traitant des effets des polluants gazeux et particulaires sur les organismes vivants. L'objectif prioritaire est de

mettre en relation des niveaux et des types d'exposition parfaitement caractérisés (compétences en chimie) avec des effets biologiques détectés chez des organismes vivants (compétences en biologie et santé humaine), à proximité de différents sites industriels et urbains. L'intérêt du développement de telles recherches multidisciplinaires est double : (i) mieux appréhender les mécanismes d'action toxique des xénobiotiques* polluant l'atmosphère mais également (ii) de dégager des indicateurs d'exposition et d'effets précoces dont la pertinence faciliterait des mesures de prévention indispensables. À terme, il s'agit de produire une meilleure aide à la décision en politique de santé publique et en matière de risques environnementaux et sanitaires.

Dans le cadre d'une première phase d'études, l'action écotoxicologique a mis en jeu l'utilisation de végétaux sentinelles pour la recherche des impacts des COV. Les objectifs étaient de caractériser les profils de COV adsorbés ou absorbés et de mieux comprendre les mécanismes d'action de ces COV chez le chou fourrager (*Brassica oleracea*) (Rzepka, 2008) et chez les bryophytes. Le chou présente deux intérêts majeurs : d'une part, c'est un végétal cultivé qui est susceptible d'entrer dans la chaîne alimentaire; d'autre part, il constitue un modèle en écotoxicologie pour l'étude des hydrocarbures aromatiques polycycliques (norme chez le chou VDI-3957-3; 2000, réactualisation 2008). Les bryophytes, quant à elles, ont un rôle primordial dans les écosystèmes terrestres. En effet, ce sont les espèces végétales pionnières, à la base de la dynamique de colonisation d'un écosystème. Par ailleurs, les bryophytes, et en particulier les mousses, constituent un modèle écotoxicologique pour l'étude de polluants organiques et inorganiques. Ainsi, elles sont l'objet de normes françaises pour la surveillance de la qualité de l'air. (norme chez les mousses VDI-3957 Blatt 19; 2008)

Les premiers résultats obtenus chez le chou ont mis en évidence une accumulation de COV et le rôle notable des cires épicuticulaires du chou dans ce phénomène d'accumulation. De plus, des expositions *in situ* ont révélé un stress global de l'organisme, révélé par des analyses de marqueurs du stress oxydant et un test de génotoxicité. Les bryophytes constituent de très bons bioaccumulateurs des polluants métalliques, c'est pourquoi il est intéressant d'étudier leur potentiel à accumuler les COV. De plus, certaines de leurs caractéristiques morphlogiques leur permettent de piéger les dépôts particulaires et, du fait également de l'absence de cuticule, en font un modèle complémentaire des végétaux supérieurs.

* *cf*. glossaire

B. Le littoral dunkerquois

1) L'agglomération dunkerquoise

a) Description générale

L'agglomération dunkerquoise s'étale au nord de la région Nord Pas-de-Calais sur une superficie de plus de 25 000 hectares. Elle compte 210 000 habitants, repartis sur 18 communes, et constitue le 3ème port français après Marseille et Le Havre. Elle présente, concentrée autour du port, une zone d'activités industrielles importante comptant 225 implantations industrielles qui emploient 29 000 personnes. Cette zone industrielle englobe une zone urbaine dense dans laquelle se concentre la population. Le réseau routier est dense au sud de l'agglomération, avec notamment l'autoroute A16 qui mène en Belgique à l'Est et au tunnel sous la Manche à l'Ouest, et la route nationale N225, prolongement de l'autoroute A25 au Sud-Est, qui permet de relier Dunkerque à Lille.

Ainsi, l'intérêt d'une telle aire d'étude réside dans la double origine des polluants : industrielle et urbaine.

b) Caractéristiques météorologiques

Le département du Nord se caractérise par un climat tempéré océanique : faibles amplitudes thermiques et ensoleillement réduit (1900 heures/an à Dunkerque). Les précipitations annuelles moyennes à Dunkerque sont de l'ordre de 676 mm (à titre indicatif, à Toulouse : 656 mm), réparties sur 120 jours de pluie. Les mois les plus pluvieux sont juillet et août. L'ensoleillement, quant à lui, est assez réduit, limitant ainsi les épisodes de pollution photochimique, mais les brouillards fréquents favorisent la formation de divers aérosols.

Les vents, majoritairement du Sud-Ouest, sont propices à la bonne dispersion des polluants atmosphériques, transportés vers la Mer du Nord. Ils sont fréquents, environ 1 jour sur 3 et peuvent atteindre des vitesses élevées, jusqu'à 10 $m.s^{-1}$ (35 jours en 2007). En revanche, les vents du Nord-Est restent assez fréquents et sont souvent synonymes d'épisodes de pollution à l'intérieur des terres. Du fait de sa situation littorale, l'agglomération dunkerquoise est sujette aux phénomènes de brise de mer et de brise de terre qui influent beaucoup sur la dispersion ds polluants de l'air. Tandis que les brises de terre et vents de Sud-Est favorisent la dispersion vers la Mer du Nord, les brises de mer et vents de Nord Nord-Ouest entraînent des épisodes de pollution à l'intérieur des terres, au niveau du secteur résidentiel.

2) État sanitaire de la population dunkerquoise

Une enquête a récemment été menée pour évaluer la perception de la pollution par les habitants de la Communauté Urbaine de Dunkerque (CUD) (Bonnefoy *et al*., 2003). La pollution de l'air, considérée comme un problème majeur de la région dunkerquoise, est souvent assimilée par les habitants à la pollution visuelle et olfactive. L'estimation de la qualité de l'air est fonction du lieu de résidence des habitants : ainsi ceux

résidant à proximité des zones industrielles estiment la qualité de l'air plus mauvaise que ceux qui habitent dans une commune peu exposée. La plupart des personnes interrogées estiment que les usines et leurs émissions sont nuisibles pour la santé mais qu'elles restent cependant indispensables à l'économie de la région comme sources d'emploi.

Pour l'ensemble des personnes interrogées, la pollution atmosphérique de l'agglomération de Dunkerque induit des problèmes de santé. Les problèmes les plus fréquemment cités sont les infections respiratoires et les problèmes pulmonaires (42%), l'asthme (37%), les allergies (6%) voire le cancer (9%). Cette pollution a aussi un effet sur le comportement des habitants comme le fait de nettoyer plus fréquemment la maison (78%), de ne pas ouvrir les fenêtres (32%), de limiter les jeux à l'extérieur pour les enfants, de moins exploiter le jardin, notamment dans les communes exposées à la pollution des usines.

Globalement, l'espérance de vie des habitans du Nord Pas-de-Calais est inférieure à celle de la moyenne française, avec une surmortalité touchant surtout les actifs de plus de 35 ans. Une étude qui recense les impacts sur la santé dans l'agglomération de Dunkerque, menée par l'Observatoire Régional de la Santé (Prouvost *et al*, 2004), indique que la CUD présente une surmortalité par tumeurs, pathologies respiratoires et circulatoires, une spécificité non pas de la CUD mais de la région Nord Pas-de-Calais. Les hommes semblent être plus touchés que les femmes, plus nettement dans la CUD que dans la région, ce qui peut suggérer un lien entre l'exposition professionnelle et la mortalité (les expositions professionnelles aux polluants sont très différentes entre les deux sexes). On constate en effet une surmortalité des hommes par cancer des voies aéro-digestives et de l'oesophage. Ainsi, le cancer des bronches a augmenté de 20% en dix ans, et il est plus fréquent dans les zones industrielles en général. Il existe donc une corrélation entre certaines affections et la qualité de l'air dans la région. Toutefois, la consommation d'alcool ou de tabac et la prise en charge médicale, déficitaire pour certaines spécialités sur le littoral en raison d'un manque de praticiens, doivent être prises en compte (Prouvost *et al*, 2004).

3) Les sources de COV sur le littoral

a) Les sources industrielles

L'agglomération de Dunkerque est une zone d'implantation d'industries lourdes. Ces industries englobent plusieurs secteurs : Sidérurgie-Métallurgie-Fonderie, Chimie-Parachimie-Pétrole, Traitement de surface, Energie et Verres-Matériaux. 23 des établissements industriels installés dans la zone industrialo-portuaire de Dunkerque sont soumis à la directive SEVESO ou assimilés.

Pour l'année 2007, les émissions de composés organiques volatils non méthaniques (COVNM) s'élevaient à 10 917 tonnes environ pour la région Nord Pas-de-Calais. Plus des deux tiers de ces émissions sont imputables à 16 « gros émetteurs », parmi lesquels figurent Arcelor-Mittal (850 tonnes) à Dunkerque, Polimeri Europa France à Mardyck (712 tonnes), et la Raffinerie des Flandres Total à Loon Plage (655 tonnes) (IRE,

2008).

Les familles de COV les plus représentées dans les émissions industrielles sont les alcanes, les alcènes et les aromatiques dont les BTEX, principalement rejetés par les activités de pétrochimie.

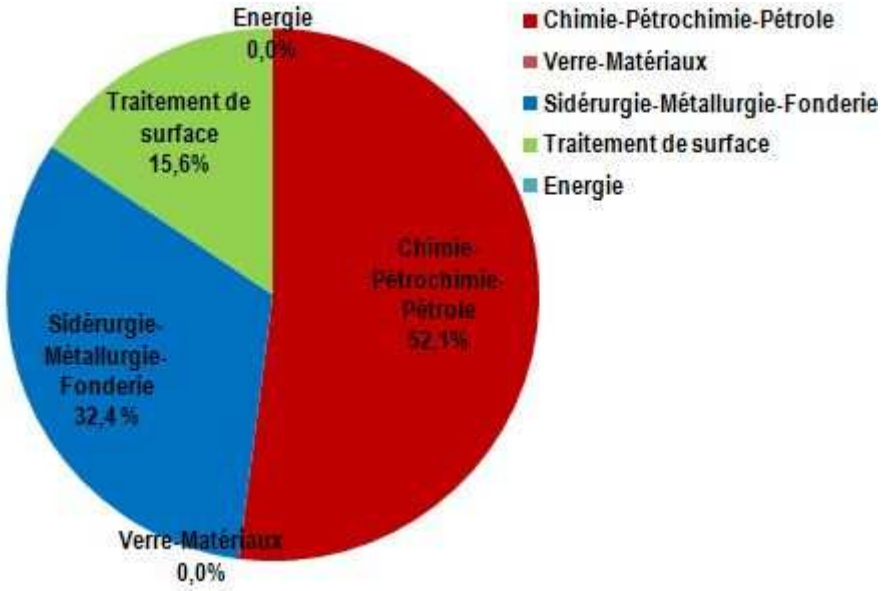


Figure 1: Répartition des rejets en composés organiques volatils non méthaniques par les émetteurs industriels dunkerquois en 2007 (IRE, 2008 consulté en décembre 2008)

b) Les sources du secteur résidentiel

Ce secteur représente 31,5% des émissions des COVNM en France pour l'année 2007 (IRE, 2008). Les principales sources sont le chauffage domestique, les peintures, l'usage de solvants et les fuites de gaz naturel. Les émissions sont notamment composées de butane, pentane et composés chlorés de type perchloroéthylène.

c) Les sources mobiles

Les transports routier, autoroutier, ferroviaire et maritime sont importants sur le littoral dunkerquois.

La situation géographique de l'agglomération dunkerquoise, zone d'échanges propice entre le Royaume-Uni et le continent, entre l'Europe du Nord Ouest, la France et la péninsule ibérique, en fait une région particulièrement desservie par de nombreux axes routiers et autoroutiers.

Sur le plan maritime, Dunkerque se situe à proximité de la route Manche/Mer du Nord, la plus fréquentée au monde (www.ville-dunkerque.fr). Le port autonome de Dunkerque s'étend sur 17 kilomètres, avec 51 millions de tonnes de marchandises transportées par an, et accueille près de 7 000 navires pas an. C'est aussi le premier port français d'importation des minerais et de charbon et le premier port d'exportation d'acier (www.portdedunkerque.fr).

Les composés aromatiques constituent les principaux composés rejetés par l'activité des transports.

ETAT DE L'ART

III. État de l'art

A. Les Composés Organiques Volatils

Au cours du siècle dernier, la problématique de la pollution atmosphérique a évolué, passant d'une pollution monopolluante massive à une pollution multipolluante diffuse. La diversité des polluants présents dans l'air complique l'étude des impacts de cette pollution. Dans cette problématique, les COV constituent une des catégories de polluants les moins connues. Dans cette catégorie, on compte environ 13 000 espèces chimiques différentes regroupées sous les familles suivantes : alcanes, alcènes, alcynes, aldéhydes, aromatiques, cétones, composés azotés, chlorés et soufrés. La complexité de ces composés réside notamment dans les incertitudes que l'on a quant à leurs interactions entre eux dans l'air et leurs effets réels sur les êtres vivants.

1) Généralités sur les COV

En 1986, l'US EPA (United States Environmental Protection Agency : Agence de protection de l'environnement des Etats-Unis) a défini comme COV toute substance carbonée (sauf le monoxyde de carbone, le dioxyde de carbone, les acides carboniques, les carbures et carbonates métalliques et carbonates d'ammonium) qui participe aux réactions photochimiques de l'atmosphère. Ainsi il est possible d'appréhender les effets des COV en fonction de leur longévité dans le milieu naturel et leur capacité de réactivité lors de réactions photochimiques dans l'atmosphère (Moretti & Mukhopadhyay, 1983).

En France, les composés organiques volatils (COV) définissent, par arrêté ministériel du 1er mars 1993 (en Europe dans la Directive 1999/13/CE du 11 mars 1999), « tout composé qui, à l'exclusion du méthane, contient des atomes de carbone et d'hydrogène, lequel peut être substitué par d'autres atomes tels que des atomes d'oxygène, de soufre, d'azote, de phosphore ou encore des halogènes, à l'exception des oxydes de carbones et des carbonates. Ces composés se trouvent à l'état de gaz ou de vapeur dans des conditions normales de température (20°C) et de pression (1 atm). ».

Les COV sont caractérisés notamment par une tension de vapeur élevée à température ambiante. La tension de vapeur seuil, à partir de laquelle un composé organique est considéré comme volatil, est déterminée arbitrairement.

2) Les sources de COV

En France, les sources des émissions de COV sont très diverses.

D'une part, les sources naturelles :

Des émissions naturelles par les végétaux constituent des sources naturelles de COV comme les terpènes et

l'isoprène.

D'autre part, les sources anthropiques :

- Les sources domestiques de COV sont la fumée de cigarettes, les émanations de sources de combustion interne, les activités de peintures domestiques, l'utilisation de déodorants, le nettoyage des habits ou de la vaisselle…
- Il existe des sources industrielles telles que la production d'énergie, la cogénération et chauffage urbain, la combustion dans l'industrie, les procédés de fabrication (produits pétroliers, métaux ferreux, mines de charbon, procédés du bois et de la pâte à papier), l'extraction et la distribution de combustibles fossiles et l'utilisation de solvants (peinture, dégraissage des métaux, nettoyage à sec, imprimerie)…
- Enfin, les transports routiers et autres sources mobiles sont aussi émetteurs de COV, et il existe des sources agricoles de COV.

Un intérêt particulier est porté à certains de ces composés aromatiques, notamment le benzène, le toluène, l'éthylbenzène et les xylènes (BTEX), car ils représentent une part quantitative importante des COV présents dans l'air et constituent un danger pour la santé humaine et l'environnement.

3) La toxicité des COV chez l'Homme

La pollution de l'air entraîne de façon générale des perturbations olfactives de la qualité de vie globale des populations vivant à proximité des sources de pollution .

Les effets à court terme sont les plus faciles à mettre en liaison avec la pollution atmosphérique, du fait de la relation chronologique étroite entre les épisodes de pollution, et l'apparition des symptômes au sein de la population exposée. Ils se localisent essentiellement au niveau de l'appareil respiratoire, et affectent davantage les populations sensibles comme les jeunes enfants ou les sujets asthmatiques.

Les effets à long terme sur la fonction respiratoire sont plus difficiles à évaluer, du fait du délai d'apparition et de l'origine multifactorielle des maladies respiratoires dégénératives et les cancers de l'appareil respiratoire. Cependant, à risque tabagique égal, il apparaît que les pathologies respiratoires et les cancers soient plus fréquents dans les zones à pollution élevé (Préfecture du Nord Pas-de-Calais, PRQA, 2000).

La toxicité des BTEX chez l'homme a été particulièrement étudiée en raison de cas d'intoxiciations professionnelles révélées, ce qui a entraîné des études toxicologiques approfondies. Le tableau 2 (élaboré d'après les fiches toxicologiques développés par l'INERIS) synthétise les principaux effets induits chez l'homme par des expositions aiguës ou chroniques aux BTEX. Nous y avons ajouté le styrène, accompagnant les BTEX et connu pour sa dangerosité.

	Effets toxiques à court terme	Effets toxiques à long terme	Valeurs toxicologiques de référence	Valeurs limites réglementaires pour la population générale
Benzène	Mort à 20 000ppm pendant 5 à 10 minutes. Atteinte de la moëlle osseuse; irritation des yeux; troubles cardiaques et digestifs; troubles du système nerveux; céphalées	Effets hémotoxiques et immunotoxiques Cancérogène (leucémie) classe 1 (Union Européenne, JOCE 2004) Mutagène classe 2 (Union Européenne)	VTR avec seuil inhalation chronique : 0,003 ppm (ATSDR, 2005) VTR sans seuil : ERUi=6.10^{-6} µg.m^{-3} (OMS, 2000)	France : décret 2002-213 du 15/02/2002 Valeur limite annuelle 2010 : 5µg.m^{-3} objectif qualité : 2µg.m^{-3} Union Européenne : Directive 2000/69/CE du 16/11/2000 valeur limite annuelle 5µg.m^{-3}
Toluène	Irritation des yeux; troubles cardiaques et digestifs; troubles du système nerveux; céphalées; vertiges; somnolence; muqueuses irritées	Effets neurologiques Tératogène (classe 3 Union Européenne)	VTR avec seuil inhalation : 5mg.m^{-3} (USEPA, 2005)	France : aucun texte concerné OMS : Directive Qualité pour air : 0,26mg.m^{-3}
Ethylbenzène	Irritation des yeux, nez, muqueuses; atteintes neurologiques, hépatiques et rénales	Atteintes hépatiques, rénales et du système hématologique	VTR avec seuil inhalation : 1ppm (ATSDR, 1999)	Aucune réglementation française, européenne ou OMS
Xylènes	Mort à 43 500 mg.m^{-3} irritation du nez, de la gorge; perte de mémoire; déséquilibre; tachycardie	Atteintes des voies respiratoires; troubles hématologiques mais difficulté de diagnostic du fait d'expositions toujours à des polluants en mélange	VTR avec seuil inhalation : 0,05ppm (ATSDR, 2005)	Aucune réglementation française, européenne ou OMS
Styrène	Troubles du système nerveux central; irritations du nez, de la gorge, des yeux; nausées; céphalées	Irritations des voies respiratoires; neurotoxique des systèmes nervaux central, périphérique et autonome	VTR avec seuil inhalation : 0,06 ppm ou 0,26 mg.m^{-3} (ATSDR, 1992)	OMS : Directive de qualité pour l'air (2000) : moins de 0,016 ppm ou 0,070 mg.m^{-3} pour 30 minutes d'exposition

Tableau 2: Toxicité des composés organiques volatils majeurs : benzène, toluène, ethylbenzène, xylènes et styrène (d'après fiches toxicologiques de l'INERIS consulté en mars 2007)

Compte tenu de la dangerosité de ces composés organiques, il apparaît nécessaire d'approfondir l'étude de leurs mécanismes d'action et d'optimiser des paramètres indicateurs d'exposition pouvant servir d'indicateurs d'effets précoces, pour une mesure en amont du développement d'une pathologie cliniquement décelable.

4) Les bryophytes et les composés organiques volatils

Les caractéristiques de bryophytes (*cf*. paragraphe D) en font un modèle intéressant pour l'étude des contaminants de l'atmosphère. Suite à une analyse bibliographique préliminaire, il s'avère que les recherches sur les bryophytes sont principalement axées sur l'étude des métaux et de quelques composés organiques tels que les organochlorés, les dioxines (Carballeira *et al*, 2006) et les hydrocarbures aromatiques polycycliques (Lim *et al*, 2006; Vasseur & Cossu-Leguille, 2006; Ötvös *et al*, 2004). A notre connaissance, il n'existe aucune étude dans la littérature scientifique relatant de recherches sur le comportement des COV chez les bryophytes, que ce soit en terme d'accumulation ou en terme d'impacts.

Etant donnée la toxicité avérée ou potentielle des COV et la grande variabilité des profils environnementaux des COV selon leurs sources d'émission et la toxicité de ces polluants, l'étude des phénomènes d'accumulation des COV chez les bryophytes et de leurs mécanismes d'action toxique apparaît essentielle. Elle permettrait, en effet, l'acquisition d'une meilleure connaissance des expositions humaines et le développement d'une méthode de biosurveillance de l'exposition des populations aux COV atmosphériques et d'une méthode de diagnostic en environnements pollués.

B. Biosurveillance de la qualité de l'air

1) Contexte général - l'écotoxicologie

Le National Research Council a défini en 1983 l'évaluation des risques sanitaires comme étant « l'utilisation des faits scientifiques pour définir les effets sur la santé d'une exposition d'individus ou de populations à des matériaux ou à des situations dangereuses ». De façon générale, l'évaluation des risques vise à estimer quantitativement le niveau de risque, pour l'environnement et la santé humaine, associé à une exposition à des substances dangereuses.

Les interactions entre la santé humaine et les faibles doses de polluants environnementaux ont été les premières concernées par l'évaluation du risque, du fait de l'incertitude scientifique liée aux difficultés d'observation de tels phénomènes. L'évaluation des risques s'est notamment orientée vers l'évaluation des risques écotoxicologiques. Cette dernière rassemble des compétences relatives à :

- l'évaluation des dangers présentés par les substances chimiques, les effluents, les déchets, les sols, les sédiments vis-à-vis des espèces animales et végétales et de leurs associations au sein des écosystèmes;
- l'étude du devenir des substances dans les différents milieux, ce qui permet de définir l'exposition des cibles considérées (animaux, végétaux...) au sein de leur milieu ;
- et la caractérisation des risques par comparaison des concentrations prévisibles dans l'environnement et des concentrations réputées sans effet, en tenant compte des incertitudes rencontrées aux différentes étapes de l'évaluation des dangers ou des expositions.

Truhaut définissait en 1977 l'écotoxicologie comme « la branche de la toxicologie qui étudie les effets toxiques provoqués par les substances naturelles ou les polluants d'origine synthétique sur les constituants des écosystèmes animaux, y compris l'homme, végétaux, et micro-organismes, dans un contexte intégré ».

L'évaluation de la qualité des milieux naturels a longtemps reposé en grande partie sur la recherche et la quantification de substances toxiques dans divers types d'échantillons (air, sols, eaux, sédiments, organismes) (Lagadic & Caquet, 1997a). Le plus souvent, la traduction écotoxicologique des analyses chimiques ainsi réalisées est difficile. En effet, s'il est relativement aisé de connaître la toxicité d'une substance donnée dans les conditions expérimentales, il est éminemment plus complexe d'en évaluer les effets dans le milieu naturel.

Ainsi l'interaction de plusieurs substances peut dans certains cas exacerber leur potentiel toxique (synergie), ou au contraire diminuer leurs effets sur les organismes vivants (antagonisme). Par ailleurs, une même concentration en toxique peut avoir une signification écotoxicologique différente selon le milieu considéré car certains phénomènes modifient, parfois de façon importante, la biodisponibilité des polluants (adsorption-désorption, spéciation...). De plus, en l'état actuel des méthodes chimiques d'analyse, il est très difficile, voire impossible, de quantifier et d'identifier certains toxiques. Enfin, la diversité des polluants dans l'environnement rend illusoire la mesure des concentrations de toutes les substances présentes dans un échantillon.

C'est pourquoi il s'avère nécessaire d'utiliser d'autres techniques de détection des polluants dans le milieu naturel. Ces techniques se doivent d'intégrer la diversité des substances présentes dans l'environnement, ainsi que les éventuelles interactions entre elles et avec le milieu, et surtout leurs effets sur les êtres vivants. Dans cette perspective, le recours aux organismes vivants eux-mêmes, animaux et végétaux, s'impose, sous la forme de marqueurs biologiques de pollution dont les variations peuvent rendre compte des effets des polluants sur les systèmes biologiques.

Les végétaux chlorophylliens sont les producteurs primaires de biomasse les plus importants sur les terres émergées et ils sont de ce fait à la base du fonctionnement de pratiquement tous les écosystèmes terrestres. La photosynthèse est en effet le processus le plus important pour l'entrée de l'énergie dans les écosystèmes. Les composantes des réseaux trophiques (animaux, bactéries, champignons et plantes elles-mêmes) dépendent de la conversion de l'énergie lumineuse en énergie chimique et photosynthétats. Par ailleurs, les végétaux ont d'autres fonctions écologiques :

- l'architecture des plantes et du couvert végétal permet l'individualisation de strates qui constituent autant d'habitats pour la faune sauvage ;
- les plantes participent aux cycles biogéochimiques des éléments et notamment à la formation de la matière organique qui joue un rôle clé dans la fertilité des sols ;
- le couvert végétal assure une protection efficace contre l'érosion, etc.

Classiquement, l'analyse chimique est mise en oeuvre sur les sols pollués pour diagnostiquer les effets

potentiellement néfastes que les contaminants peuvent avoir sur une culture de végétaux. Cependant, les résultats obtenus peuvent conduire à des erreurs de diagnostic, car la disponibiltié des éléments dans le substrat et leur prélèvement par les racines sont fonction des conditions du milieu (pH du sol, particules atmosphériques, acidité de l'eau, etc.).

Parmi les outils les plus employés pour évaluer les effets de contaminants figurent les tests de toxicité. Les tests de phytotoxicité aiguë les plus largement utilisés sur les végétaux nécessitent que l'intoxication des plantes-tests atteigne une valeur ou une durée suffisante pour que ses effets soient visibles, ce qui limite l'intérêt de tels tests en tant qu'outils de dignostic.

Dans cette perspective, des biomarqueurs pourraient être utilisés en tant que signal d'alarme vis-à-vis d'un stress général ou particulier.

2) La biosurveillance

La biosurveillance peut être définie comme étant « l'utilisation à tous les niveaux d'organisation biologique (moléculaire, biochimique, cellulaire, physiologique, tissulaire, morpholgique, écologique) d'un organisme ou d'un ensemble d'organismes pour prévoir et/ou révéler une altération de l'environnement et pour en suivre l'évolution » (Garrec & Van Haluwyn, 2002).

Tandis que l'approche physicochimique ne permet qu'une analyse indépendante des différents polluants préalablement sélectionnés pour représenter un niveau de pollution, la biosurveillance apporte, elle, des informations sur le devenir et la toxicité de ces substances dans les systèmes biologiques. Elle se présente ainsi comme complémentaire de l'approche physico-chimique et permet de rendre compte d'un effet réel lorsque le dosage du milieu étudié oblige à une extrapolation, plus ou moins aléatoire.

Selon Nimis (1999), la biosurveillance ne prend toute sa valeur que lorsqu'elle « établit une comparaison avec une situation témoin considérée comme « naturelle », évaluant ainsi un degré d'altération par rapport à une « normalité » pour une région donnée et en tenant compte des paramètres environnementaux.

Ainsi la biosurveillance opère selon deux approches pour diagnostiquer une situation : l'approche passive et l'approche active.

En biosurveillance végétale, l'approche passive consiste en l'analyse des végétaux en place sur un site par rapport aux relevés de pollution de ce site et des paramètres stationnels, comme le climat, tout en considérant également les variabilités génétiques du végétal étudié.

Dans l'approche active, des végétaux génétiquement sélectionnés et cultivés dans des conditions standardisées sont mis en place sur un site pendant une période donnée. Ainsi, l'évolution de leur état d'organisation (aux différents niveaux préalablement cités) traduit la pollution du site étudié. (Garrec & Van Haluwyn, 2002)

A partir des différents niveaux d'organisation biologique déjà évoqués précédemment, quatre concepts regroupés sous le terme de biosurveillance peuvent être déterminés : biomarqueur, bioindicateur, biointégrateur et bioaccumulateur.

Le biomarqueur se situe au niveau infra-individuel, et traduit des altérations moléculaires, biochimiques, cellulaires ou physiologiques non visibles.

Le bioindicateur évoque le niveau individuel et les altérations physiologiques, tissulaires ou morphologiques visibles.

Le biointégrateur se situe au niveau populationnel ou communautaire et dénote la disparition ou l'apparition d'espèces, la variation densitaire.

Enfin, le bioaccumulateur, situé au niveau individuel, a pour particularité de déterminer l'accumulation d'un élément à une concentration supérieure à celle du milieu sans pour autant qu'il y ait de dommages immédiats de la physiologie ou de la morphologie. Il est de fait utilisé comme matrice pour le dosage des polluants. Il peut également être utilisé pour l'étude des phénomènes biologiques résultant de l'accumulation de ces polluants.

*a) Les biomarqueurs**

Le biomarqueur est défini comme « un changement observable et/ou mesurable au niveau moléculaire, biochimique, cellulaire, physiologique qui révèle l'exposition présente ou passée d'un individu à au moins une substance chimique à caractère polluant » (Lagadic *et al*, 1997b; Cossu *et a*l, 1997).

Les biomarqueurs peuvent être classés comme suit :

- biomarqueurs d'exposition : ils indiquent que le polluant présent dans le milieu a pénétré dans l'organisme
- biomarqueurs d'effet à l'exposition : ils indiquent que le xénobiotique est entré dans l'organisme et qu'après avoir été distribué entre les différents tissus, il a exercé un effet toxique ou non, sur une cible critique
- biomarqueurs de sensibilité aux effets : ils traduisent le phénomène de variation d'origine génétique de la réponse à la contamination par des polluants.

Les différents biomarqueurs ne sont pas tous de la même nature. Nous pouvons trouver des biomarqueurs biochimiques (péroxydases, catalases...), des biomarqueurs physiologiques (photosynthèse, taux de chlorophylle...) et des biomarqueurs de génotoxicité (adduits à l'ADN, coupure de l'ADN, micronoyaux...).

Les biomarqueurs ne sont pas toujours spécifiques d'une pollution mais évaluent un stress général.

Mesuré au niveau individuel, un biomarqueur ne trouve sa signification écotoxicologique que lorsqu'il permet de décrire, d'expliquer, voire même éventuellement de prédire, les effets des polluants sur les populations et communautés évoluant dans leur environnement naturel.

*b) Les bioindicateurs**

Ils présentent les effets de polluants phytotoxiques. Ces effets observables correspondent à des altérations morphologiques, tissulaires ou physiologiques. Ainsi, leur utilisation est simple, rapide et économique.

*c) Les biointégrateurs**

Ils traduisent une modification de la présence et de l'abondance d'espèces indiquant la modification de l'environnement de ces espèces. L'introduction d'un polluant dans un milieu peut perturber, modifier la structure des populations et/ou des communautés, qu'elles soient animales ou végétales.

Les biointégrateurs permettent de témoigner de l'état d'un système écologique et de détecter les modifications de ce système de par les variations de ses caractéristiques.

Ainsi, les bryophytes présentent, comme les lichens, une sensibilité aux pollutions atmosphériques dues aux gaz industriels. En effet, on sait que des « indices de pureté atmosphérique » ont pu être déduits de l'examen des populations cryptogamiques des troncs d'arbres en combinant le nombre d'espèces, leur vitalité et leur degré de recouvrement. (Ozenda, 1990 ; Denayer, 2000)

3) Les bioaccumulateurs*

Ce sont des organismes vivants capables d'accumuler des substances pouvant être toxiques dans leurs tissus. La bioaccumulation est un phénomène par lequel une substance s'accumule en surface et/ou pénètre dans un organisme. Les concentrations trouvées dans les organismes sont supérieures à celles observées dans leur milieu. La bioaccumulation constitue un équilibre dynamique entre la plante et son milieu, équilibre dynamique dont la constante de temps dépend de la plante, de sa biomasse, de la vitesse de métabolisation du polluant ou de la vitesse de dépôt. (Garrec & Van Haluwyn, 2002).

C. Intérêts des bryophytes pour l'étude de la qualité de l'air

Afin de mieux comprendre le rôle important que jouent les bryophytes en tant que modèle en écotoxicologie, il est nécessaire de présenter leurs caractéristiques générales.

1) Généralités sur les bryophytes

Les bryophytes correspondent au premier embranchement des Archégoniates, troisième niveau d'organisation des végétaux.

Ce sont des végétaux généralement autotrophes*, représentés par des organismes haploïdes* (gamétophyte*), le sporophyte*, diploïde*, vivant en hémi-parasite. (Ozenda, 1990)

Cet embranchement comprend trois classes : les mousses, les hépatiques et les anthocérotes (*cf*. annexe 1).

Les bryophytes sont des Archégoniates à cycle biphasique, comprenant un gamétophyte durable, sans racine ni tissu conducteur, à fort pouvoir de multiplication végétative, et un sporophyte transitoire développé sur le gamétophyte et terminé par une capsule* sporifère.

On connaît environ 25 000 espèces de bryophytes. Leur aspect est varié mais, quelles que soient les formes, toutes naissent, croissent et se reproduisent suivant le même processus. Autrement dit, tout ce groupe de plantes est essentiellement caractérisé par son cycle de développement. (Ozenda, 1990)

a) Cycle de développement des bryophytes (cf. annexe 2)

i- Description

Les mousses ressemblent à de toutes petites plantes feuillées. La majorité des mousses appartiennent à l'ordre des Bryales. Elles ont un protonéma* filamenteux, une tige feuillée à symétrie radiale et une capsule typique. Leurs tiges et feuilles ne sont pas comparables à celles des végétaux terrestres. La « tige » est un simple cordon revêtu d'un épiderme faiblement cutinisé*. Des cellules allongées, les hydroïdes* spécialisées dans le transport de l'eau, et les leptoïdes*, dans celui des molécules issues de la photosynthèse (transport de la sève), apparaissent seulement chez certaines mousses tropicales et les sphaignes.

Les « feuilles » sont de simples émergences de la tige, constituées d'une seule assise de cellules chlorophylliennes, excepté dans la région médiane où deux ou trois épaisseurs de cellules simulent une nervure. « Tige » et « feuille » sont dépourvues de stomates*. Des anthocyanes* assurent une protection contre les rayons ultra-violets, mais leur variété structurale est encore faible. (Ozenda, 1990 ; Denayer, 2000 ; Roland, 1999)

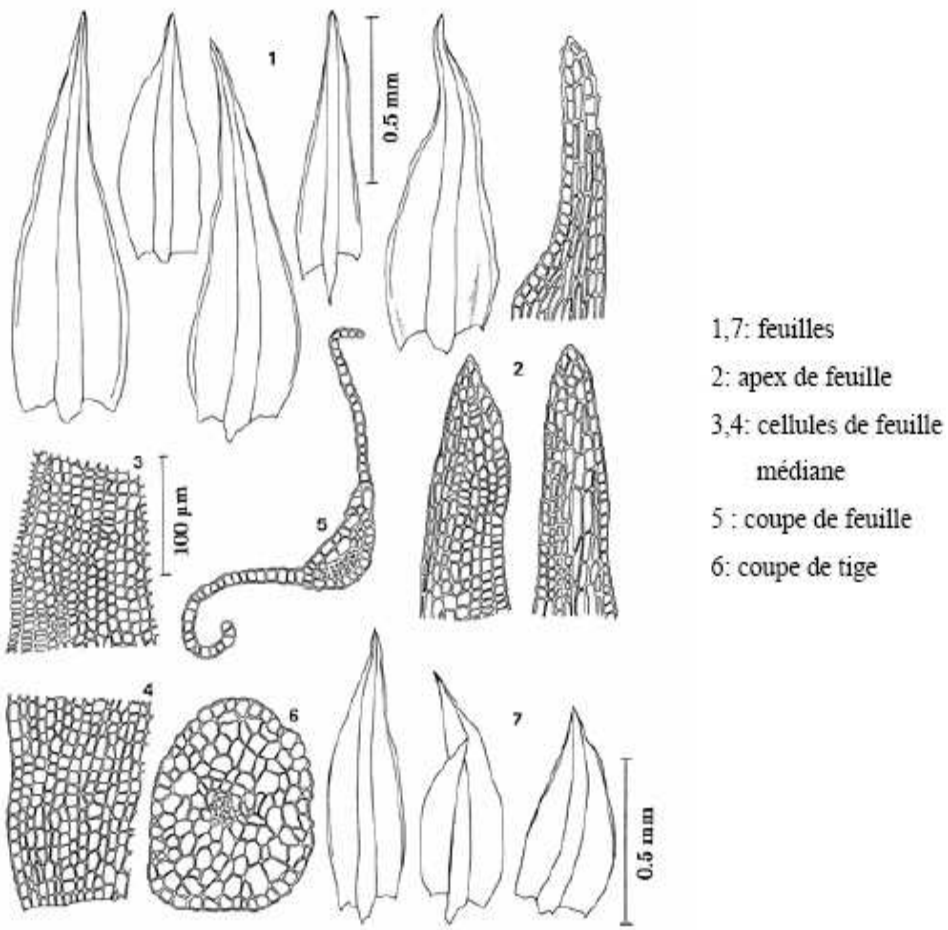


Figure 2: Représentation de feuilles et tiges d'une mousse (Source : http://antmoss.nipr.ac.jp/ham/en/search_photo.html)

Le sporogone*, issu de la transformation d'un zygote* résultant de la fusion des noyaux mâle et femelle, est à 2n chromosomes et présente en revanche un épiderme muni de stomates et, au niveau de la soie* (ou pédicelle*), une ébauche de tissu conducteur. Son pied lui permet de rester fixé sur la plante feuillée. La soie porte à son extrémité une capsule dont l'ouverture permet la libération des spores*, à n chromosomes après réduction chromosomique.

Selon la disposition du sporogone sur le gamétophyte chez les mousses, on distingue :

- les mousses acrocarpes* dont les sporogones sont terminaux ;
- les mousses pleurocarpes* dont les sporogones sont latéraux.

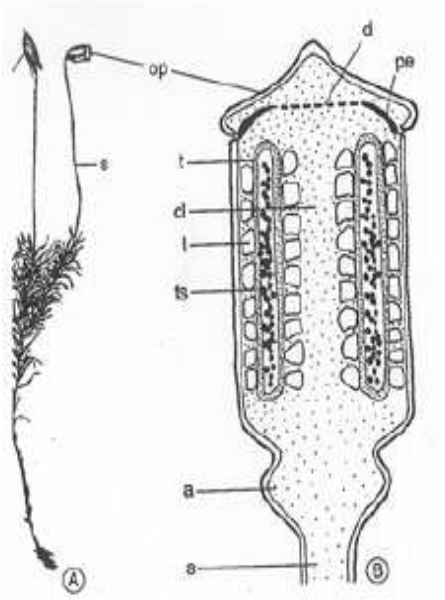


Figure 3: Sporogone de Polytrichum (A. op : opercule; s : soie; B. a : apophyse; cl : columelle; d : diaphragme; op : opercule; pe : péristome; s : spore; ts : tissu sporogène; t : assise nourricière) (source : université Joseph Fourier, Grenoble : http://web.ujf-grenoble.fr)

Les hépatiques sont constituées d'une lame foliacée plus ou moins complexe qui rappelle le thalle* des algues. Elles sont caractérisées par un protonéma souvent réduit et massif, un appareil végétatif et des capsules simples, elles comprennent deux groupes : les hépatiques à feuilles et les hépatiques à thalle. Il n'y a pas de stomates ni sur le sporogone ni sur le thalle mais des pores permettant les échanges gazeux chez plusieurs espèces.

Les anthocérotes constituent un petit groupe d'une centaine d'espèces, longtemps rattaché aux hépatiques. Ils possèdent des stomates aussi bien sur le gamétophyte que sur le sporophyte. L'archégone* (organe sexuel femelle) est protégé en étant inclus dans les tissus du gamétophyte ; le sporophyte peut croître en hauteur grâce à un méristème* basal. Comme les algues et à la différence des mousses et hépatiques, ils ne synthétisent pas d'anthocyanes. (Ozenda, 1990)

Pour résumer, la différence entre les mousses, les hépatiques et les anthocérotes réside dans la présence ou l'absence de stomates, de tissus conducteurs et par les types de méristèmes.
Ainsi, les hépatiques diffèrent par l'absence de stomates tandis que les anthocérotes ont un méristème basal

particulier et ne possèdent pas de tissu conducteur spécialisé ; leurs stomates sont semblables à ceux des plantes vasculaires. Chez les mousses, quand il y a un tissu conducteur, celui-ci est formé d'hydroïdes et de leptoïdes. (Raven *et al,* 2000)

ii- Multiplication végétative

La multiplication végétative chez les bryophytes est une multiplication sans fécondation ni réduction chromosomique, il s'agit d'une simple fragmentation.

Une spore à n chromosomes, petite masse sphérique et unicellulaire, émet un protonéma (protos : premier, nema : fil) qui se différencie en chloronéma, lorsqu'il est chlorophyllien, ou en caulonéma, et est filamenteux ou lamellaire. Cet organe est transitoire. La phase protonématale est caractérisée par des cellules indifférenciées contenant de nombreux chloroplastes et ayant une division cellulaire très rapide.

Sur ce protonéma naissent des bourgeons qui forment soit des tiges feuillées (mousses, sphaignes), soit une lame ou thalle (hépatiques), puis le protonéma disparaît.

L'organogenèse* du pied feuillé est assurée par une cellule apicale, bien repérable par sa taille, sa forme tétraédrique et ses caractéristiques cytologiques. Elle se divise selon un rythme lent et régulier, chaque division affectant successivement ses trois faces basales et découpant ainsi des cellules dérivées (segments) disposées sur trois hélices.

Sitôt mis en place, les segments se recloisonnent et produisent deux séries de cellules : certaines seront à l'origine de l'émergence des feuilles, les autres seront à l'origine de la tige. La cellule apicale joue donc un rôle organisateur important.

Lorsque la tige feuillée est suffisamment développée, les organes mâles, ou anthéridies*, et les organes femelles, ou archégones, apparaissent (les deux organes peuvent être portés par le même pied dans le cas d'espèces monoïques*, ou par des pieds différents dans le cas d'espèces dioïques*).

Les anthéridies, généralement sphériques, contiennent les anthérozoïdes* (gamètes mâles) qui sont biciliés.

Les archégones sont en forme de bouteille à long col allongé et contiennent l'élément femelle ou oosphère* (gamète femelle).

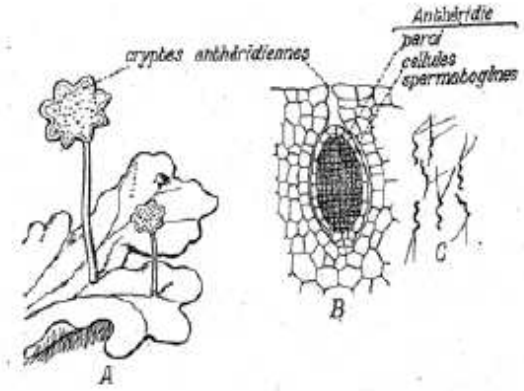


*Figure 4: Anthéridiophore : A aspect général, B détail d'une anthéridie, C spermatozoïdes chez une hépatique à thalle (*Marchantia polymorpha*) (Source : université Joseph Fourier, Grenoble : http://web.ujf-grenoble.fr)*

*Figure 5: Archégoiophore chez une hépatique à thalle (*Marchantia polymorpha*) (Source : université Joseph Fourier, Grenoble : http://web.ujf-grenoble.fr)*

Les bryophytes ne possèdent pas de racines vraies, elles sont pourvues de fins filaments assurant sa fixation au sol : les rhizoïdes*. Ceux-ci peuvent être abondants au niveau de la tige ou du thalle. La plupart des rhizoïdes sur le gamétophore* sont de type micronemata*. Le type macronemata* est localisé à la base des bourgeons chez certaines mousses acrocarpes. Il est possible qu'ils aient un rôle protecteur, alors que les micronemata auraient un rôle très important de fixation et dans le transport de l'eau par capillarité. Chez les mousses acrocarpes, les rhizoïdes ne semblent pas être affectés par le substrat, mais vont par contre hautement participer à la stabilisation du sol. Les rhizoïdes ont également un rôle dans la multiplication végétative de certaines mousses acrocarpes comme *Ceratodon purpureus (C. purpureus)*. Effectivement, quand le rhizoïde apparaît à la surface du sol, il devient un protonéma chlorophyllien qui produira plus tard de nouveaux gamétophytes feuillés. (Ozenda, 1990 ; Denayer, 2000 ; Roland, 1999)

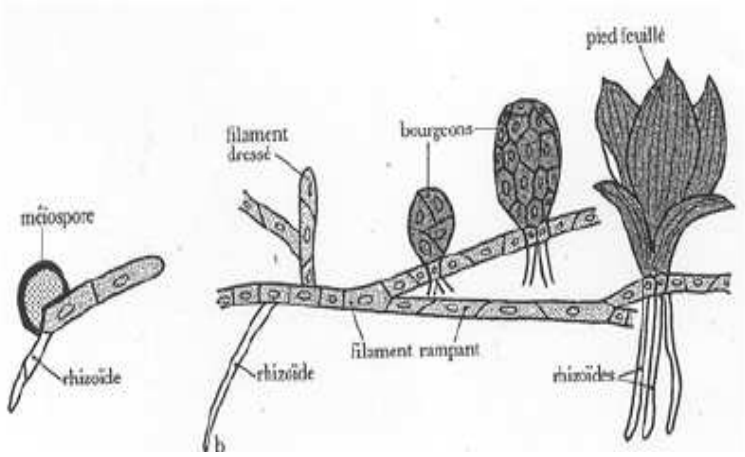


Figure 6: Germination de la spore et évolution du protonéma (Source : université Joseph Fourier, Grenoble : http://webujf-grenoble.fr)

iii- Reproduction

Les anthérozoïdes mûrs, libérés de l'anthéridie par gélification et rupture de la paroi, sont entraînés par des gouttes d'eau dans lesquelles ils se déplacent. A ce moment, l'organe femelle est ouvert au sommet et les cellules placées dans l'axe du col sont résorbées, laissant un canal, rempli de matière riche en glucose, attirant ainsi par chimiotactisme les anthérozoïdes qui parviennent alors jusqu'à l'oosphère.

Les noyaux mâle et femelle, à n chromosomes, fusionnent et donnent un zygote à 2n chromosomes qui va aussitôt se diviser et se transformer en un sporogone, la partie ventrue de l'archégone constituant ainsi une enveloppe protectrice.

Le sporogone est composé :

- d'un pied qui lui permet de rester fixé sur la plante feuillée ou le thalle ;
- d'un pédicelle ou soie qui porte à son extrémité un sporange ou capsule. Cette capsule s'ouvre, soit par un couvercle ou opercule soit par des valves, pour libérer les spores, futurs gamétophytes. (*cf*. figure 6).

Les spores se forment après une réduction chromatique du nombre de chromosomes de 2n à n. Ainsi d'une cellule mère diploïde se forment quatre spores haploïdes. Ces dernières sont entourées d'une enveloppe commune correspondant à la paroi de la cellule mère. Chaque spore possède une double paroi : à l'extérieur , l'exine* (épaisse, cutinisée, sporopollénine*), et à l'intérieur, l'intine* (mince, cellulosique).

Dans des conditions favorables, les spores tombées au sol germeront et un nouveau cycle recommencera.

Nous retiendrons trois points importants du cycle de développement :

- la fécondation est aquatique : elle nécessite la présence d'eau dans laquelle se déplacent les anthérozoïdes ;
- la phase diploïde est très courte : elle se réduit au sporogone ;
- le gamétophyte est représenté par des organes végétatifs peu différenciés du fait qu'ils sont à n chromosomes. (Ozenda, 1990 ; Denayer, 2000 ; Roland, 1999)

b) Écologie des mousses

i- <u>L'eau</u>

La plupart des mousses sont des végétaux de stations fraîches ou humides : sous-bois, rochers ombragés ou suintants, voisinage des cascades. Certaines, même, sont franchement aquatiques, vivant au bord des cours d'eau ou dans des marais : ainsi, on peut noter l'exemple de nombreux *Hypnum* et genres voisins, qui sont un constituant important des tourbières à eaux neutres ou faiblement basiques ou *Fontinalis antipyretica* qui vit submergée.

Inversement, d'autres sont franchement xérophiles*, vivant sur des rochers exposés en plein soleil ou sur des toits, par exemple les *Grimmia* et les *Barbula*. Beaucoup de mousses présentent, comme les lichens et certains animaux, la faculté de reviviscence*, c'est-à-dire la possibilité de passer, en un temps très court et réversiblement, de l'état hydraté et physiologiquement actif à l'état sec et quiescent (ex: *Syntrichia ruralis*). Le taux d'hydratation peut tomber à 30% du poids sec et les fonctions sont suspendues ; à la moindre pluie l'organisme se réhydrate jusqu'à 300% ou davantage ; respiration et photosynthèse reprennent leur valeur maximum en un temps de l'ordre d'une heure. Ainsi les mousses sont dites poïkilohydriques*, c'est-à-dire que leur hydratation varie en fonction de l'humidité du milieu ambiant.

À défaut d'appareil racinaire, l'absorption de l'eau se fait par toute la plante et notamment par les jeunes feuilles, et celle des matières minérales est assurée par la même voie.

	Forme de l'eau	Mécanisme d'absorption	Type de bryophyte
Atmophyta	En vapeur, brouillard	Toute la surface	
Amphiphyta	Eau liquide, eau vapeur	Toute la surface supérieure, face inférieure et organes s'y référant	
Ombrophyta	Eau liquide		La plupart des bryophytes
	Eau liquide	Voie interne, eau du sol importante	Endohydriques* (*Polytrichum*, *Marchantiales*)
	Eau liquide	Toute la surface	Ectohydriques* (pleurocarpes, une partie des acrocarpes)
	Eau liquide	Toute la surface + voie interne	Mixohydriques (acrocarpes)

Tableau 3: L'eau chez les bryophytes (d'après Barkman, 1958)

Le caractère poïkilohydrique des mousses en fait des organismes particulièrement exposés au stress hydrique; ce dernier peut être causé par un excès d'eau ou un déficit hydrique, situation la plus fréquemment rencontrée et considérée sous le terme de stress hydrique. Du fait de cette exposition, les mousses ont dû développer des stratégies d'adaptation fondées sur le contrôle et l'ajustement de leurs systèmes métaboliques.

Le départ d'eau du protoplasme entraîne une augmentation de la concentration des solutés dans la cellule, entraînant des dommages structurels et métaboliques. L'intégrité des membranes et des protéines est aussi affectée, ce qui occasionne également des dysfonctionnements métaboliques.

La perte d'eau des cellules rompt la structure de la bicouche lipidique et provoque l'apparition de canaux remplis d'eau, et bordés par les groupements polaires des têtes des phospholipides. Autrement dit, les membranes deviennent très poreuses lorsqu'elles sont desséchées. Lorsque les membranes sont réhydratées, ces canaux permettent une fuite très importante de solutés entre les compartiments ou dans l'espace extracellulaire. Les stress, qui affectent la bicouche lipidique, pourraient également provoquer le déplacement des protéines membranaires, qui, du fait de la fuite de solutés, contribuent à une perte de sélectivité des membranes, une destruction généralisée de la compartimentation cellulaire ainsi qu'à une perte des enzymes membranaires. En plus de dommages créés aux membranes, de nombreuses études ont montré que les protéines cytoplasmiques et des organites peuvent subir d'importantes pertes d'activité ou

même être complétement dénaturées, lorsqu'elles sont déshydratées. La perte de l'intégrité des membranes et la perte de la stabilité des protéines pourraient, toutes deux, être exacerbées par un accroissement dans la cellule de la concentration en électrolytes qui accompagne la déshydratation du protoplasme. La conséquence de tous ces évènements est une perturbation du métabolisme cellulaire lors de la réhydratation.

La photosynthèse est particulièrement sensible au stress hydrique. L'apparition dans les cellules de potentiels hydriques faibles intervient directement sur l'intégrité de la machinerie photosynthétique. Le faible potentiel hydrique entraîne des lésions des membranes des thylacoïdes et de la protéine ATP synthétase, amenant à une réduction de l'activité de transport d'électrons et de photophosphorylation dans les chloroplastes. Ainsi, de faibles teneurs en eau vont limiter les capacités de photosynthèse, tandis que les très fortes teneurs en eau vont limiter le taux de photosynthèse en augmentant la résistance à la diffusion du CO_2 (Valanne, 1984).

ii- La lumière

Les mousses sont en général des végétaux peu photophiles. Beaucoup vivent dans des stations ombragées, telles que sous-bois ou troncs d'arbre. Le point de compensation, c'est-à-dire l'intensité lumineuse pour laquelle la photosynthèse équilibre la respiration, est plus bas que pour les Phanérogames*.

iii- La température

Les mousses peuvent supporter de grandes amplitudes thermiques ; les espèces boréales résistent bien à – 30°, celles des rochers ensoleillés supportent des températures de l'ordre de 80°. Cette résistance est favorisée par la reviviscence.

iv- Le sol

Chaque espèce est en général liée à un substrat déterminé : écorce, roche, sol. Les espèces terricoles sont de bons indicateurs de pH : *Leucobryum glaucum*, qui forme des coussinets compacts d'un vert blanchâtre, est très caractéristique des sols sablonneux acides dans la région parisienne ; *Dicranum scoparium* est également un indicateur de sol très acide, *Atrichum undulatum* et *Mnium hornum*, au contraire, vivent sur humus doux.

Les mousses jouent un rôle important dans la formation des sols :

- d'une part, comme colonisateurs de substrats neufs (rochers des anciennes carrières, sols nus des terrassements) ;
- d'autre part, comme matière première dans la formation de l'humus, la biomasse des mousses pouvant représenter l'essentiel de la litière sur certains terrains.

v- Les facteurs biotiques

Les mousses présentent des rapports de concurrence et de commensalisme* entre elles et avec les autres composants de la végétation : favorisées par l'ombre des arbres, elles sont en compétition* pour l'occupation du sol avec les herbes et les lichens. Certaines espèces émettent des substances « télétoxiques » qui diffusent dans le sol et inhibent le développement des végétaux concurrents. Des antibiotiques bactéricides ou fongiques ont été mis en évidence chez les mousses, mais ne sont pas exploités. (Ozenda, 1990)

c) Biogéographie

Les bryophytes croissent le plus souvent dans des stations humides des forêts tempérées et tropicales ou le long des cours d'eau et dans les endroits humides. Les bryophytes ne se cantonnent cependant pas à ces habitats. On trouve beaucoup d'espèces de mousses dans des déserts relativement secs, et plusieurs d'entre elles peuvent former des mousses de grande taille sur des rochers secs dénudés pouvant s'échauffer fortement.

Les mousses occupent souvent le terrain à l'exclusion de toute autre plante sur de grandes surfaces au nord du cercle arctique. Présentes aussi bien dans les régions arctiques que dans les forêts tempérées et tropicales, les mousses y stockent l'eau par capillarité. En montagne, elles interviennent dans la fonte des neiges.

Dépourvues de racines pour aller chercher l'eau en profondeur et de stomates pour assurer la transpiration, seule la capillarité intervient. C'est pourquoi, les mousses sont localisées dans des lieux humides.

Ce sont aussi les plantes dominantes des pentes rocheuses au dessus de la limite des arbres en montagne, et de nombreuses mousses sont capables de supporter de longues périodes de froid rigoureux sur le continent antarctique. Quelques bryophytes sont aquatiques et l'on en trouve même sur des rochers mouillés par les embruns de l'océan, bien qu'aucune ne soit réellement marine.

En résumé, on trouve les hépatiques et les anthocérotes principalement dans des zones tempérées et tropicales humides ; quelques hépatiques sont aquatiques et la plupart des hépatiques sont épiphytes. Les mousses, quant à elles, se trouvent souvent dans les régions tempérées et tropicales humides mais aussi parfois dans des régions arctiques et antarctiques. Elles sont aussi souvent présentes dans des habitats secs, et quelques unes sont aquatiques. (Ozenda, 1990 ; Denayer, 2000)

2) Intérêt du modèle bryophyte pour les études écotoxicologiques

Les particularités anatomiques et les caractéristiques physiologiques des bryophytes font d'elles des organismes particulièrement bien adaptés pour l'étude des contaminants atmosphériques. Les avantages à l'utilisation des bryophytes sont les suivants :

- les bryophytes possèdent un rapport élevé surface/volume ou surface/masse qui favorise le piégeage des grosses particules ;
- il n'y a pas de vaisseaux conducteurs ni un vrai système racinaire, ce qui assure d'une exposition quasi exclusive aux composés d'origine atmosphérique ;
- on observe l'absence de cuticule cireuse mais une paroi épidermique mince : ainsi les tissus sont facilement perméables à l'eau et aux minéraux, notamment les ions métalliques ;
- les constituants de la paroi des cellules possèdent de nombreux groupes chargés négativement et jouent un rôle efficace d'échangeurs de cations ; les différents groupements de la paroi et de la partie externe de la membrane plasmique sont des groupements hydroxyles, amines, sulfhydryles et carboxyles des polymères de l'acide uronique ;
- chez les pleurocarpes, la nutrition s'effectue plutôt par la déposition sèche et humide de particules et d'ions solubles, le substrat n'intervient donc pas ; pour certaines espèces acrocarpes épigéiques, une absorption de métaux du sol semble être possible par capillarité ;
- la formation de nouvelles tiges feuillées se fait au sommet de la précédente : il n'y a donc pas de contact direct ou d'interaction avec le sol ;
- les bryophytes sont capables de filtrer les particules contaminées par des polluants organiques et d'absorber de grosses molécules, elles se révèlent donc être un bon matériel pour le dosage des polluants organiques (Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP), dioxines/furanes, PolyChloroBiphényles (PCB), pesticides) dans le cadre d'une biosurveillance de pollution atmosphérique par exemple. L'efficacité d'une bryophyte vis-à-vis d'une pollution organique particulaire dépendra du coefficient de partage octanol/air du polluant ;
- plusieurs espèces sont abondantes et largement distribuées ;
- la longévité des bryophytes permet leur utilisation pour intégrer des dépôts sur une durée importante (habituellement 5 ans) ;
- chez la plupart des espèces bryophytiques, il existe peu de transfert de contaminants entre des segments adjacents ou à partir d'une tige feuillée ancienne sur laquelle se développe une nouvelle, ceci permet d'être plus précis lorsque l'on cherche à étudier par exemple la bioaccumulation de contaminants au cours d'une période donnée ;
- chez certaines espèces, il est possible de reconnaître et de séparer les pousses annuelles. Ceci facilite la détermination de la durée d'exposition du matériel vivant à une pollution, par exemple dans le cadre de la biosurveillance ;
- leur nature poïkilohydrique* leur assure une grande résistance aux conditions climatiques difficiles ; leur faculté de reviviscence leur permet de survivre dans des conditions de température très froide et de sécheresse ;

- la forte proportion d'acides gras insaturés présents dans les chloroplastes confère aux mousses une forte résistance aux faibles températures (Valanne, 1984) ;
- leur activité photosynthétique est continue tout au long de l'année et leurs capacités photosynthétiques ne varient pas en fonction des saisons, ce qui en fait un bio-indicateur utilisable à n'importe quelle période de l'année ;
- la simplicité et le faible coût des méthodes d'échantillonnage des bryophytes sont des qualités importantes en diagnostic environnemental. (Valanne, 1984; Denayer, 2000 ; Garrec & Van Haluwyn, 2002 ; Zechmeister *et al*, 2003)

Par ailleurs, les mousses peuvent être considérées comme un modèle végétal simplifié. On retrouve effectivement chez une mousse, l'architecture fondamentale d'une plante avec une rhizosphère (pour la fixation au sol et l'assimilation des nutriments), une partie aérienne photosynthétique avec une tige, des feuilles et les organes reproducteurs. Toutefois, l'anatomie d'une mousse est relativement simple et permet l'étude de processus physiologiques et morphogénétiques pour l'expérimentation au niveau unicellulaire. Par ailleurs, le métabolisme et le développement de la plante sont contrôlés par les mêmes facteurs biochimiques (Cove, 1984) et environnementaux (Cove & Knight, 1987 ; Kadota *et al*, 2000) que les autres plantes terrestres. D'un point de vue génétique, le cycle de vie d'une mousse à dominante haploïde facilite les approches génétiques. Les cultures *in vitro* en conditions axéniques* ont été mises au point pour certaines espèces de mousses. De plus, chez certaines espèces, il est possible de régénérer une plante à partir de n'importe quel fragment de tissu, sans étape de dédifférenciation (cals), limitant ainsi les risques de variations somaclonales. Toutes ces caractéristiques font que les mousses sont un système expérimental modèle pour des études concernant le règne végétal. (Schaefer, 2001)

3) L'accumulation de contaminants chez les bryophytes : les composés organiques

Comparativement aux autres polluants, la bibliographie sur la thématique bryophytes et polluants organiques atmosphériques est relativement faible. La première référence date de 1979 avec une étude de Thomas menée en Europe Centrale sur la contamination de la mousse *Hypnum cupressiforme* par le lindane, le PCB-60 et le benzo(g,h,i)pérylène. Les concentrations et les proportions de ces différents contaminants correspondaient parfaitement avec la typologie des sites de prélèvement (agricole ou industrielle). Pour ces trois polluants ainsi que pour le benzo(a)pyrène et le fluoranthène, les valeurs des ratios entre les concentrations dans les mousses et celles dans les dépôts particulaires sont toujours supérieurs à 1 (de 1,3 pour le fluoranthène à 709 pour le PCB-60) (Thomas *et al*., 1983 ; Thomas, 1984). Selon les auteurs, la contamination des mousses en polluants organiques serait principalement d'origine particulaire. Il est intéressant de noter que si les contaminations observées reflètent bien la typologie des sources, il ne peut être mis en évidence de lien direct entre les concentrations dans la mousse et les concentrations dans

l'atmosphère. Carlberg *et al.* (1983) observent des teneurs naturelles en alcanes non négligeables.

Les travaux qui ont suivi concernent principalement les HAP (et plus particulièrement les 16 molécules inscrites à l'Agence Américaine de l'Environnement comme étant les plus dangereuses pour la santé humaine). Un certain nombre d'études concernent les organochlorés (lindane, dioxines et PCBs). Carballeira *et al* (2006) considèrent d'ailleurs que les mousses constituent une matrice particulièrement adaptée pour le dosage des dioxines.

Les méthodes utilisées relèvent surtout de l'approche passive c'est-à-dire d'une récolte des mousses *in situ* (tableau 4). Toutefois, certaines études utilisent l'approche active par réalisation de « moss bag » (Wegener *et al*., 1992 ; Orliński *et al,* 2002; Viskari *et al*., 1997). Les mousses pleurocarpes sont les mousses les plus utilisées ; ce sont également celles qui sont retenues au niveau européen pour étudier les retombées atmosphériques métalliques (Harmens *et al*, 2007) (*Hylocomium splendens, Pseudoscleropodium purum, Pleurozium schreberi* et *Hypnum cupressiforme*).

Parmi les mousses acrocarpes étudiées, on notera l'utilisation des deux mousses *Ceratodon purpureus* (Borghini *et al*., 2005) que nous avons également étudié dans ce travail, et *Tortula muralis* (Gerdol *et al*., 2002).

Une seule étude est expérimentale, il s'agit de l'étude de Larsen *et al.* (1985) dans laquelle des moss bags de *Pleurozium schreberi* sont contaminés en organochlorés appliqués par un système de pluies artificielles. Toutes les autres études utilisent les mousses comme matrices de dosage afin d'évaluer la contamination de l'environnement sans que les mécanismes d'accumulation mis en œuvre soient explicités. Toutefois, l'origine particulaire de la contamination est parfois évoquée (Liu *et al*, 2005 ; Ötvös *et al*., 2004). L'étude expérimentale de Larsen *et al*. (1985) démontre que l'accumulation du lindane et de ses dérivés résulterait d'un équilibre dynamique qui s'installe entre la mousse et le milieu ambiant.

On peut remarquer également qu'aucune étude n'aborde les effets des polluants accumulés par les mousses. A notre connaissance, une seule publication traite des effets causés par des HAP sur les mousses (Roy *et al*., 1996), mais ce travail concerne le milieu aquatique. Il s'agit d'une expérience au cours de laquelle la mousse aquatique *Fontinalis antipyretica* est exposée sous forme de moss bag dans les eaux du port de Kuopio en Finlande. Les effets sont évalués à l'aide des biomarqueurs de stress oxydant (ascorbate peroxydase-APOX, guaïacol peroxydase-GPOX, superoxyde dismutase-SOD et glutathion réductase-GSH réductase).

Mousses	Méthode	Molécules	Pays	Auteurs
Pleurocarpes				
Hypnum cupressiforme	Passive	Lindane, benzo(g,h,i)pérylène, PCB 60	Europe centrale	Thomas (1979)
Hypnum cupressiforme	Passive	Lindane, PCB, HAP	Allemagne	Thomas *et al*., (1983)
Hypnum cupressiforme	Passive	Lindane, PCB, HAP	Allemagne	Thomas (1984)
Hylocomium splendens	Passive	organochlorés	Norvège	Carlberg *et al.* (1983)
Hypnum cupressiforme	Passive	organochlorés		Morosini *et al.* (1993)
Sphagnum sp.	Passive	PCB	Finlande	Himberg *et al*. (1994)
Hypnum cupressiforme	Passive	HAP, PCB, POP	Tchéquie	Holoubek *et al*. (2000)
Hypnum cupressiforme	Passive	HAP	Hongrie	Ötvös *et al.* (2004)
Hypnum plumaeforme	Passive	POP	Chine	Liu *et al.* (2005)
Isopterygium minutiranemeum	Passive	Lindane, dioxines	Singapour	Lim *et al*. (2006)
Pseudoscleropodium purum	Passive	dioxines	Espagne	Carballeira *et al.* (2006)
Pleurozium schreberi et Hylocomium splendens	Passive	HAP	Pologne	Galuszka (2007)
Pleurozium schreberi	Active (expérimentation) Pluie artificielle contaminée	Lindane et produits dérivés		Larsen *et al.* (1985)
Sphagnum sp.	Active	HAP	Pays bas	Wegener *et al*. (1992)
Pleurozium schreberi	Active	HAP		Viskari *et al.* (1997)
Hylocomium splendens	Active	HAP	Pologne	Orliński *et al.* (2002)
Acrocarpes				
Bryum argenteum, Pottia heimii et Ceratodon purpureus	Passive	organochlorés	Antarctique	Borghini *et al.* (2005)
Tortula muralis	Passive	HAP	Italie	Gerdol *et al.* (2002)

Tableau 4: Etat des lieux des études d'accumulation de composés organiques chez les bryophytes

D. Composés Organiques Volatils et les végétaux

1) Composés Organiques Volatils et végétaux : état des connaissances pour les végétaux supérieurs – comparaison avec les bryophytes

Chez les végétaux, il existe 2 voies d'entrée des COV atmosphériques : les stomates et la cuticule des feuilles. Ce mode de capture concerne les retombées directes de COV sur les végétaux mais aussi le réenvol des COV adsorbés à la surface du sol.

Les mousses ne possèdent ni l'une ni l'autre de ces deux voies d'entrée. Aussi, peut-on supposer que si les COV se trouvent piégés chez les mousses, cela pourrait résulter d'une interaction directe des composés avec les premières couches cellulaires.

a) Adsorption

Le processus d'accumulation des COV dépend de la nature physico-chimique du composé et de son interaction avec les substances biologiques de la plante. Ainsi, la couche lipidique est propice à l'accumulation des composés organiques lipophiles, les composés pouvant y être adsorbés (Holoubek *et al*, 2000).

Chez les bryophytes, notamment chez les mousses, les composés organiques hydrophobes n'ont pas d'affinité avec la surface de ces végétaux du fait de l'absence de cuticule cireuse. Une étude de Thomas (1984) démontre que l'accumulation des Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) par les mousses dépend de leur degré d'hydratation. Aucune publication ne permet de savoir s'il existe un phénomène d'absorption intracellulaire des COV chez les mousses et si un mécanisme de transfert entre les cellules est possible.

L'adsorption est un processus réversible, de courte durée, les composés pouvant être relargués dans l'atmosphère (Schreber & Schönherr, 1992). Le vent est un facteur météorologique qui influence la durée de rétention des COV dans les feuilles. En effet, même si l'adsorption des COV dans les plantes est possible au moment où les concentrations atmosphériques sont les plus fortes, il suffit d'un vent « propre » de direction opposée pour nettoyer les feuilles de leur contenu en peu de temps (Hiatt, 1999). D'autre part, ils peuvent être dégradés par l'action des rayons ultraviolets auxquels ils sont sensibles, ou par les microorganismes (bactéries, algues, champignons) de la phyllosphère (N'Guyen-Viet *et al,* 2008; Ares *et al*, 2009). La comparaison des capacités d'élimination du toluène par des plantes inoculées ou non avec *Pseudomonas putida*, met en évidence un effet prononcé de l'augmentation de la phyllosphère sur l'élimination du toluène (De Kempeneer *et al*, 2004).

Les mousses hébergent de nombreuses communautés microbiennes, notamment des amibes à thèques qui constituent une interface importante avec les contaminants atmosphériques. On connaît l'impact des contaminants métalliques comme le plomb sur l'abondance et la diversité spécifiques de ces communautés microbiennes (N'Guyen *et al,* 2007, 2008) ou de polluants gazeux tels que les oxydes d'azote (N'Guyen *et al,* 2004). Par contre, aucune étude ne fait état de leur rôle dans l'adsorption et/ou la dégradation des composés organiques.

b) Absorption

L'accumulation des COV chez les végétaux est très peu étudiée, ses mécanismes encore moins. La capture des produits présents dans l'atmosphère va dépendre de leur biodisponibilité pour l'organisme. (Yunus & Iqbal, 1996). La disponibilité d'un composé pour un organisme au niveau du compartiment atmosphérique dépend de la forme sous laquelle se présente ce composé : forme vapeur, dissoute dans les gouttelettes d'eau ou adsorbée sur des particules atmosphériques. (Grover, 1991).

Les mécanismes de capture dépendent de cette spéciation, mais aussi, des propriétés physico-chimiques du polluant (poids moléculaire, solubilité dans l'eau, lipophilie, coefficient octanol-eau, constante de Henry…), des conditions environnementales et des espèces végétales utilisées (surface de contact, teneur en lipides disponibles pour l'accumulation) (Holoubek *et al*, 2000; Simonich & Hites, 1995). Hiatt (1999) définit un facteur de bioconcentration résultant du rapport entre la concentration en COV dans le végétal et celle dans l'environnement. Il ne peut être calculé que lorsque les concentrations sont à l'état stationnaire, qu'elles ne varient plus. La température, le type de plante et sa capacité à métaboliser sont des paramètres qui influencent le facteur de bioconcentration d'un COV. Chez les végétaux supérieurs, les COV accumulés dans la cuticule peuvent migrer dans les cellules en profondeur, par diffusion. Ce phénomène de migration est plus lent que celui de l'adsorption de surface (Schreiber & Schönherr, 1992).

On ne dispose d'aucune donnée scientifique concernant les mécanismes d'absorption des COV chez les bryophytes. Toutefois, les mousses renferment des teneurs non négligeables en triacylglycérol, en cire et en « esters stéryls » (Karunen, 1981). Ces composés interviendraient dans l'adaptation des mousses aux conditions environnementales (Karunen *et al*, 1988; Hakala & Sewon, 1992). Les bryophytes renferment également de fortes teneurs en acides gras polyinsaturés (Dembitsky, 1993; Gellerman *et al*, 1972). Dans les chloroplastes, il existe différents lipides polaires dont le diacylglycéryltriméthylhomosérine, composé important chez les cryptogames mais dont le rôle n'est pas connu.

2) Métabolisation des COV chez les végétaux

Les COV ayant pénétré dans les cellules sont susceptibles d'être pris en charge par les mécanismes de métabolisation qui transformeront les composés primaires en composés secondaires plus ou moins toxiques.

La métabolisation des composés organiques fait intervenir principalement les cytochromes CYT P450. Ils forment la plus grande famille des protéines végétales. Ils interviennent en catalysant les réactions d'oxydation (principalement la monooxydation) (Chaudhry *et al*, 2002, Shang *et al*, 2001, Guengerich, 1991, Porter & Coon, 1991). Ainsi l'activation ou la détoxification des herbicides par les végétaux sont catalysées via les CYT P450 (Werck-Reichart & Didierjean, 2000). D'autres enzymes, notamment les peroxydases, sont également susceptibles d'intervenir dans le métabolisme par les végétaux de divers xénobiotiques (Stiborova *et al*, 2000 ; Plewa & Wagner, 1993 ; Gichner *et al*, 1994 ; Stavreva *et al,* 1997). On ne dispose que de très peu d'informations sur la métabolisation des COV chez les végétaux. En utilisant le marquage au carbone 14, Ugrekhelidze *et al* (1997) ont démontré l'accumulation du benzène et du toluène dans les plantes et leur métabolisation par clivage de leur cycle aromatique. Les atomes de carbone libérés sont incorporés dans différents composés organiques et une part est émise sous forme de CO_2 (Durmishidze & Ugrekhelidze, 1975; Ugrekhelidze 1976 ; Ugrekhelidze & Ugrekhelidze,1984). Concernant la métabolisation du benzène, la première étape est l'hydroxylation ; les composés intermédiaires étant le phénol et le pyrocatéchol (Ugrekhelidze *et al,* 1997). Divers acides organiques sont les composés finaux de la métabolisation du benzène. L'acide muconique est le premier produit de clivage du cycle aromatique, qui, après oxydation béta-lipidique, donne l'acide fumarique. L'oxydation du benzène pourrait être réalisée dans les chloroplastes par une enzyme contenant du cuivre dans son groupement prosthétique. De telles enzymes (phénoloxydases, ascorbate peroxydase), seraient à l'origine de la formation de quinones, de semiquinones ou d'acide déhydroascorbique. Ce sont les formes quinoniques qui sont impliquées, chez l'homme, dans les mécanismes de cancérogénicité du benzène (Xie *et al*, 2005; Gaskell *et al,* 2004, 2005, Sommers & Schiestl, 2006).
Le clivage oxydatif du toluène chez les végétaux peut se faire selon deux réactions :

- oxydation du groupement méthyle en groupement carboxyle suivie d'une hydroxylation au niveau du cycle aromatique. On obtient alors l'acide alpha carboxymuconique ;
- hydroxylation du cycle aromatique sans oxydation préalable du groupement méthyle, ce qui donne directement l'acide alpha méthylmuconique.

Il est intéressant de noter que les métabolites intermédiaires produits par les végétaux sont également ceux que l'on retrouve chez l'homme. Aussi, il serait possible que les végétaux produisent également les mêmes métaboliques toxiques identifiés chez l'homme lors de la métabolisation des COV. Tout comme chez l'homme, cette métabolisation chez les végétaux ne serait pas une détoxification complète mais serait à l'origine de métabolites toxiques pour la plante.

En ce qui concerne les bryophytes, on connaît l'existence de cytochromes P450 (Asakawa, 2001) mais leur rôle dans la détoxification des contaminants organiques n'a encore jamais été décrite.

3) Effets des COV chez les végétaux

Peu de données existent sur les effets causés par les COV chez les végétaux. Collins & Bell (2002) réalisent une synthèse des différents travaux réalisés dans ce domaine. L'éthylène, l'acide trichloroacétique et les nitrophénols sont les composés passés en revue. Parmi les impacts identifiés, nous pouvons citer les modifications morphologiques végétatives et florales, les nécroses, les effets sur les stomates et leur ouverture, l'action sur la photosynthèse, la respiration et le transfert des assimilats, les perturbations métaboliques, la mise en place de systèmes de défense physique et biochimique, le stress oxydatif, les actions génotoxiques (adduits à l'ADN) et la perturbation de la reproduction. Selon Collins & Bell (2002), ce sont surtout les enzymes de détoxification qui sont mises en jeu et notamment la glutathion S transférase ainsi que la glucosyl transférase et ce, dans les cas d'une exposition aux chloro- et nitrophénols. Les enzymes telles que la SOD et l'ascorbate peroxydase ont des concentrations plus élevées après exposition à l'acide formique et à l'acide acétique (Ogawa *et al,* 1998).

C'est donc tout naturellement le stress oxydant qu'on peut envisager d'étudier même s'il peut être mis en jeu par beaucoup d'autres facteurs qu'ils soient biotiques ou abiotiques.

E. Le stress oxydant chez les végétaux

1) Généralités sur le stress oxydant

Une des conséquences de l'exposition des êtres vivants aux contaminants est l'accroissement du stress. La notion de stress peut se définir comme étant la première rupture de l'homéostasie (= équilibre sanitaire), nécessitant la mise en place de mécanismes de compensation.

À l'origine du stress, il existe différents facteurs biotiques (engendrés par des fonctions normales de l'organisme ou une pathologie) et abiotiques (provoqués par un élément étranger à l'organisme).

Il existe différents types de stress, le stress oxydant est le plus répandu.

a) Définition du stress oxydant

On parle de stress oxydant lorsque la formation d'ERO excède les capacités de défense du système antioxydant. Ainsi, selon Sies (1991), le stress oxydant résulte d'un déséquilibre entre les systèmes pro-oxydants et anti-oxydants en faveur des premiers et c'est une source d'effets toxiques potentiels. L'origine du stress oxydant chez les organismes aérobies provient de la consommation intracellulaire de la molécule d'oxygène qui est essentielle pour de nombreuses fonctions physiologiques mais qui génère dans le même

temps la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ERO), potentiellement toxiques pour la cellule. Les principales sources de production des ERO proviennent de la phosphorylation oxydative de l'ADP, des chaînes de transport d'électrons microsomales, de l'activité phagocytaire et de l'activité de plusieurs enzymes qui produisent des ERO comme molécules intermédiaires. Les xénobiotiques peuvent augmenter la production intracellulaire des ERO, par exemple, au cours de la réduction, où ils peuvent être transformés en leur radical libre qui va rapidement donner son électron à une molécule d'oxygène et produire un radical anion superoxide ($O_2^{\cdot -}$).

b) Les espèces réactives de l'oxygène (ERO)

Le terme d'ERO est un terme collectif décrivant 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). Les ERO sont constamment produites chez les organismes vivants au cours du métabolisme normal et en particulier au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale où 1 à 2 % de l'oxygène métabolisé est converti en $O_2^{\cdot -}$.

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. Elles peuvent causer des dommages, permanents ou transitoires.

Toutefois, si la réactivité des ERO peut être à l'origine d'effets biologiques néfastes, la relation réactivité-toxicité n'est pas aussi simple qu'il y paraît à première vue. L'intervention d'ERO ne s'accompagne pas systématiquement de phénomènes de toxicité, notamment certaines ERO sont des intermédiaires de processus physiologiques normaux. D'autre part, en cas de dysfonctionnement et de surproduction de ces espèces, celles-ci peuvent être neutralisées et les lésions initiales réparées et compensées.

Ce n'est que lorsque ces systèmes de défense ne suffisent plus que la toxicité se manifeste, avec passage d'un état de perturbation à un état de perturbation installée.

L'anion superoxyde $O_2^{\cdot -}$: il résulte de la capture d'un électron par la molécule d'O_2. Les électrons non appariés des métaux de transition, comme le fer ou le cuivre, en font d'excellents catalyseurs de la réduction de l'oxygène avec la formation d'anion superoxyde.

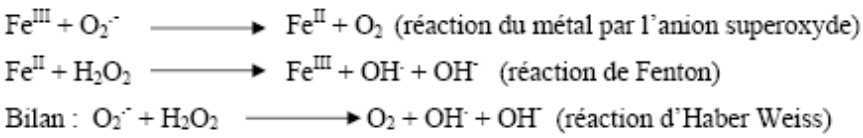
Il est produit chez les plantes dans la chaîne de phosphorylation. Il est formé en général au niveau des membranes biologiques et est hydrophobe mais il n'est pas l'oxy-radical le plus réactif. Toutefois, il contribue à la destruction des phospholipides membranaires par attaque nucléophile des liaisons esters entre les acides gras et le glycérol. Il peut également servir de précurseur pour la formation d'autres espèces radicalaires

beaucoup plus nocives comme le radical hydroperoxyle (HO_2^-) et l'oxygène singulet ($^1O_2$).

(Dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène en milieu acide)
[SOD : la Superoxyde Dismutase catalyse la dismutation en milieu neutre (Fridovich, 1975)]

Le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 : formé lors de la dismutation de l'anion superoxyde, il est peu réactif mais il franchit facilement les membranes biologiques du fait de son état non ionisé et non chargé. Sous l'action de la catalase, l'H_2O_2 produit de l'eau et de l'oxygène. Il constitue un oxydant important pour des thiols et du pyruvate (Haliwell & Gutteridge, 1989) et il peut former des adduits à l'ADN. Cependant, son action comme initiateur de la formation de radicaux libres (notamment il participe à la production de radical hydroxyle $OH^{\cdot}$) est plus importante que son action en tant qu'ERO (Yu, 1994).

Le radical hydroxyle $OH^{\cdot}$: il est produit par diverses réactions : radiations ionisantes, réactions thermiques, réactions de Fenton (avec des métaux). C'est un radical extrêmement réactif, il réagit avec les premières cibles rencontrées. Ce sont des réactions par addition sur la molécule cible (acide nucléique), par arrachage d'un atome d'hydrogène (attaque lipidique) ou par transfert d'électron.



Cette réaction dépend donc de la disponibilité des métaux de transition à l'état libre (surtout le cuivre et le fer abondants dans les systèmes biologiques).

L'oxygène singulet $^1O_2$: cet élément est formé lors de réactions photochimiques au niveau des pigments biologiques tels que la chlorophylle, et de réactions de thermolyse des endoperoxydes. L'$^1O_2$ existe sous deux états d'excitation :

- l'état delta ($O_2{}^1\Delta g$) : cet état n'a pas d'électrons impairs, ce n'est pas un radical. Sa durée de vie est longue et il est diffusible, cet état de l'oxygène singulet sera donc responsable de dommages cellulaires importants, notamment au niveau de l'ADN ;

– l'état sigma ($O_2{}^1\Sigma g$) : il est radicalaire et très énergétique. Il se dégrade rapidement en forme delta.

	Sites	Mécanismes	ERO
Production des ERO	Chloroplastes	Photosynthèse : TE PSI et PSII Chlorophylle	O_2^-, $^1O_2$
	Mitochondries	Respiration : TE chaîne respiratoire	O_2^-
	Réticulum endoplasmique	Réduction de substrat contenant -RH	O_2^-
	Peroxysomes Glyoxysomes	Photorespiration : glycolate oxydase β-oxydation des acides gras xanthine oxydase	H_2O_2, O_2^-
	Membranes plasmiques	NADPH-oxydase	O_2^-
	Parois cellulosiques	Peroxydase, Mn^{2+} et NADH	H_2O_2, O_2^-
	Apoplastes	Oxalate oxydase, amine oxydase	H_2O_2

Tableau 5: Localisation et mécanismes de production des espèces réactives de l'oxygène dans les cellules végétales (Bidar, 2007)

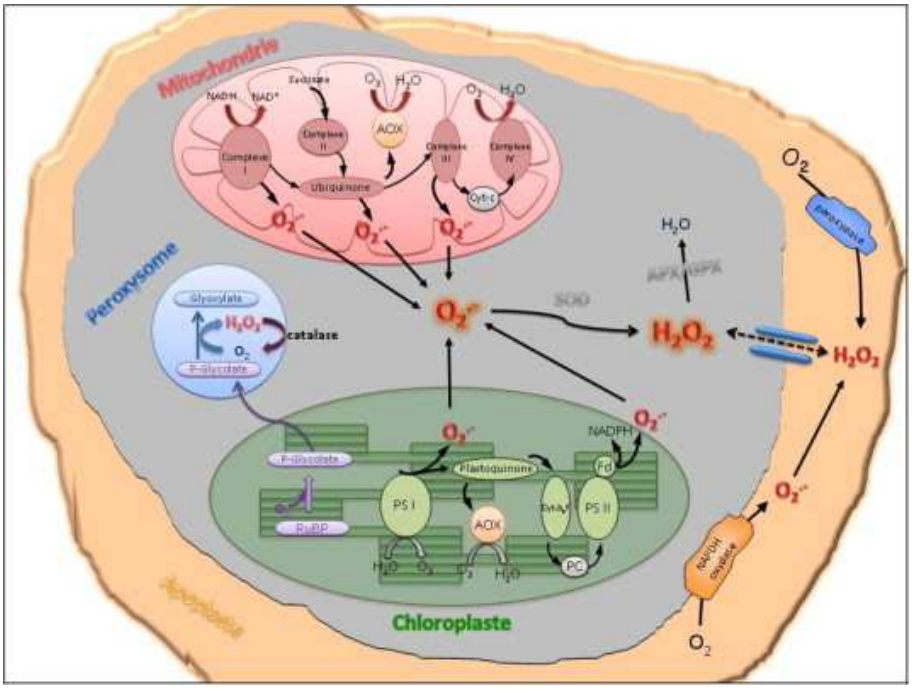


Figure 7: Sites de production intra-organites des formes réactives de l'oxygène (ROS) dans la cellule végétale (Parent et al*, 2008)*

c) Les facteurs à l'origine du stress oxydant

Pour le stress oxydant, on peut trouver comme facteurs biotiques :

- la chaîne respiratoire mitochondriale et phosphorylation acyclique ;
- le vieillissement ;
- nombreuses réactions enzymatiques mettant en jeu les oxydases ;
- les réactions d'auto-oxydation.

Comme facteurs abiotiques, citons:

- les polluants (ozone, ETM, certains pesticides…) ;
- les facteurs environnementaux (gel, température élevée, ultraviolets, dessiccation) ;
- la déshydratation ;
- l'altitude.

Le stress oxydant est à l'origine de dommages sur tous les composants cellulaires, lipides membranaires, ADN et protéines (peroxydation lipidique, désactivation d'enzymes, oxydation de l'hémoglobine, mutation) et de différentes pathologies comprenant la carcinogenèse, les maladies cardiaques, le vieillissement…

d) Les principaux dommages cellulaires causés par les ERO

Une cellule soumise à un stress oxydant peut subir des dommages dont les cibles seront les lipides, les protéines et les acides nucléiques.

Les lipides, composants majoritaires des membranes plasmiques, assurent une certaine fluidité membranaire. Ils influent sur les échanges cellulaires avec le milieu extérieur et ils peuvent perturber la conformation des protéines membranaires et modifier leur activité. Les ERO attaquent les acides gras insaturés des phospholipides membranaires en provoquant une peroxydation. En fonction de la structure acylée lipidique, la peroxydation conduit à la formation de différents hydrolipoperoxydes dont l'instabilité en présence d'ions métaux de transition sera à l'origine de composés de coupure constitués d'aldéhydes (ex : le malondialdéhyde MDA), d'acides et de traces d'hydrocarbures (Wade & Van Rij, 1985). Ceux-ci sont utilisés comme biomarqueurs d'effets. Mais il a été observé que la modification des propriétés des lipides membranaires entraînait une fuite d'électrolytes intracellulaires comme le potassium. Ces électrolytes ont de ce fait également été utilisés comme biomarqueurs de l'atteinte de l'intégrité membranaire.

Les protéines attaquées par des radicaux verront leur catabolisme augmenter et une grave perturbation de la fonction normale de la cellule sera observable au travers de l'apparition de groupes carbonyles, d'acides aminés modifiés et de ponts disulfures.

L'oxydation des membranes lipidiques peut rendre la membrane plus perméable et favoriser ainsi les atteintes du matériel génétique, de l'Acide DésoxyriboNucléique (ADN) plus particulièrement. L'augmentation du flux de radicaux libres peut générer une variété de lésions de l'ADN; on compte cinq catégories de dommages de la

double hélice d'ADN : les coupures simples et doubles brins; les bases modifiées (ex: adduit à l'ADN), les pontages ADN-ADN et ADN-protéines, les sites abasiques (provenant d'une altération première du sucre ou d'une perte de base) et les adduits intra-caténaires (Gregus & Klaasen, 2001). Les noyaux et l'ADN peuvent subir une attaque radicalaire. Les dommages engendrés au niveau du matériel génétique peuvent être responsables de mutations ponctuelles et prémices du processus de carcinogenèse. Les différents types de dommages peuvent être détectés via la recherche de biomarqueurs caractéristiques de ces dégradations. Ainsi, l'adduit à l'ADN 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8OHdG) constitue un biomarqueur des adduits à l'ADN.

La formation de la 8OHdG s'opère par addition d'un radical ·OH en position 8 de la guanine. Le radical libre attaque préférentiellement la liaison N7-C8.Du fait de la modification de la base, lors de la réplication, les ADN polymérases vont préférentiellement insérer une 8-hydroguanine en face d'une adénine. C'est ce qu'on appelle une mutation ponctuelle par transversion Guanine-Thymine. La 8OHdG est l'un des adduits oxydatifs à l'ADN les plus abondants (Breen & Murphy, 1995 ; Wang *et al*, 1995), il représente environ 5% de tous les adduits oxydatifs (Beckman & Ames, 1997). Ainsi, du fait de la prévalence de la survenue de la 8OHdG, cet adduit est un marqueur de dommage oxydatif largement exploité. Outre sa prévalence, ce sont les conséquences mêmes des dommages de l'ADN qui constituent l'intérêt de leur étude. En effet, les dommages provoqués par les radicaux libres sur l'ADN sont la source de mutations génétiques et contribuent au développement de cancers. C'est pourquoi l'étude de la génotoxicité de polluants chez les plantes constitue un enjeu important en matière de santé publique puisqu'elle peut révéler le caractère délétère d'une substance et amener à entreprendre des études de cancérogénicité de la substance.

Par ailleurs, le stress oxydant peut engendrer des cassures de la molécule d'ADN du fait de l'action des ERO sur l'ADN mais également de mécanismes d'excision de bases modifiées comme la 8OHdG. Ainsi, l'étude des cassures de l'ADN offre un complément d'informations à l'étude de la formation d'adduits à l'ADN. Le test du DNA Ladder permet d'étudier la fragmentation de l'ADN et apporte une information quant à la dégradation de cette molécule. Le test du DNA Ladder est souvent réalisé dans le cadre d'études concernant l'apoptose, principalement chez l'animal. En effet, le processus d'apoptose amène à la dégradation de la cellule et de l'ADN qu'elle contient. La recherche de fragments d'ADN constitue un indicateur de ce phénomène de mort cellulaire programmée.En résumé, le test du DNA Ladder ne permet donc pas de déterminer le caractère clastogène (coupures simples et doubles brins) d'un agent stressant mais est un indicateur infra-cellulaire de l'atteinte du noyau et de la dégradation de la molécule d'ADN.

Pour détecter les coupures simples ou doubles brins, le test des comètes est de plus en plus souvent utilisé. C'est un test permettant d'évaluer la présence d'ADN de poids moléculaire inférieur à la normale. Un petit poids moléculaire signifie la présence de fragments issus d'une atteinte clastogénique. Le caractère génotoxique d'une molécule polluante est révélé par ce test. Effectivement, un polluant peut entraîner une

brisure sur un ou deux brins de l'ADN. A l'origine des brisures de l'ADN, on retrouve les irradiations, des molécules comme les espèces réactives de l'oxygène et, par conséquent, les substances polluantes susceptibles d'entraîner la formation d'ERO. Ces brisures seront à l'origine de la fragmentation de l'ADN engendrant éventuellement la perte d'informations génétiques.

e) Exemple de dommages : les dommages membranaires liés aux ERO

Lorsque l'ensemble des mécanismes enzymatiques et non enzymatiques ne suffisent pas à compenser la formation d'ERO dans la cellule, ces dernières occasionneront des dommages oxydatifs, notamment au niveau des membranes et des protéines.

i- Péroxydation des lipides membranaires

La lipoperoxydation est un processus destructif pour les sytèmes biologiques si elle n'est pas rapidement maîtrisée par les systèmes antioxydants. Dans les conditions physiologiques normales, du fait de l'efficacité de la défense antioxydante, la lipoperoxydation présente des conséquences réduites. La cytotoxicité de la lipoperoxydation est imputable aux ERO produites et aux aldéhydes qui en sont issus. De nombreux aldéhydes issus de la lipoperoxydation sont cytotoxiques, génotoxiques, et peuvent bloquer la prolifération cellulaire.

* Au niveau membranaire, les radicaux lipidiques qui se forment lors d'attaques radicalaires, les hydrolipoperoxydes et leurs «aldéhydes de coupure» perturbent de façon importante la cohésion des membranes cellulaires et se traduisent par les effets suivants :

- baisse de leur fluidité (Dobretsov e*t al,* 1977) ;
- inactivation des récepteurs liés à la membrane et des enzymes qui y sont associées (glucose-6-phosphate déshydrogénase et enzymes du complexe CYT P450) (Doyotte, 1998) ;
- modifications structurales des récepteurs à leur surface qui en empêchent la reconnaissance ;
- augmentation de leur perméabilité aux H^+ ainsi qu'aux Ca^{++} (pouvant mener à la rupture de l'acide désoxyribonucléique (ADN) (Orrenius *et al*, 1989);
- gonflement et lyse des mitochondires et des lysosomes (Horton & Fairhurst, 1987, Snell & Mullock, 1987; Pré, 1991).

* L'oxydation des acides aminés et des protéines est générale. Pour ne citer que quelques exemples : l'oxydation réversible des groupes thiols, de la méthionine en sulfoxyde et en sulfane; celle des amino-acides cycliques, tryptophane, histidine, proline.

* L'oxydation de l'ADN peut mener à de multiples lésions telles que coupure de chaîne, formation de dimères

cyclobutaniques, oxydation des bases puriques et pyrimidiques, et pontages des protéines nucléiques (Brennan *et al,* 1994).

Les produits de la peroxydation lipidique sont également capables d'interagir avec l'ADN et peuvent conduire à des coupures double-brin ou mono-brin (Vaca *et al,* 1988; Dix & Mmett, 1983). Ces anomalies oxydatives de l'ADN peuvent conduire à des anomalies de la multiplication cellulaire, de la synthèse protéique et de la transmission du message génétique.

Au cours de la peroxydation lipidique, une grande variété d'aldéhydes tels le malondialdéhyde (MDA), sont formés à partir des hydroxyperoxydes lipidiques (produits primaires de la peroxydation).

Les aldéhydes générés par la peroxydation lipidique représentent une autre façon par laquelle les radicaux libres pourraient exercer leur toxicité. De plus, comparativement aux radicaux libres, les aldéhydes ont une demi-vie (t½) plus longue et peuvent ainsi diffuser de leur point d'origine (c'est-à-dire les membranes) pour atteindre des cibles intracellulaires ou extracellulaires distantes, propageant ainsi le dommage. Ainsi, ces aldéhydes agiraient en tant que «messager toxique secondaire» amplifiant le dommage des radicaux libres (Esterbauer *et al*, 1985; 1989, 1991).

En se liant aux groupements amines ou thiols, les aldéhydes dénaturent ou inactivent :

- les macromolécules telles les protéines, les enzymes, les phospholipides et les acides nucléiques ;
- les petites molécules telles le GSH, le coenzyme A, la cystéine et la lysine. (Rousseau, 1999)

Dhindsa (1982) montre en particulier chez *Tortula ruralis (T. ruralis)* et *Cratoneuron filicinum*, la propriété du MDA à inhiber la synthèse protéique.

ii- <u>Formation d'aldéhydes issus de la lipoperoxydation</u>

Le stress oxydant et, plus particulièrement les ERO, engendrent la peroxydation des lipides constitutifs de la membrane cellulaire. La peroxydation lipidique conduit donc à la formation de différents hydrolipoperoxydes (LOOH) qui, du fait de leur instabilité en présence d'ions de métaux de transition, sont à l'origine de «composés de coupures» constitués d'aldéhydes, d'acides gras et de traces d'hydrocarbures (éthane, pentane) (Wade & Van Rij, 1985)

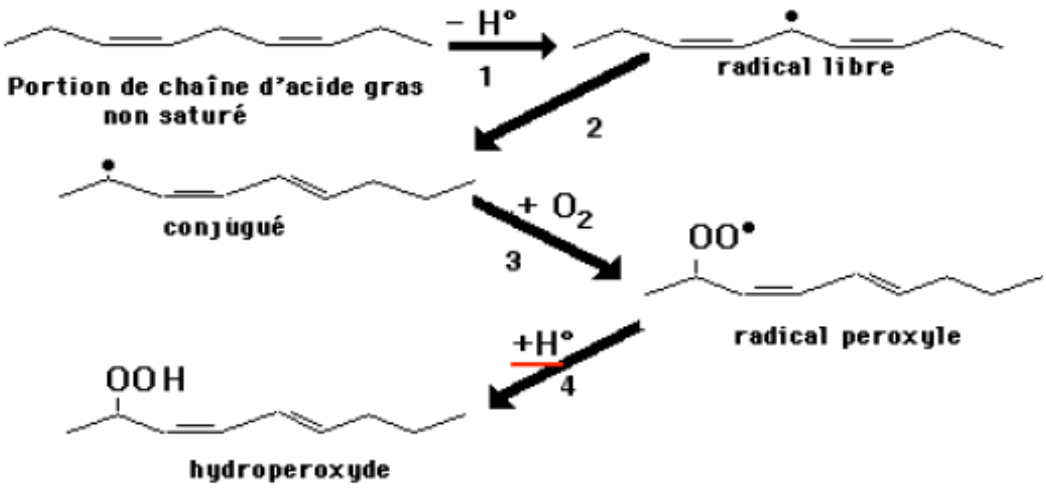


Figure 8: Péroxydation d'une portion de chaîne lipidique (www.ulg.ac.be/cord/ChapIX.pdf)

La peroxydation lipidique des acides gras polyinsaturés se subdivise en trois phases : initiation, propagation et terminaison et conduit à des eicosanoïdes (c'est-à-dire des molécules ayant 20 carbones saturés) très actifs du point de vue biologique.

Initiation (Pré, 1992) : parmi les ERO, le radical hydroxyle et l'oxygène singulet peuvent agir comme initiateurs. L'attaque, par le radical hydroxyle, d'un acide gras polyinsaturé (LH sur la figure 9) conduit à la formation d'un radical lipidique ($L^{\bullet}$) et à la stabilisation d'$OH^{\bullet}$ en H_2O ($LH + HO^{\bullet} \bullet L^{\bullet} + H_2O$). Il est possible que d'autres radicaux puissent également initier la peroxydation lipidique.

Propagation : il y a d'abord formation d'un radical lipoperoxyde ($L^{\bullet} + O_2 \bullet LOO^{\bullet}$) qui, en réagissant avec un autre LH, engendre simultanément un hydroxylipoperoxyde (LOOH), assurant ainsi la propagation du processus. Les formes ionisées des métaux de transition participent activement à cette phase de propagation. $LOO^{\bullet}$ peut être directement produit par l'action de l'oxygène singulet sur les lipides insaturés. $LO^{\bullet}$ est beaucoup plus réactif que $LOO^{\bullet}$ et propage la peroxydation lipidique. Les réducteurs tels que l'acide ascorbique, $O_2^{\bullet -}$, ou la cystéine accélèrent la lipoperoxydation par les métaux de transition. Les radicaux thiol ($RS^{\bullet}$), issus de l'action de $HO^{\bullet}$ sur les thiols (-SH) cystéiniques des protéines contribuent à amplifier le processus de peroxydation lipidique (Schöneich *et al,* 1989).

Terminaison : Chaque $L^{\bullet}$ est à l'origine d'une centaine de molécules de LOOH. La phase de terminaison consiste en la formation de composés stables issus de la rencontre de deux espèces radicalaires (ex. : $L^{\bullet} + L^{\bullet} \bullet L\text{-}L$; $LO^{\bullet} + L^{\bullet} \bullet LOL$, etc.) (Haliwell & Dizdaroglu, 1992). Cette phase ne survient qu'après un certain temps

car la probabilité de rencontre entre deux radicaux libres est beaucoup plus faible que celle entre un radical libre et les acides gras polyinsaturés (leurs concentrations étant de beaucoup supérieures). Plus le milieu est riche en piégeurs physiologiques de radicaux libres (section 5.1.2), plus ce temps est court. (Rousseau, 1999)

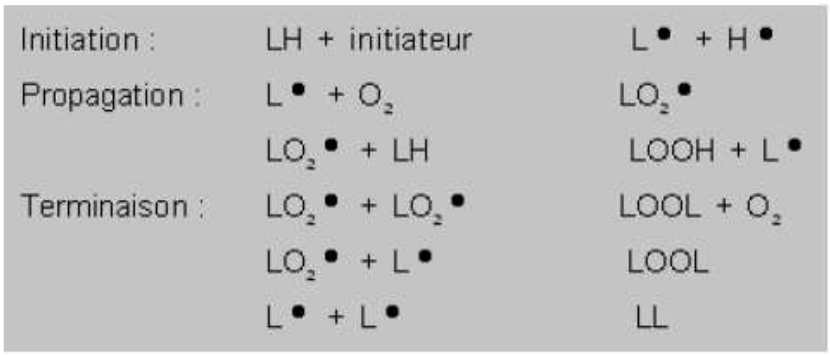


Figure 9: Processus de peroxydation lipidique

(www.ulg.ac.be/cord/ChapIX.pdf)

Parmi les aldéhydes, on retrouve le malondialdéhyde.

Ce dialdéhyde tricarboné est issu de l'oxydation disruptive des insaturations maloniques présentes dans les acides gras polyinsaturés (Frankel & Neff, 1983). Ainsi, afin d'étudier les effets éventuels d'une substance ou d'un agent stressant sur la membrane, le malondialdéhyde constitue un biomarqueur intéressant.

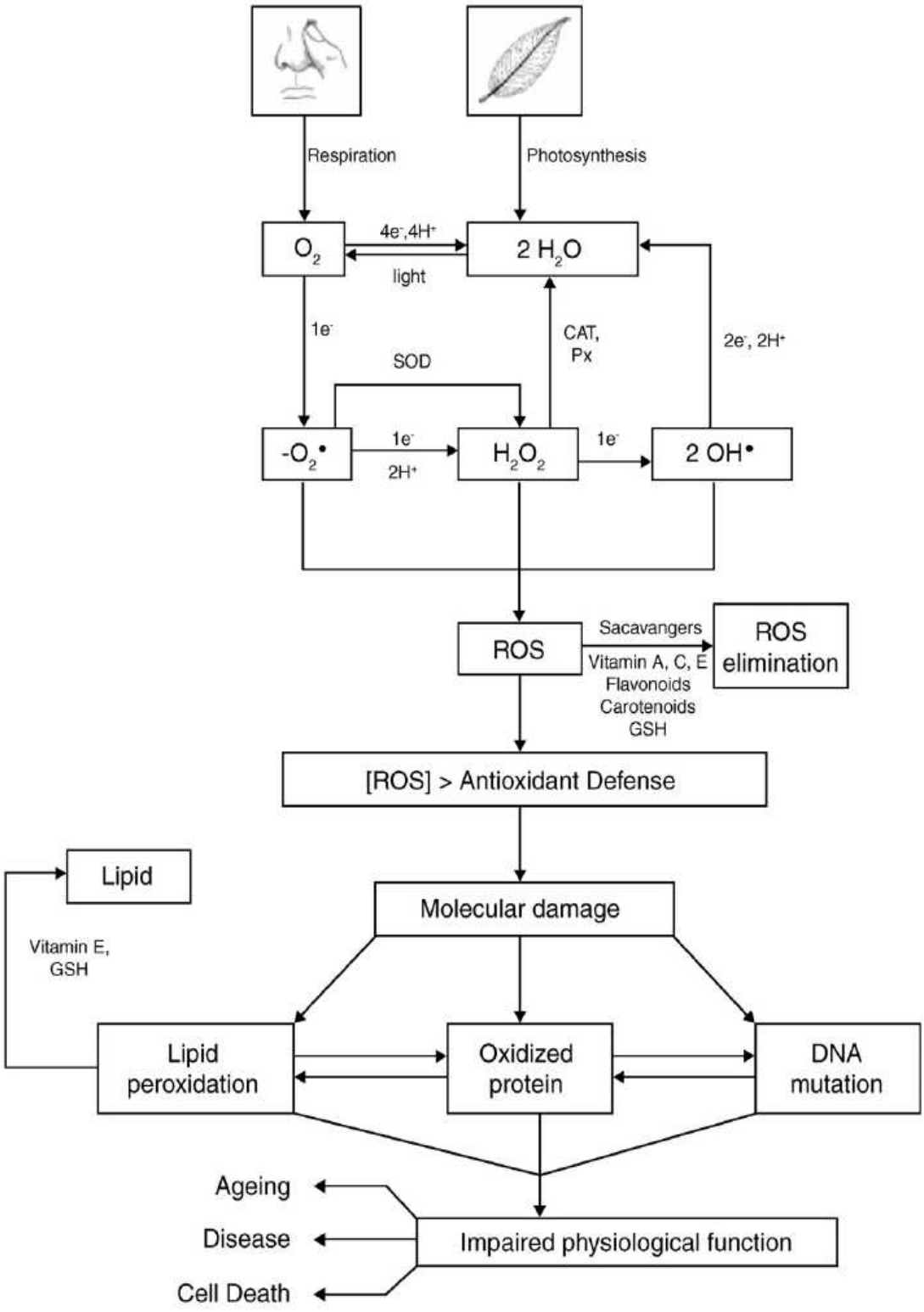


Figure 10: Synthèse des dommages induits par les espèces réactives de l'oxygène (França et al*, 2007)*

La figure 10 synthétise les principaux effets toxiques des espèces ractives de l'oxygène : la fragmentation des protéines, l'inactivation d'enzymes, la peroxydation des lipides, les dommages à l'ADN et la mort cellulaire.

f) Les mécanismes de défense antioxydants

Pour répondre à ces dommages, divers composés qualifiés d'antioxydants sont synthétisés au niveau cellulaire.

Les trois principaux mécanismes d'action antioxydante développés par les organismes vivants visent à éliminer les ERO et les catalyseurs de leur formation, à induire la synthèse des antioxydants et à augmenter l'activité des systèmes de réparation et d'élimination des molécules endommagées.

Les moyens mis en œuvre pour l'élimination des ERO consistent à :

- éliminer les métaux catalyseurs de la production d'$OH^{\cdot}$ en les séquestrant par des métalloprotéines*;
- inactiver $O_2^{\cdot -}$ et H_2O_2 à l'aide d'enzymes spécifiques ;
- capter les radicaux libres responsables de dommages cellulaires à l'aide de piégeurs moléculaires ;
- casser la propagation des réactions en chaîne.

Il existe deux grands types de mécanismes antioxydants selon la nature des molécules antioxydantes, à savoir : enzymatiques ou non enzymatiques.

i- <u>Les mécanismes antioxydants enzymatiques</u>

Les molécules antioxydantes enzymatiques sont, tout d'abord, les superoxydes dismutases (SOD) présentes au niveau des chloroplastes, du cytoplasme et des mitochondries. Elles constituent les premières lignes de défense cellulaire contre les radicaux oxygénés (Alscher *et al,* 1997). Elles possèdent un métal de transition au niveau de leur site actif. Elles catalysent la réaction de dismutation du radical superoxyde.

Les peroxydases catalysent la réduction chimique d'une grande variété de peroxydes à l'aide d'un substrat (H_2R) (ex : l'ascorbate peroxydase).

Les glutathion réductases, responsables du maintien du rapport glutathion réduit/oxydé (pouvant servir comme biomarqueur - Stegeman *et al,* 1992), font intervenir le NADPH, l'ascorbate peroxydase, la deshydroascorbate réductase, l'ascorbate et le glutathion. Ce cycle, dit cycle Haliwell-Asada, qui permet le recyclage de l'ascorbate et du glutathion, assure l'élimination de l'eau oxygénée dans tous les tissus.

Et enfin les catalases, possèdant un groupement hème (fer), catalysent la réduction du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène. Elles possèdent également une activité peroxydase : le peroxyde d'hydrogène réagit avec le fer du site actif de l'enzyme pour former un composé non réactif (Chance *et al*., 1979).

Ces enzymes sont toutes des métalloprotéines et agissent de façon coordonnée.

ii- <u>Les mécanismes antioxydants non enzymatiques</u>

Les molécules antioxydantes non enzymatiques agissent par réduction ou piégeage de radicaux : elles renforcent les actions des enzymes antioxydantes.

- Ainsi, l'acide lipoïque est un réducteur puissant du glutathion (GSH) et des radicaux peroxyles.

- Le glutathion neutralise les ERO comme les radicaux hydroxyles, réduit le peroxyde d'hydrogène et les lipoperoxydes (Deneke & Fanburg, 1989 ; Munday & Winterburn, 1989 ; Deleve & Kaplowitz, 1991), et inactive l'oxygène singulet à pH 7 (Cadenas, 1989). Il est utilisé dans la photosynthèse des phytochélatines. On les trouve dans les membranes et les chloroplastes.
- L'acide ascorbique (ou vitamine C) au niveau du cytoplasme est hydrosoluble, il réduit l'anion superoxyde, le radical hydroxyle et nombreux hydroperoxydes lipidiques.
- La vitamine E (dont l'α-tocophérol) est lipophile, on la trouve associée aux membranes intracellulaires notamment celles des chloroplastes, des mitochondries et du réticulum endoplasmique. Elle protège les membranes contre la lipoperoxydation en cédant un atome d'hydrogène aux espèces radicalaires (Byczkowski & Gessner, 1988 ; Cadenas, 1989). Elle est régénérée par la vitamine C.
- Enfin le β-carotène (ou vitamine A) et les caroténoïdes protègent les lipides de la peroxydation par l'oxygène singulet.

	Sites	Système antioxydant	ERO datoxifiés
Détoxification des ERO	Chloroplastes	SOD, APOX, ThPX, AA, GSH, caroténoïdes	H_2O_2, O_2^-, $^1O_2$
	Mitochondries	SOD, APOX, ThPX, AA, GSH	H_2O_2, O_2^-
	Peroxysomes	SOD, APOX, AA, GSH, CAT	
	Apoplastes	SOD, APOX, AA, GSH	
	Membranes	α-tocophérol	$^1O_2$, ROOH
	Vacuoles	Peroxydases	H_2O_2
	Cytosol	SOD, APOX, ThPX, AA, GSH, GPX, peroxydases	ROOH, H_2O_2, O_2^-
	Parois cellulosiques	Peroxydases	H_2O_2

Tableau 6: Localisation et action des composés antioxydants dans les cellules végéatales (Bidar, 2007)

iii- Le glutathion (L-γ-glutamyl-L-cystéinylglycine) : rôle et fonctionnement

Elément constitutif des organismes vivants, notamment les végétaux, le glutathion est un thiol non protéique très abondant (Kranner & Grill, 1995). On le trouve majoritairement sous une forme réduite (GSH) dans les cellules. Il agit comme nucléophile en neutralisant les ERO, et comme réducteur du perxoyde d'hydrogène et des lipoperoxydes (Deneke & Fanburg, 1989 ; Munday & Winterbourn, 1989 ; Deleve & Kaplowitz, 1991). Il joue donc un rôle important comme antioxydant endogène et dans le maintien de l'équilibre d'oxydo-réduction. En fait, le GSH participe à l'élimination du peroxyde d'hydrogène et des hydrolipoperoxydes, en servant de cosubstrat à l'enzyme glutathion peroxydase (Ferrari *et al,* 1991). Ainsi sa forme oxydée (GSSG) est indicatrice d'un stress oxydant (Arkeboom & Sies, 1990). La glutathion réductase, enzyme régulée par les

concentrations en GSH et NADPH, permet de rétablir le glutathion sous sa forme réduite.

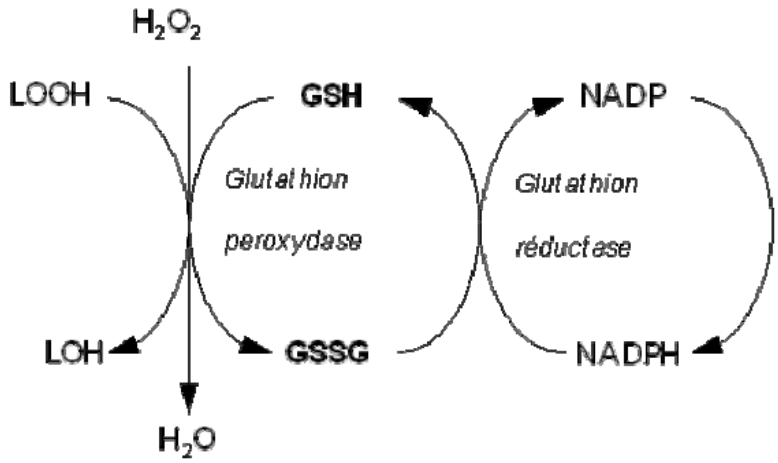


Figure 11: Cycle du glutathion (Rousseau, 1999)

En résumé, le GSH peut inhiber la peroxydation des lipides et s'avère efficace comme piégeur direct de certains ERO, tels les $OH^{\bullet}$ et $^1O_2$ (Biaglow, 1989; Haliwell, 1996).

g) Impacts du stress oxydant sur les protéines cellulaires

Les protéines intracellulaires et extracellulaires sont des cibles critiques de l'attaque des radicaux libres en raison de leurs activités catalytiques. Plusieurs constituants amino-acyl (cystéine, méthionine, tryptophane) cruciaux pour leurs fonctions sont particulièrement vulnérables aux dommages induits par les espèces radicalaires. Les ERO peuvent agir directement et simultanément sur plusieurs de ces sites, et ce, préférentiellement au niveau des groupements -SH et $-NH_2$ (Haliwell & Gutteridge, 1989). Les conséquences de ces attaques consistent en des agrégations et des pontages, des fragmentations et des cassures, et des modifications des groupements thiols (Horton & Fairhurst, 1987, Pré, 1991; Rice-Evans *et al,* 1991, Doyotte 1998). Ezzine et Ghorbel (2006) ont étudié l'impact de solutions de nitrate de potassium chez la tomate par la recherche de biomarqueurs du stress oxydant et notamment, par l'étude de la variation des teneurs en protéines totales. Une diminution des teneurs en protéines totales a été observée en plus de l'augmentation de l'activité des protéases. D'autres études s'intéressent également à des protéines spécifiques, couramment appelées 'heat shock proteins' et notamment les HSP 70, dont l'expression est accrue lors d'un stress thermique. L'expression de ces protéines augmente également lorsque l'organisme est exposé à des métaux (Heckathorn *et al*, 2004; Stout & Al-Niemi, 2002). Ainsi *Fontinalis antipyretica* (Rau *et al,* 2007) exposée à des solutions de Cu, Cd, Pb et Zn (50 µM) présente une expression accrue de HSP 70 après 4 heures d'exposition pour le cuivre et le cadmium, et après 24 heures pour les 4 métaux.

Ainsi, les teneurs globales en protéines constituent un premier indicateur des dommages aux protéines induits

par un stress oxydant, soit par l'action des ERO, soit par celle des produits issus de la lipoperoxydation.

2) Les spécificités chez les végétaux

a) L'ascorbate peroxydase (APOX) et la guaïacol peroxydase (GPOX) : enzymes spécifiques

i- L'ascorbate peroxydase : description et fonctions dans la cellule

Même sous des conditions optimales, beaucoup de processus métaboliques, notamment les systèmes de transport d'électrons membranaire au niveau chloroplastique, mitochondrial et plasmatique, produisent des espèces réactives de l'oxygène. L'ascorbate peroxydase existe comme iosenzyme et joue un rôle important dans le métabolisme du peroxyde d'hydrogène chez les végétaux supérieurs (Shigeoka *et al,* 2002). L'ascorbate peroxydase réduit le peroxyde d'hydrogène en eau, en utilisant l'ascorbate comme donneur d'électron. C'est une enzyme clé du cycle glutathion ascorbate (*cf*. figure 12). En effet, la deshydroascorbate résultant de cette réaction est recyclée en ascorbate via le glutathion réduit qui donne un électron en s'oxydant. Cette forme oxydée est reconvertie en forme réduite par l'enzyme glutathion réductase, NAD(P)H dépendante. (Baccouch, 1998). Mittler (2002) décrit l'APOX comme un modulateur de l'H_2O_2 dans la cellule (les catalases étant les enzymes mises en jeu en cas de fortes concentrations en H_2O_2). Les isoenzymes de l'APOX sont distribués dans au moins 4 compartiments cellulaires : le stroma et les membranes thylakoïdes des chloroplastes, les membranes des glyoxysomes et peroxysomes, et le cytosol (Nakano & Asada, 1981; Chen & Asada, 1989; Miyake *et al*, 1993; Yamagushi *et al*.,1995a,b; Bunkelmann & Trelease, 1996; Ishikawa *et al,* 1996a,b; 1998). Une 5ème isoenzyme d'APOX se situe dans la membrane des mitochondries (Jiménez *et al,* 1997; Leonardis *et al,* 2000).

Dans les chloroplastes, elle existe sous une forme soluble et sous une forme liée à la membrane des thylakoïdes. C'est ainsi que les radicaux superoxydes générés à la surface de la membrane peuvent être convertis en peroxyde d'hydrogène, qui sera ensuite détruit pas l'ascorbate peroxydase lié à la membrane. L'ascorbate peroxydase a une affinité de l'ordre du µM et jouerait ainsi un rôle dans la modulation fine de la concentration en ERO impliquées dans la signalisation cellulaire.

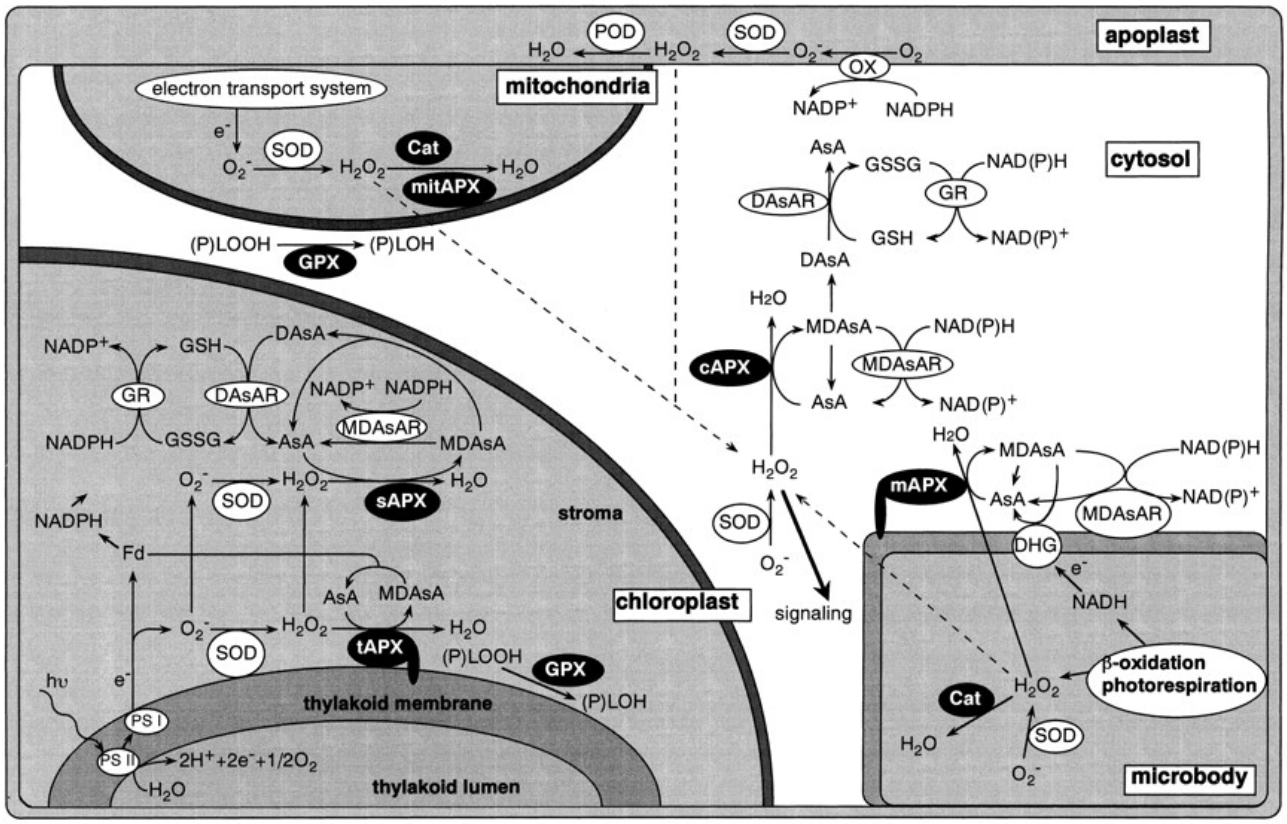


Figure 12: Système de prise en charge des espèces réactives de l'oxygène chez les végétaux (Shigeoka et al.*, 2002)*

Une des propriétés caractéristiques de l'APOX est son instabilité en absence d'acide ascorbique. Quand la concentration en acide ascorbique est inférieure à 20 µM, l'activité d'APOX est rapidement perdue. Les temps de demi-inactivation des APOX chloroplastique et mitochondrial sont de moins de 30 secondes, alors que ceux des APOX des membranes de glyoxysomes et peroxysomes, et du cytosol, sont d'environ 1 heure ou plus (Chen & Asada, 1989; Miyake *et al,* 1993; Ishikawa *et al*, 1998; Yoshimura *et al,* 1998; Leonardis *et al*, 2000). Cette instabilité des APOX semble être une raison pour qu'elle ne soit pas trouvée longtemps chez des organismes photosynthétisant.

ii- <u>La guaïacol peroxydase : description et fonctions dans la cellule</u>

Il existe également une autre peroxydase que la glutathion et l'ascorbate peroxydase. Elle est couramment appelée guaïacol peroxydase du fait de l'utilisation du guaïacol comme substrat universel dans les techniques de dosages de l'activité de cette enzyme (Chaoui *et al.*, 1997; Blokhina *et al*, 2003; Bidar, 2007). En réalité, elle ne possède pas de substrat spécifique. Sa présence au niveau du cytosol, de la paroi cellulaire et dans les vacuoles, permet de former de l'eau à partir de peroxyde d'hydrogène. Elle a également été détectée dans les mitochondries chez le maïs (*Zea mays* L.).

Cette enzyme serait impliquée dans le métabolisme des phénols et alcaloïdes (Prasad *et al*, 1995). Amako *et*

al (1994) citent la participation de cette peroxydase dans des processus physiologiques comme la biosynthèse de la lignine, le développement de la plante et l'organogenèse via la dégradation de l'acide indolacétique et la biosynthèse de l'éthylène. Les peroxydases interviennent également dans la suberisation, les pontages de protéines de paroi cellulaire, la réponse au stress et la tolérance au sel (Ghamsari *et al,* 2007). En réponse à des agents parthogènes et au phénomène de sénescence, l'expression d'isoenzymes spécifiques de guaïacol peroxydase a été mise en évidence (Amako *et al,* 1994). L'ascorbate serait un inhibiteur non compétitif de la GPOX (Ghamsari *et al*, 2007).

b) Une protéine particulière du monde végétal : la chlorophylle

Chez les végétaux, l'homéostasie peut s'estimer par l'étude de la respiration, de la croissance, des modifications enzymatiques, de la perméabilité, de la composition des membranes, du stress oxydant et des effets visibles sur les cellules. L'étude des atteintes oxydatives des pigments chlorophylliens permet d'appréhender la dégradation d'une fonction essentielle qu'est la photosynthèse, et d'anticiper sur le phénomène de chlorose, effet visible souvent utilisé en bioindication.

i- Description des pigments

La photosynthèse est la conversion de l'énergie lumineuse en énergie chimique dans les chloroplastes des cellules eucaryotes. L'absorption de cette énergie est réalisée, au niveau de la membrane des thylakoïdes, par l'intermédiaire de molécules sensibles à la lumière : les chlorophylles. La chlorophylle est localisée dans les chloroplastes. Les pigments sont présents dans des structures protéiniques organisées en photosystèmes (PSI et PSII). Ils sont présents en particulier dans une antenne collectrice, composée de chlorophylles « a » et « b » ainsi que de caroténoïdes et xantophylles, et dans un centre réactionnel comprenant uniquement une paire de chlorophylle a. Cette dernière existe en deux variantes selon les protéines qui lui sont associées : la P680 qui absorbe des longueurs d'ondes de 430 nm dans le bleu et de 680 nm dans le rouge (PSII) et la P700 qui absorbe à 700 nm au lieu de 680 nm (PSI). Les autres pigments accessoires ont un spectre d'absorption décalé : la chlorophylle « b » absorbe vers 460 nm et 600 nm, les caroténoïdes absorbent dans les orangés-jaunes et le bleu, les phycobillines dans le vert et le bleu.

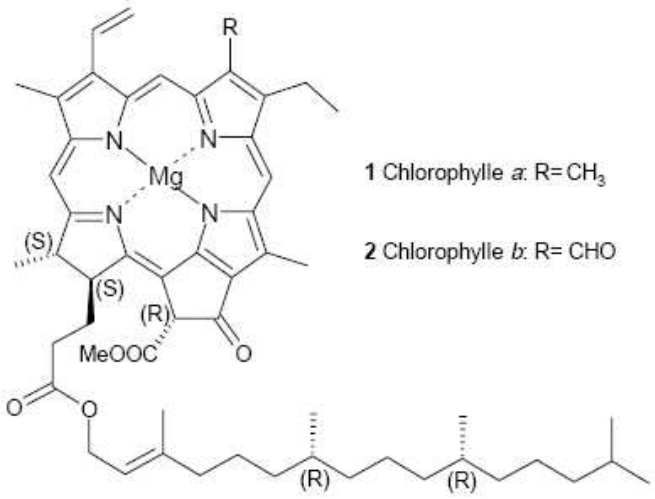


Figure 13: Structure des chlorophylles a et b avec leur configuration absolue (Folly, 2000)

La production pigmentaire est indicatrice de l'activité photosynthétique et donc de l'état de santé du végétal. Chez les mousses, les chlorophylles a et b sont les principaux pigments. Le rapport entre ces 2 pigments est variable selon les espèces et selon également les conditions d'ensoleillement (Martin, 1980). Toutefois, la chlorophylle a constitue le pigment majoritaire, avec une quantité en moyenne 2,7 fois supérieure à celle de la chlorophylle b (Martin & Churchill, 1982).

ii- Fonctionnement - Rôle

Le mécanisme de la photosynthèse nécessite la lumière. Quand un pigment absorbe un photon d'énergie donnée, un électron change de niveau d'énergie. La molécule est alors dite excitée; elle se trouve à un niveau d'énergie supérieur très instable. Cet électron revient d'ailleurs rapidement à son état initial en 10^{-9} s. Ce faisant, il libère son énergie sous forme de chaleur, et pour certains pigments comme la chlorophylle également sous forme d'un photon, ce qui entraîne un phénomène de fluorescence. L'observation de la variation de la fluorescence peut constituer un marqueur d'atteinte du système photosynthétique de la cellule végétale.

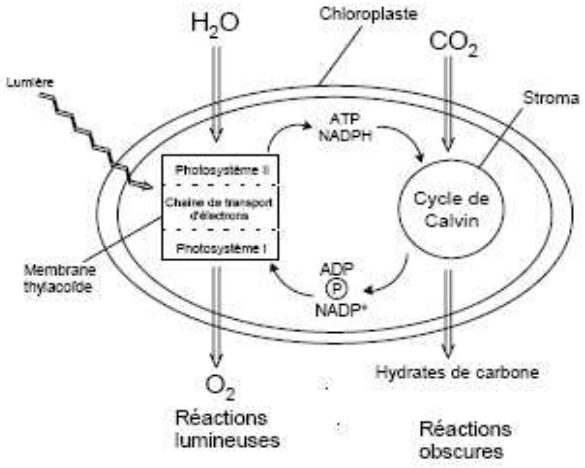


Figure 14: Le phénomène de la photosynthèse (Folly, 2000)

Il existe quelques spécificités chez les mousses concernant la photosynthèse et les organites photosynthétiques. En effet, les chloroplastes des mousses sont beaucoup plus riches en acides gras insaturés que ceux des végétaux supérieurs, ce qui leur confère un caractère résistant aux conditions extrêmes (Valanne, 1984). Par ailleurs, elles sont capables de photosynthèse dans le noir car l'intégrité de l'ultrastructure des chloroplastes est conservée, mais cette capacité diminue. Cependant, leur capacité photosynthétique diminue avec l'âge et se trouve également réduite quand les teneurs en eau sont faibles ou, au contraire, en excès (augmentation de la résistance à la diffusion du CO_2) (Oechel & Collins, 1976; Proctor, 1980).

3) Les spécificités chez les bryophytes : répercussion du stress hydrique sur l'expression de biomarqueurs du stress oxydant

Lorsque les conditions de vie deviennent défavorables, les plantes ont développé des stratégies d'adaptation fondées sur le contrôle et l'ajustement de leurs systèmes métaboliques. Le stress hydrique peut se définir comme le rapport entre la quantité d'eau nécessaire à la croissance d'un végétal et la quantité d'eau disponible dans son environnement.

Les mousses semblent dotées de mécanismes permettant de compenser le stress hydrique. Ces mécanismes sont notamment de nature à prendre en charge les ERO produites lors d'un stress hydrique, tout comme lors d'un stress induit par un xénobiotique. Ainsi, le stress hydrique constitue une source confondante d'ERO et son impact oxydatif est à prendre en compte dans l'analyse de l'expression du stress oxydant induit par des contaminants.

a) Les mécanismes de défense vis-à-vis du stress hydrique

Les mécanismes de tolérance à la dessiccation permettent de prévenir ou de réparer deux types de dommages biochimiques associés à la dessiccation :

- les dommages oxydatifs dus à l'accumulation d'agents tels que les ERO ;
- les modifications ultrastructurales et de métabolisme causées par un changement de configuration des macromolécules et une modification des membranes.

Les mécanismes de tolérance permettent :

- la limitation des dommages encourus à un niveau réparable ;
- le maintien de l'intégrité physiologique dans un état stable ;
- la mobilisation des mécanismes de réparation durant la réhydratation.

Les bryophytes sont capables de supporter la déshydration grâce à l'expression de « Late Embryogenesis Abundant (LEA) » protéines, aux concentrations élevées de sucres non réduits, aux antioxydants efficaces et à la photoprotection. Ensuite, c'est par l'expression de gènes que les processus de réparation seront activés après réhydratation (Proctor *et al*, 2007a).

b) Les dommages cellulaires et les réponses métaboliques au stress hydrique

T. ruralis, espèce native du nord et de l'ouest de l'Amérique du Nord est la bryophyte la plus utilisée pour l'étude de la résistance à la dessiccation, aussi bien sur les plans physiologique et biochimique qu'au niveau de la réponse cellulaire globale (Oliver, 2000a). *T. ruralis* possède la capacité remarquable de recouvrir rapidement son métabolisme de synthèse au moment de la réhydratation (Bewley, 1979 ; Oliver & Bewley, 1997 ; Oliver *et al*, 2005). Divers travaux ont mis en évidence des différences de réponse selon la vitesse de dessiccation (lente ou rapide). Ainsi, une dessiccation lente aboutit chez *T. ruralis* à une oxydation de 30% du pool cellulaire du glutathion (Dhindsa, 1987a), ce qui indique une diminution des capacités de la mousse à supporter les dommages oxydatifs. Au cours de la réhydratation qui suit, la concentration en glutathion oxydé diminue progressivement pour atteindre un niveau « normal » (Dhindsa, 1987 b). Par contre, lors d'une dessiccation rapide, les teneurs en glutathion oxydé et la lipoperoxydation sont beaucoup plus élevées (Dhindsa, 1987 a). Lors de la réhydratation, la concentration en glutathion oxydé continue à augmenter dans les deux heures qui suivent puis diminue jusqu'à atteindre le niveau « normal » six heures après la réhydradation (Dhindsa, 19987 b). En résumé, plus la déshydratation est lente, plus les teneurs en glutathion oxydé et la lipoperoxydation diminuent mais également plus la synthèse des protéines augmente. Concernant la synthèse protéique, Dhindsa (1987 a) note une diminution plus importante de celle-ci lors dune dessiccation rapide que lors d'une dessiccation lente. Or, il a été démontré que le glutathion oxydé a la faculté d'inhiber la synthèse protéique (Dhindsa, 1987 a) ; ce même auteur établit une corrélation négative entre la synthèse protéique et la concentration en glutathion oxydé (Dhindsa, 1991). Proctor (2000) suggère que la dessiccation

rapide minimise les dommages liés à la déshydratation.

La dessiccation ne mène pas nécessairement à la perte de pigments chez les bryophytes tolérantes à la dessiccation (Proctor & Tuba, 2002) contrairement aux angiospermes tolérantes à la dessiccation (Oliver *et al,* 2000b). Toutefois, quelques pertes de chlorophylle dues à la déshydratation ont été observées chez *Atrichum androgynum* (Guschina *et al*, 2002). Une perte significative de pigment (20%) a été observée chez *T. ruralis* après un cycle de déshydratation rapide (Schonbeck & Bewley, 1981a, b). Après 2 cycles de déshydratation chez *Tortula inermis*, une perte de 70% des pigments est observée (Stark *et al*, 2007). Des mécanismes de photoprotection diminuent la production d'ERO et les détoxifient (Logan, 2005). Ainsi, un complexe d'enzymes et de molécules antioxydantes dont le glutathion et l'ascorbate, convertissent l'anion superoxyde en eau (Foyer *et al,* 1994; Smirnoff, 1996, 2005). La photoprotection jouerait probablement un rôle essentiel dans la minimisation de la production d'ERO chez les bryophytes tolérantes à la dessiccation (Marschall & Proctor, 2004). Une des principales hypothèses attribue ce phénomène de photoprotection à la dissipation thermique de l'excès d'énergie d'excitation par le cycle des xantophylles (Deltoro *et al*, 1999; Demming-Adams & Adams, 1992; Gilmore, 1997; Herbe *et al*, 2001, 2006; Marschall & Proctor, 1999).

4) Usage de ces paramètres comme biomarqueurs

Nous rappellerons que les biomarqueurs ne sont pas spécifiques d'une pollution mais évaluent un stress général ou particulier comme le stress oxydant. Pour répondre le plus précocement possible et afin d'établir des diagnostics précoces d'exposition d'organismes à des xénobiotiques, il faut faire appel à des biomarqueurs intervenant au niveau infra-individuel (Van Gestel & Van Brummelen, 1996). Le biomarqueur correspondant à ce niveau infra-individuel traduit des altérations moléculaires, biochimiques, cellulaires ou physiologiques non visibles.

En résumé, l'intérêt de l'utilisation de biomarqueurs pour le suivi de la qualité des milieux est qu'il procure l'avantage d'une évaluation intégrée dans le temps et dans l'espace des polluants biodisponibles, non seulement en terme de présence, mais également par rapport aux effets que ces produits sont susceptibles d'exercer sur les populations animales, végétales ou microbiennes (Amiard *et al,* 1997).

a) Agents antioxydants et effets du stress oxydant utilisés comme biomarqueurs

Certaines des molécules antioxydantes, mises en œuvre pour répondre aux attaques d'ERO, peuvent être utilisées comme biomarqueurs de stress oxydant.

Lors d'un stress oxydant, l'organisme va activer son système de compensation enzymatique et non enzymatique afin de prendre en charge les ERO formées. Ainsi, un des indicateurs précoces d'un stress

oxydant est les enzymes antioxydantes, l'augmentation de leur activité ou parfois leur inactivation, et l'augmentation de la production de molécules antioxydantes. Chez les végétaux, il existe deux enzymes spécifiques, mises en jeu pour la prise en charge d'ERO : l'ascorbate et la guaïacol peroxydases. Ces enzymes se chargent principalement de la dégradation du peroxyde d'hydrogène en eau. Lorsque ces enzymes ne parviennent pas à prendre en charge l'intégralité du peroxyde d'hydrogène présent dans la cellule, ces ERO pourront engendrer des dommages dans les compartiments membranaire, cytosolique ou au niveau des organites comme les chloroplastes.

b) APOX et GPOX comme biomarqueurs du stress oxydant

i- Intérêt de l'utilisation de l'APOX et de la GPOX comme biomarqueurs

L'ascorbate et la guaïacol peroxydases sont mises en jeu dans les mécanismes de défense contre le stress oxydant et la prise en charge des ERO. Les stress abiotiques, de type exposition à un xénobiotique, peuvent ainsi induire l'expression de ces enzymes qui constituent alors des indicateurs infra-cellulaires de stress oxydant. Lors d'une étude de l'effet du nickel chez *Zea mays*, Baccouch *et al* (1998) décrivent l'ordre chronologique de réponse à l'exposition au nickel, de différentes enzymes antioxydantes. Ainsi, dans un premier temps, les SOD varient, puis l'activité de la GPOX augmente, et un peu plus tard, l'APOX, la catalase et la glutathion réductase voient leur activité augmenter. Après survient la peroxydation de lipides membranaires et la formation de malondialdéhyde. Smeets *et al* (2005), lors d'une exposition au cadmium, montrent une activation des principales enzymes dans les 24 heures suivant l'exposition, et une formation de MDA dans les 48 heures. Des dommages observés au niveau des chloroplastes (chlorose) ne surviennent que 72 heures après. La rapidité de la réponse au stress que constituent les peroxydases confère à ces enzymes une sensibilité à prévenir un stress oxydant et en fait un biomarqueur précoce d'effets oxydatifs. La GPOX, de par la diversité de ses fonctions dans la cellule, est un indicateur plus global de stress oxydant au niveau de la cellule que l'APOX.

ii- Etat des lieux concernant l'APOX et la GPOX

Plusieurs études menées chez les végétaux ont recherché l'influence d'exposition à des contaminants sur l'expression de l'activité de ces enzymes. Certaines ont montré l'augmentation des activités enzymatiques après des expositions au cobalt (Kumar-Tewari *et al,* 2002), au plomb (Verma & Dubey, 2003), au mélange chlorure de sodium et silicone (Zhu *et al,* 2004), au cuivre (Cuypers *et al*, 2002; 2005), au cadmium (Smeets *et al*, 2005) et à l'uranium (Vandenhove *et al*, 2006).

Chez les bryophytes, des travaux portant principalement sur des mousses aquatiques comme *Fontinalis antipyretica*, ont montré l'augmentation puis la diminution des activités d'APOX et GPOX en fonction de l'augmentation des concentrations d'exposition en chrome (Dazy *et al*, 2008) ou en plomb, zinc, cuivre et cadmium (Dazy *et al,* 2009). Chez *Plagiomnium cuspidatum*, Wu *et al* (2009) ont signalé une augmentation de

l'activité de GPOX après exposition au cuivre tandis que celle d'APOX tendait à diminuer. Par ailleurs, d'autres paramètres tels que le stress photochimique (qui varie en fonction des saisons) et le stress hydrique ont une incidence sur l'activité des peroxydases, notamment celle de l'APOX. En effet, Paciolla et Tommasi (2003) déterminent un lien entre la capacité de *Brachythecium velutinum* à recycler efficacement l'acide ascorbique et sa tolérance à la déshydratation. Sharma (2009) montre la diminution de l'APOX chez *Brachythecium populeum* en hiver lorsque le stress photochimique est moindre.

À l'heure actuelle, l'usage de ces biomarqueurs chez les bryophytes concerne principalement les impacts de contaminants métalliques chez des espèces aquatiques. Peu de travaux ont été menés chez des espèces bryophytiques terrestres (notamment du fait de la difficulté à contrôler l'influence du stress hydrique sur l'expression des biomarqueurs du stress oxydant); les travaux mettant en jeu les bryophytes exposées à des contaminants organiques n'ont visé qu'à en étudier les phénomènes d'accumulation. Seuls Roy *et al*. (1996) ont mis en évidence une augmentation d'activités enzymatiques (peroxydases, superoxyde dismutase) chez *F. antipyretica* exposée en milieu contaminé aux hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP). Ces activités enzymatiques étaient par ailleurs corrélées aux concentrations en HAP mesurées chez la mousse;

c) MDA comme biomarqueur du stress oxydant

i- Intérêt de son utilisation comme biomarqueur

Le MDA est un indicateur du degré de stress oxydant dans les sytèmes biologiques. Formé par les ERO, il est lié à la peroxydation des acides gras insaturés (Mehelman & Borek, 1987). Il est ainsi souvent utilisé comme indicateur métabolique de la dégénération oxydative des membranes. Il apparaît comme un des premiers indicateurs de l'effet d'un agent stressant sur un organisme puisqu'il permet de mettre en évidence un dommage de la membrane lipidique. Effectivement, comme l'ont démontré Smeets *et al* (2005), la formation de MDA survient après l'activation des enzymes APOX et GPOX. Il constitue ainsi un biomarqueur d'effet oxydatif de l'exposition à un agent de stress comme les xénobiotiques.

ii- Etat des lieux des études sur le MDA

A l'heure actuelle, le malondiadéhyde a déjà fait l'objet de nombreuses études, notamment chez l'animal et les végétaux supérieurs (Gallego *et al*, 1996; Luna *et al,* 1994; Chaoui *et al,* 1997; Pandolfini *et al,* 1992). Il a été étudié dans le cadre de recherches sur les effets de polluants métalliques chez les végétaux (Verma & Dubey*,* 2003; Cuny *et al,* 2004; Kumar Tewari *et al,* 2002; Baccouch *et al*, 1998). Chez les mousses, Denayer (2000) a observé une corrélation des concentrations en MDA chez *C. purpureus*, corrélées avec les concentrations intracellulaires en cadmium. Dazy *et al* (2009) mettent en évidence une augmentation de la concentration en MDA chez *F.antipyretica* après exposition au plomb, au zinc, au cuivre et au cadmium. Wu *et al* (2009) démontrent par ailleurs l'augmentation de la lipoperoxydation après une exposition de *Plagiomnium cuspidatum* à différentes concentrations en cuivre. Ainsi, souvent les études de la lipoperoxydation

membranaire induite par des polluants est liée à une exposition aux métaux et montrent une augmentation du marqueur de peroxydation des lipides membranaires. Cependant, Kumar-Tewari *et al* (2002) observent une diminution de la concentration en MDA chez *Phaseolus aureus* exposé au cobalt, et l'expliquent par l'augmentation des activités antioxydantes qui, prenant en charge le peroxyde d'hydrogène, en réduisent sa concentration dans la cellule et limitent ainsi la formation de MDA.

d) GSH comme biomarqueur du stress oxydant

i- Intérêt de son utilisation comme biomarqueur

Ses capacités en tant que nucléophile vis-à-vis des ERO et comme réducteur des lipoperoxydes font du glutathion un biomarqueur d'effet intéressant dans l'étude des effets relatifs au stress oxydant. Ainsi, l'étude de la fluctuation de sa forme oxydée, répondant à la formation d'ERO, permet d'évaluer le stress oxydant induit par des agents stressants, et sa capacité à réduire les lipoperoxydes permet de compléter l'information apportée par l'étude de la lipoperoxydation au travers de la recherche de MDA, voire de l'expliquer.

ii- Etat des lieux des études sur le GSH

Le glutathion a fait l'objet de nombreuses études, principalement chez l'animal, notamment relatif à son rôle dans la synthèse de protéines, le transport d'acides aminés, la réserve et le transport de la cystéine, le métabolisme des prostaglandines et des leucotriènes, et la réduction de ribonucléotides en déoxyribonucléotides (Meister & Anderson, 1983 ; Cotgreave *et al,* 1990 ; Estrela & Pallardó, 1990, Bray & Taylor, 1993). Par ailleurs, chez le végétal, un rôle important du glutathion dans la détoxification des ETM et des xénobiotiques a déjà été mis en évidence (Rennenberg & Lamoureux, 1990 ; Smith *et al,* 1990), notamment par formation de phytochélatines.

Chez deux espèces bryophytiques, *Tortula ruraliformis* et *Dicranella palustris*, Kranner & Grill (1995) ont montré qu'une dessiccation lente entraînait une augmentation de glutathion sous sa forme oxydée, augmentation corrélée également avec les taux de lipoperoxydation. Ainsi, le glutathion constitue un biomarqueur permettant de mettre en évidence le stress oxydant occasionné, dans ce cas, par la dessiccation. Enfin, chez *F. antipyretica*, il a été montré qu'une exposition à de fortes concentrations en cadmium entrainait une augmentation du taux de glutathion (Bleuel *et al*, 2005; Bruns *et al*, 2001).

Auteur(s), année	Espèces Bryophytiques	Marqueurs	Effets observés
Wu *et al*, 2008	*Plagiomnium cuspidatum*	TBA réactives, GPOX, APOX, protéines, SOD, CAT, GR	Augmentation de l'activité de GPOX après exposition au cuivre APOX, CAT et GR ne varient pas
Dazy *et al,* 2008	*Fontinalis antipyretica*	SOD, CAT, APOX, GPOX, GR, GSH, CHL	Augmentation des activités enzymatiques après exposition au chrome (sauf pour APOX) pas d'effet sur les quantités de glutathion des effets sur les concentrations en chlorophylles et sur le ratio chla/chlb
Paciolla & Tommasi, 2003	*Brachythecium velutinum* *Marchantia polymorpha*	APOX, protéines	Le stress hydrique engendre une diminution de l'activité d'APOX chez *M.polymorpha* mais pas chez *B.velutinum* il existe une corrélation entre l'efficacité du recyclage de l'ascorbate et la tolérance au stress hydrique
Chobot *et al,* 2006	*Ceratodon pururеus,* *Dicranum polusetum,* *Dicranum scoparium,* *Leucobryum glaucum,* *Mnium marginatum*	Enzymes antioxydantes	Aucune corrélation observées entre les teneurs totales et les activités antioxydantes

Tableau 7: Utilisation des biomarqueurs du stress oxydant chez les bryophytes

e) La chlorophylle comme biomarqueur du stress

i- Intérêt comme biomarqueur de stress

L'étude des concentrations en chlorophylle et l'évaluation de la dégradation de cette dernière constituent des méthodes d'évaluation de l'état sanitaire d'un végétal. Chez les bryophytes, du fait de l'absence de cuticule, de système racinaire et de tissus conducteurs développés, leur état sanitaire sera fortement lié à leur environnement, et ainsi, toute perturbation sera susceptible de donner lieu à une altération dans leur métabolisme ou leur physiologie. Par conséquent, dans le cadre d'études écotoxicologiques d'impacts de contaminants, il s'avère nécessaire de réaliser un suivi physiologique des organismes.

Pour réaliser le suivi de l'homéostasie, le dosage des pigments (chlorophylles, caroténoïdes et phycobilines)

de par sa simplicité,est une méthode couramment utilisée.

Plusieurs paramètres sont susceptibles d'engendrer la destruction de la chlorophylle : les changements significatifs dans le cycle de vie de l'organisme (sénescence des tissus) ; le turnover naturel des cellules ; les facteurs environnementaux dont les dommages physico-chimiques peuvent être dus soit à la pression de l'environnement naturel (température, luminosité), soit aux activités anthropiques (polluants solides, liquides ou gazeux) (Hendry *et al,* 1987).

En fonction des effets recherchés, plusieurs techniques d'analyse de la chlorophylle sont utilisées.(Peñuelas, 1984) :

- des méthodes d'induction de la fluorescnce (Tuba *et al,* 1987),
- des dosages des quantités de chlorophylles présentes dans la mousse,
- des analyses des rapports entre les quantités de chlorophylle a et de chlorophylle b,
- l'analyse des rapports entre les quantités de chlorophylle a et ses produits de dégradation (phéophytine a, chlorophorbide a, phéophorbide a (Leblond, 2004).

L'étude de la fluorescence est la technique la plus précise car elle révèle les variations au niveau du fonctionnement des chloroplastes, avant même la survenue de dommages. Cependant, lors d'études de terrain, ce n'est pas une méthode très facile à mettre en place. L'analyse des pigments chez des végétaux est elle plus aisée. Tout d'abord, les concentrations en chlorophylles sont indicatrices de la vitalité de l'organisme puis qu'elles augmentent lorsque l'organisme est en croissance. Le calcul du ratio chlorophylle a sur chlorophylle b est important car il reflète l'abondance et le rôle physiologique de ces deux types de chlorophylle. Ce ratio augmente avec l'activité tissulaire du fait de l'augmentation de la synhtèse de chlorophylle a dans les tissus en croissance (Margalef, 1982), et il diminue dans les plantes sénescentes ou en conditions de stress, car il y a dégradation du complexe lumineux dans lequel la chlorophylle b est abondante, et parce que la dégradation du complexe riche en chlorophylle a est plus lente (Hendry, 1987). Chez les mousses, ce ratio est plus faible que chez les végétaux supérieurs et est compris entre 1,1 et 2,4 (Valanne, 1984).

Le rapport entre la quantité de chlorophylle a et la quantité de phéophytine a, quant à lui, détermine un indice de phéophytinisation*, indicateur de l'état sanitaire de la mousse. Les chlorophylles peuvent être modifiées par voies chimique ou enzymatique sans ouverture du macrocycle. Le schéma ci-dessous donne un aperçu des dérivés obtenus par les différentes combinaisons possibles de la démétallation, de l'hydrolyse de l'ester phytylique et de la décarbométhoxydation sur la position C(13²).

Ainsi, le ratio chla/phéoa diminue en conditions de stress, et il est souvent utilisé pour quantifier la dégradation de la chlorophylle (Martinez-Abaiger & Nunez-Olivera, 1998). Il se calcule soit par le ratio (densite optique 435 nm / densité optique 415 nm) ou par le ratio (densité optique 665 nm / densité optique 665 nm après

acidification). Par ailleurs, il est intéressant de doser en parallèle la quantité de chlorophylle a présente dans l'organisme car, lorsque ce dernier subit un stress important ou prolongé, la chlorophylle a et la phéophytine a vont ensemble être rapidement dégradées, ou alors les chloroplastes vont être endommagés, ce qui va occasionner une diminution globale de la concentration en chlorophylle a, sans nécessairement affecter l'indice de phéophytinisation.

Un autre ratio est parfois calculé : 'index caroténoïdes'. Il correspond au rapport entre les pigments bruns et les pigments verts d'un organisme et augmente en conditions de stress. Il se calcule comme suit: (densité optique à 435 nm / densité optique à 665 nm) (Bignal *et al*, 2008).

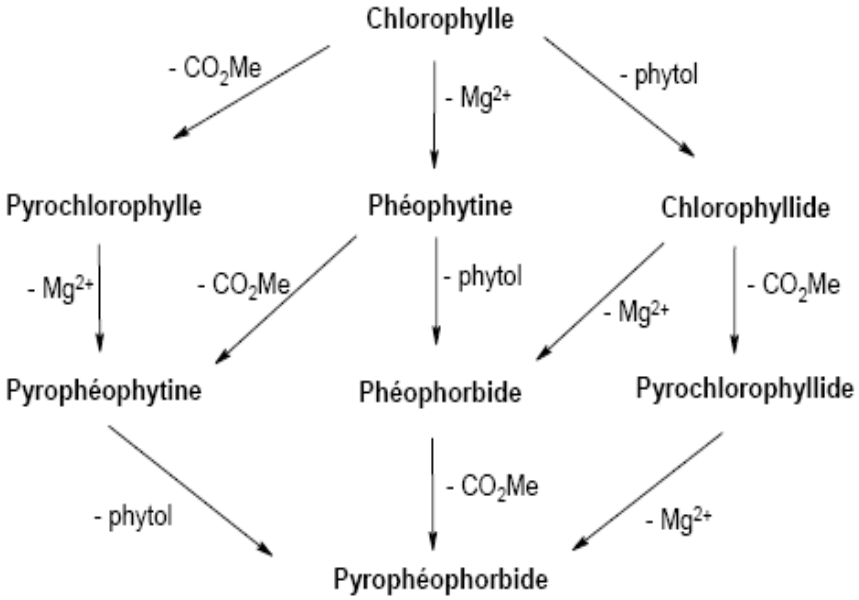


Figure 15: Pigments dérivés de la chlorophylle (Folly, 2000)

ii- Etat des lieux des études sur la chlorophylle en tant que biomarqueur

Plusieurs études ont montré l'influence de paramètres environnementaux sur l'expression des pigments. Lagriffoul *et al* (1998) ont montré que les teneurs en chlorophylle chez *Zea mays* diminuaient avec l'augmentation des concentrations en cadmium. Chez les bryophytes, Peñuelas, en 1984, et plus récemment Lopez, en 1997, ont établi que l'indice de phéophytinisation, mesuré notamment chez *F. antipyretica*, pouvait constituer un indicateur de pollution de l'eau de rivière. Les teneurs en chlorophylles et les ratios des pigments, surtout l'indice de phéophytinisation, caractérisent le stress induit par une pollution métallique ou

organique chez cinq espèces de bryophytes aquatiques (Lopez, 1989).

Par ailleurs, il est intéressant de noter que, chez les bryophytes, les espèces aquatiques présentent des concentrations en chlorophylle a supérieures à celles des espèces terrestres, et qu'une espèce est qualifiée de résistante lorsque l'indice de phéophytinisation est faible (environ 1,55) (Lopez, 1989).

Plusieurs auteurs ont démontré l'impact d'eau contaminée en zinc, plomb, cadmium et cuivre sur la fluorescence (Rau *et al*, 2007) et le ratio (chla/chlb) (Dazy *et al*, 2008) chez *F.antipyretica*. Chez des bryophytes terrestres, Bakken (1995) et plus récemment Bignal *et al.* (2008) ont observé l'augmentation des concentrations en chlorophylle en milieux riches en composés azotés. Cette augmentation est corrélée à la croissance des organismes (Bignal *et al,* 2008). Ainsi, selon ces auteurs, l'activité photosynthétique ne constituerait pas un bon indicateur de contaminations azotées. Par contre, dans le cadre d'étude en zones urbaines polluées, Tretiach *et al* (2007) ont observé la dégradation des pigments chlorophylliens chez *Hypnum cupressiforme*. En effet, les concentrations en chlorophylle totale et l'indice de phéophytinisation (DO435/DO415) chez *H. cupressiforme* diminuent après exposiiton en milieux contaminés (industriel et urbain). De la même manière, Aboal *et al* (2008) ont observé une dimuntion des concentrations en chlorophylle totale et de l'indice de phéophytinisation en corrélation avec les concentrations en fluor du milieu d'exposition.

MATERIEL ET METHODES

IV. Matériel et Méthodes

A. Caractérisation des sites d'étude *in situ*

1) Présentation et objectifs des expériences *in situ*

L'étude de terrain se déroule en 2 phases :

- la première phase est réalisée sur 2 sites au cours des mois de juin et de juillet 2007

Cette étude *in situ* a un double objectif : d'une part, l'efficacité du système d'hydratation est mise à l'épreuve, d'autre part, cette exposition *in situ* permet l'étude du comportement de 3 espèces différentes de bryophytes vis-à-vis des COV présents dans l'atmosphère des sites d'exposition. Cette exposition *in situ* permet donc d'optimiser les conditions d'exposition et de déterminer l'espèce la mieux adaptée pour la suite des expérimentation (*in situ* et en conditions contrôlées).

- la seconde phase est réalisée au cours du mois d'octobre 2008, sur 24 sites.

L'objectif de cette expérience *in situ* est de déterminer la représentativité des concentrations en BTEX chez une espèce bryophytique exposée sur 24 sites, par rapport aux concentrations dans l'air sur ces sites. De plus, sur 3 de ces 24 sites, le stress global subi par la mousse est évalué par la mesure de différents biomarqueurs.

2) Sites d'exposition

a) Sites de la 1ère expérimentation

2 sites ont été retenus pour cette expérience.

Le site A (caserne des pompiers de Fort Mardyck) est situé en bordure de la zone industrielle de Dunkerque, sous les rejets industriels; il constitue un site de typologie industrielle.

le site B (Collège Robespierre) est situé en centre ville, les vents dominants du littoral exposant ce site aux rejets de la zone industrielle dunkerquoise proche; il constitue un site de type industrialo-urbain.

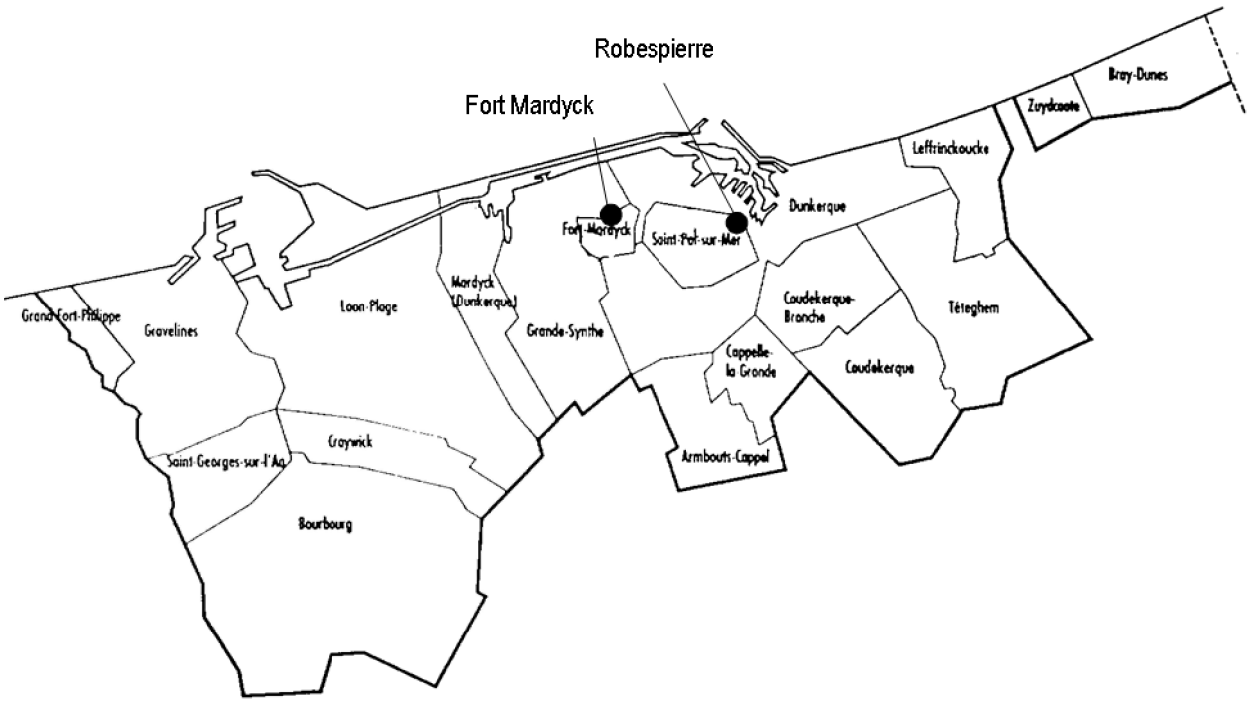


Figure 16: Sites d'exposition de la 1ère phase d'exposition (juin et juillet 2007)

b) Sites de la 2nde expérimentation

Les mousses sont exposées sur 24 sites localisés sur le littoral dunkerquois, 21 de ces sites, cadrillant une zone de 6 km sur 17 km au niveau de la communauté urbaine de Dunkerque. Ces sites sont plus ou moins exposés aux contaminations issues des rejets industriels et aux pollutions de type urbain.

Les sites retenus ont été choisis de manière à couvrir les différentes sources de COV présentes sur la zone d'étude, à savoir :

- des sites soumis aux rejets d'industries choisies parmi les plus gros émetteurs de COV ;
- des sites soumis à la fois aux retombées industrielles et urbaines (trafic routier) ;
- des sites situés relativement loin des sources émettrices industrielles et urbaines.

Les 24 sites d'exposition sont répartis comme suit (*cf.* figure 17) :

- 4 se situent à Grande Synthe, à proximité Sud de la zone industrielle (7, 18, 11, 13)
- 3 se localisent au niveau de Petite Synthe, enclavés au Sud-Est de la zone industrielle (1, 12, 19)
- 1 se trouve à Fort Mardyck, juste à l'Est de la zone industrielle (10)
- 2 se situent à Saint-Pol-sur-Mer, en milieu industrialo-urbain, à l'Est de la zone industrielle (2, 23)
- 2 sont à Dunkerque même, plus à l'Est (20, 14)
- 1 se trouve à Leffrinckoucke et 1 à Zuydcoote, à l'extrémité Est de la zone d'étude (24, 21)

- 3 sont situés au niveau de la ville de Coudekerque-Branche (3, 4, 6)
- 2, plus au Sud, se trouvent placés dans la ville de Cappelle-la-Grande (5, 8)
- 1, encore plus au Sud, est à proximité des axes autoroutiers, sur la commune d'Armbouts-Cappel (17)
- 1, situé à proximité d'une raffinerie à Mardyck (22)
- enfin, 3 sites sont localisés au Sud à 10 km (Bierne), 16 km (Wormhout) et 26 km (Winnezeele) de la communauté urbaine de Dunkerque (respectivement 9, 16 et 15), en milieu rural.

Les sites 22, 23 et 24 sont les 3 sites retenus pour l'étude des biomarqueurs. Le premier est situé en milieu industriel; le deuxième en milieu urbain soumis aux vents amenant les rejets industriels ; le troisième est plus éloigné de la zone industrielle et constitue un site périurbain.

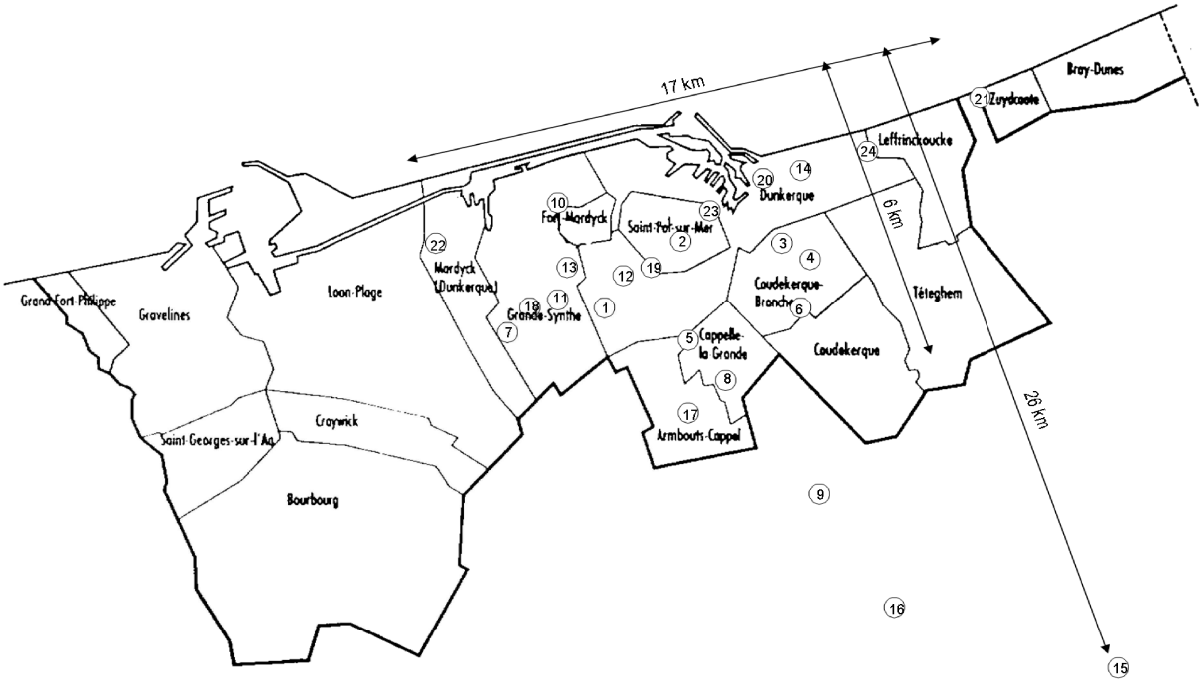


Figure 17: Sites d'exposition de la 2nde phase d'exposition (octobre 2008)

3) Conditions météorologiques

a) Conditions météorologiques de la 1ère expérimentation

i- Durée d'exposition

Pour observer l'évolution de l'état d'hydratation des mousses au cours d'une exposition *in situ*, celles-ci sont exposées sur les différents sites pendant 8 semaines, du 30 mai 2007 au 25 juillet 2007, et des prélèvements sont réalisés tout au long de l'exposition, comme décrit ultérieurement (paragraphe B.5.b.ii).

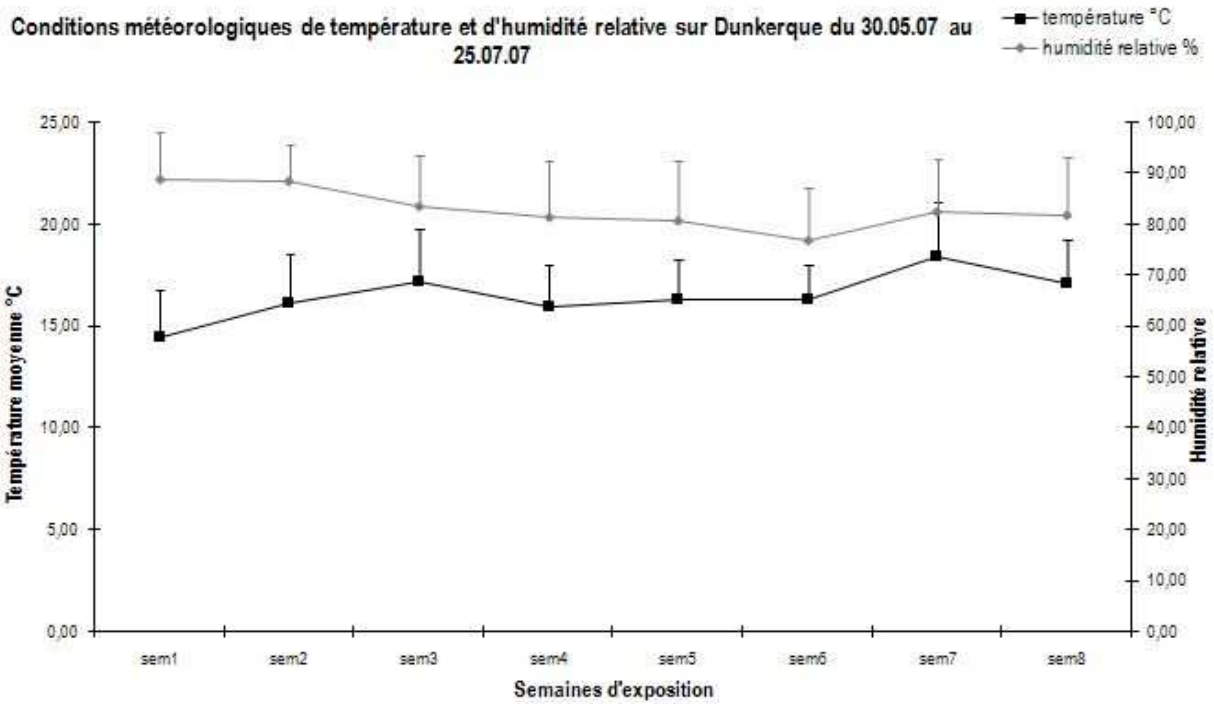


Figure 18: Température et humidité relative sur l'agglomération dunkerquoise au cours des mois de juin et juillet 2007 (Source Atmo Nord Pas-de-Calais consulté en octobre 2007)

ii- Paramètres météorologiques d'exposition

Au cours des 8 semaines d'exposition, le relevé des conditions météorologiques montre une augmentation des températures moyennes, l'exposition s'achevant en pleine saison estivale. En parallèle, l'hygrométrie diminue et les vents sont globalement de plus en plus forts au fur et à mesure de l'exposition. Ces conditions sont idéales pour éprouver l'efficacité du système. En effet, les températures relativement chaudes et les vents parfois soutenus constituent des conditions météorologiques propices à l'étude de l'efficacité d'un système d'hydratation en conditions réelles de terrain. (Source : réseau Atmo Nord Pas-de-Calais)

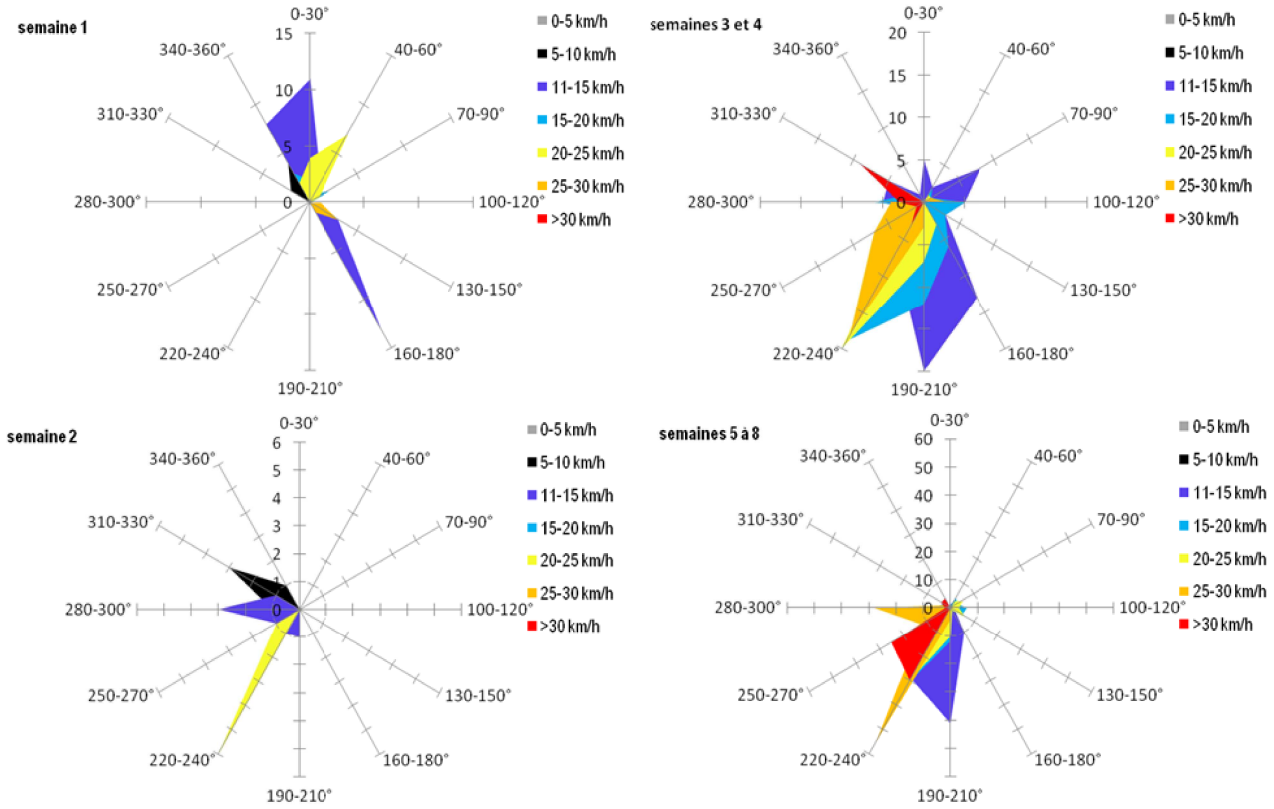


Figure 19: Roses des vents sur l'agglomération dunkerquoise au cours des mois de juin et juillet 2007 (source Atmo Nord Pas-de-Calais consulté en octobre 2007)

b) Paramètres météorologiques de la 2nde expérimentation

i- Durée d'exposition

Les expositions se sont déroulées au cours du mois d'octobre 2008 et ont duré 2 semaines (du 8 au 23 octobre 2008).

ii- Conditions météorologiques d'exposition

Lors des 2 semaines d'exposition, les conditions météorologiques enregistrées (température, humidité relative, vents) sont reportées dans le tableau 8 :

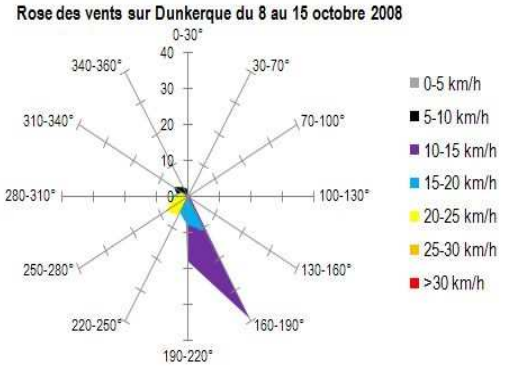
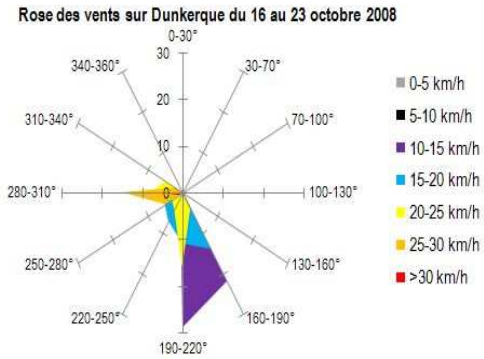
Semaine d'exposition	Du 8 au 15 octobre 2008	Du 16 au 23 octobre 2008
Température moyenne (°C)	15,0	13,0
Humidité relative moyenne (%)	86,2	82,1
Rose des vents		

Tableau 8: Température, humidité relative et roses des vents sur l'agglomération dunkerquoise au cours du mois d'octobre 2008 (source Atmo Nord Pas-de-Calais consulté en décembre 2008)

4) Caractérisation des profils atmosphériques en COV et teneurs en BTEX sur les sites d'exposition

Pour affiner la caractérisation la pollution atmosphérique en COV de notre zone d'étude, des prélèvements et analyse des COV atmosphériques ont été réalisés sur chacun des sites d'exposition, en collaboration avec l'Ecole des Mines de Douai.

a) Échantilonnage des COV atmosphériques

L'échantillonnage de l'air est réalisé au moyen de tubes à diffusion passive de type Radiello®. Ceux-ci sont exposés pendant 7 jours *in situ*.

Les tubes Radiello® (Fondazione Salvatore Maugeri, Padove, Italie) sont constitués d'un corps diffusif qui est une membrane poreuse en polyéthylène de forme cylindrique, dans laquelle se trouve une cartouche cylindrique en acier inoxydable contenant du carbograph 4.

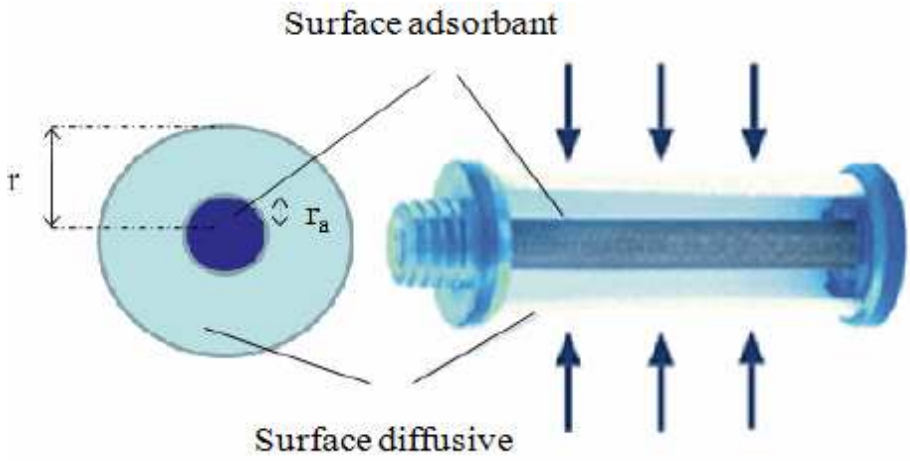


Figure 20: Schéma du principe de diffusion à travers un tube Radiello®

Pour les COV, il existe deux types de membrane poreuse : la membrane blanche de forte épaisseur et de porosité 25 µm et la membrane jaune de faible épaisseur et de porosité de 10 µm. Le tube Radiello® doté d'une membrane poreuse jaune, qui est peu épaisse et de faible porosité, est adapté aux durées d'exposition longues (14 jours). Il possède des débits d'échantillonnage moins élevés (~20 cm^3.min) que celui doté d'une membrane poreuse blanche (~60 cm^3.min). Cette dernière est utilisée pour des durées d'exposition courtes (8 heures).

Dans le cadre de cette expérimentation nous optons pour la membrane jaune qui permettra d'exposer les tubes pendant 7 jours.

b) Analyse des COV atmosphériques

i- Dispositif analytique

L'analyse d'une cartouche nécessite une désorption thermique puis une séparation des composés. Le dispositif d'analyse est un thermodésorbeur ATD 400 Perkin Elmer, couplé à un chromatographe en phase gazeuse Varian 3300, équipé de deux détecteurs : un détecteur à ionisation de flamme (FID) et un spectromètre de masse (SM) DSQ Thermo. La colonne mise en place dans le chromatographe gaz (GC) est une colonne CP-SIL 5 CB (60 m x 0,25 mm x 1 µm). La quantification des BTEX est réalisée à l'aide du FID et l'identification des COV par spectrophotométrie de masse.

Photographie 1: Thermodésorbeur ATD 400 Perkin Elmer couplé à un chromatographe en phase gazeuse doté d'une détection par ionisation de flamme et d'un spectromètre de masse (Photo Faburé, 2007)

ii- Analyse des cartouches

L'analyse de l'échantillon comprend trois étapes principales :

La désorption primaire :

Cette étape consiste à désorber, sous un flux d'hélium, les composés adsorbés sur la cartouche et à les transférer sur le piège de préconcentration. La cartouche, placée sur le Perkin Elmer, va être maintenue sous un flux d'hélium pendant 15 min à 350°C à un débit de 35 mL/min.

Le temps et la température sont optimisés selon l'efficacité d'adsorption du matériau contenu dans la cartouche et de la nature des composés piégés. Plus les composés sont lourds, plus le temps est prolongé et la température élevée. Les composés sont ensuite transférés jusqu'à un piège maintenu à 10°C par effet Peltier, où ils seront préconcentrés. Le piège est constitué de deux adsorbants : 20 mg de Carbopack B pour piéger les composés lourds et 100 mg de Carbosieve III pour les composés légers

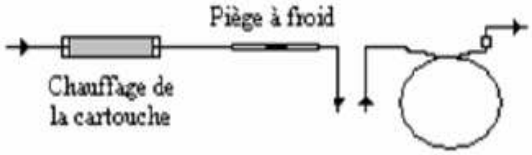


Figure 21: Schéma de la désorption primaire (Roukos, 2007 non publié)

La désorption du piège de préconcentration

Le piège est chauffé à 290°C à une vitesse de 40°C/s. Les composés sont injectés en Flash via la ligne de transfert, vers la colonne chromatographique. Un « outlet split » peut être imposé à la sortie du piège,

permettant de diminuer les masses injectées dans le système chromatographique. Le flux est partagé en 2 parties, l'une envoyée au chromatographe, l'autre est rejetée du système. Ceci va éviter la saturation du FID et diminuer la durée de l'injection, améliorant la séparation des composés. Le rapport de split est calculé comme étant égal à :

$$(débit\ de\ colonne + débit\ d'outlet\ split) / débit\ de\ colonne$$

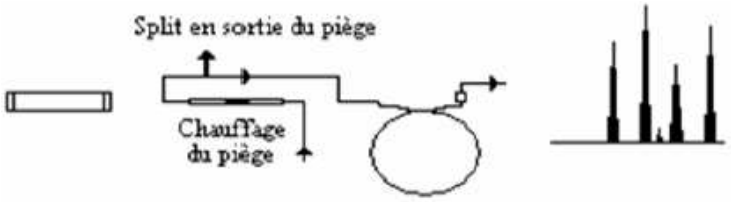


Figure 22: Schéma de la désorption du piège de préconcentration (Roukos 2007 non publié)

La séparation chromatographique

Les composés sont séparés sur une colonne capillaire selon une programmation de la température du four. A la sortie de la colonne, une double détection est appliquée. Le couplage des deux détecteurs est effectué de façon à envoyer la majorité de l'échantillon au FID (2/3 de l'échantillon) et le reste (1/3) vers le SM. Le FID servira pour la quantification des BTEX alors que la spectrométrie de masse est utilisée pour l'identification des COV.

Thermo-désorbeur	Piège de préconcentration	Carbopack B + Carbosieve SIII Température du piège : 10°C
	Etape 1 : test de fuite	Pression en tête de colonne : 30,5 psi
	Etape 2 : purge	Durée : 1 min
	Etape 3 : désorption primaire	Durée : 10 min Débit de désorption : 35 mL/min Température de désorption : 350°C Température de la vanne : 200°C
	Etape 4 : désorption/injection	Durée : 10 min Débit d'outlet split : 10,2 mL/min Température du piège : 290°C Vitesse de chauffage du piège : 40°C/s
	Ligne de transfert	Température : 200°C
CG	Colonne capillaire silice fondue	Type : CP-Sil 5 CB Dimensions : 60 m x 0,25 mm x 1 µm Gaz vecteur : He Débit colonne : 1,25 mL/min
	Programmation en température du four	35 °C (10 min) 5 °C/min jusqu'à 140 °C 15 °C/min jusqu'à 250 °C 250 °C (3 min)
Détecteur FID	Débit H_2 (mL/min) Débit air (mL /min) Température (°C)	35 350 250
Spectrométrie de masse	Mode full scan	m/z=25 à 250

Tableau 9: Conditions analytiques du GC/MS-FID pour l'analyse des cartouches Radiello® (Roukos, 2007 non publié)

iii- Méthode d'étalonnage

L'analyse quantitative des BTEX échantillonnés sur une cartouche d'adsorbant nécessite au préalable un étalonnage spécifique. La méthode de dopage par vaporisation a été utilisée.

Préparation des solutions étalons par gravimétrie

Préparation de la solution mère de BTEX

Dans un premier temps, une solution mère composée d'une masse d'un composé x, diluée dans du méthanol est préparée. Cette solution mère de masse mM de volume VM et de masse volumique ϕM est obtenue en pesant la masse connue du composé x, noté mx pesée, et une masse de solvant (mCH_3OH pesée) dans un flacon en verre de 15 mL. Chaque masse est pesée à l'aide d'une balance de précision (avec une résolution d'au moins 0,0001 g).

Préparation des solutions étalon filles

Dans un second temps, différents volumes V_A de solution mère (de masse mA) sont prélevés et transférés dans des flacons de 15 mL. Chaque prélèvement V_A est diluée par l'ajout d'un volume de méthanol (V_{CH3OH} (F)

de masse $mCH_3OH(F)$).

La masse volumique de la solution fille ϕF est considérée égale à celle du solvant ϕCH_3OH, car la dilution sera choisie de manière à avoir une masse de solvant au moins 50 fois supérieure à celle du benzène dans la solution fille.

Dopage des cartouches étalon par vaporisation

Une série de cartouches Radiello® conditionnées sont dopées avec les solutions filles préparées précédemment. Pour réaliser ce dopage, la solution fille est vaporisée dans l'injecteur d'un chromatographe, les BTEX sont ensuite entraînés par un gaz vecteur (Hélium) jusqu'à la cartouche d'adsorbant. Cette dernière est placée dans un tube à désorption Perkin Elmer, lui-même relié à l'injecteur à l'aide d'un capillaire d'un diamètre intérieur 0,32 mm. Un volume de solution fille de 1 µL est injecté à l'aide d'une micro seringue. La température de l'injecteur est fixée à 250 °C pour vaporiser complètement le mélange. L'injecteur est balayé par un flux d'hélium à un débit de 35 mL/min, ce qui entraîne les composés du mélange vaporisé jusqu'à la cartouche où ils sont retenus. Afin d'éviter les points de condensation entre l'injecteur et la cartouche d'adsorbant, le capillaire est placé dans le four du chromatographe, maintenu à une température de 250 °C. La cartouche est positionnée en sortie immédiate du four, comme indiqué sur la figure 23. La durée du dopage est fixée à 10 min.

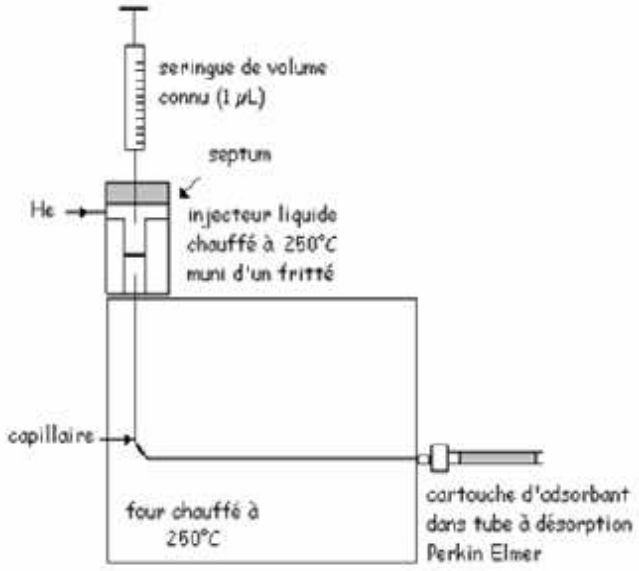


Figure 23: Dispositif de dopage par vaporisation d'une solution de benzène sur une cartouche Radiello® (Roukos, 2007 non publié)

iv- Analyse qualitative des COV

Choix du tube adsorbant

L'objectif est de faire une analyse qualitative, donc de retenir sur un même adsorbant une large gamme de composés. Le carbograph 4 capte des composés allant de C2 à C16 appartenant à plusieurs familles (des hydrocarbures, des oxygénés, des chlorés et des azotés). Il semble donc être un outil d'échantillonnage

adapté pour l'identification des COV.

Position du tube à diffusion

Le tube doit être placé à une hauteur de 1,5 à 2 m afin d'éviter toute influence du sol sur l'échantillonnage. Le tube est fixé verticalement et à au moins 2 à 3 centimètres des parois du support de façon à ce que l'air circule sans restriction autour du tube. Il est placé dans une boîte de protection pour l'isoler des intempéries (pluies et vents forts).

Durée d'échantillonnage

La durée d'échantillonnage est d'une semaine pour identifier tous les composés. On a fait le choix d'une durée longue pour accumuler une masse suffisante afin qu'elle soit détectable par TD-GC-MS. Au delà de cette période, on perd certains composés comme le benzène qui possède une volatilité relativement importante.

Conservation des tubes

Les tubes sont fermés hermétiquement . En dehors du transport et de la période d'échantillonnage, les tubes doivent être conservés au réfrigérateur à 4°C.

Analyse des tubes

Les tubes ont été analysés par couplage TD-GC-FID/SM. La quantification est effectuée sur le FID et le screening des COV est effectué par spectrométrie de masse.

B. Matériel biologique et protocole d'étude du stress hydrique chez les bryophytes

Les mousses utilisées dans le cadre des différentes expérimentations sont réhydratées, conditionnées avec un système d'hydratation et acclimatées en serre 1 semaine avant le début d'une expérience (photographie 2).

Photographie 2: Conditionnement et acclimatation de Tortula ruralis *en serre (Photo Faburé, 2008)*

NB: La serre d'acclimatation est localisée à proximité d'un parking, aussi un contrôle des teneurs en BTEX dans la serre au cours des périodes d'acclimatation est réalisée. Les concentrations moyennes dans la serre sont inférieures à 0,6 $\mu g.m^{-3}$ (ou 0,18 ppb) pour le benzène, 2,1 $\mu g.m^{-3}$ pour le toluène, 0,5 $\mu g.m^{-3}$ pour l'éthylbenzène, 1,5 $\mu g.m^{-3}$ pour les méta et para-xylènes et 0,5 $\mu g.m^{-3}$ pour l'ortho-xylène.

1) *Ceratodon purpureus (Hedw.) Brid.*

a) Systématique du Ceratodon purpureus (Hedw.)

Règne : *Plantae*

Embranchement : *Bryophyta*

Classe : *Musci*

Sous-classe : *Bryidae*

Ordre : *Dicranales*

Famille : *Ditrichaceae*

Genre : *Ceratodon*

Espèce : *purpureus*

b) Caractéristiques de Ceratodon purpureus (Hedw.)

L'espèce *C. purpureus* est une mousse acrocarpe dont les brins sont dressés, non ramifiés ou dichotomes, de 2 à 3 cm de long, en gazon lâche étendu, rougeâtre à brun verdâtre. Elles possèdent des tiges mesurant de 1 à 4 centimètres des feuilles entières, lancéolées, à extrémités très pointues dans lesquelles pénètre une nervure médiane, et s'enroulant vers le bas à la marge. Elle est ectohydrique, puisant l'eau par capillarité, au niveau de son substrat et de l'atmosphère; il n'existe pas de vaisseaux permettant le transport de l'eau entre les différentes parties de la mousse.

Elles fructifient amplement, avec une soie rouge de 1 à 3 cm de long (*cf*. photographie 3).

La capsule est ovale, allongée (à l'état jeune en forme de lance ou de javelot), penchée, à surface sillonnée. Les dents du péristome sont rouges, amincies sur les bords, ce qui les rend plus pâles et plus claires dans ces parties.

Photographie 3 : Ceratodon purpureus *(Hedw.)* Brid.

(Argaud, 2003)

c) Ecologie et répartition géographique de Ceratodon purpureus (Hedw.)

C. purpureus, très largement répandu et abondant, se développe sur les bois, à même le sol et sur les rochers, dans des endroits très variés ; on le trouve notamment sur des endroits brûlés. On peut trouver *C. purpureus* sur un sol tourbeux ou sableux, sur des bancs rocheux, du sable, dans des carrières de graviers et des bas-côtés, sur des toits, des murs de béton ou encore sur l'écorce d'un arbre comme un épiphyte*. Son ubiquité en fait une espèce très intéressante dans le cadre de la biosurveillance de la qualité de l'air. Par ailleurs, *C. purpureus* est une espèce considérée comme résistante aux pollutions environnementales.

Le substrat sur lequel il se développe est modérément acide voire neutre (pH 4,9 à 7,0) et l'humidité de son habitat varie de modérément humide à modérément sec. *C. purpureus* a tendance à se développer en pleine lumière, exposé au sud et/ou à l'abri du vent.

C. purpureus se trouve dans différentes régions du globe, de la région australe à la région arctique en passant par les régions tropicales. On le trouve dans des zones de climat variable, il est cosmopolite. Préférentiellement il se localise dans des zones urbaines et à hautes altitudes. Sa stratégie de vie est de type colonialiste et son potentiel de vie est de quelques années. (During, 1992)

d) Origine et intérêt de Ceratodon purpureus (Hedw.) *dans le cadre de notre étude*

Dans le cadre de ces travaux de recherche, *C. purpureus* est récolté sur une dalle de béton d'une friche, située à environ 20 km de Lille. Cette espèce est pionnière dans la colonisation végétale de la dalle de béton de ce site.

Au laboratoire de botanique, des cultures en conditions contrôlées et standardisées (en collaboration avec la Société MCK Environnement) de *C. purpureus* sont développées (photographie 4). Cette culture standardisée de *C. purpureus* fait par ailleurs l'objet d'un brevet français, européen et américain dont la Société MCK

Environnement possède l'exclusivité pour la fabrication.

Photographie 4: Barquette de Ceratodon purpureus *réalisée par la société MCK Environnement (Photo, Denayer, 2000)*

L'intérêt de la culture standardisée de cette espèce acrocarpe est qu'elle permet d'assurer une grande homogénéité génétique et physiologique (maturité biologique des individus) et de limiter ainsi la variabilité pouvant exister au sein d'une même espèce. Ce point est un atout pour envisager l'utilisation en routine de cette espèce comme sentinelle de la qualité de l'air dans le cadre de procédures réglementaires, ce qui révèle l'intérêt des études écotoxicologiques réalisées chez cette espèce.

2) Pseudoscleropodium purum (Hedw.) Limpr.

a) Systématique de Pseudoscleropodium purum (Hedw.)

Règne : *Plantae*

Embranchement : *Bryophyta*

Classe : *Musci*

Sous-classe : *Bryidae*

Ordre : *Hypnobryales*

Famille : *Brachytheciaceae*

Genre : *Pseudoscleropodium*

Espèce : *purum*

b) Caractéristiques de Pseudoscleropodium purum (Hedw.)

Pseudoscleropodium purum (P. purum) est une mousse pleurocarpe, possèdant des rameux julacés, arrondis à leur extrémité (photographie 5). Elle mesure de 5 à 15 cm de long. C'est une mousse robuste, d'une couleur vert clair. Elle est plus ou moins pennée, aplatie, couchée ou faiblement redressée.

Elle est ectohydrique, puisant l'eau par capillarité, au niveau de son substrat et de l'atmosphère; il n'existe pas de vaisseaux permettant le transport de l'eau entre les différentes parties de la mousse.

Photographie 5: Pseudoscleropodium purum (Hedw.) Limpr.

(Argaud, 2003)

c) Ecologie et répartition géographique de Pseudoscleropodium purum (Hedw.)

Cette espèce se développe sur un substrat pouvant être très acide ou basique (4,1 < pH < 7) et l'humidité de son habitat varie de modérément humide à modérément sec.

P. purum s'adapte très bien à des zones ombragées et peut se développer également dans des habitats modérément éclairés. De plus, ce sont surtout dans des sites où la température n'est ni froide ni chaude qu'elle rencontre son optimum de développement.

On peut trouver *P. purum* principalement dans des habitats constitués d'herbe ou dans des landes, dans les dunes, les carrières et aussi dans des régions boisées et sur des bas-côtés. *P. purum* est cosmopolite, il se développe dans des zones climatiques variées, notamment continentales où les amplitudes thermiques sont élevées, mais également tropicales dont les parties océaniques sont caractérisées par un potentiel de végétation naturelle constituée de forêts de bouleaux.

d) Origine et intérêt de Pseudoscleropodium purum (Hedw.) *dans le cadre de notre étude*

P. purum, utilisé dans le cadre de nos expériences, est issu de récoltes réalisées en forêt de Desvres, dans le Boulonnais (62). L'intérêt de l'utilisation de cette espèce dans le cadre de travaux sur l'écotoxicité des COV est qu'elle est une des espèces prises en référence dans le programme international cadre (PIC Vegetation - Harmens, 2007 pour revue) développé au niveau européen. Ce projet établit des cartographies des dépôts métalliques chez des mousses présentes dans les différents pays européens engagés dans le projet. Cette espèce a montré de bonnes capacités à résister à des pollutions atmosphériques en éléments traces métalliques. Elle est utilisée à l'échelle nationale dans le cadre du programme européen précité (Galsomiès *et al*, 1999, 2003; Gombert, 2005).

Par ailleurs, les différences morphologiques avec *C. purpureus* peuvent en faire une espèce complémentaire

dans le comportement vis-à-vis des COV et leur accumulation.

3) Tortula ruralis (Hedw.) Gärtn. (= Syntrichia ruralis (Hedw.) F. Weber & D. Mohr)

L'espèce a fait l'objet de révisions taxinomiques récentes. La dénomination actuelle est *Syntrichia ruralis*. Mais c'est surtout sous le nom de *Tortula ruralis* que cette espèce est connue dans les publications d'écotoxicologie. C'est pourquoi, nous conserverons cette dénomination tout au long de ce manuscrit.

a) Systématique de Tortula ruralis (Hedw.)

Règne : *Plantae*

Embranchement : *Bryophyta*

Classe : *Musci*

Sous-classe : *Bryidae*

Ordre : *Pottiales*

Famille : *Pottiaceae*

Genre : *Tortula*

Espèce : *ruralis*

b) Caractéristiques de Tortula ruralis (Hedw.)

Mousse acrocarpe pouvant mesurée jusqu'à 8 cm de haut, *T. ruralis* se présente en coussinets lâches, souvent étendus, de couleur vert clair émeraude à roux (photographie 6). A l'état humide, les feuilles sont régulièrement déjetées et recourbées en arrière; à l'état sec, elles sont adossées et enroulées en touffes. Les feuilles, au bord enroulé, se terminent par une pointe hyaline, dentée.

Photographie 6: Tortula ruralis (Hedw.) Gärnt. (Argaud, 2003)

c) Ecologie et répartition géographique de Tortula ruralis (Hedw.)

Cette espèce est largement répandue, depuis la plaine jusqu'en haute montagne (Jahns, 1989). Native du Nord et de l'Ouest de l'Amérique du Nord, on la retrouve souvent en milieu calcaire, mais occasionnellement, elle peut se trouver dans d'autres milieux. Sa distribution géographique est vaste : Europe, Islande, Asie, nord de l'Afrique, Afrique du Sud, Amérique du Nord, Patagonie, Australie et Océanie.

d) Origine et intérêt de Tortula ruralis (Hedw.) *dans le cadre de notre étude*

Dans le cadre de ces travaux de recherche, *T. ruralis* est récolté sur une dalle de béton d'une friche, située à environ 20 km de Lille. Cette espèce est une des espèces pionnières dans la colonisation de la dalle de béton de ce site par les végétaux. Son apparition a suivi celle de *C. purpureus*.

Les données de la littérature indique que cette mousse est particulièrement résistante à la dessiccation (Bewley, 1979 ; Oliver & Bewley, 1997 ; Oliver *et al,* 2005). C'est pourquoi; elle est l'espèce bryophytique la plus étudiée sur les plans physiologique, métabolique. Cette résistance doit engendrer un grand nombre de réactions de compensation au niveau des cellules c'est pourquoi cette espèce est intéressante.

De plus, *T. ruralis* se présente sous la forme de brins assez longs et forme des tapis denses, il est donc assez facilement manipulable. Le fait qu'il pousse de manière dense lui permet de se déshydrater moins rapidement.

4) Étude de l'impact du stress hydrique chez *Tortula ruralis* par l'expression des biomarqueurs du stress oxydant

Différents travaux ont étudié l'impact du stress hydrique chez *T. ruralis*. Ces travaux ont mis en évidence des effets aux niveaux membranaire et cytosolique se manifestant notamment par la sur-expression de biomarqueurs du stress oxydant. Ceci est particulièrement à connaître lorsque l'on étudie les effets du stress oxydant de différents contaminants sur ce type de matériel biologique (et ce, quelle que soit l'espèce choisie). Si on veut déterminer avec précision l'impact imputable aux contaminants, il est essentiel de pondérer par les effets induits par le stress hydrique.

Pour cette étude sur le stress hydrique, les protocoles de deshydratation et de réhydratation ont nécessité des mises au point. En effet, nous avons cherché à déterminer l'impact de la déshydratation et de la réhydratation sur l'expression des biomarqueurs de stress oxydant. par ailleurs, les travaux de Dhindsa (1987a) nous ont incités à étudier également l'influence des vitesses de déshydratation et de réhydratation sur l'expression de ces biomarqueurs.

Les phénomènes de déshydratation et réhydratation s'observent très souvent chez les mousses dans leur milieu naturel et peuvent donc survenir lors d'études *in situ*. En effet, sur le terrain, les conditions de sécheresse, la force des vents, les régimes de pluie, la nature de l'apport hydrique vont agir sur la vitesse de déshydratation ou de réhydratation. Il est donc important de pouvoir reproduire ces différentes vitesses en conditions contrôlées.

Afin de connaître l'influence exclusivement des vitesses et non du degré d'hydratation sur l'expression des biomarqueurs, il a été primordial de mettre au point des protocoles de déshydratation et réhydratation qui

permettaient d'obtenir des états d'hydratation identiques quelle que soit la vitesse des phénomènes.

a) Conditions d'exposition

Les conditions d'expérimentations sont fonction des objectifs recherchés. Ainsi, pour définir les effets oxydatifs de la déshydratation et de la réhydratation, notamment en fonction des vitesses d'occurrence, quatre combinaisons sont réalisées :

- expérience A : une déshydratation (DH) rapide (r) suivie d'une réhydratation (RH) rapide,
- expérience B : une déshydratation rapide suivie d'une réhydratation lente (l),
- expérience C : une déshydratation lente suivie d'une réhydratation lente,
- expérience D : une déshydratation lente suivie d'une réhydratation rapide.

b) Durée d'exposition

Les durées de déshydratation ont été déterminées lors d'essais qui ont défini les temps permettant d'obtenir des taux d'hydratation identiques mais à 2 vitesses différentes.

L'étape de déshydratation rapide est réalisée en 2 heures, la lente est réalisée en 14 heures. Dans la littérature, la déshydratation est considérée comme lente si elle dépasse 8 heures (Dhindsa, 1987a).

Concernant la réhydratation, il n'est pas fait état dans la littérature de réhydratation lente. En effet, les études visent avant tout à déterminer les effets de la déshdratation, et non ceux de la réhydratation. Pour une procédure rapide, on estime la réhydratation obtenue après 20 minutes, tandis que pour la procédure lente, une réhydratation en 8 heures a été appliquée.

DHr : 2 heures

DHl : 14 heures

RHr : 20 minutes

RHl : 8 heures

c) Matériel d'exposition

La reproduction de vitesses rapide et lente de déshydratation et de réhydratation imposent d'adapter les protocoles expérimentaux.

i- <u>Déshydratation rapide</u>

300 g de granulés de sulfate de calcium sont disposés au fond d'un petit cristallisoir (figure 24). Ils assurent la dessiccation du milieu. Au dessus des granulés, on dispose un papier filtre sur lequel sont disposés les brins de mousses. Le papier évite les interactions entre les granulés et les mousses. Le cristallisoir est ensuite recouvert avec du parafilm afin d'isoler le système de l'humidité ambiante.

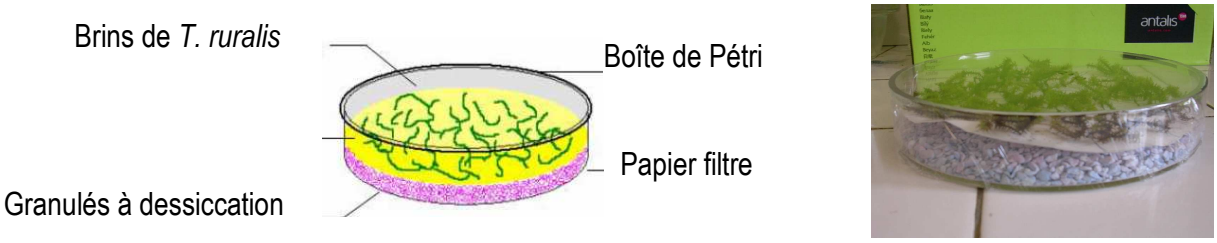


Figure 24: Dispositif de déshydratation rapide des mousses (Photo Faburé, 2007)

ii- Déshydratation lente

Dans un pot de 180 mL, contenant 30 g de granulés de sulfate de calcium, les brins de mousses sont déposés sur une compresse disposée à l'extrémité supérieure du pot, comme présenté sdans la figure 25.

Un pot correspond à un réplicat, on en dispose donc de 10.

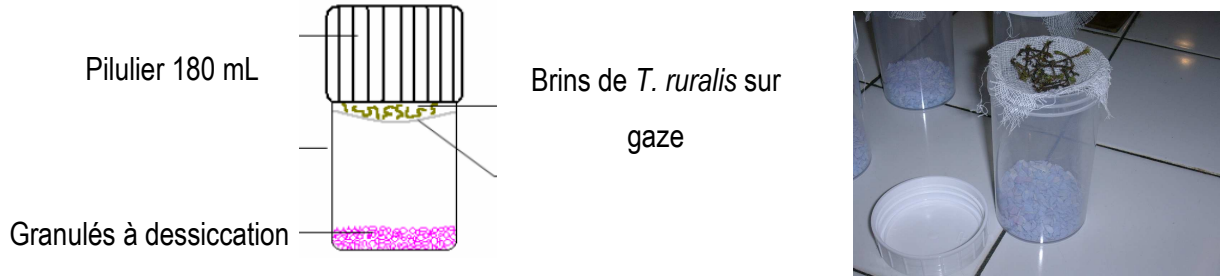


Figure 25: Dispositif de déshydratation lente des mousses (Photo Faburé, 2007)

iii- Réhydratation rapide

Les brins de mousses sont immergés dans une boîte de Pétri (diamètre 5 cm) remplie d'eau distillée (figure 26).

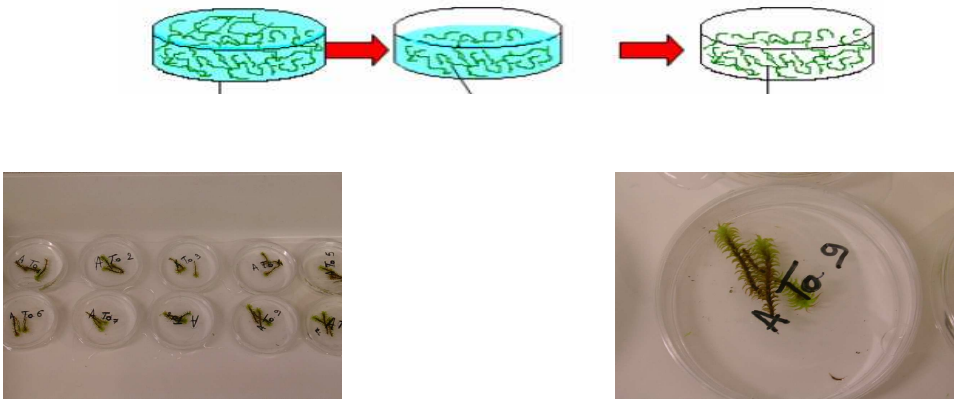


Figure 26: Dispositif de réhydratation rapide des mousses (photo Faburé, 2007)

iv- Réhydratation lente

Une compresse est disposée sur une boïte de Pétri (diamètre 5 cm). Les brins de mousses sont déposés sur la compresse (figure 27). Les boîtes de Pétri sont placées sur un humidificateur d'air muni d'un film plastique permettant de constituer une poche humide alimentée par la brumisation de l'humidificateur. Ce système permet aux mousses d'absorber de l'eau en petite quantité, permettant une réhydratation lente.

Figure 27 : Dispositif de réhydratation lente des mousses (photo Faburé, 2007)

d) Échantillonnage

Les mousses sont conditionnées en barquette pendant 1 semaine en serre, puis les brins de mousses sont disposés sur les différents supports servant aux étapes de déshydratation et de réhydratation.

Les échantillonnages sont réalisés avant la déshydratation (T0), après la déshydratation (DH) et après la réhydratation (RH). 10 réplications sont effectuées à chaque étape du prélèvement. Ainsi, en fonction des étapes de l'expérimentation, les supports sont virtuellement découpés en 10 parties.

A chaque échantillonnage, des prélèvements sont réalisés pour :

- la mesure du taux d'hydratation RWC (environ 30 mg)
- le dosage des activités enzymatiques APOX et GPOX (environ 200 mg)
- le dosage de MDA (environ 200 mg)
- le dosage en pigments chlorophylliens (au moins 50 mg)

Le taux d'hydratation est mesuré dans la continuité de l'expérimentation, tandis que les échantillons permettant le dosage des biomarqueurs sont congelés dans l'azote liquide et conservés à -20°C jusqu'à analyse.

5) Efficacité du système d'hydratation adapté au matériel d'exposition des mousses

Puisqu'il est nécessaire de prendre en compte la part du stress oxydant induit par le stress hydrique, il convient de tester les performances du système d'hydratation. Il apparaît primordial de définir un système permettant de pallier les conditions climatiques parfois défavorables sur le littoral capables de générer un stress hydrique (vents, ensoleillement).

Pour ce faire, nous procédons à l'étude de l'efficacité d'un système d'irrigation chez les 3 espèces bryophytiques.

Nous observons le taux d'hydratation chez ces mousses disposées en atmosphère plus ou moins favorable à la déshydratation.

Ces expériences sont menées en deux temps : tout d'abord elles sont réalisées en laboratoire, puis elles sont vérifiées *in situ*, lors d'expositions sur le littoral dunkerquois.

a) Matériel biologique

C. purpureus, P. purum et *T. ruralis* sont retenues pour ces expérimentations.

Les 3 espèces sont acclimatées en chambre de culture pendant 2 semaines.

b) Conditions de l'expérimentation

i- Étude en conditions contrôlées

Matériel d'exposition

Les mousses sont transplantées dans des barquettes en plastique alimentaire, munies ou non du système d'hydratation présenté dans la figure 28. Ce système est constitué d'une réserve d'eau, de mèches en viscose assurant l'apport en eau par capillarité jusqu'à une couche de géotextile placée sous les mousses, au fond de la barquette. Précisons que les brins de *C. purpureus* et *T. ruralis* sont disposés en tapis dans la barquette.

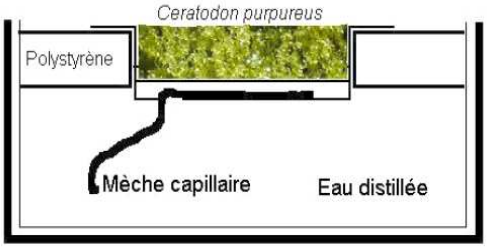


Figure 28: Schéma du système d'hydratation de mousse conditionnée en barquette (Denayer, 2000)

Durées et conditions hygrométriques d'exposition

Afin d'évaluer l'efficacité du système d'hydratation, les barquettes de mousses sont exposées à 2 types d'ambiance :

- en chambre de culture, où l'hygrométrie est de l'ordre de 99%
- en laboratoire, où l'hygrométrie varie entre 10 et 15%

Les expositions durent 96 heures.

Echantillonnage

Pour chaque espèce, 4 barquettes sont préparées : pour chacune des deux conditions hygrométriques d'exposition, une barquette est munie du système d'hydratation et l'autre pas.

Au cours des 96 heures d'exposition, des prélèvements sont réalisés au début de l'expérience (T0), puis toutes les 24 heures. Ces prélèvements permettent la mesure du taux d'hydratation et correspondent chacun à environ 30 mg.

À chaque prélèvement et pour chaque barquette, 5 réplications sont réalisées. Pour cela, un plan d'échantillonnage aléatoire est défini.

NB : l'homogénéité du taux d'hydratation des mousses sur l'ensemble d'une barquette a été vérifiée au préalable (résultats non montrés). Cette expérimentation a mis en évidence une variabilité non négligeable de l'hydratation des mousses au sein d'une même barquette Cette disparité n'est pas liée à la zone de prélèvement sur la barquette mais à une variabilité intrinsèque de la mousse. De ce fait, il est nécessaire de réaliser un grand nombre de réplications.

ii- Étude *in situ*

Matériel d'exposition

Les mousses sont conditionnées en barquette munie du système d'hydratation.

5 barquettes de chaque espèce sont exposées sur le site A (*cf.* Figure 29 et photographie 7), disposées sous un abri, appelé biostation.

Cette biostation présente les caractéristiques suivantes :

- un plateau pour poser les mousses, situé à environ 1 mètre du sol afin d'éviter une exposition aux réenvols de poussières ;
- un toit transparent abritant les mousses des précipitations tout en laissant passer la lumière.

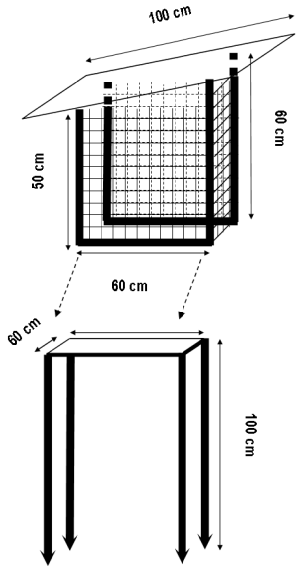


Figure 29: Biostation - dispositif d'exposition des mousses in situ

Photographie 7: Biostation installée sur le site du collège Robespierre de Saint-Pol-sur-mer (Photo Faburé, 2007)

Durées et conditions hygrométriques d'exposition

L'expérimentation *in situ* dure 8 semaines et se déroule sur 2 sites au cours des mois de juin et juillet 2007.

Les conditions d'exposition sont celles décrites au paragraphe III. A. 3) a) ii.

Echantillonnage

Pour chaque espèce, 5 réplicats sont échantillonés à chaque temps d'échantillonnage. Ce dernier est réalisé avant l'exposition (TR), au début de l'exposition (T0), après 1 semaine (T1), 2 semaines (T2), 4 semaines (T4) et 8 semaines (T8).

Ces prélèvements permettent la mesure du taux d'hydratation et correspondent chacun à environ 30 mg.

NB: Pour correspondre à ces 6 échantillonnages, les barquettes de mousses sont découpées en 6 zones d'échantillonnage; dans chaque zone de prélèvement des barquettes, on ne récoltera que le centre de la zone afin d'éviter que les zones limitrophes subissent un biais lié à l'absence de mousses de l'échantillonnage précédent.

c) Conclusions et validation du système d'hydratation des mousses

Lors des expérimentations en condition contrôlées, le système d'hydratation s'est révélé capable de maintenir le taux d'hydratation de *C. purpureus* et *T. ruralis*, que celles-ci se trouvent en milieu humide (chambre de culture) ou sec (laboratoire) (*cf*. figure 30). Par contre, il ne présente pas la même efficacité pour *P. purum*. En effet, si le taux d'hydratation de *P. purum* se maintient en milieu humide, il diminue nettement en milieu sec, et ce, malgré le dispositif d'hydratation.

L'expérience de validation *in situ* de ces performances montre un bon maintien de l'hydratation chez *C. purpureus* et *T. ruralis* pendant 4 semaines. Au cours des 4 dernières semaines, le taux d'hydratation diminue significativement. Toutefois, notons que les 4 dernières semaines correspondent à une période au cours de laquelle la température dépasse plusieurs fois les 20°C. Chez *P. purum*, le taux d'hydratation s'effondre dès la 1ère semaine d'exposition sur le site.

En conclusion, le système d'hydratation ne permet pas de maintenir l'état d'hydratation de *P. purum.* Par contre il est performant pour *C. purpureus* et *T. ruralis*. La relative petite taille de ces mousses et leur disposition en tapis dense favorisent probablement la rétention de l'eau. Ce dispositif assure donc un maintien de l'hydratation et permet l'utilisation *in situ* des 2 mousses acrocarpes testées.

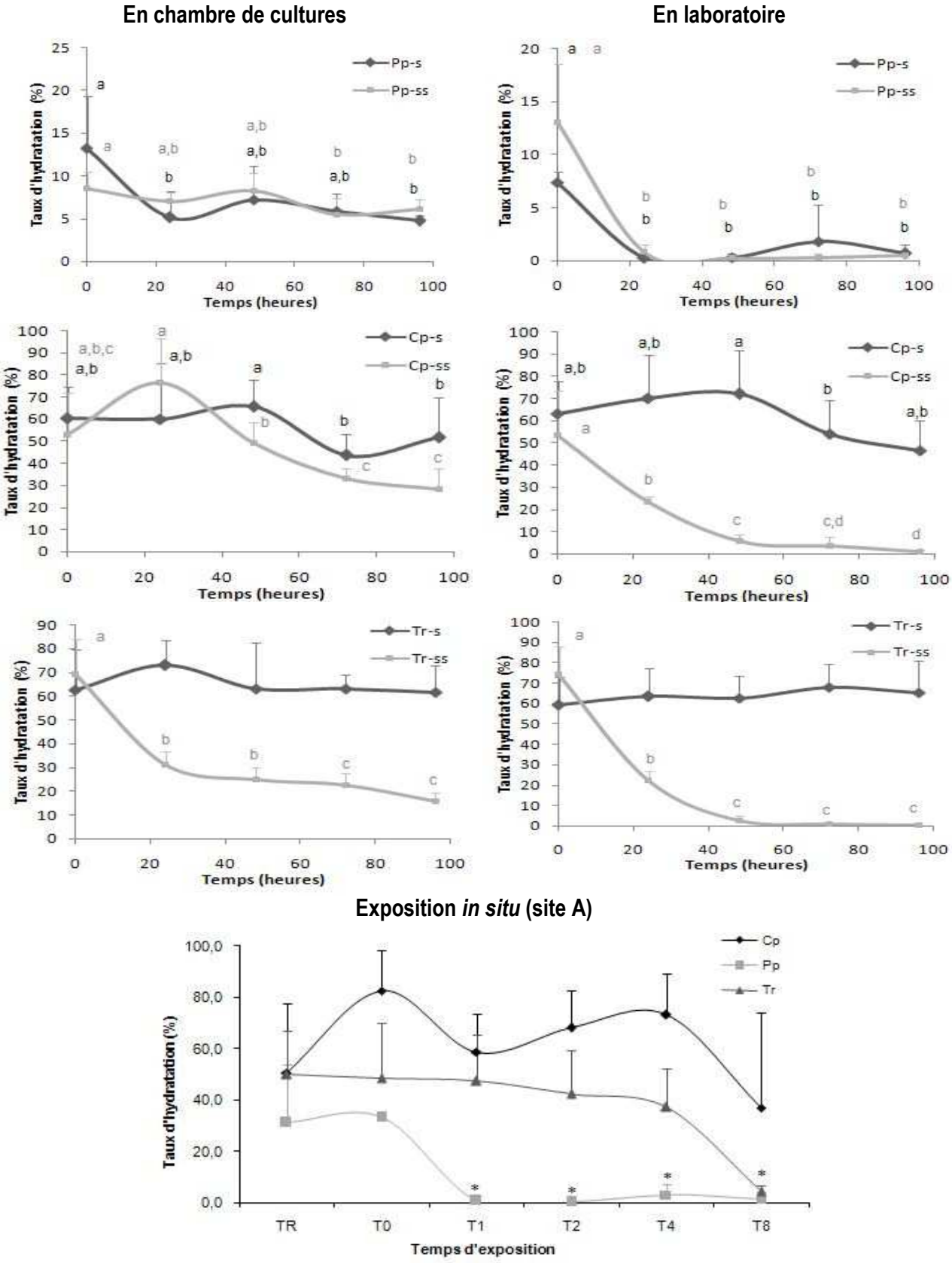


Figure 30: Variations des taux d'hydratation chez Ceratodon purpureus *(Cp),* Pseudoscleropodium purum *(Pp) et* Tortula ruralis *(Tr) au cours des expérimentations en laboratoire et* in situ *(s/ss : avec/sans système d'hydratation; TR : avant exposition; T0 : début de l'exposition; T1 ; après 1 semaine; T2 : 2 semaines; T4 : 4 semaines; T8: 8 semaines) (Test t de Student pour échantillons appariés;*

*n=5 ; * ou des lettres différentes signalent des différences significatives p<0,05))*

6) Étude de l'influence de l'âge de *Tortula ruralis* sur l'expression des biomarqueurs du stress oxydant

Le vieillissement des végétaux constitue un facteur biotique générateur de stress oxydant (Sohal *et al*, 1995; Goel *et al*, 2003; Parent *et al*, 2008). Aucune référence bibliographique chez les mousses n'aborde ce sujet. C'est pourquoi, il nous est apparu essentiel d'étudier l'impact oxydatif lié au vieillissement de la mousse. Ceci est fait dans le but d'éliminer les biais susceptibles d'interférer sur l'expression des biomarqueurs de stress oxydant. La sénescence chez un organisme végétal peut engendrer la modification et la détérioration de certains de ses constituants comme les lipides membranaires, les protéines ou encore les pigments chlorophylliens. Ainsi, en fonction de « l'âge » d'un organisme, les proportions de chacun de ses composés peuvent varier. En vue d'étudier les impacts de divers stress sur des paramètres biologiques d'un organisme bryophytique, il est nécessaire de déterminer des valeurs de base pour ces paramètres, et d'évaluer l'importance de l'âge de l'organisme sur leur expression. En effet, cette expérimentation permettra de mieux comprendre l'évolution physiologique de la mousse en fonction de l'âge.

a) Sélection du matériel biologique - conditionnement

L'espèce de choix pour cette étude est *T. ruralis*. La récolte est réalisée de manière à obtenir 2 lots de mousses de la même espèce, issus de la même zone du site de récolte, assurant ainsi une homogénéité d'exposition aux conditions environnementales du lieu de récolte. Les 2 groupes sont établis en fonction du stade de développement, de sorte qu'il existe un groupe de mousses « jeunes » et un groupe de mousses « anciennes ».

Les mousses récoltées sont conditionnées dans des barquettes et acclimatées au laboratoire pendant une semaine.

b) Echantillonnage - conservation

Pour définir et quantifier l'âge des mousses, un échantillonnage de brins de mousses dans chacun des 2 groupes est réalisé et la longueur de chaque brin échantillonné est mesurée. Nous décidons de ne pas retenir la biomasse fraîche comme paramètre d'estimation de l'âge de la mousse du fait de l'importante incidence de la teneur en eau sur cette biomasse. *T.ruralis* est une espèce pouvant mesurer jusqu'à 8 centimètres, la longueur des brins est donc un paramètre aisément mesurable.

i- Échantillonnage :

L'échantillonnage des mousses est réalisé sur le matériel frais.

Les paramètres mesurés sont :

- la longueur : 1 brin par échantillon
- la teneur relative en eau (RWC) : environ 30 mg par échantillon
- l'activité enzymatique des peroxydases (APOX et GPOX) : 200 mg par échantillon
- la lipoperoxydation des lipides (MDA) : 200 mg par échantillon
- les concentrations en chlorophylle (CHL) : au moins 50 mg par échantillon

Pour chaque paramètre mesuré, l'échantillonnage est réalisé parallèlement dans les 2 groupes de mousses, et 9 réplications sont réalisées pour chacun de ces paramètres. Les barquettes sont ainsi virtuellement découpées en 9 compartiments, définissant 9 zones de prélèvement.

ii- Conservation :

Après échantillonnage, les mesures de la longueur et de la teneur en eau sont réalisées immédiatement. Les autres échantillons sont congelés dans l'azote liquide et conservés au congélateur -20°C jusqu'à analyse.

C. Étude de l'accumulation et de la toxicité des BTEX chez les mousses

1) Étude *in situ* de l'accumulation de BTEX chez des mousses

L'affinité des BTEX pour les mousses n'est pas connue. Cette affinité peut potentiellement varier en fonction des espèces, notamment du fait des différences morphologiques pouvant exister entre les espèces bryophytiques. L'objectif de cette expérimentation est de déterminer si une des mousses, parmi les espèces pré-sélectionnées, est plus adaptée à l'étude de l'accumulation et de la toxicité des BTEX.

Les 3 mousses sont exposées dans 2 milieux contaminés de nature différente : un site soumis aux rejets industriels, un autre de type industrialo-urbain, localisé en agglomération, sous influence d'activités industrielles et liées au trafic.

a) Matériel d'exposition

Pour chaque site d'exposition, on dispose 5 éléments mousse-système d'hydratation, et ce pour chacune des 3 espèces. Ces 5 éléments constituent 5 réplications de l'exposition.

Les barquettes sont disposées aléatoirement sur les biostations (décrites auparavant) et leur emplacement est randomisé tout au long de l'exposition.

b) Conditions d'exposition

L'expérimentation *in* situ dure 8 semaines et se déroule sur 2 sites au cours des mois de juin et juillet 2007. Les conditions d'exposition sont celles décrites au paragraphe (*cf*. paragraphe III.A 2 et 3).

c) Protocole d'échantillonnage

i- L'échantillonnage

L'échantillonnage est réalisé comme suit :

- en laboratoire, avant le début de l'exposition sur le terrain (temps référence TR)
- sur le terrain, juste au début de l'exposition (T0)
- après 1 semaine d'exposition (T1)
- après 2 semaines d'exposition (T2)
- après 4 semaines d'exposition (T4)
- à la fin de l'exposition (après 8 semaines) (T8)

ii- Prélèvement des mousses

Les prélèvements de mousses sont réalisés *in situ* pour mesurer les teneurs en BTEX, les taux d'hydratation des mousses et la concentration en chlorophylle a ainsi que l'indice de phéophytinisation. Ces marqueurs biologiques sont étudiés afin d'estimer l'état sanitaire des organismes exposés.

Lors des prélèvements, les pesées sont effectuées au moyen d'une balance portable (précision 10^{-3} g, OHAUS) et le matériel récolté est réparti pour les différents dosages :

- environ 30 mg : mesure du taux d'hydratation des mousses ;
- le tiers à la moitié d'un vial de 20 mL : dosage des BTEX dans la mousse
  (Le vial est serti dès l'échantillonnage, transporté en glacière puis conservé au congélateur) ;
- environ 50 mg : dosage en chlorophylle a (conditionnés en tube à hémolyse en verre entouré d'aluminium, transportés en glacière et conservés au congélateur –80°C).

d) Protocole de dosage des BTEX dans les mousses

Le dosage des BTEX accumulés par les 3 espèces bryophytiques est réalisé au Centre Commun de Mesures de l'Université du Littoral Côte d'Opale (ULCO). L'analyse s'effectue par la technique d'Headspace statique reliée à un chromatographe en phase gazeuse (CPG) couplé à un détecteur de spectrométrie de masse (SM). Le vial serti contenant les mousses est placé dans un four à 80°C pendant 30 min. Un équilibre se crée entre la phase solide et la phase gazeuse (espace de tête). La phase gazeuse est alors injectée en CPG/MS. Cet appareillage permet de détecter les produits volatils de la matrice végétale et ceux susceptibles d'avoir été

piégés par les mousses. La limite de détection est de 10 ng par vial.

Les conditions chromatographiques sont les suivantes :

- Appareillage :

Chromatographie phase gazeuse (Varian - Saturn 4 D)

détecteur de masse (Varian)

- Conditions de désorption :

Chauffage à 80°C pendant 30 minutes

- Paramètres chromatographiques :

Colonne capillaire : DB-6MS (longueur 30m, diamètre 0,32mm, épaisseur de film 1 µm)

Analyse à pression constante de 8 psi (gaz vecteur : Helium)

Température de la ligne de transfert GC-MS : 200°C

- Paramètres du détecteur du détecteur à spectrophotométrie de masse :

Température du détecteur E.I. 70Ev : 170°C.

Gamme de masse : 40-300 uma

2) Protocole d'étude en conditions contrôlées de l'accumulation et de la toxicité des BTEX chez *Tortula ruralis*

Les expériences menées visent à déterminer, d'une part, l'évolution des réponses de la mousse en fonction de la durée pendant laquelle elle est exposée au benzène, et d'autre part, la variation des réponses en fonction de la concetration de benzène à laquelle la mousse est exposée.

Pour ces expériences, l'espèce bryophytique choisie est *T.ruralis*. (*cf*. résultats de la 1ère expérimentation *in situ*)

La première expérience tend ainsi à définir la cinétique de réaction des paramètres biologiques chez *T. ruralis* exposée au benzène, tandis que la seconde constitue une première approche des relations dose/réponse entre les concentrations d'exposition au benzène et les réponses (accumulation ou effets) observées chez *T. ruralis.*

- Objectifs de l'étude de l'accumulation :

La première expérimentation *in situ* avait pour objectif de mettre en évidence la présence de BTEX chez les mousses, et d'observer le comportement d'accumulation des BTEX tout au long de l'expérience. Pour mieux comprendre les observations réalisées *in situ*, ces expériences en laboratoire permettent de compléter la connaissance du phénomène d'accumulation. L'étude de l'accumulation vise à observer le comportement accumulatif du benzène chez *T. ruralis* en fonction de la durée de l'exposition et en fonction de la concentration de l'exposition. Il n'existe pas d'antécédents scientifiques relatant des phénomènes

d'accumulation de COV chez les mousses, aussi l'un des premiers objectifs est de chercher à établir s'il existe un lien entre les teneurs en benzène dans l'air et celles dans la mousse. Pour s'assurer d'une réponse de l'organisme à l'exposition, on réalise, dans un premier temps, des expositions à de fortes concentrations. Dans un second temps, l'organisme est exposé à des concentrations plus réalistes, plus proches de celles observées *in situ*, afin d'apporter une réponse exploitable dans le cadre d'études écotoxicologiques applicables *in situ*.

- Objectifs de l'étude de la toxicité :

Les COV comme le benzène sont susceptibles d'entraîner des dommages chez les végétaux. Si ces dommages sont avérés, il pourrait être intéressant de les utiliser comme indicateurs de pollution. L'interaction des contaminants avec les constituants cellulaires est susceptible de provoquer l'apparition de dommages et la formation d'ERO ; d'autre part, leur possible métabolisation par l'organisme peut également engendrer la formation d'ERO. Ainsi, l'étude de la toxicité du benzène menée chez *T. ruralis* est réalisée via la recherche de variations de l'expression de biomarqueurs du stress oxydant et d'indicateurs de l'état sanitaire global de l'organisme. Les biomarqueurs biochimiques recherchés dans le cadre des expériences présentées ci-après permettent de mettre en évidence : une production d'ERO (par la variation des activités enzymatiques APOX et GPOX), des dommages membraines (MDA) et une dégradation des pigments chlorophylliens, éléments fonctionnels, notamment essentiels à la croissance végétale.
Pour étudier un possible effet néfaste du benzène, la mousse est délibérément exposée à de très fortes concentrations.

Les études de l'accumulation et de la toxicité du benzène chez *T. ruralis* sont réalisées au travers d'expérimentations communes qui permettent la réalisation d'une interprétation croisée des 2 résultats. Il est ainsi possible de comprendre les effets oxydatifs mesurés en fonction des concentrations d'exposition en benzène mais aussi en fonction des teneurs effectivement mesurées dans la mousse.

a) Protocole d'étude de l'accumulation et de la toxicité de fortes concentrations de benzène chez Tortula ruralis

i- <u>Matériel d'exposition</u>

Les mousses sont disposées dans des enceintes en verre de 20 litres, hermétiquement fermées (photographie 8).
Les enceintes sont placées à température ambiante.

Photographie 8: Enceinte d'exposition des mousses en conditions contrôlées – volume 20 litres (Photo Faburé, 2008)

ii- Protocole d'exposition au benzène en conditions contrôlées de *Tortula ruralis* : effets des concentrations de benzène

Cette expérience est réalisée 3 fois dans le but d'observer la variabilité des réponses biologiques imputables à l'expérimentation elle-même et non aux paramètres testés (à savoir les concentrations d'exposition).

Nature et concentrations du polluant

Les mousses sont exposées à de fortes concentrations en benzène. Ce dernier est déposé sous forme liquide dans un verre de montre placé dans l'enceinte d'exposition.

Les concentrations d'exposition sont 20, 200 et 2000 ppm de benzène. À ces 3 concentrations s'ajoute une exposition sans benzène qui constitue le témoin de l'exposition. Les 4 expositions sont réalisées simultanément. Le tableau 10 présente les équivalences des volumes de benzène déposés dans l'enceinte, en quantités de benzène et en concentrations par rapport au volume de l'enceinte (en ppm et en mg/m^{-3}).

Volume injecté dans l'enceinte de 20 litres	Quantités (mg) de benzène équivalentes dans 20 litres	Concentrations en benzène (ppm) (quantité/volume)	Concentrations en benzène (mg/m^{-3})
1,48 µL	1,3	20	65
14,8 µL	13	200	650
148 µL	130	2000	6500

Tableau 10: Equivalences des fortes concentrations d'exposition de benzène

Durée d'exposition

Les mousses sont exposées aux différentes concentrations pendant 24 heures.

Échantillonnage

La barquette contenant la mousse est virtuellement découpée en 4 parties délimitant ainsi 4 réplications pour les prélèvements.

Pour chacune des concentrations d'exposition, un échantillonnage est réalisé avant l'exposition (Ti) et juste après (Tf), permettant ainsi d'observer l'évolution des différents paramètres suite à l'exposition, tout en tenant compte de la variabilité intra-espèce pouvant exister entre les différentes barquettes.

iii- Protocole d'exposition au benzène en conditions contrôlées de *Tortula ruralis* : effets de la durée d'exposition

Nature et concentration du polluant

Dans une enceinte en verre de 20 litres, hermétiquement fermée, les mousses sont exposées à une forte concentration en benzène. Ce dernier est déposé sous forme liquide dans un verre de montre placé dans l'enceinte d'exposition.

Dans le cadre de cette expérience, la concentration d'exposition en benzène est de 200 ppm (ou 650 mg/m^3).

Durées d'exposition

Les mousses sont exposées pendant 75, 150, 300, 600, 1200 et 6000 minutes.

Par ailleurs, une barquette a été exposée en enceinte pendant 75 minutes, sans présence de benzène. Cette exposition constitue un témoin de l'effet du dispositif d'exposition sur la mousse. Effectivement, l'enceinte en verre crée un phénomène d'effet de serre dans lequel l'hygrométrie est très élevée.

Une barquette de mousse correspond à chaque durée d'exposition, c'est-à-dire que 7 expositions sont réalisées.

Échantillonnage

La barquette contenant la mousse est virtuellement découpée en 5 parties délimitant ainsi 5 réplications pour les prélèvements.

Un échantillonnage est réalisé avant l'exposition (Ti) et juste après (Tf), permettant ainsi d'observer l'évolution des différents paramètres suite à la durée de l'exposition, tout en tenant compte de la variabilité intra-espèce pouvant exister entre les différentes barquettes.

iv- Dosage du benzène et paramètres biologiques

D'une part, les teneurs en benzène chez les mousses permettent d'étudier l'accumulation du benzène en fonction des durées ou des concentrations d'exposition et établir une éventuelle corrélation. D'autre part, les mesures des biomarqueurs d'effet déterminent l'impact oxydatif des différentes expositions au benzène, la

dégradation des membranes et de la chlorophylle. Nous rechercherons s'il existe une relation entre les durées et/ou les concentrations d'exposition au benzène et les variations des biomarqueurs.

Les prélèvements de mousses réalisés lors des différentes expositions sont répartis comme suit :

- entre 300 et 500 mg dans un vial serti pour le dosage du benzène dans les mousses ;
- environ 30 mg pour la mesure du taux d'hydratation ;
- environ 200 mg pour le dosage des activités enzymatiques et des protéines totales ;
- environ 200 mg pour le dosage du MDA ;
- au moins 50 mg pour le dosage en chlorophylles.

La mesure du taux d'hydratation est réalisée dans la continuité de l'exposition, tandis que les autres échantillons sont congelés dans l'azote liquide puis conservés au congélateur à -20°C.

Mesure de l'état d'hydratation chez *Tortula ruralis*

Le suivi du taux d'hydratation est réalisé suivant le protocole présenté précédemment. Il permet le calcul du ratio entre la biomasse fraîche et la biomasse sèche. Grâce à ce ratio, il est possible de calculer la biomasse sèche des échantillons utilisés pour les mesures en benzène et les biomarqueurs. On peut ainsi exprimer les résultats pour les différents paramètres du stress oxydant en fonction de la biomasse sèche de mousse prélevée.

Protocole de mesure des concentrations en benzène chez *Tortula ruralis*

Le dosage des BTEX accumulés chez *T. ruralis* est réalisé au laboratoire de la société Micropolluants. L'analyse s'effectue par la technique d'Headspace statique reliée à un chromatographe en phase gazeuse (CPG) couplé à un détecteur de spectrométrie de masse (MS). Le vial serti contenant les mousses est placé dans un four à 90°C pendant 30 min. Un équilibre se crée entre la phase solide et la phase gazeuse (espace de tête). La phase gazeuse est alors injectée en CPG/MS. Cet appareillage permet de détecter les produits volatils de la matrice végétale et ceux susceptibles d'avoir été piégés par les mousses. La limite de détection est de 10 ng par vial.

Les conditions chromatographiques sont les suivantes :

- Appareillage :

Chromatographie phase gazeuse (GC Agilent 6890)

Détecteur de masse (MSD Agilent 5973)

Passeur Headspace HP 7694

- Conditions de désorption :

Chauffage à 90°C pendant 30 minutes

Ligne de transfert passeur GC à 120°C

Température de la boucle du passeur 110°C

- Paramètres chromatographiques :

Colonne capillaire : DB-1MS (longueur 30m, diamètre 0,25mm, épaisseur de film 0,25 µm)

Analyse à pression constante de 10 psi

Ratio de spit à 40

Programmation du four : température initiale à 30°C maintenue pendant 5 minutes

Premier gradient de température : montée à 5°C/min jusqu'à 90°C

Deuxième gradient de température : montée à 15°C/min jusqu'à 180°C.

Température de l'injecteur : 250°C

Température de la ligne de transfert GC-MS : 250°C

- Paramètres du détecteur du détecteur à spectrophotométrie de masse :

Température de la source d'ions : 230°C

Température du quadripole : 150°C.

Gamme de masse : 38-350 uma.

Dosages des biomarqueurs de stress oxydant et de dégradation de la chlorophylle

Les mesures des activités enzymatiques APOX et GPOX, le dosage des protéines totales, le dosage en MDA et le dosage en chlorophylles, sont réalisés suivant les protocoles décrits dans la partie III.D.

b) Protocole d'étude de l'accumulation chez Tortula ruralis exposée à des concentrations réalistes en BTEX (coll. H.Plaisance, Ecole des Mines de Douai)

L'objectif de cette expérience est d'observer le comportement accumulatif de *T. ruralis* lors d'exposition à des concentrations réalistes de BTEX, concentrations proches de celles mesurées lors de l'expérience *in situ*, sur le littoral dunkerquois. Cette expérience vise à mieux appréhender les phénomènes observés lors des expérimentations de terrain et à améliorer la compréhension des mécanismes d'accumulation des BTEX chez *T. ruralis*.

i- Conditions d'exposition

Matériel d'exposition

Les mousses conditionnées en barquette (mais sans système d'hydratation) sont disposées dans une enceinte en verre de 36 litres, hermétiquement fermée, comme présenté sur le schéma ci-après. Cette enceinte est elle-même disposée dans une enceinte thermo-régulée (figure 31).

La température et l'humidité relative dans l'enceinte sont contrôlées toutes les minutes au moyen d'une sonde

qui les relève et enregistre toutes les minutes. Un ventilateur placé dans l'enceinte génère un vent de 1 mètre par seconde, ce qui permet d'homogénéiser l'air dans cette enceinte.

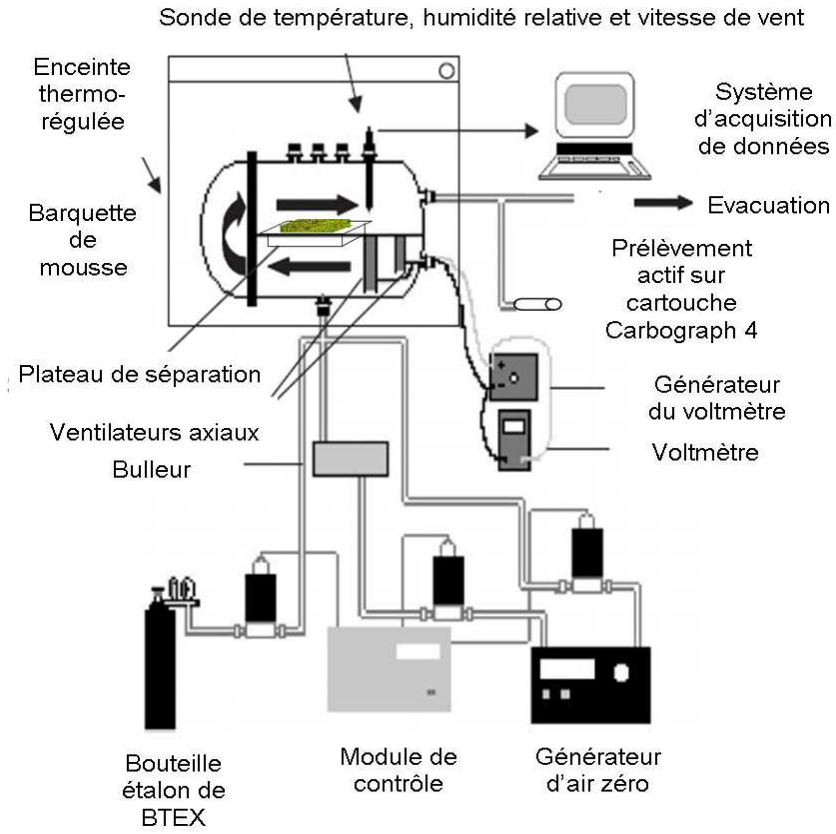


Figure 31: Dispositif d'exposition aux BTEX en enceinte, à faibles concentrations (d'après Pennequin-Cardinal, 2005) – (photo Faburé 2008)

La température moyenne relevée au cours des expositions est d'environ 20,3°C (+/- 0,3) et l'humidité relative moyenne s'élève à 66 % (+/- 0,5).

Nature et concentrations des polluants

Une bouteille étalon d'un mélange de benzène, toluène, ethylbenzène, meta-xylène, para-xylène et ortho-xylène, est reliée à l'entrée de l'enceinte, associée à un générateur d'air zéro qui assure la dilution de l'étalon pour l'obtention des concentrations désirées. De l'air zéro passe par un système humidificateur avant d'être injecté dans l'enceinte afin de pouvoir moduler l'humidité.

La bouteille étalon affiche les concentrations présentées dans le tableau 11 y figurent également les 3 concentrations théoriques d'exposition : les concentrations d'exposition C1, C2 et C3 correspondent respectivement à 2 fois, 5 fois et 20 fois la concentration limite annuelle du benzène (5 $\mu g.m^{-3}$).

Le tableau 11 présente les équivalences des concentrations en BTEX en $\mu g.m^{-3}$ enconcentrations en ppb et en quantités de BTEX d'après ces concentrations du débit et du temps d'exposition.

Composé	Concentration étalon ppm	C1 ($\mu g.m^{-3}$)	C1 (ppb)	C2 ($\mu g.m^{-3}$)	C2 (ppb)	C3 ($\mu g.m^{-3}$)	C3 (ppb)	Quantités équivalentes sur 24 heures (Concentration x Débit x Temps) µg		
								C1	C2	C3
benzène	10,14	13,22	4,07	27,02	8,31	103,92	31,97	104,7	214,0	822,9
toluène	29,1	24,56	11,7	68,27	23,8	362,09	91,7	194,5	540,7	2867,8
ethylbenzène	4,88	3,12	1,96	5,57	4,00	45,06	15,4	24,7	44,1	356,9
meta-xylène	5,70	6,82	2,29	11,68	4,67	103,28	18,0	54,0	92,5	818,1
para-xylène	5,70									
ortho-xylène	5,74	3,57	2,30	6,02	4,70	52,55	18,1	28,3	47,7	416,2

Tableau 11: Equivalences des faibles concentrations d'exposition en conditions contrôlées

La sortie de l'enceinte est reliée à un système de prélèvement actif sur cartouche qui permet de mesurer les concentrations en BTEX dans l'enceinte par CPG/FID.

Le débit en entrée de l'enceinte est de l'ordre de 5,5 $L.min^{-1}$dont quelques millilitres d'étalon BTEX (le reste étant de l'air zéro, en partie humidifiée). Ce débit global assure le renouvellement de l'air dans l'enceinte toutes les 6'30" environ.

Le débit de sortie est identique à celui d'entrée, ce qui atteste de l'étanchéité du dispositif.

Durée d'exposition

Les mousses sont exposées 24 heures à chacune des 3 concentrations en BTEX.

Échantillonnage

Les barquettes, virtuellement divisées en 5 parties, sont échantillonnées avant (Ti) et après l'exposition (Tf).

ii- Mesure de la réponse biologique

Les 5 parties constituent 5 réplications. À chaque prélèvement, les mousses sont réparties comme suit :

- environ 30 mg pour la mesure du taux d'hydratation ;
- environ un vial (20mL) en verre rempli au tiers ou à la moitié et serti (300 à 500 mg en fonction de l'état d'hydratation) pour l'analyse en BTEX dans les mousses .

Le taux d'hydratation est mesuré dans la continuité de l'expérience tandis que les vials sont conservés au congélateur à -20°C.

Mesure de l'état d'hydratation chez *Tortula ruralis*

Le suivi du taux d'hydratation est réalisé suivant le protocole présenté précédemment.

Protocole de mesure des concentrations en BTEX chez *Tortula ruralis*

Le dosage des BTEX accumulés chez *T. ruralis* est réalisé au laboratoire de la société Micropolluants. L'analyse s'effectue par la technique d'Headspace statique reliée à un chromatographe en phase gazeuse (CPG) couplé à un détecteur de spectrométrie de masse (MS), dans les conditions décrites précédemment.

3) Protocoles d'étude de l'adsorption et de la désorption des BTEX chez *Tortula ruralis* en conditions contrôlées

Compte tenu de l'absence de cuticule chez les mousses, les cellules des feuilles pourraient ne constituer qu'une interface d'échanges gazeux. Ainsi, les teneurs en BTEX chez les mousses seraient susceptibles de s'équilibrer avec les concentrations atmosphériques.

a) Protocole mis en oeuvre pour étudier le comportement de Tortula ruralis après l'arrêt d'une exposition au benzène

L'expérience réalisée à forte concentration consiste à doser le benzène chez la mousse après exposition puis 2,4 et 8 heures après l'arrêt de l'exposition, dans le but de déterminer si le benzène dosé dans la mousse y est ou non fixé. Par ailleurs, dans le cadre de cette expérience, les biomarqueurs de stress oxydant sont étudiés afin de déterminer la variation de l'expression de ces paramètres biologiques après l'arrêt de l'exposition pour mieux appréhender l'adaptation de l'organisme au stress environnemental.

i- Nature et concentration du polluant

Dans une enceinte hermétiquement fermée, les mousses sont exposées à une forte concentration en benzène.

Dans le cadre de cette expérience, la concentration d'exposition en benzène est de 200 ppm ou 650 mg/m^3.

ii- Durée d'exposition

Les mousses sont exposées pendant 20 heures.

iii- Échantillonnage

La barquette contenant la mousse est virtuellement découpée en 5 parties délimitant ainsi 5 réplications pour les prélèvements.

Un échantillonnage est réalisé avant l'exposition (Ti), puis juste après les 20 heures d'exposition (Tf), 2 heures après la fin de l'exposition (Tf+2), 4 heures après (Tf+4) et 8 heures après (Tf+8), permettant ainsi d'observer l'évolution des différents paramètres suite à l'exposition et après arrêt de l'exposition.

iv- Dosage du benzène et paramètres biologiques

Voir le protocole décrit au paragraphe III.C.2.a.iv

b) Protocoles d'étude de l'adsorption et de la désorption des BTEX en faibles concentrations chez Tortula ruralis en conditions contrôlées (coll. H.Plaisance, Ecole des Mines de Douai)

L'expérience réalisée à forte concentration a consisté à doser le benzène chez la mousse après exposition puis 2,4 et 8 heures après la fin de l'exposition, ceci afin de déterminer effectivement si le benzène dosé dans la mousse y était ou non fixé. Pour compléter cette hypothèse, nous pouvons nous interroger sur le devenir du benzène accumulé chez la mousse. En effet, il peut être désorbé, alors la matrice mousse ne constituerait en effet qu'une surface d'échange, ou métabolisé. Nous allons chercher à observer le potentiel de relargage du benzène par la mousse dans cette expérience.

Le principe est d'exposer *T. ruralis*, en milieu clos, à un mélange BTEX en introduisant les polluants progressivement, et de réitérer l'expérience en l'absence de mousses. L'objectif est d'observer l'augmentation des concentrations dans l'enceinte avec et sans la mousse pour déterminer s'il existe un phénomène de rétention des BTEX par la mousse, c'est-à-dire de déterminer si la mousse absorbe une partie des BTEX injectés dans l'enceinte. Après avoir atteint les concentrations souhaitées dans l'enceinte, l'injection en BTEX est arrêtée et c'est la décroissance des concentrations dans l'enceinte qui est alors observée (avec et sans mousses). La mousse peut relarguer une partie des BTEX qu'elle aurait absorbée, ce qui se traduirait par une quantité de benzène plus importante en présence de mousse, lors de cette phase de décroissance.

L'hypothèse contraire serait de supposer que la mousse ne relarguerait pas les BTEX, ce qui se traduirait par une quantité de benzène moins importante en présence de mousse, lors de cette phase de décroissance.

i- Conditions d'exposition

Pour déduire les variations des concentrations en BTEX relargués dans l'enceinte par les mousses, la même exposition est réalisée sans la mousse, permettant ainsi de déduire les fluctuations liées au dispositif d'exposition lui-même.

Matériel d'exposition

Les mousses conditionnées en barquette (mais sans système d'hydratation) sont disposées dans une enceinte en verre de 36 litres, hermétiquement fermée (*cf*. figure 32).

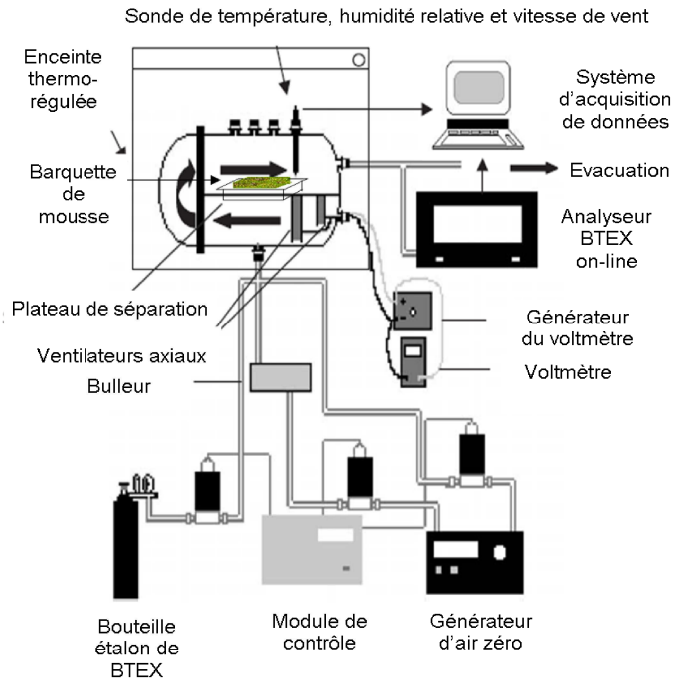


Figure 32: Dispositif d'exposition de Tortula ruralis *à de faibles concentrations en BTEX avec contrôle on-line des concentrations dans l'enceinte (d'après Cardinal-Pennequn, 2005)*

La température et l'humidité relative dans l'enceinte sont contrôlées au moyen d'une sonde qui les relève et enregistre toutes les minutes. Un ventilateur placé dans l'enceinte génère un vent de 1 mètre par seconde, ce qui permet d'homogénéiser l'air dans cette enceinte.

La température moyenne relevée au cours des expositions est de 20°C et l'humidité relative moyenne s'élève à 55% en l'absence de mousses et 95% en présence de mousses.

Nature et concentrations des polluants

Une bouteille étalon d'un mélange de benzène, toluène, ethylbenzène, meta-xylène, para-xylène et ortho-xynlène, est reliée à l'entrée de l'enceinte, associée à un générateur d'air zéro qui assure la dilution de l'étalon pour l'obtention des concentrations désirées. De l'air zéro passe par un système humidificateur avant d'être injecté dans l'enceinte afin de pouvoir moduler l'humidité.

La bouteille étalon affiche les concentrations présentées dans le tableau 12 y figurent également les concentrations théoriques d'exposition.

Le tableau 12 présente les équivalences des concentrations en BTEX en $\mu g.m^{-3}$ enconcentrations en ppb et en quantités de BTEX d'après ces concentrations du débit et du temps d'exposition.

Composé	Concentration étalon ppm	Concentration en $\mu g.m^{-3}$	Concentration en ppb	Quantités équivalentes sur 24 heures (Concentration x Débit x Temps) µg
benzène	10,14	100	31	43,2
toluène	29,1	287	74,9	124,0
ethylbenzène	4,88	48,1	10,8	20,8
meta-xylène	5,70	56,2	12,6	24,3
para-xylène	5,70	56,2	12,6	24,3
ortho-xylène	5,74	56,6	12,7	24,5

Tableau 12: Conversions des faibles concentrations d'exposition aux BTEX pour l'étude de l'adsorption et de la désorption chez Tortula ruralis

La sortie de l'enceinte est reliée à un analyseur BTEX on-line qui permet de mesurer les concentrations en BTEX dans l'enceinte par CPG/FID.

Le débit en entrée de l'enceinte est de l'ordre de 300 $mL.min^{-1}$ dont 1mL d'étalon BTEX (le reste étant de l'air zéro, en partie humidifié). Ce débit global assure le renouvellement de l'air dans l'enceinte toutes les 2 heures. Le débit de sortie est identique à celui d'entrée, garant de l'étanchéité du dispositif.

Durée d'exposition

On injecte le mélange BTEX pendant 24 heures, puis on coupe l'injection de BTEX en laissant uniquement l'air zéro pour assurer le renouvellement de l'air dans l'enceinte. On poursuit les mesures des concentrations en BTEX dans l'enceinte pendant 24 heures.

ii- Mesures des concentrations en BTEX dans l'enceinte

L'enceinte est reliée à sa sortie à un analyseur BTEX on-line qui échantillonne l'air à la sortie de l'enceinte. Le

cycle de l'analyse dure 74 minutes répartis en 27 minutes de prélèvement d'air et 47 minutes d'analyse du prélèvement.
L'échantillon est analysé en chromatographie phase gaz couplée à une détection à ionisation de flamme (FID). Un étalonnage préalable du dispositif d'analyse permet de calculer les concentrations mesurées d'après les aires de pics des chromatogrammes.

4) Protocole d'exposition *in situ* de *Tortula ruralis* : accumulation des BTEX et expression des biomarqueurs du stress oxydant

L'objectif de cette expérience est de déterminer s'il existe une relation entre les teneurs atmosphériques en BTEX *in situ* et celles mesurées chez *T. ruralis*, autrement dit, si *T. ruralis* peut constituer un bon organisme traceur de la pollution de l'air en BTEX. D'autre part, ces expositions *in situ* permettent de tester la pertinence des biomarqueurs développés en conditions contrôlées dans le cadre d'exposition *in situ*, en milieux contaminés. Cette expérimentation vise à étudier la réponse globale de l'organisme à un stress environnemental.
L'objectif est de déterminer s'il existe une corrélation entre les concentrations en BTEX mesurées dans l'air et les teneurs dosées chez *T. ruralis*.

a) Conditions d'exposition

Les mousses sont exposées sur 24 sites localisés au niveau du littoral dunkerquois, comme décrit au paragraphe IIII.A.2.b et IIII.A.3.b.

b) Durée d'exposition

Les premières exposition *in situ* ont démontré que les teneurs variaient dès la 1ère semaine d'exposition (*cf*. résultats de la 1ère expérimentation *in situ*).
Ainsi, pour cette expérimentation, les mousses sont exposées pendant 14 jours, du 8 au 22 octobre 2008.

c) Matériel d'exposition

Le dispositif d'exposition (biostations A et B : *cf*. figures 33 et 34) permet d'abriter la mousse des précipitations, de la protéger des oiseaux et des réenvols de poussières.
L'étude des réponses des biomarqueurs en milieu contaminé est réalisée sur 3 des 24 sites (*cf*. paragraphe IV.A.2.b). La quantité d'échantillons de mousses est plus grande du fait des dosages de biomarqueurs; aussi, le dispositif d'exposition est plus grand (biostation B), il permet l'installation d'une quantité plus importante de mousses.

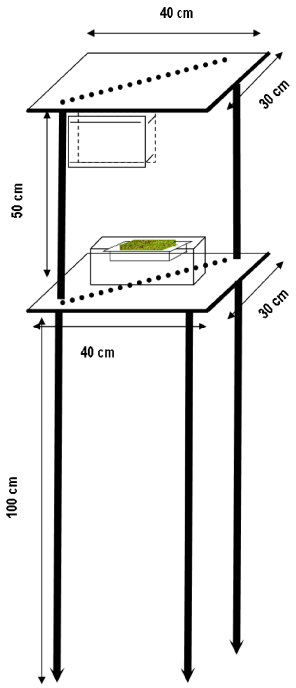


Figure 33: Biostation A d'exposition des mousses in situ

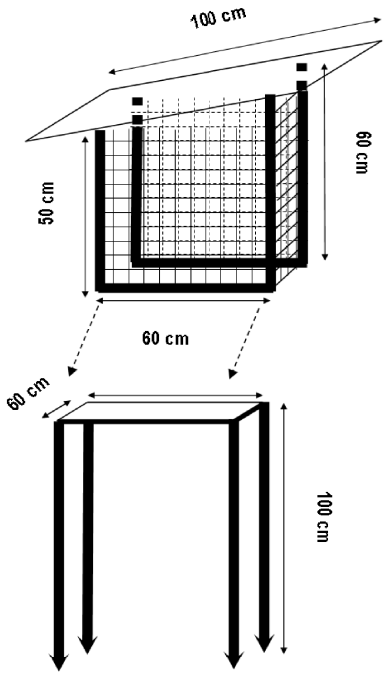


Figure 34: Biostation B d'exposition des mousses in situ

d) Étude de la réponse biologique

L'échantillonnage est réalisé comme suit :

Sur chacun des sites d'étude de l'accumulation des BTEX, 3 réplications sont réalisées à chaque échantillonnage, et les prélèvements sont répartis comme suit :

- la mesure du taux d'hydratation RWC (environ 30 mg) ;
- le dosage des BTEX dans la mousse: un vial (20 mL) est rempli entre le tiers et la moitié; le vial est serti dès l'échantillonnage, transporté en glacière puis conservé au congélateur.

Sur les sites où sont étudiés les biomarqueurs de réponse au stress environnemental, 5 réplications sont réalisées et les prélèvements permettent en plus de la mesure de l'état d'hydratation et des teneurs en BTEX :

- le dosage des activités enzymatiques APOX et GPOX (environ 200 mg) ;
- le dosage en MDA (environ 200 mg) ;
- le dosage en pigments chlorophylliens (au moins 50 mg).

Le taux d'hydratation est mesuré dans la continuité de l'expérimentation, tandis que les échantillons

permettant le dosage des biomarqueurs sont congelés dans l'azote liquide et conservés à -20°C jusqu'au jour de l'analyse.

D. Marqueurs biologiques

L'ensemble des dosages de biomarqueurs chez les mousses réalisés dans le cadre de ces travaux de recherche a nécessité des mises au point et/ou des adaptations de protocoles d'extraction et de dosage des différentes molécules recherchées. Ces étapes ont permis notammnent de définir les biomasses de mousses nécessaires à la mesure des biomarqueurs et de vérifier l'inocuité (ou incidence négligeable) de la congélation des mousses sur l'expression des biomarqueurs.

1) Mesure du paramètre d'évaluation du stress hydrique : la teneur relative en eau ou Relative Water Content (RWC)

La mesure du taux d'hydratation est réalisée par la mesure de la teneur relative en eau (RWC) suivant le protocole décrit par Nepomuceno *et al* (1998).

Il correspond au rapport entre la biomasse fraîche (au moment de l'échantillonnage) sur la biomasse de la mousse en turgescence (obtenue après un bain d'hydratation de l'échantillon de mousse dans de l'eau déionisée pendant 4 heures).

À chacune de ces biomasses est soustraite la biomasse sèche (obtenue après dessiccation en étuve à 40°C pendant 48 heures).

Ce ratio est enfin multiplié par 100 pour obtenir un résultat exprimé en pourcentage d'eau dans la mousse. (balance de précision Sartorius, précision 10^{-4}).

RWC (%) = (biomasse fraîche – biomasse sèche) / (biomasse en turgescence – biomasse sèche) x 100

2) Dosage des activités enzymatiques de l'ascorbate peroxydase et du guaïacol peroxydase, et des protéines totales

Les peroxydases sont mises en jeu lors de la réaction d'un organisme végétal au stress oxydant, ainsi l'augmentation de leur activité permet de mettre en évidence l'occurrence de ce stress. Le protocole utilisé et décrit ci-après est adapté de Cuypers *et al* (2001).

a) Extraction des enzymes

200 mg de mousses fraîches sont broyées au pilon dans un mortier, à 4°C, d'abord dans l'azote liquide, puis

dans 500 µL d'un tampon d'extraction Après obtention d'un liquide, l'extrait est placé dans un tube à hémolyse 5mL pour être centrifugé à 4°C, 15 000 tours.min^{-1} pendant 10 minutes.

Remarque : 2 tampons d'extraction ont été testés : le Tris HCl (Sigma 7-9, Sigma T13-78; 0,1M) correspond au tampon d'extraction des enzymes utilisé dans la plupart des protocoles pour l'extraction et le dosage de l'APOX et de la GPOX. Cependant, ce tampon est incompatible avec le protocole de dosage des protéines utilisé dans le cadre de cette thèse. Aussi, des expérimentations préliminaires ont été réalisées afin de comparer les activités enzymatiques après extraction au tampon TrisHCl et celles obtenues après extraction au PBS (Phosphate Buffer Saline - Gibco E7308). Ce tampon phosphate est compatible avec le procédé de dosage des protéines. Cette expérimentation a montré des activités enzymatiques comparables lors des extractions au tampon PBS.

D'autre part, l'analyse bibliographique a mis en évidence l'impact de stress, comme le stress hydrique ou l'ozone, sur les teneurs en protéines et sur la synthèse protéique chez les mousses (Dhindsa, 1992; Brunschön-Harti *et al*, 1995). Aussi, comme la teneur en protéines peut être affectée, elle ne peut pas être considérée comme une base de référence à l'expression des activités enzymatiques. C'est pourquoi le calcul des activités de l'APOX et de la GPOX est rapporté à la biomasse sèche de l'échantillon de mousse.

b) Dosage des enzymes

i- Ascorbate Peroxydase (APOX)

Dans une cuve en quartz, sont ajoutés 100µL d'extrait, 2,6mL de tampon HEPES-EDTA (0,1M, pH 7,0, Sigma H3375-E5134), 200 µL d'ascorbate de sodium (30mM, Sigma, A4034-100G, conservé à l'obscurité) et 100µL de peroxyde d'hydrogène (20 mM, Prolabo 23622,298, préparé extemporanément). Le mélange est analysé au spectrophotomètre, à la longueur d'onde 298 nm, pendant 5 minutes et la valeur de l'absorbance est relevée toutes les 30 secondes. On mesure ainsi la cinétique d'activité de l'APOX de l'échantillon qui consomme l'ascorbate mis en présence.

ii- Guaïacol Peroxydase (GPOX)

Dans une cuve en plastique, sont ajoutés 100µL d'extrait, 950µL de tampon phosphate de potassium (0,1M, pH 7,0, Sigma P0662), 300 µL de guaïacol (2,7 mM, Sigma G5502, conservé à l'obscurité) et 150µL de peroxyde d'hydrogène (8 mM, Prolabo 23622,298, préparé extemporanément). La mélange est analysé au spectrophotomètre, à la longueur d'onde 436 nm, pendant 4 minutes et la valeur de l'absorbance est relevée toutes les 30 secondes. On mesure ainsi la cinétique d'activité de la GPOX de l'échantillon qui transforme le guaïacol en tétraguaïacol, dont la densité optique est plus élevée.

Les solutions tampon sont placées à 25°C (le froid empêchant l'activation des enzymes)

75 µL de surnageant sont récupérés dans un microtube et conservés au congélateur en vue du dosage des protéines totales.

En appliquant la loi de Beer-Lambert, nous exprimerons les activités enzymatiques en nanokatal par g de biomasse sèche, par application des coefficients d'extinction molaire de l'ascorbate de sodium et du tetraguaïacol, à savoir, respectivement, ε=0.8mM.cm^{-1} et ε=25.5 mM.cm^{-1}.

$$C = Abs / (l.\varepsilon)$$

où C correspond à la concentration en chlorophylle (L/mol), Abs correspond à l'absorbance à la longueur d'onde de 298 ou 436 nm, et l correspond à la longueur du trajet optique (cm).

c) Dosage des protéines

Les protéines totales constituent l'élément référent auquel sont rapportées les activités enzymatiques. En effet, chez les bryophytes, la forte variabilité de l'état d'hydratation nécessite de définir un paramètre permettant la comparaison des échantillons entre eux, autre que la biomasse fraîche.

Toutefois, certains travaux (Dhindsa, 1987a,b) ont mis en évidence l'impact de certains stress abiotiques sur la synthèse de protéines et les concentrations en protéines totales. Aussi, ce paramètre peut également constituer un indicateur de stress environnemental.

Le dosage des protéines est réalisé grâce au kit Bicinchoninic Acid Protein Assay Kit (Sigma).

i- Extraction des protéines

Lors du dosage des peroxydases, 75µL d'extrait ont été conservés au congélateur -20°C pour ce dosage en protéines.

ii- Préparation de la gamme étalon de protéines

Une gamme étalon est constituée de 6 concentrations en protéines. Cette gamme permet de calculer la concentration de protéines totales des échantillons en fonction de la densité optique.

Des dilutions d'une solution mère (1mg/mL) de serum albumine bovin (BSA) permettent la réalisation de la gamme (tableau 13).

N° de standard	Concentration (mg/mL)	Quantité BSA (µL)	Quantité H_20 ultrapure (µL)
1	1,0	200	0
2	0,8	160	40
3	0,6	120	80
4	0,4	80	120
5	0,2	40	160
6	0	0	200

Tableau 13: Gamme des concentrations-étalon de serum albumine bovin

iii- Dosage des protéines totales

Les 75µL d'extrait végétal sont dilués par 2 par ajout d'eau ultra-pure.

1,2 mL de tampon de réaction (cuivre II/acide bicinchoninique 1v/50v) sont ajoutés aux 150 µL d'échantillon ou de standard.

Le mélange est placé en étuve à 37°C pendant 30 minutes, puis il est transféré en cuve plastique et dosé par spectrophotométrie à la longueur d'onde 562 nm.

Les résultats obtenus en mg/L sont convertis en milligramme de protéines par gramme de biomasse sèche.

3) Dosage des concentrations en malondialdéhyde

La lipoperoxydation est un mécanisme de dommage cellulaire bien connu et utilisé comme indicateur de stress oxydatif. Les lipoperoxydes sont dérivés d'acides gras polyinsaturés. Ils sont instables et se décomposent pour former des composés carbonylés dont le plus abondant est le malondialdehyde (MDA). C'est pourquoi le MDA est souvent utilisé comme indicateur de la lipoperoxydation. L'avantage de la méthode de dosage utilisée dans le cas présent (kit Bioxytech® MDA 586 (TebuBio) est que, contrairement à la méthode TBARS (ThioBarbituric Acid Reactive Substances) non spécifique, qui dose indifféremment le MDA libre et le MDA lié aux protéines, cette technique ne dose que le MDA libre, ou après hydrolyse, le MDA total.

a) Extraction du MDA

200 mg de mousses sont broyés à 4°C, au pilon dans un mortier, dans l'azote liquide puis dans 2 mL d'une solution d'acétonitrile-2,6Di-tert-butyl-4-methylphenol) (100v/1v). Ensuite, l'extrait est centrifugé pendant 10 minutes, à 4°C et 3000 g.

b) Préparation de la gamme étalon de MDA

Une gamme étalon est constituée de 6 concentrations de MDA (tableau 14). Cette gamme permet de calculer la concentration de MDA des échantillons en fonction de la densité optique.

Dans un premier temps, une solution mère (20 µM) est préparée en diluant 1,2 µL de tetramethoxypropane dans 598,8 µL d'eau ultra-pure. Des dilutions de cette solution permettent la réalisation de la gamme.

N° standard	Volume de solution mère (µL)	Volume d'eau ultra-pure (µL)	Concentration (µM)
1	0	200	0
2	25	175	0,5
3	50	150	1,0
4	100	100	2,0
5	150	50	3,0
6	200	0	4,0

Tableau 14: Gamme des concentrations-étalon de malondialdéhyde

c) Dosage du MDA

200 µL d'extrait ou de standard sont mis en présence des réactifs R1-méthanol (640 µL) et R2 (150 µL) puis, après agitation au vortex, placés en incubation au bain-marie, à 45°C pendant 60 minutes. Après incubation, les échantillons sont à nouveau centrifugés (10 min, 4°C, 10 000 g), puis transférés dans une cuve plastique 1,5 mL et dosés en spectrophotométrie. La densité optique est lue à une longuer d'onde de 586 nm.

Afin de déterminer la part d'absorption induite par la présence de chlorophylle dans l'extrait, un extrait référent, mesuré en parallèle, est réalisé en substituant le R1-NMPI par de l'acétonitrile.

Les résultats obtenus en µmole par litre sont convertis en milligramme de MDA par gramme de biomasse sèche.

4) Dosage des concentrations en chlorophylles et indice de phéophytinisation

Les concentrations en chlorophylles constituent un indicateur de l'état sanitaire des végétaux. Parce qu'ils participent à des fonctions essentielles à la vie du végétal, les pigments chlorophylliens et leur degré de dégradation peuvent informer sur les impacts néfastes induits par des stress environnementaux et pouvant mener à la détérioration de l'organisme.

La littérature scientifique fait état de nombreux procédés d'extraction et de dosage des pigments chlorophylliens chez les végétaux. Une étude approfondie de l'état de l'art a été menée afin de définir le protocole le plus adapté à nos études chez les bryophytes.

a) Etat des connaissances des techniques d'analyse des pigments chlorophylliens

i- Extraction

Les deux principaux solvants utilisés sont l'acétone et le dimethylsulfoxide (DMSO). D'autres solvants sont parfois utilisés. Ce sont : le méthanol, le N,N-Dimethylformamide (DMF), le chloroforme et le di-ethylether

(Wellburn, 1994). Plusieurs études comparent l'efficacité et le caractère pratique des deux solvants d'extraction les plus utlisés (Alpert, 1984; Hains, 1985; Inskeep & Bloom, 1985; Spencer & Ksander, 1987; Porra *et al.*, 1989; Barnes *et al*, 1992; Richardson *et al*., 2002; Tait & Hik, 2003).

Le éléments ci-après synthétisent les principaux avantages et inconvénients de l'usage du DMSO (comparé à l'acétone) (d'après Alpert, 1984).

Avantages de l'extraction au DMSO

- préparation facile des échantillons
- possibilité d'extraire des échantillons desséchés sans hydratation préalable
- aucune nécessité de broyage aux mortier et pilon
- turbidité très faible des extraits
- possibilité de pesée les biomasses sèches

Inconvénients de l'extraction au DMSO

- multiplicité des pigments extraits (chlorophylles, anthocyanes etc...) ce qui peut augmenter la turbidité des extraits et sous-estimer les concentrations en chlorophylle
- temps d'incubation variables en fonction des espèces

A ces avantages préalablement cités, il convient d'ajouter :

- stabilité dans le temps des extraits au DMSO (Alpert, 1994, Raeymaekers, 1986; Spencer et Ksander, 1987) (Cette remarque est contredite par Tait et Hik (2003) qui jugent l'extraction au DMSO chez certains végétaux supérieurs, moins stable que celle à l'acétone. La littérature ne révèle pas de consensus pour ce caractère)
- quantité de chlorophylle extraite plus importante (Raeymaekers, 1986; Spencer et Ksander, 1987), alors que Barnes *et al* (1992) n'observent cette différence que chez les lichens mais pas chez les végétaux supérieurs

En résumé, les 2 solvants d'extraction sont utilisés, et les études comparatives n'ont pas permis de prioriser l'un des solvants par rapport à l'autre. Il semble que l'efficacité du solvant utilisé soit plus fonction de l'espèce étudiée, de l'objectif recherché et du protocole utilisé que des propriétés intrinsèques des solvants.

ii- Dosage

Le plus souvent la chlorophylle est dosée en spectrophotométrie. Il existe des techniques de dosage par chromatographie haute performance ou par spectrophotométrie d'absorption atomique mais celle par spectrophotométrie avec détection ultra-violet est la plus couramment employée, et est celle sur laquelle repose les calculs de coefficients d'extinction des chlorophylles. Des équations basées sur le principe de la loi Beer-Lambert ont été établiées de manière à convertir, d'après ces coefficients d'extinction, les absorbances

en concentrations de chlorophylle. Les équations les plus souvent utilisées sont celles établies en 1949 par Arnon qui a travaillé sur l'extraction de chlorophylle chez *Beta vulgaris* par l'acétone (80%). Depuis, ces équations ont plusieurs fois été revues (Inskeep & Bloom, 1985; Barnes *et al*, 1992; Wellburn, 1994) du fait de l'amélioration de la résolution des spectrophotomètres (*cf*.tableau 15). Pourtant, aucune étude à notre connaissance n'a établi de différence entre les résultas obtenus avec les différentes équations. Aujourd'hui, ces équations sont toujours les équations référentes utilisées dans la littérature scientifique pour le calcul de concentrations en chlorophylles, même dans le cadre de travaux utilisant d'autres solvants d'extraction, chez d'autres modèles végétaux (Richardson, 2002; Signoret, 2002; Dazy *et al*, 2008).

Auteurs	**Solvant d'extraction**	**Équation pour calcul de la concentration en chlorophylle a ($g.L^{-1}$)**	**Équation pour calcul de la concentration en chlorophylle b ($g.L^{-1}$)**	**Équation pour calcul de la concentration en chlorophylle totale ($g.L^{-1}$)**
Arnon (1949)	Acétone (80%)	$C_a = 0.0127\ D_{663} - 0.00269\ D_{645}$	$C_b = 0.0229\ D_{645} - 0.00468\ D_{663}$	
Barnes *et al* (1992)	DMSO	$C_a = 14.85\ A_{664.9} - 5.14\ A_{648.2}$	$C_b = 25.48\ A_{648.2} - 7.36\ A_{664.9}$	$C_{a+b} = 7.49\ A_{664.9} + 20.34\ A_{648.2}$
	Acétone (80%)	$C_a = 12.58\ A_{663.1} - 2.93\ A_{646.2}$	$C_b = 21.14\ A_{646.2} - 5.09\ A_{663.1}$	$C_{a+b} = 7.49\ A_{663.1} + 20.34\ A_{646.2}$
Wellburn (1994)	DMSO	$C_a = 12.47\ A_{665.1} - 3.62\ A_{649.1}$	$C_b = 25.06\ A_{649.1} - 6.5\ A_{665.1}$	
	Acétone (80%)	$C_a = 12.25\ A_{663.2} - 2.79\ A_{646.8}$	$C_b = 21.5\ A_{646.8} - 5.1\ A_{663.2}$	

Tableau 15: Synthèse des équations établies pour le calcul des concentrations en chlorophylles

L'examen de la littérature scientifique met en évidence des désaccords entre les auteurs concernant la définition d'une méthode optimale d'extraction des pigments chlorophylliens. Ces désaccords semblent notamment imputables à la variation des organismes chlorophylliens étudiés. Il est donc apparu indispensable de procéder à une comparaison des 2 solvants (DMSO et acétone) sur notre modèle bryophytique.

b) Protocole de comparaison de 2 techniques d'extraction des pigments chlorophylliens chez Tortula ruralis

Dans un premier temps, nous avons optimisé et adapté à notre espèce chacune des deux méthodes d'extraction (données non présentées). Afin de comparer la sensibilité des méthodes en réponse à un stress, nous avons soumis notre matériel biologique à un stress thermique. En effet, le stress thermique est connu pour générer une dégradation des pigments et/ou une variation des indices de phéophytinisation. Cette expérience vise à déterminer la méthode la plus appropriée aux études écotoxicologiques menées dans le cadre de ces travaux de recherche.

Par ailleurs, nous utiliserons les différentes équations décrites précédemment pour le calcul des concentrations afin de déterminer si les valeurs obtenues diffèrent significativement d'une équation à l'autre.

i- Conditions d'exposition - échantillonnage

T. ruralis, conditionnée en barquette, est virtuellement partagée en 10 parties.

1	2	3	4	5
6	7	8	9	10

3 prélèvements de matériel frais sont réalisés dans chacune des parties :

- 1 pour la mesure du taux d'hydrataion : environ 30 mg ;
- 2 pour le dosage des concentrations en pigments chlorophylliens : au moins 50 mg pour l'analyse à l'acétone et au moins 50 mg pour l'analyse au DMSO.

Les barquettes sont placées en chambre chaude (40°C) pendant 72 heures afin de générer un stress thermique chez les mousses. Celles-ci sont réhydratées juste avant le second échantillonnage.

ii- Protocoles d'extraction des pigments chlorophylliens

Le protocole d'extraction et de dosage des pigments chlorophylliens par l'acétone est adapté principalement des travaux de Leblond (2003).

Le protocole d'extraction et de dosage des pigments chlorophylliens par le DMSO est adapté principalement à partir des travaux d'Alpert (1984), Barnes *et al* (1992) et Tretiach *et al* (2007).

Extraction des pigments chlorophylliens à l'acétone 90%

Les échantillons de mousses sont conservés à -20°C, à l'obscurité, dans un tube à hémolyse contenant 1 mL d'acétone 90%.

Chaque échantillon est broyé au pilon et au mortier dans l'acétone, à 4°C. L'extrait est repris ensuite dans 4 mL d'acétone 90% et placé à l'obscurité pendant 24 heures, sur un plateau agitateur à 4°C.

Après incubation de 24 heures, les échantillons sont centrifugés 10 minutes à 1 500g, à 4°C.

Extraction des pigments chlorophylliens au dimethyl sulfoxide (DMSO)

Les échantillons de mousses sont conservés à -20°C, à l'obscurité. Chaque échantillon est transféré dans un tube à hémolyse contenant 4 mL de DMSO, puis placé en incubation, à l'obscurité, à l'étuve à 65°C, pendant au moins 14 heures (durée optimale d'incubation déterminée lors d'étapes préalables de mise au point et non présentées ici).

iii- Préparation des gammes étalon de chlrophylle a

Des gammes étalon de chlorophylle a et b sont constituées de 8 concentrations (tableau 16). Ces gammes permettent de calculer les concentrations de chlorophylles des échantillons en fonction de la densité optique.
Une solution mère de chlorophylle a (10mg/L) est préparée par dilution d'1 mg de chlorophylle a (Sigma C5753-1MG) pure dans 100 mL de solvant (acétone 90% ou DMSO en fonction de la méthode d'extraction).
A partir de ces solutions mères, des dilutions sont réalisées comme suit :

N° du standard	Volume de chlorophylle	Volume de solvant (mL)	Concentration finale obtenue (mg/L)
1	5 mL de solution mère	0	10
2	2,5 mL de solution mère	2,5	5
3	1,25 mL de solution mère	3,75	2,5
4	500 µL standard 1	4,5	1
5	500 µL standard 2	4,5	0,5
6	500 µL standard 3	4,5	0,25
7	500 µL standard 4	4,5	0,1
8	0	5	0

Tableau 16: Gamme d'étalonnage de la chlorophylle a

À partir de cette gamme, les coefficients d'extinction molaire (ε) en L/mol/cm sont calculés d'après la loi de Beer-Lambert : $C = Abs / (l.\varepsilon)$
où C correspond à la concentration en chlorophylle (L/mol), Abs correspond à l'absorbance à la longueur d'onde de 663 nm, et l correspond à la longueur du trajet optique (cm).

iv- Dosage des pigments chlorophylliens

2 mL d'extrait végétal ou de standard sont transférés dans un cuve en quartz et l'échantillon est analysé en spectrophotométrie, aux longueurs d'onde : 415, 435, 645, 665 et 750 nm. Les absorbances à ces longueurs

d'onde permettent de déterminer les concentrations en chlorophylles, en tenant compte de la turbidité des échantillons. Les concentrations en chlorophylles sont obteneues en remplaçant les absorbances dans les équations précédemment décrites (IV.D.4.a.). Dans la mesure où nous souhaitons comparer l'efficacité des 2 solvants et que Arnon n'a travaillé qu'avec de l'acétone, nous comparerons les équations de Barnes et Wellburn.

v- Estimation de la dégradation de la chlorophylle a en phéophytine a

Il existe 2 calculs permettant d'estimer la dégradation de la chlorophylle a en phéophytine a :

- soit par le ratio des densités optiques à 435 nm par 415 nm (correspondant à l'absorbance de la chlorophylle a sur celle de la phéophytine a) ;
- soit par le ratio des densités optiques à 665 nm avant et après acidification.

L'acidification est réalisée par l'ajout de 10 µL d'acide chlorhydrique (HCl) à 1,5M dans le cas d'extraction à l'acétone 90%, ou 20µL d'HCl 1M pour l'extraction au DMSO. Puis après 3 minutes, on renouvelle la mesure des absorbances. L'acide permet de dégrader la totalité de la chlorophylle et ainsi d'estimer la proportion de phéophytine effectivement mesurée dans l'échantillon par rapport à la quantité totale de phéophytine potentielle.

vi- Résultats de la comparaison des 2 techniques d'analyse des pigments chlorophylliens

La figure 35 montre que les concentrations en chlorophylle-a obtenues après extraction au DMSO, avant l'application d'un stress thermique, ne présentent pas de différences significatives avec celles obtenues après extraction à l'acétone (quelles que soient les équations utilisées pour le calcul des concentrations).

Par contre, après apllication aux mousses d'un stress thermique (figure 36), les concentrations en chlorophylle-a après extraction au DMSO chez *T. ruralis* sont significativement inférieures à celles obtenues après extraction à l'acétone(quelles que soient les équations utilisées pour le calcul des concentrations).

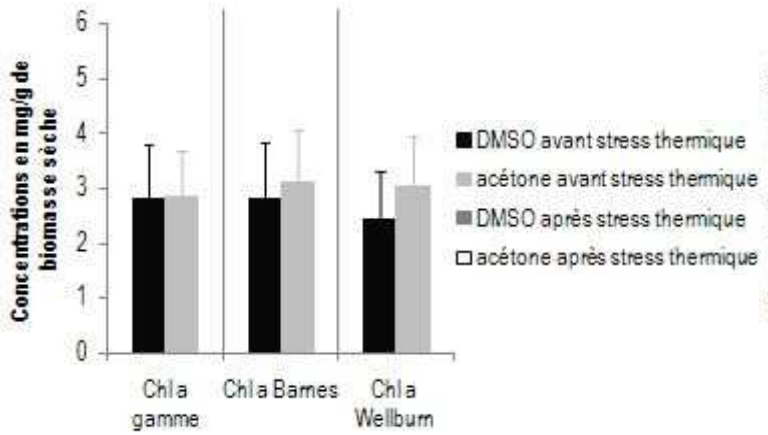


Figure 35: Concentration en chlorophylle a chez Tortula ruralis avant application d'un stress thermique, en fonction du solvant d'extraction (Test t de Student, n=10)

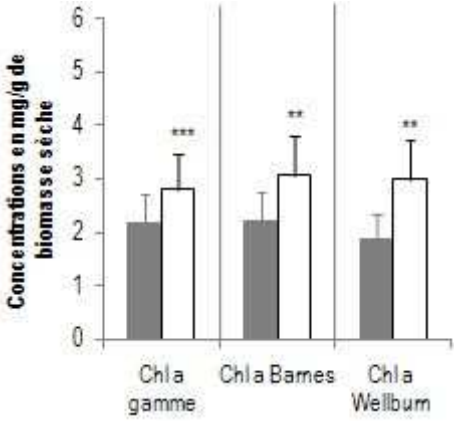


*Figure 36: Concentration en chlorophylle a chez Tortula ruralis après application d'un stress thermique, en fonction du solvant d'extraction (Test t de Student, n=10 ; différence significative * : p<0,05 ; ** : p<0,01 ; *** : p<0,001)*

Les concentrations en chlorophylle-b et en chlorophylle totale mesurées à partir des équations de Barnes et Wellburn sont toujours significativement supérieures après extraction à l'acétone qu'après extraction au DMSO, aussi bien avant qu'après application du stress. Les concentrations en chlorophylle-a et chlorophylle totale ne varient pas après que la mousse a subi un stress thermique, et ce quel que soit le solvant utilisé pour l'extraction. Les concentrations en chlorophylle-b après extraction au DMSO diminuent significativement après le stress thermique.

En calculant les variations des concentrations avant le stress thermique et celles après, il n'existe pas de différences quel que soit le solvant utilisé, bien que l'on observe des variations plus importantes lorsque l'extraction a été réalisée avec de l'acétone (figure 37). Toutefois les coefficients de variations avec l'acétone sont beaucoup plus élevés.

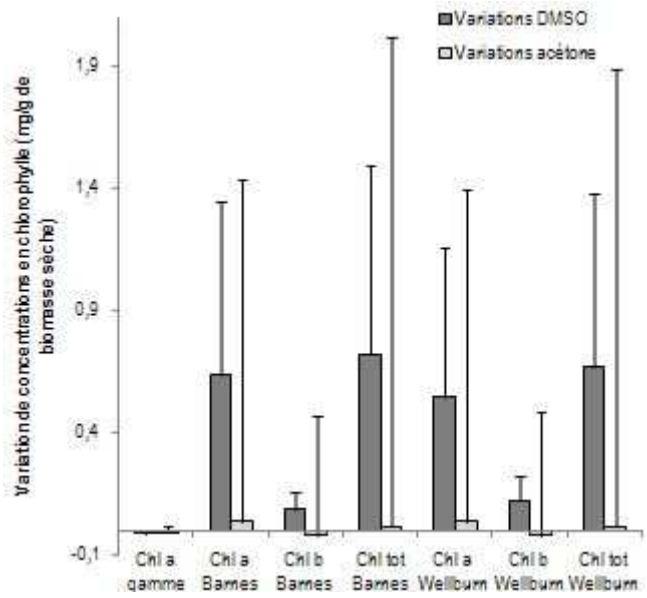


Figure 37: Comparaison des variations des concentrations en chlorophylles a b et totales, induites par un stress thermique, chez Tortula ruralis, en fonction des solvants d'extraction et des équations de calcul (Test t Student, n=10)

A partir des extractions de chlorophylle-a au moyen des 2 solvants, les concentrations obtenues en rapport avec la gamme de chlorophylle-a réalisée et celles obtenues avec les équations de Barnes et Wellburn sont comparées. Les résultats appuyés d'un test de comparaison de moyenne n'a pas révélé de différence entre les concentrations obtenues. Aussi les 2 types d'équations peuvent être utilisées pour le calcul des concentrations en chlorophylle-a. Cependant, des comparaisons des concentrations en chlorophylle b calculées au moyen des 2 types d'équations ont montré des concentrations supérieures en chlorphylle b calculées avec l'équation de Wellburn, lorsque l'extraction avait été réalisée avec le DMSO. Cette différence peut cependant s'expliquer par l'origine de l'extrait de chlorophylles pures sur lequel ont travaillé les 2 auteurs. En effet, tandis que Barnes a utilisé des extraits d'épinards, Wellburn a réalisé ses extraits sur des feuilles de Mauve (*Lavatera olbia L.*), ce qui peut expliquer la différence observée.

Enfin, l'étude des indices de phéophytinisation (figure 38) révèle que les indices ne varient pas lorsqu'ils sont issus d'extraction à l'acétone, tandis qu'ils augmentent significativement après le stress thermique avec l'extraction au DMSO. (Rappel : un indice qui diminue correspond à une dégradation de la chlorophylle en phéophytine et donc à un stress de l'organisme). Par ailleurs, l'indice calculé à partir des absorbances à 435 et 415 nm est plus élevé avec l'extraction au DMSO, alors que l'indice calculé à partir de l'absorbance à 663 nm avant et après acidification, est plus important avec l'extraction à l'acétone.

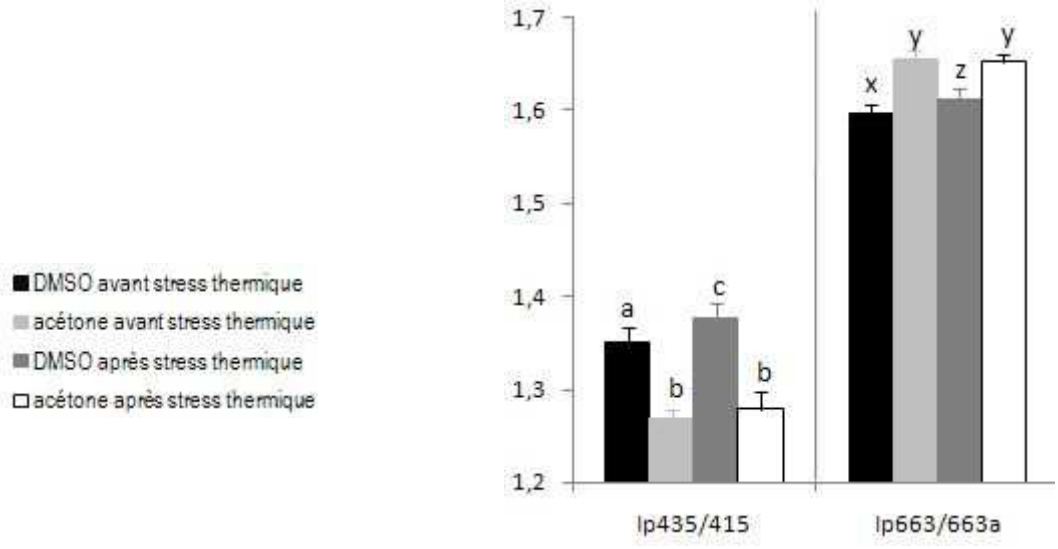


Figure 38: Comparaison des indices de phéophytinisation chez Tortula ruralis *en fonction du solvant d'extraction. (Les 2 indices sont analysés indépendamment - test t Student, n=10; des lettres différentes signalent des différences significatives p<0,05)*

c) Conclusions sur la comparaison des 2 techniques d'analyse des pigments chlorophylliens

L'usage des équations de Barnes et Wellburn permet le calcul de concentrations semblables à celles estimées au moyen de la gamme étalon. Mais la variabilité intrinséque des concentrations en chlorophylle chez *T. ruralis* est plus faible lorsque ces concentrations sont calculées d'après la gamme étalon.

Avant application d'un stress thermique, les concentrations en chlorophylles ne diffèrent pas en fonction des solvants d'extraction. Mais les variations après stress thermique sont significatives lorsque l'on utilise le DMSO. Par ailleurs, les coefficients de variations pour les concentrations en chlorophylles extraites à l'acétone sont très élevées.

Enfin, la comparaison des 2 indices de phéophytinisation ne permet pas de distinguer la sensibilité de ces 2 indices. Toutefois, lorsqu'ils sont établis après extraction au DMSO, on observe une légère augmentation des indices, dénotant peut-être dune sensibité accrue à ce solvant.

En conclusion, le DMSO apparaît comme le solvant le plus approprié à l'étude d'indicateurs chlorophylliens, les variations étant plus prononcées. Par ailleurs, le protocole d'extraction au DMSO nécessite moins de manipulation des échantillons que celui à l'acétone, ce qui permet de limiter les facteurs d'incertitudes induits lors de l'extraction.

E. Traitement statistique des données

Dans le cadre du traitement statistique des résultats des expérimentations et pour la mise en évidence de différences entre les groupes testés, la normalité des échantillons a été vérifiée par le test de Lilliefors, adaptation pour de petits échantillons du test de Komogorov-Smirnov, l'homogénéité des variances a été vérifiée par le test de Levene.

Afin de comparer les moyennes des différents paramètres mesurés chez les mousses (état d'hydratation, concentrations en protéines, malondialdéhyde, chlorophylles et activités de l'APOX et de la GPOX) avant et après les différents traitements appliqués, des tests paramétriques de Student pour échantillons indépendants ou appariés ont été réalisés lorsque les distributions étaient normales et l'homogénéité des variances était respectée. Dans le cas inverse, des tests non paramétriques ont été menés, à savoir le test U de Mann-Whitney pour les échantillons indépendants, et le test de Wilcoxon pour les échantillons appariés.

L'étude des corrélations entre les différents paramètres biologiques et les conditions d'expositions sont réalisées par le test non paramétrique de Spearman, afin de déterminer des relations entre les variations des marqueurs biologiques et les paramètres d'exposition.

Le seuil minimal de significativité de 5% ($p<0,05$) a été retenu.
Le traitement statistique des données a été réalisé avec le logiciel d'analyses statistiques Statistica (StatSoft, 2004).

RESULTATS

V. Résultats

A. Caractérisation de la contamination atmosphérique des sites lors des deux périodes d'exposition

1) 1ère expérimentation *in situ* (juin-juillet 2007)

Les 2 sites de l'étude réalisée durant 8 semaines au cours des mois de juin et juillet 2007 sont localisés sur l'agglomération dunkerquoise. Le site, nommé site A ou site industriel, se trouve à proximité immédiate de la zone industrielle, sous les vents dominants. Le site, nommé site B ou site urbain, se trouve dans la ville de Saint-Pol-sur-Mer, ville sous les vents dominants de la zone industrielle et qu'on pourrait définir comme site industrialo-urbain. Les tubes à diffusion passive Radiello ont permis l'identification des COV et la mesure des concentrations en BTEX présents sur chacun de ces sites au cours des 8 semaines d'exposition. Par ailleurs, des données fournies par le réseau Atmo Nord-Pas-de-Calais ont permis d'identifier la présence des contaminants atmosphériques autres que les COV.

a) Caractérisation qualitative des composés organiques volatils sur les 2 sites d'exposition

La caractérisation qualitative des 2 sites d'étude s'appuie sur un screening de tous les COV (comprenant de 2 à 14 atomes de carbone), réalisé par spectrophotométrie de masse.

Pour chaque site, les COV sont regroupés par famille : alcanes, alcénes, aromatiques, aldéhydes, cétones, alcools, éthers, esters, chlorés, azotés, acides (*cf* figures 39 et 40).

Au cours des 8 semaines de l'étude, l'analyse qualitative présente au moins 2 fois sur les 8 semaines d'échantillonnage, 134 COV sur le site industriel et 131 COV sur le site urbain. La répartition des COV entre les différentes familles est sensiblement identique sur les 2 sites. Les alcanes, alcènes et aromatiques représentent à elles trois, plus des $^2/_3$ des COV. Nous trouvons peu de composés chlorés (6 sur chaque site).

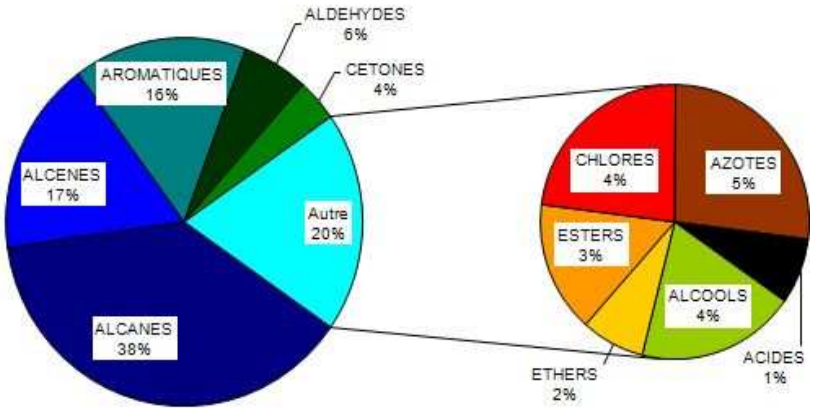


Figure 39: Distribution des COV sur le site industriel (A)

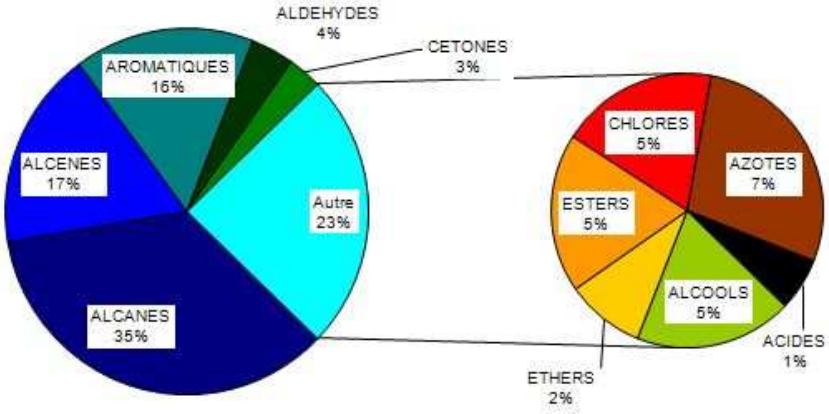


Figure 40: Distribution des COV sur le site urbain (B)

Sur l'ensemble des 8 semaines d'étude, les 2 sites présentent qualitativement une contamination en COV assez semblable. Toutefois, certains composés distinguent les 2 sites (*cf*. tableau 17). En effet, 3 composés sont identifiés 4 fois de plus (sur un total de 8 échantillons) sur un des deux sites, et 7 composés sont identifiés 3 fois de plus. Ces composés discrimants mettent en évidence la présence plus fréquente de 2 composés chlorés sur le site urbain : le tétrachloroéthylène et le 1,2 dichlorobenzène. Le site industriel présente plus fréquemment 6 composés de type alcane ou alcène.

Molécules très discriminantes	**Alcanes**	**éthyl cyclopentane**	Site industriel > site urbain
		diméthyl heptane	Site industriel > site urbain
	Chlores	**tétrachloroethylene**	Site urbain > site industriel
Molécules discriminantes	**Alcanes**	diméthyl cyclohexane	Site industriel > site urbain
		3méthyl octane	Site industriel > site urbain
		méthyl nonane	Site industriel > site urbain
	Alcènes	méthyl heptène	Site industriel > site urbain
	Aromatiques	méthyl méthyléthyl benzène	Site urbain > site industriel
	Ethers	tétra hydrofuran	Site urbain > site industriel
	Chlores	1,2 dichlorobenzène	Site urbain > site industriel

Tableau 17: Liste des COV discriminant les 2 types de site d'exposition (A : site industriel; B : site urbain; > supériorité de la présence d'un composé sur un site)

b) Caractérisation quantitative des BTEX sur les 2 sites d'exposition

L'analyse quantitative des BTEX sur les 2 sites d'exposition au cours des 8 semaines d'étude fait apparaître des concentrations en benzène un peu plus élevées sur le site industriel que sur le site urbain (*cf*. figure 41). Ces concentrations sont toutefois toujours inférieures à la limite annuelle réglementaire (5 µg.m^{-3}). Les concentrations en toluène, ethylbenzène et xylènes sont sensiblement identiques sur les 2 sites pendant les 6 premières semaines. Des pics de concentrations en toluène, éthylbenzène et xylènes sont observés sur le site urbain au cours de la 7ème semaine et des pics de concentrations en éthylbenzène et xylènes sont observés sur le site industriel au cours de la 8ème semaine.

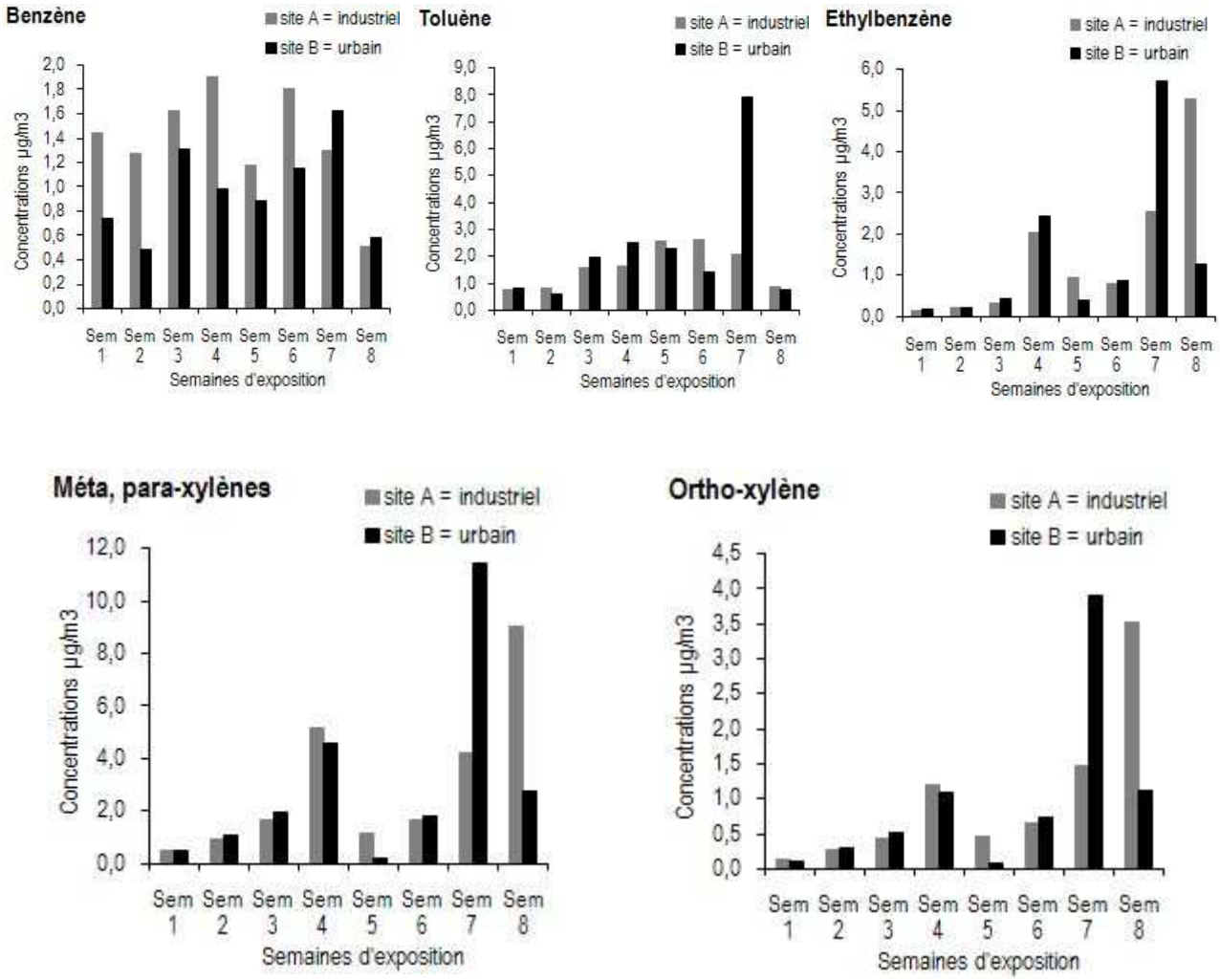


Figure 41: Concentrations dans l'air (µg.m^{-3}) en BTEX sur les 2 sites d'exposition (industriel-A et urbain-B) au cours des 8 semaines d'étude

le tableau 18 présente les concentrations moyennes, maximales et minimales des BTEX observées sur chacun des 2 sites pour les 8 semaines de l'exposition. La concentration moyenne en benzène est plus élevée sur le site industriel, tandis que la concentration moyenne en toluène est plus élevée sur le site urbain. Les concentrations moyennes en éthylbenzène et en xylènes sont elles sensiblement identiques sur les 2 sites.

concentrations	benzène		toluène		ethylbenzène		m,p-xylènes		o-xylène	
(µg.m^{-3})	site A	site B	site A	site B	site A	site B	site A	site B	site A	site B
minimale	0,51	0,48	0,78	0,60	0,15	0,18	0,53	0,21	0,15	0,07
maximale	1,90	1,63	2,60	7,89	5,28	5,71	8,99	11,42	3,52	3,90
moyenne	1,38	0,97	1,62	2,28	1,53	1,44	3,04	3,05	1,02	0,98
écart type	0,44	0,38	0,75	2,38	1,75	1,88	2,91	3,65	1,11	1,25

Tableau 18: Concentrations moyennes, minimales et maximales en BTEX sur les 2 sites d'exposition (industriel-A et urbain-B)

Les figures 42 et 43 présentent la proportion des concentrations en BTEX dans l'air. Contrairement aux concentrations, le ratio toluène sur benzène (T/B) n'est pas sensible aux phénomènes de dilution et de dispersion de masse d'air. Cela permet de comparer les 2 sites et d'en déduire les sources potentielles des contaminants. Ainsi, le ratio T/B est proche de 3 en milieu urbain, majoritairement soumis à une contamination de type automobile. Le ratio proche de 1 met en évidence une source de benzène supplémentaire, et peut caractériser une pollution de type industriel. Dans le cadre de cette étude, ce ratio est en moyenne égal à 1,25 (+/- 0,58) sur le site industriel, et à 2,04 (+/- 1,28) sur le site urbain. Ces ratios confirment le typologie des sources de pollution majoritaires sur chacun des 2 sites. Le site A est clairement sous l'influence d'émissions de benzène d'origine industrielle, tandis que le site B, urbain, est majoritairement sous l'influence du trafic automobile mais sous l'influence des émissions de la zone industrielle proche.

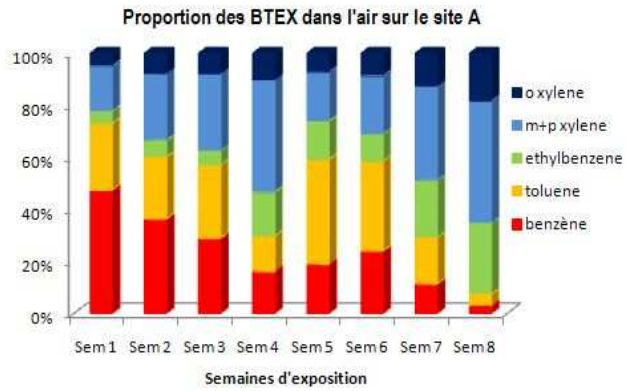


Figure 42: Proportion des BTEX dans l'air, les uns par rapport aux autres, au cours des 8 semaines d'étude sur le site industriel

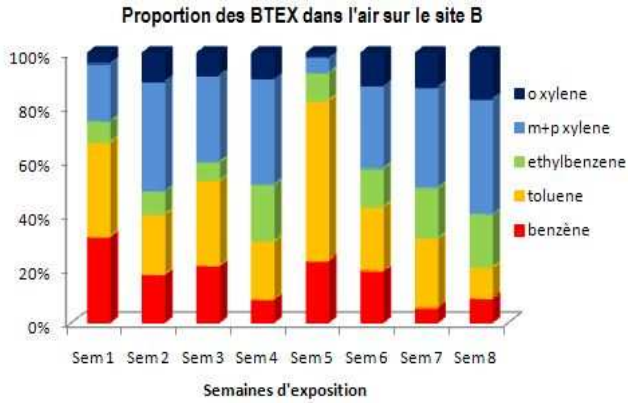


Figure 43: Proportion des BTEX dans l'air, les uns par rapport aux autres, au cours des 8 semaines d'étude sur le siteurbain

c) Contaminants atmosphériques non organiques

2 types de contaminants non organiques (dioxyde de soufre et particules égales ou inférieures à 10µm) sont mesurés en routine sur les 2 sites. Les résultats montrent que les concentrations en dioxyde de soufre sont systématiquement plus importantes sur le site A, tandis que les concentrations en PM_{10} sont sensiblement identiques sur les 2 sites. Ceci confirme la nature industrielle du site A, les sources anthropiques du dioxyde de soufre étant principalement industrielles.

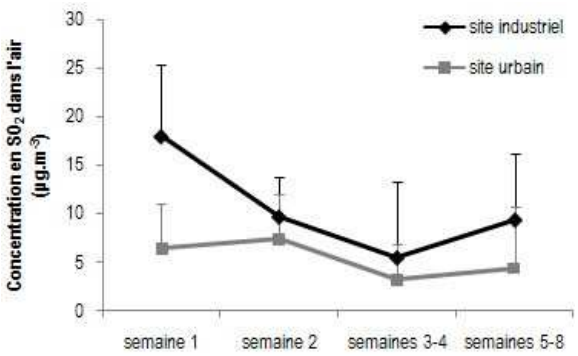


Figure 45: Concentration en dioxyde de soufre au cours des 4 périodes d'exposition sur les sites industriel et urbain (Source Atmo Nord Pas-de-Calais consulté en octobre 2007)

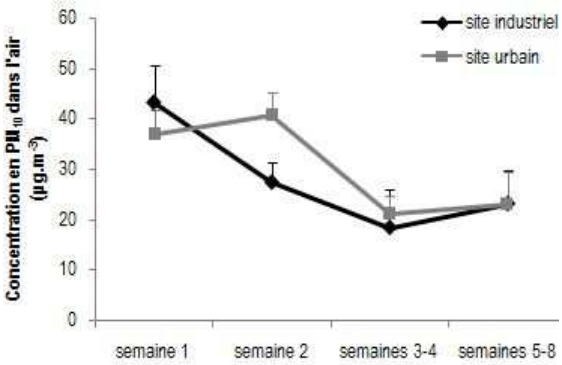


Figure 44: Concentration en particules de taille inférieures ou égales à 10 µm, au cours des 4 périodes d'exposition sur les sites industriel et urbain (Source Atmo Nord Pas-de-Calais consulté en octobre 2007)

2) 2nde expérimentation *in situ* (octobre 2008)

a) Caractérisation quantitative des BTEX sur les 24 sites d'exposition

Les concentrations atmosphériqus en BTEX sont au cours des deux semaines d'exposition sont synthétisées dans les tableaux 19 et 20.

$\mu g.m^{-3}$	Benzène	Toluène	Ethylbenzène	m,p-Xylènes	o-Xylène
Concentration minimale	0,267	0,251	0,025	0,077	0,03
Concentration maximale	1,917	70,6	7,575	6,675	1,419
Concentration moyenne (+/- écart type)	1,084 (+/- 0,401)	3,395 (+/- 9,967)	0,553 (+/- 1,062)	1,619 (+/- 1,290)	0,503 (+/- 0,357)

Tableau 19: Concentrations atmosphériques moyennes, maximales et minimales en BTEX pour l'ensemble des sites d'étude

	Concentrations en (µg.m^{-3}) semaine 1					Concentrations en (µg.m^{-3}) semaine 2				
site	benzène	toluène	éthylbenzène	m,p-xylènes	o-xylène	benzène	toluène	éthylbenzène	m,p-xylènes	o-xylène
1	1,41	2,44	0,58	2,29	0,76	0,97	1,89	0,37	1,55	0,45
2	1,46	2,65	0,65	2,81	0,86	1,07	1,76	0,31	1,10	0,33
3	1,50	2,29	0,59	1,99	0,71	1,02	1,48	0,40	1,76	0,63
4	1,34	3,11	0,82	3,53	1,11	1,27	4,34	0,44	1,11	0,34
5	1,41	2,54	0,71	3,12	1,04	1,11	3,32	0,42	1,18	0,36
6	1,10	2,13	0,70	2,45	0,83	0,66	0,69	0,15	0,56	0,18
7	1,61	2,02	0,41	1,50	0,54	0,80	1,05	0,18	0,70	0,22
8	1,25	70,60	7,57	3,84	1,36	0,42	0,35	0,02	0,09	0,03
9	1,22	2,88	0,62	1,93	0,68	0,68	0,74	0,10	0,33	0,09
10	1,60	2,14	0,53	2,26	0,78	1,00	0,90	0,20	6,67	0,26
11	1,92	2,17	0,47	2,01	0,64	0,81	1,59	0,25	0,76	0,23
12	1,44	3,21	1,02	4,31	1,42	0,64	0,77	0,06	0,22	0,06
13	1,71	1,75	0,33	1,23	0,43	0,85	1,31	0,32	1,18	0,34
14	1,88	2,43	0,33	1,43	0,53	0,97	1,70	0,37	1,64	0,45
15	1,01	1,34	0,57	2,08	0,71	0,76	0,67	0,14	0,40	0,12
16	1,05	1,01	0,23	0,73	0,33	0,71	2,22	0,18	0,36	0,13
17	1,28	1,46	0,49	1,77	0,74	0,68	0,88	0,12	0,32	0,10
18	1,48	1,87	0,54	2,18	0,66	0,74	2,86	0,28	0,75	0,21
19	1,46	2,59	0,63	1,93	0,70	0,43	0,37	0,03	0,08	0,03
20	1,80	4,68	0,96	3,63	1,28	1,05	2,75	0,50	2,09	0,66
21	1,00	1,74	0,43	1,48	0,56	0,58	0,47	0,08	0,23	0,08
22	1,32	2,97	0,78	2,56	0,86	0,55	1,05	0,31	0,59	0,17
23						1,10	3,34	0,37	0,90	0,28
24	1,03	1,33	0,30	1,40	0,50	0,65	4,88	0,47	0,44	0,13

Tableau 20: Concentrations (µg.m^{-3}) en BTEX sur les 24 sites et au cours des 2 semaines de l'étude

Au moyen d'un logiciel de modélisation (Surfer), nous avons réalisé la cartographie des concentrations en BTEX sur la zone d'étude. Notons que les sites numérotés 9, 15 et 16, situés à au moins 10 kilomètres de la zone d'étude n'ont pas été intégrés dans la modélisation. Cette modélisation par crygeage amène le logiciel à estimer la concentration en BTEX dans une zone sans donnée en fonction des concentrations voisines. Compte tenu de la distance qui sépare ces sites de la zone principale d'étude, l'estimation des concentrations entre ces points et la zone ne serait pas représentative. De la même manière, dans la lecture des cartographies (*cf*. figures 46 à 55), les concentrations en BTEX, pour les parties de la carte où aucune mesure n'a été réalisée, ne sont pas très fiables; elles sont estimées à partir des variations entre les concentrations mesurées sur les sites.

L'analyse de ces cartographies révèle tout d'abord que les concentrations en BTEX mesurées dans l'air étaient, d'une manière générale, plus élevées au cours de la première semaine d'exposition qu'au cours de la seconde.

Durant la première semaine, la répartition des concentrations en benzène et en xylènes distingue des foyers émetteurs : un situé à Grande Synthe, au niveau de la zone industrielle dont les activités peuvent les sources émettrices; l'autre à Saint Pol-sur-mer, dont le trafic automobile urbain pourrait induire ces concentrations. La répartition des concentrations en toluène et éthylbenzène au cours de la première semaine est dominée par un pic de concentrations mesuré pour un site localisé au sud de la zone d'étude. Ce pic de concentrations

masquent les plus petites variations de concentrations existant entre les autres sites.

Au cours de la seconde période d'exposition, les concentrations en BTEX sont plus faibles, et assez homogènes sur l'ensemble de la zone d'étude. Toutefois, il semble apparaître une dispersion de ces contaminants vers la mer. Au regard des roses des vents correspondant à ces 2 semaines d'expérimentation, il semblerait que les vents du sud de plus forte intensité au cours de la seconde semaine aient favorisés la dispersion des BTEX, telle que la modélisation le fait apparaître.

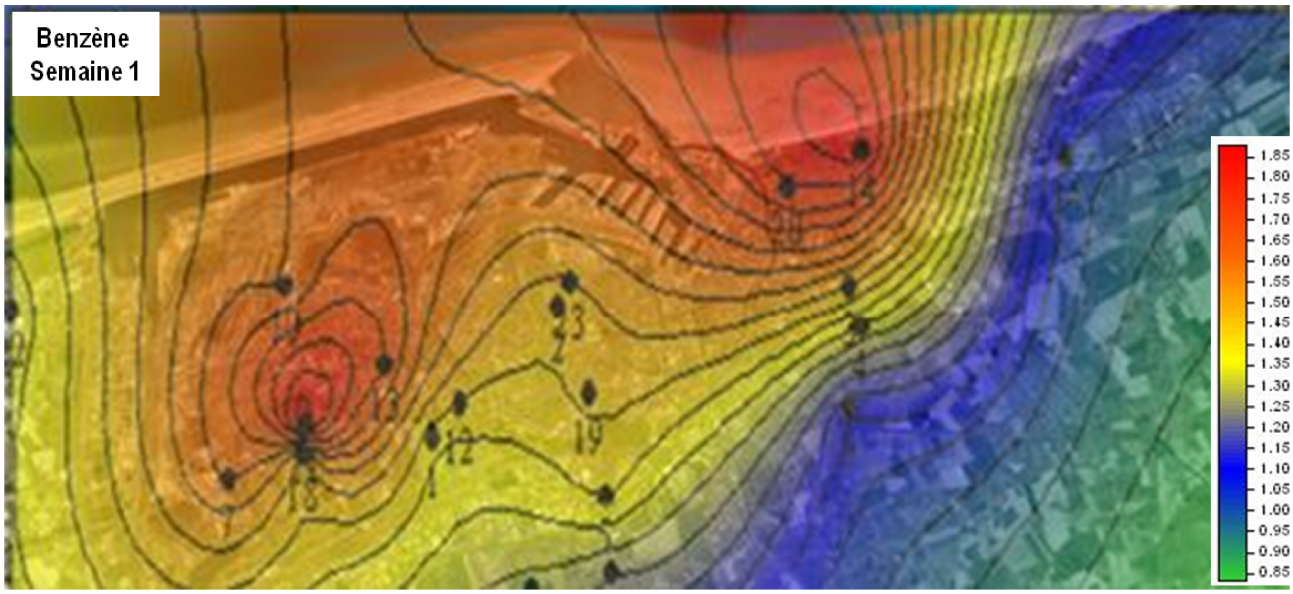


Figure 46: Modélisation de la contamination atmosphérique en benzène sur la zone d'étude au cours de la 1ère semaine d'exposition (octobre 2008)

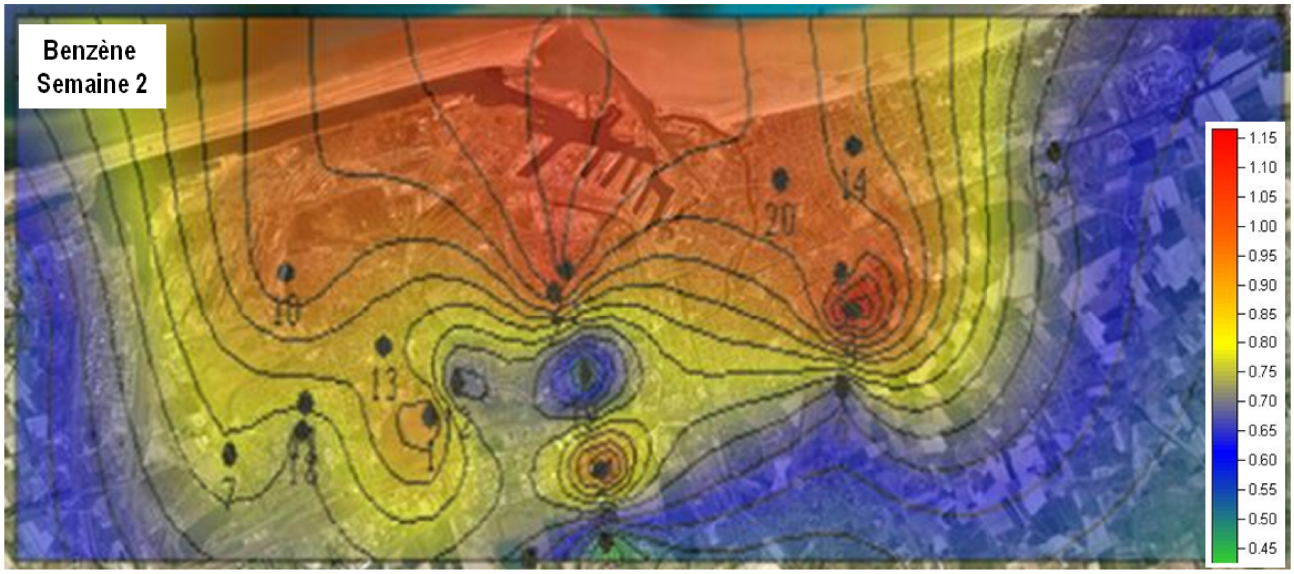


Figure 47: Modélisation de la contamination atmosphérique en benzène sur la zone d'étude au cours de la 2nde semaine d'exposition (octobre 2008)

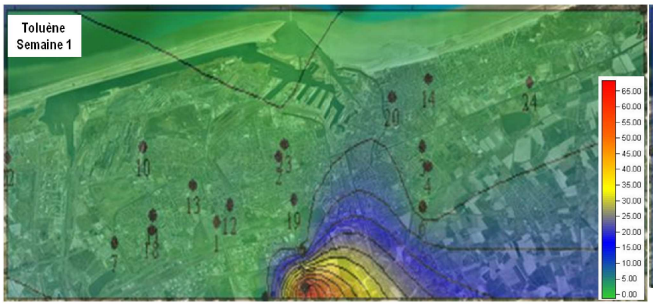


Figure 48: Modélisation des concentrations en toluène sur la zone d'étude au cours de la 1ère semaine d'exposition (octobre 2008)

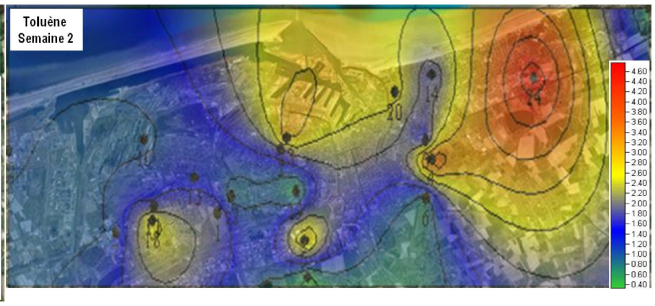


Figure 49: Modélisation des concentrations en toluène sur la zone d'étude au cours de la 2nde semaine d'exposition (octobre 2008)

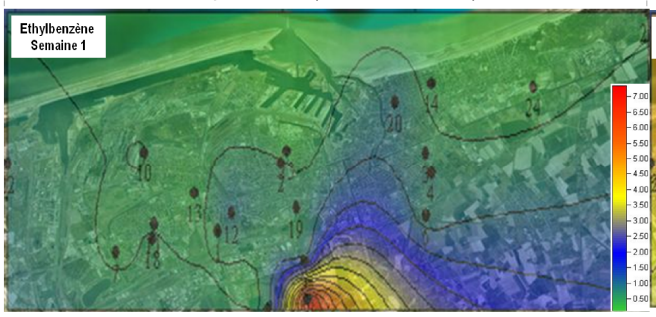


Figure 51: Modélisation des concentrations en éthylbenzène sur la zone d'étude au cours de la 1ère semaine d'exposition (octobre 2008)

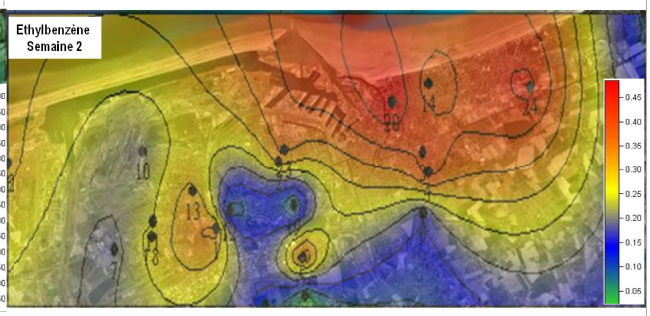


Figure 50: Modélisation des concentrations en éthylbenzène sur la zone d'étude au cours de la 2nde semaine d'exposition (octobre 2008)

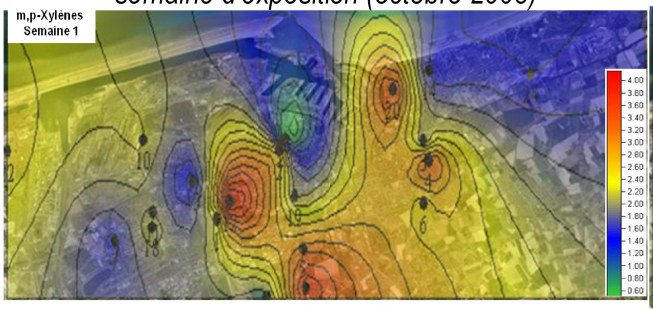


Figure 52: Modélisation des concentrations en méta,para-xylènes sur la zone d'étude au cours de la 1ère semaine d'exposition (octobre 2008)

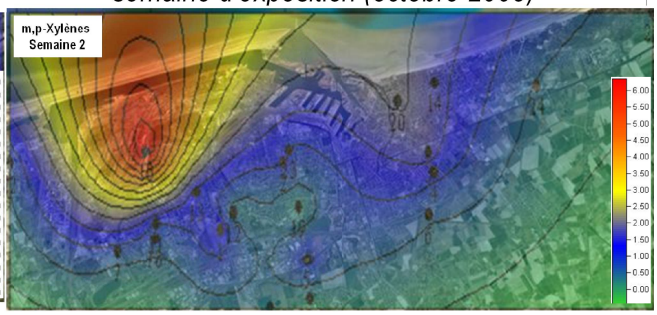


Figure 53: Modélisation des concentrations en méta,para-xylènes sur la zone d'étude au cours de la 2nde semaine d'exposition (octobre 2008)

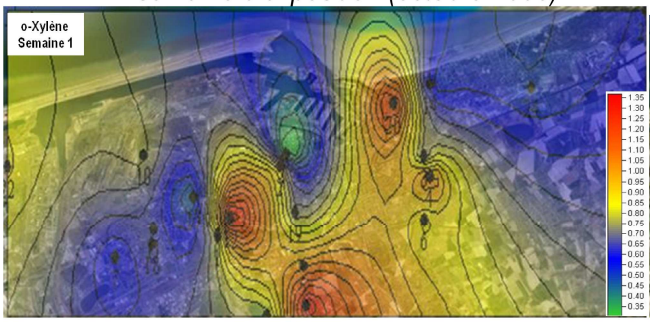


Figure 54: Modélisation des concentrations en ortho-xylène sur la zone d'étude au cours de la 1ère semaine d'exposition (octobre 2008)

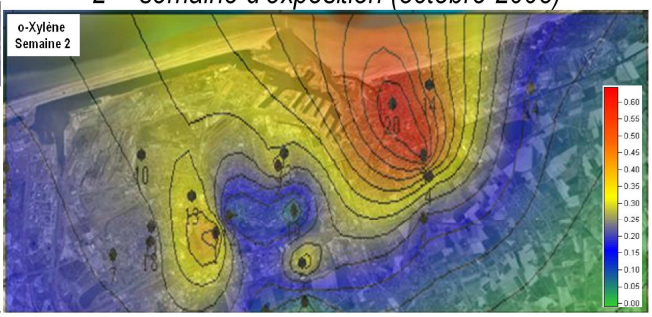


Figure 55: Modélisation des concentrations en ortho-xylène sur la zone d'étude au cours de la 2nde semaine d'exposition (octobre 2008)

b) Contaminants atmosphériques non organiques

13 des 24 sites d'exposition sont situés à proximité de stations de mesure de polluants atmosphériques mises en place par le réseau de mesure Atmo Nord Pas-de-Calais. Les concentrations en dioxyde de soufre, monoxyde d'azote, dioxyde d'azote, ozone et particules PM_{10} (égales ou inférieures à 10µm) mesurées au cours de l'étude sont synthétisées dans le tableau 21. Les moyennes des concentrations sont calculées pour chacune des 2 semaines d'exposition.

Localisation des stations de mesure		sites à proximité	SO_2 (µg.m^{-3})		NO (µg.m^{-3})		NO_2 (µg.m^{-3})		O_3 (µg.m^{-3})		PM_{10} (µg.m^{-3})	
			moyenne	écart type	moyenne	écart type	moyenne	écart type	moyenne	écart type	moyenne	écart type
semaine 1	Grande Synthe	7, 11, 13, 18	4,38	4,90							24,88	8,13
	Mardyck	22	1,50	1,07	8,75	12,00	19,75	5,47			20,63	6,52
	St-Pol-sur-mer	2, 23,	6,88	8,04	17,25	21,01	29,13	10,18	20,13	7,02	37,75	13,34
	Petite Synthe	1	2,63	3,11	28,25	26,87	25,50	7,98	17,25	5,39	38,00	10,04
	Fort Mardyck	10	7,25	3,69	21,38	18,51	28,38	6,76			21,33	
	Dunkerque centre	12, 19	2,88	1,73	20,25	16,99	34,50	9,02			34,88	7,86
	Malo	14, 20	2,50	1,69					18,88	7,18	33,38	8,80
semaine 2	Grande Synthe	7, 11, 13, 18	6,38	5,85							15,75	3,11
	Mardyck	22	1,25	0,71	3,75	4,74	14,00	5,07			13,38	2,97
	St-Pol-sur-mer	2, 23,	3,57	4,55	8,50	5,73	23,38	7,03	32,25	7,13	31,25	14,70
	Petite Synthe	1	3,25	2,19	15,88	11,54	24,63	7,11	26,50	6,68	22,13	4,39
	Fort Mardyck	10	7,13	3,80	11,00	3,93	22,63	4,50			24,50	
	Dunkerque centre	12, 19	4,63	4,50	11,38	5,48	28,63	6,78			22,38	4,63
	Malo	14, 20	2,50	1,41					30,25	7,69	20,88	3,04

Tableau 21: Concentrations moyennes (µg.m^{-3}) en dioxyde de soufre, monoxyde d'azote, dioxyde d'azote, ozone et PM_{10} pour les villes localisées dans la zone d'étude, au cours des 2 semaines (Source Atmo Nord Pas-de-Calais consulté en décembre 2008)

Les concentrations les plus élevées en dioxyde de soufre sont mesurées sur les zones de Grande Synthe, Saint Pol-sur-mer et Fort Mardyck. Ces stations sont les plus proches des principales sources d'émissions du SO_2. Les oxydes d'azote sont des contaminants caractéristiques du trafic routier et de la pollution urbaine. Les plus fortes concentrations sont mesurées au niveau de Petite Synthe (proche du carrefour autoroutier), Saint Pol-sur-mer et en centre ville de Dunkerque.

B. Etudes préliminaires des impacts du stress hydrique chez les bryophytes

1) Impacts du stress hydrique – étude de biomarqueurs de stress oxydant

Le stress hydrique peut engendrer la formation d'ERO chez les mousses. Lors d'études *in situ*, l'état d'hydratation des mousses peut subir des variations du fait des variations des conditions météorologiques au cours des expérimentations. Pour le développement de biomarqueurs du stress oxydant chez les mousses

exposées *in situ*, il se révèle donc nécessaire de connaître la part de stress oxydatif potentiellement imputable au stress hydrique.

Les expériences de déshydratation et de réhydratation de *T. ruralis* en conditions contrôlées ont comme objectif de déterminer l'impact sur l'expression des biomarqueurs de stress oxydant et de définir l'influence de la vitesse de déshydratation et de réhydratation.

Rappelons que 4 expériences ont été réalisées afin de combiner différentes vitesses de déshydratation et de réhydratation :

- expérience A : déshydratation rapide et réhydratation rapide
- expérience B : déshydratation rapide et réhydratation lente
- expérience C : déshydratation lente et réhydratation lente
- expérience D : déshydratation lente et réhydratation rapide

a) *États d'hydratation de* Tortula ruralis

La technique de mesure de la biomasse de la mousse à l'état de turgescence est sujette à de fortes variations dépendantes de l'expérimentateur. Pour limiter cette variabilité, nous décidons d'exprimer l'état d'hydratation de la mousse, non pas par sa teneur relative en eau mais par la rapport entre sa biomasse fraîche et sa biomasse sèche.

Les états d'hydratation mesurées après déshydratation et réhydratation au cours des quatre expériences sont présentées dans les figures 56 et 57.

L'état d'hydratation des mousses après déshydratation (DH) est significativement plus faible qu'à l'état initial (T0) et qu'après réhydratation (RH) de la mousse ($p<0,05$), et ce, quelles que soient les vitesses de déshydratation et de réhydratation appliquées.

Le taux d'hydratation initial des mousses est identique dans les quatre expériences. Cette homogénéité est essentielle pour comparer l'influence des vitesses de déshydratation et de réhydratation sur la variation des marqueurs de stress. Cependant, le taux d'hydratation de la mousse après déshydratation lente (expérience D) est significativement inférieur à celui obtenu au cours des autres expériences. Aussi, l'étude de l'influence de la vitesse de déshydratation sur l'expression des biomarqueurs de stress oxydant doit être menée avec précaution. Par ailleurs, le taux d'hydratation des mousses après la réhydratation rapide (expérience A) est plus élevé qu'au cours des autres expériences.

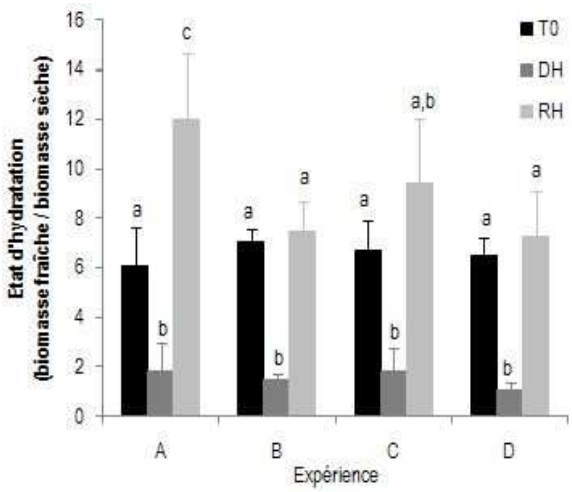


Figure 56: Variations de l'état d'hydratation de Tortula ruralis *au cours des 4 expériences A, B, C et D. (Test de Wilcoxon; n=6 ; des lettres différentes signalent des différences significatives p<0,05) (T0 : phase initiale; DH : déshydratation; RH : réhydratation)*

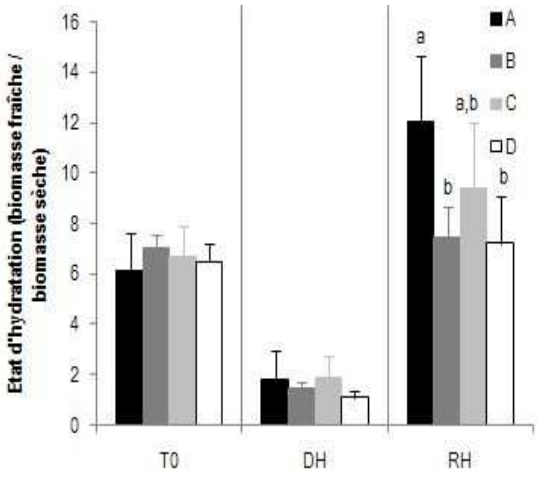


Figure 57: Etat d'hydratation de Tortula ruralis *à chaque étape (T0 : phase initiale; DH : déshydratation; RH : réhydratation) des 4 expériences(A, B, C, D) (Test U de Mann-Whitney pour échantillons indépendants; n=6 ; des lettres différentes signalent des différences significatives p<0,05)*

b) Influence du stress hydrique sur les concentrations en protéines totales

Les concentrations en protéines totales mesurées après déshydratation et réhydratation au cours des quatre expériences sont présentées dans les figures 58 et 59.

Les concentrations initiales en protéines totales étaient homogènes pour chacune des quatre expériences.

Aucune variation significative des concentrations en protéines totales n'a été mesurée après déshydratation et après réhydratation. Toutefois, chez les mousses ayant subi une déshydratation rapide suivie d'une réhydratation lente, la concentration en protéines après déshydratation est significativement inférieure à la concentration initiale et celle après réhydratation.

Par ailleurs, la vitesse de déshydratation n'a pas d'influence sur les concentrations en protéines chez les mousses. En effet, dans les deux expériences au cours desquelles les mousses sont déshydratées rapidement, il existe des différences de concentrations en protéines. Les concentrations en protéines chez les mousses déshydratées ne diffèrent pas lorsque la déshydratation est lente.

Dans nos conditions d'expérience, le stress hydrique ne semble pas engendrer de variations significatives des concentrations en protéines totales chez *T. ruralis*.

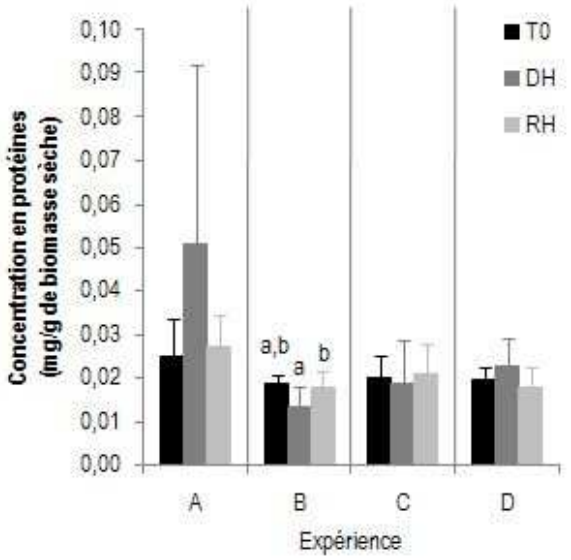


Figure 58: Variations des concentrations en protéines totales chez Tortula ruralis *au cours des 4 expériences A, B, C, et D (Test de Wilcoxon, n=6) ; des lettres différentes signalent des différences significatives p<0,05)(T0 : phase initiale; DH : déshydratation; RH : réhydratation)*

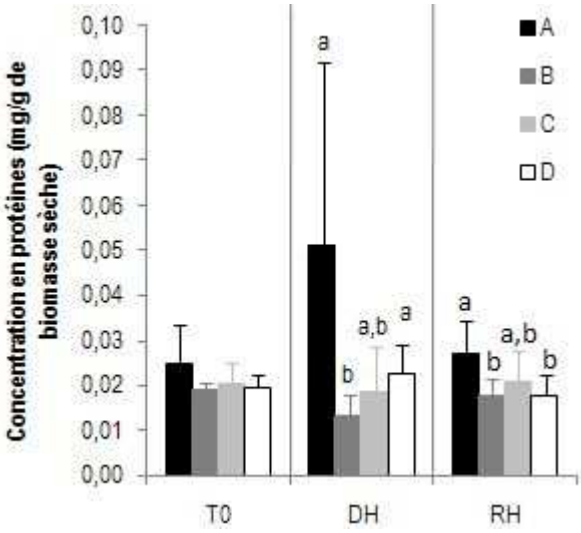


Figure 59: Concentrations en protéines totales chez Tortula ruralis *à chaque étape (T0 : phase initiale; DH : deshydratation; RH : réhydratation) des 4 expériences (A, B, C, D) (Test U de Mann-Whitney pour échantillons indépendants; n=6 ; des lettres différentes signalent des différences significatives p<0,05)*

Les variations observées de l'état d'hydratation et des concentrations en protéines totales, après réhydratation au cours des 4 expériences, sont semblables. Aussi, la concentration en protéines totales chez *T. ruralis* semble liée, dans le cadre de ces expériences, au taux d'hydratation de la mousse.

c) Influence du stress hydrique sur les activités de l'ascorbate et de la guaïacol peroxydases

Parmi les enzymes mises en jeu dans les mécanismes de compensation du stress oxydant, figurent deux enzymes spécifiques du monde végétal : APOX et GPOX. Elles ont été retenues dans cette étude pour évaluer la part du stress oxydant induit par le stress hydrique chez *T. ruralis*.

i- <u>APOX</u>

Les activités de l'APOX mesurées après déshydratation et réhydratation au cours des quatre expériences sont présentées dans les figures 60 et 61.

L'activité initiale de l'APOX est homogène pour les quatre expériences.

Les plus fortes valeurs sont observées après une déshydratation et une réhydratation rapides (A), les plus faibles après une déshydratation rapide et une réhydratation lente (B).

Dans chacune des expériences, l'activité de l'APOX a tendance à augmenter après la déshydratation, qu'elle

soit lente ou rapide ; toutefois, l'augmentation n'est statistiquement significatvie qu'au cours de l'expérience D (déshydratation lente et réhydratation rapide).

Dans chaque expérience, après réhydratation les valeurs de l'activité de l'APOX ont tendance à diminuer (expériences A, B et D) soit à augmenter (expérience C), sans que les différences soient significatives.

Il convient de noter que pour la déshydratation rapide (A et B), les activités de l'APOX peuvent être différentes entre deux expériences. Les valeurs semblent plus homogènes pour les expériences (C et D) menées en conditions de déshydratation lente.

Même si la figure 61 semble montrer quelques différences, les variations observées entre deux expériences d'un même type de réhydratation ne sont pas significatives. C'est également le cas entre les expériences menées avec les deux types de vitesse de déshydratation.

Bien qu'il existe des différences d'activité d'APOX entre les quatre expérienceS, chez la mousse déshydratée, la vitesse de déshydratation n'en est pas la cause, les mousses ayant subi une déshydratation rapide (A et B) présentent des activités d'APOX différentes.

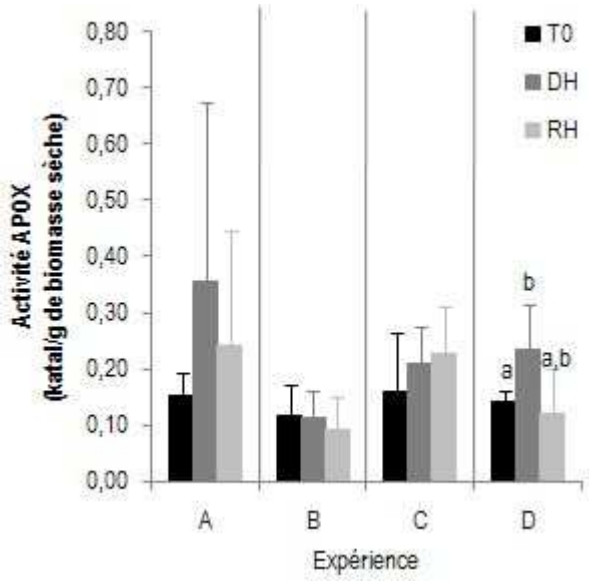


Figure 60: Variations des activités de l'APOX chez Tortula ruralis *au cours des 4 expériences A, B, C et D (Test de Wilcoxon, n=6; des lettres différentes signalent des différences significatives p<0,05) (T0 : phase initiales; DH : déshydratation; RH : réhydratation)*

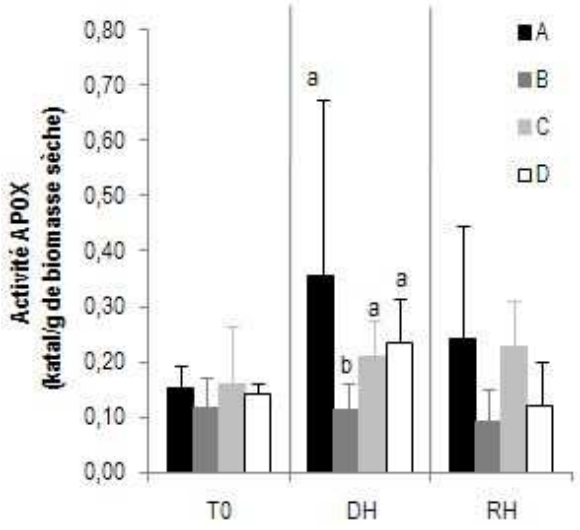


Figure 61: Activité de l'APOX chez Tortula ruralis *à chaque étape (T0 : phase initiale; DH : déshydratation; RH : réhydratation) des 4 expériences (A,B,C,D) (Test U de Mann-Whitney pour échantillons indépendants; n=6; des lettres différentes signalent des différences significatives p<0,05)*

ii- GPOX

Les activités de la GPOX mesurées après déshydratation et réhydratation au cours des quatre expériences sont présentées dans les figures 62 et 63.

L'activité initiale de la GPOX est homogène pour les quatre expériences.

À l'exception de l'expérience B, l'activité de la GPOX a tendance à augmenter après la déshydratation sans que les variations soient pour autant statistiquement significatives.

À l'exception de l'expérience B, après réhydratation, les valeurs de l'activité de la GPOX ont tendance à diminuer; cette diminution est statistiquement significative pour l'expérience D.

L'activité de la GPOX après réhydratation ne montre aucune différence significative pour la vitesse rapide de déshydratation (A et B) ; par contre, on note une différence significative sous vitesse lente (C et D). De plus, il existe une différence significative entre les mousses ayant subi une déshydratation et une réhydratation rapides (A) et celles ayant été soumises à une déshydratation lente et une réhydratation rapide (D). Ainsi, la vitesse de déshydratation pourrait avoir un impact sur l'activité de la GPOX, mais les activités n'étant pas homogènes après le déshydratation, nous ne pouvons pas comparer les activités après réhydratation, celles-ci étant intrinsèquement liées aux mesures après la déshydratation.

Nous ne pouvons pas conclure à l'impact de la vitesse de déshydratation sur l'activité de la GPOX.

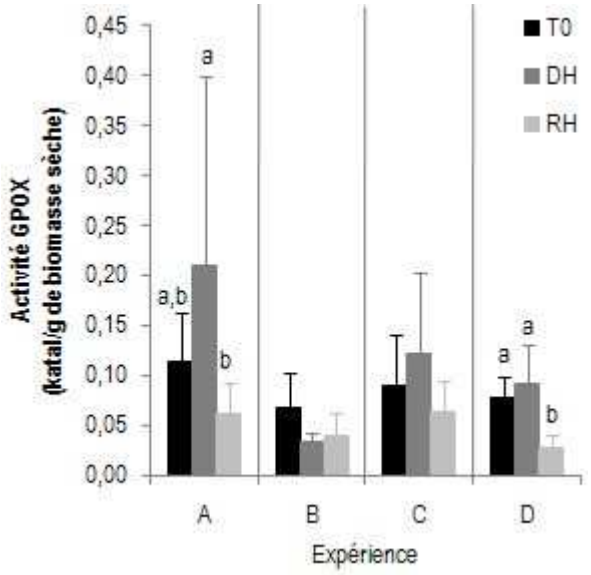


Figure 62: Variations des activités de la GPOX chez Tortula ruralis *au cours des 4 expériences A, B, C, et D (Test de Wilcoxon, n=6 ; des lettres différentes signalent des différences significatives p<0,05) (T0 : phase initiale; DH : déshydratation; RH : réhydratation)*

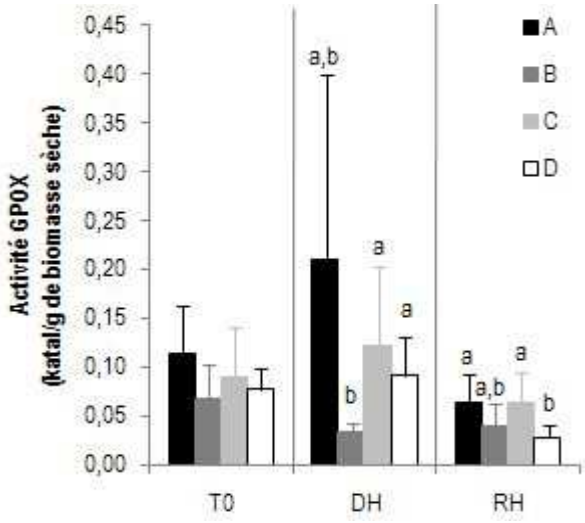


Figure 63: Activité de la GPOX chez Tortula ruralis *à chaque étape (T0 : phase initiale; DH : deshydratation; RH : réhydratation) des 4 expériences (A, B, C, D) (Test U de Mann-Whitney pour échantillons indépendants; n=6 ; des lettres différentes signalent des différences significatives p<0,05)*

d) Influence du stress hydrique sur l'intégrité des lipides membranaires

Les concentrations en MDA mesurées au cours des quatre expériences sont présentées dans les figures 64 et 65.

Les concentrations initiales ne sont pas homogènes (les teneurs mesurées lors de l'expérience D étant significativement supérieures à celles mesurées lors des expériences A et B). Cette hétérogénéité des concentrations initiales rend compromise toute comparaison entre les différentes expériences. Par contre, nous pouvons toujours procéder à l'analyse des variations des concentrations en MDA à chaque étape des quatre expériences.

La concentration en MDA diminue après la déshydratation ; cette diminution est significative pour les expériences B et D.

La concentration en MDA augmente après la réhydratation ; les concentrations finales (RH) sont supérieures significativement aux concentrations mesurées après la déshydratation. L'expérience A est la seule au cours de laquelle la concentration finale est significativement supérieure à la concentration initiale (T0).

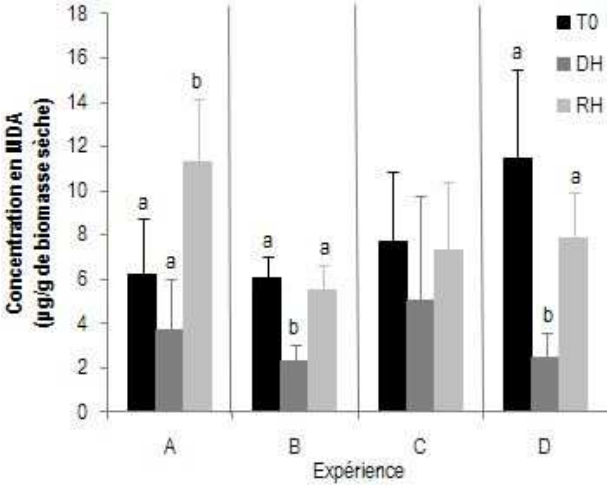


Figure 64: Variations des concentrations en MDA chez Tortula ruralis *au cours des 4 expériences A, B, C, et D (Test de Wilcoxon, n=6 ; des lettres différentes signalent des différences significatives p<0,05) (T0 : phase initiale; DH : déshydratation; RH : réhydratation)*

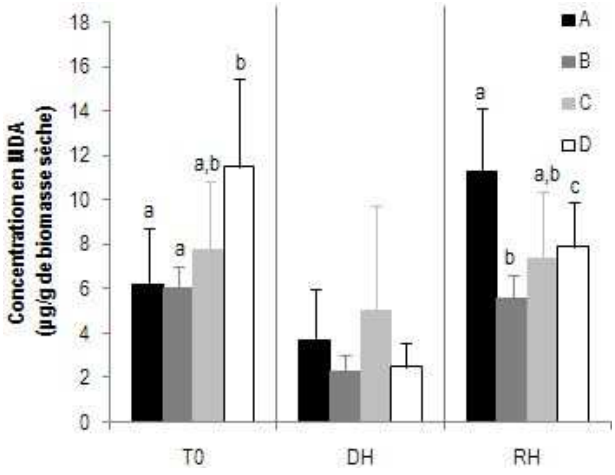


Figure 65: Concentrations en MDA chez Tortula ruralis *à chaque étape (T0 : phase initiale; DH : deshydratation; RH : réhydratation) des 4 expériences (A, B, C, D) (Test U de Mann-Whitney pour échantillons indépendants; n=6 ; des lettres différentes signalent des différences significatives p<0,05)*

e) Influence du stress hydrique sur les concentrations en chlorophylles et l'indice de phéophytinisation

Les pigments chlorophylliens constituent des éléments essentiels au développement de l'organisme végétal. L'oxydation des chlorophylles par les ERO les transforme en phéophytines. C'est pourquoi, l'indice de phéophytinisation est susceptible de mettre en évidence un stress oxydant. La diminution de cet indice correspond à la génération d'ERO dans l'organisme. Lorsque le stress est très important, les pigments chlorophylliens peuvent être complètement dégradés et la concentration en chlorophylles diminue. C'est pourquoi la mesure des concentrations en pigments chlorophylliens ainsi que l'indice de phéophytinisation peut permettre d'évaluer l'induction d'un stress oxydant par le stress hydrique.

i- <u>Chlorophylles a, b et totales</u>

Les concentrations en chlorophylles a, b et totales sont présentées dans les figures 66 à 71.

les concentrations initiales ne sont pas homogènes pour les trois types de concentrations. Cette hétérogénéité des concentrations initiales rend compromise toute comparaison entre les différentes expériences.

D'une manière générale, les concentrations en chlorophylles diminuent après la déshydratation de la mousse et augmentent après leur réhydratation.

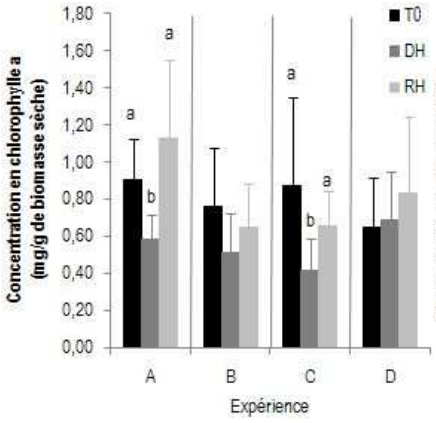


Figure 66: Variations des concentrations en chlorophylle a chez Tortula ruralis *au cours des 4 expériences A, B, C, et D (Test de Wilcoxon, n=6 ; des lettres différentes signalent des différences significatives p<0,05) (T0 : phase initiale ; DH : déshydratation ; RH : réhydratation)*

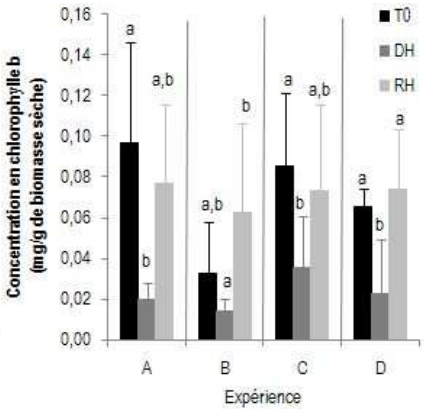


Figure 68: Variations des concentrations en chlorophylle b chez Tortula ruralis *au cours des 4 expériences A, B, C, et D (Test de Wilcoxon, n=6 ; des lettres différentes signalent des différences significatives p<0,05) (T0 : phase initiale ; DH : déshydratation ; RH : réhydratation)*

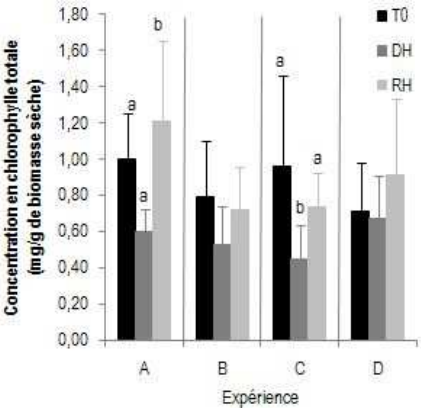


Figure 67: Variations des concentrations en chlorophylle totale chez Tortula ruralis *au cours des 4 expériences A, B, C, et D (Test de Wilcoxon, n=6 ; des lettres différentes signalent des différences significatives p<0,05) (T0 : phase initiale ; DH ; déshydratation ; RH : réhydratation)*

Les concentrations en chlorophylles différent d'une expérience à l'autre mais ces variations ne sont pas imputables aux vitesses de déshydratation et de réhydratation.

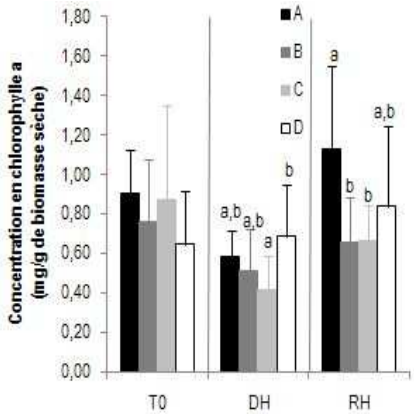


Figure 69: Concentrations en chlorophylle a chez Tortula ruralis *à chaque étape (T0 : phase initiale; DH : deshydratation; RH : réhydratation) des 4 expériences (A, B, C, D) (Test U de Mann-Whitney pour échantillons indépendants; n=6 ; des lettres différentes signalent des différences significatives p<0,05)*

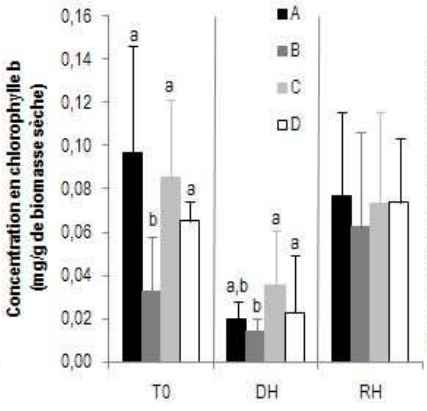


Figure 70: Concentrations en chlorophylle b chez Tortula ruralis *à chaque étape (T0 : phase initiale; DH : deshydratation; RH : réhydratation) des 4 expériences (A, B, C, D) (Test U de Mann-Whitney pour échantillons indépendants; n=6 ; des lettres différentes signalent des différences significatives p<0,05)*

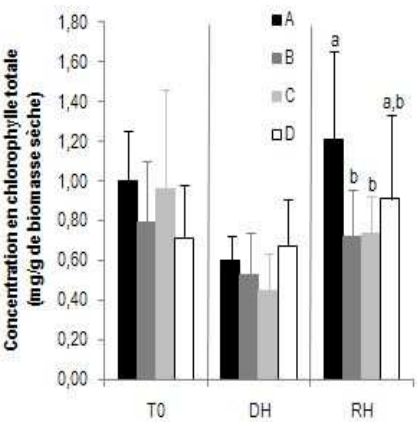


Figure 71: Concentrations en chlorophylle totale chez Tortula ruralis *à chaque étape (T0 : phase initiale; DH : deshydratation; RH : réhydratation) des 4 expériences (A, B, C, D) (Test U de Mann-Whitney pour échantillons indépendants; n=6 ; des lettres différentes signalent des différences significatives p<0,05)*

Seules, au cours de l'expérience de déshydration et réhydratation rapides (expérience A), les concentrations finales (RH) en chlorophylles sont supérieures aux initiales (T0). Mais ce phénomène ne se manifestant pas au cours des trois autres expérimentations, il n'est donc pas possible de conclure sur l'impact oxydatif du stress hydrique sur la dégradation des pigments chlorophylliens. Par contre, les concentrations sont plus faibles quand l'état d'hydratation de la mousse est plus faible (DH). De la même manière, les concentrations sont plus élevées quand la mousse est plus hydratée (après réhydratation). Ainsi, les concentrations en chlorophylles semblent liées à l'état d'hydratation de la mousse.

ii- Indice de phéophytinisation

L'indice de phéophytinisation est présenté dans les figures 72 et 73.

les valeurs initiales de l'indice de phéophytinisation sont homogènes.

Après déshydratation, l'indice de phéophytinisation na varie pas, quelle que soit la vitesse appliquée. Par contre, après la réhydratation, l'indice de phéophytinisation augmente significativement lors de l'expérience A (vitesses rapides de déshydratation et réhydratation). Il augmente aussi significativement par rapport à la valeur initiale lors de l'expérience D (déshydratation lente et réhydratation rapide).

L'indice de phéophytinisation après déshydratation ne montre aucune différence significative pour la vitesse rapide de déshydratation ; par contre, on note une différence significative sous vitesse lente. Il n'existe pas de différence significative entre les mousses ayant subi une déshydratation rapide et celles ayant été soumises à une déshydratation lente.

Les mêmes observations s'appliquent après réhydratation.

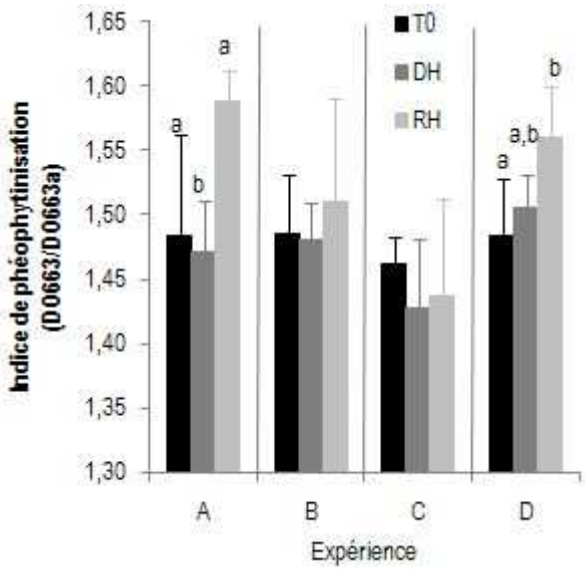


Figure 72: Variations de l'indice de phéophytnisation chez Tortula ruralis *au cours des 4 expériences A, B, C, et D (Test de Wilcoxon, n=6 ; des lettres différentes signalent des différences significatives p<0,05) (T0 : phase initiale; DH : déshydratation; RH : réhydratation)*

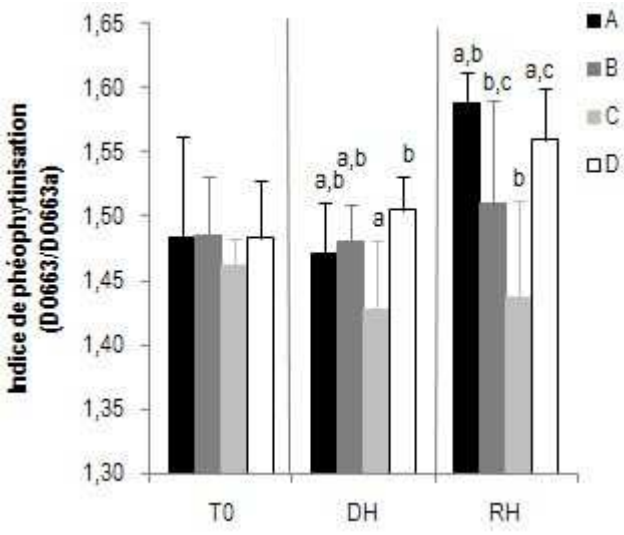


Figure 73: Indice de phéophytinisation chez Tortula ruralis *à chaque étape (T0 : phase initiale; DH : deshydratation; RH : réhydratation) des 4 expériences (A, B, C, D) (Test U de Mann-Whitney pour échantillons indépendants; n=6 ; des lettres différentes signalent des différences significatives p<0,05)*

f) Discussion

La plupart des biomarqueurs de stress oxydant semblent varier en fonction de l'état d'hydratation de la mousse et non du stress hydrique appliqué à l'organisme. Une étude des corrélations sur l'ensemble des échantillons, toutes expériences confondues, met en évidence une corrélation significative entre les concentrations de MDA et des chlorophylles avec l'état d'hydratation des mousses. L'indice de phéophytinisation est également corrélé à l'état d'hydratation mais le coefficient est assez faible (0,25).

	Concentration en protéines totales (mg/g BS)	Activité APOX (Kat/g BS)	Activité GPOX (Kat/g BS)	Concentration en MDA (µg/g BS)	Indice phéophytinisation	Concentration en Chlorophylle a (mg/ g BS)	Concentration en Chlorophylle b (mg/ g BS)	Concentration en Chlorophylle totale (mg/ g BS)
Etat d'hydratation	0,23	-0,09	-0,09	0,70	0,25	0,49	0,57	0,51

Corrélation de rangs de Spearman (n=72; significativité p<0,05)

Tableau 22: Corrélation entre l'état d'hydratation et l'expression des biomarqueurs de stress chez Tortula ruralis *(Corrélation de Spearman, n=72; coefficient de corrélation en rouge : significatif à p<0,05)*

La déshydratation est susceptible de dénaturer les protéines, toutefois, dans le cadre de nos expériences, nous n'observons pas de diminution des concentrations des protéines. *T. ruralis* posséde la capacité de rétablir rapidement son métabolisme de synthèse après avoir été réhydraté (Bewley, 1979 ; Oliver & Bewley 1997 ; Oliver *et al*, 2005), et la synthèse protéique chez la mousse est ainsi réactivée (Oliver, 1991).

Des études de l'impact de la déshydratation chez des espèces tolérantes, ont montré que la production d'ERO générées pendant une déshydratation peut amener à une dénaturation des protéines par l'oxydation des groupements sulfhydryl, la perte de pigments (Schonbeck & Bewley, 1981a, b) et des dommages au photosystème ainsi que la lipoperoxydation membranaire (Gushina *et al,* 2002) (McKersie, 1991; Smirnoff 1993).

L'APOX constitue un mécanisme enzymatique antixoydant secondaire qui participe à la régénération de composés antixoydants (*cf*. figure 12), comme le glutathion. Dhindsa (1987a) a démontré l'oxydation de 30% du pool de glutathion en sa forme oxydée chez *T. ruralis* soumise à la dessiccation, mais cette diminution de la quantité de glutathion réduit n'est observée qu'après la réhydratation de la mousse, le métabolisme étant suspendu lorsque la mousse est déshydratée. L'activité de l'APOX, pour régénérer le glutathion réduit, est donc susceptible d'être augmentée lors de la déshydratation de la mousse. Pourtant, aucune augmentation significative de l'APOX n'a été observée suite aux expériences de déshydratation et de réhydratation menées dans le cadre de notre étude du stress hydrique. Les mêmes observations ont été faites chez *T. ruraliformis*, chez qui la dessiccation n'engendre aucune stimulation de l'APOX (Kranner & Grill, 1995). Quant à la GPOX, son activité tend à diminuer à l'issue des expériences, sans que cela soit significatif.

Seel *et al* (1992) démontrent une augmentation de la lipoperoxydation après dessiccation chez les espèces intolérantes à la dessiccation comme *Dicranum. palustris*. Ils démontrent également que cette augmentation ne s'observe pas chez les espèces tolérantes à la dessiccation comme *T. ruraliformis*. Chez *T. ruralis*, espèce tolérante à la dessiccation, nous n'observons pas d'augmentation de péroxydation des lipides membranaires. Par contre, les concentrations en MDA varient de manière corrélée avec l'état d'hydratation de la mousse. Selon Breuil-Sée (1995), les lipides membranaires changent de conformation entre les phases d'anhydrobiose et de reviviscence chez des bryophytes du genre *Riccia.* Comme le MDA résulte de l'interaction des d'ERO avec certains lipides membranaires, si ces derniers sont modifiés, cela peut modifier directement les concentrations en MDA mesurées, sans que cela soit imputables à une augmentation des ERO dans l'organisme.

La déshydratation n'engendre pas nécessairement de perte de pigments chez les mousses tolérantes à la dessiccation (Proctor & Tuba, 2002). Tuba *et al* (1998) démontrent que les organismes tolérants à la dessiccation comme *T. ruralis*, maintiennent leur concentration de chlorophylle totale constante au cours de leur déshydratation et de leur réhydratation. Dans le cadre de nos expériences, nous avons également observé l'absence de variation significative des concentrations de chlorophylle. Cependant, il semble exister une corrélation entre la teneur en eau et les concentrations des chlorophylles chez la mousse. Ainsi, la forte variabilité observée pourrait masquer les variations induites par l'état d'hydratation. D'ailleurs, Tuba *et al* (1998) ont montré que les échanges gazeux du CO_2 (assimilation, respiration) diminuaient lors de la déshydratation de la mousse et augmentaient lors de sa réhydratation et que la photosynthèse est inhibée chez la mousse sèche.

Enfin, alors que Proctor (2000) suggère qu'une dessiccation rapide minimise les dommages de la déshydratation, Dhindsa (1987a, b) observe une synthèse protéique plus élevée et des concentrations du glutathion oxydé et du MDA plus faibles chez *T. ruralis* lorsque la déshydratation est lente. Pourtant, aucune influence des vitesses de déshydratation ou de réhydratation sur l'expression des biomarqueurs n'ont pu être mises en évidence dans le cadre de nos expériences.

En résumé, l'étude des corrélations entre l'expression des biomarqueurs de stress oxydant et l'état d'hydratation chez *T. ruralis* tend à démontrer que les variations de ces biomarqueurs, dans le cadre de nos expériences, ne semblent pas imputables au stress engendré par les phénomènes de déshydratation et de réhydratation, mais sont intrinséquement liées à la teneur en eau de la mousse. En conclusion, cela confirme qu'il est nécessaire d'apporter un système d'hydratation lors de l'exposition des mousses *in situ* afin de maintenir un état d'hydratation correct et constant.

2) Influence de l'âge de la mousse sur l'expression de biomarqueurs du stress oxydant

L'état physiologique et métabolique des mousses est susceptible de changer au cours de la vie de l'organisme. Dans le cadre des expérimentations réalisées sur l'accumulation et la toxicité des COV, les individus bryophytiques testés sont issus de récolte. En fonction des zones de récolte, les brins de mousses peuvent être à un état de développement différent, et cette différence peut être à l'origine de variations des paramètres physiologiques. Le vieillissement est un des facteurs pouvant occasionner un stress oxydant. L'objectif de l'expérimentation ci-après est d'étudier l'incidence de l'âge de la mousse sur l'expression des paramètres physiologiques utilisés comme biomarqueurs de stress dans les études écotoxicologiques.

Pour identifier 2 populations d'une même espèce (*T. ruralis*) récoltée sur une même zone de prélèvement, nous avons considéré la longueur des brins comme indicateur de l'âge de la mousse, les brins les plus longs indiquant une mousse plus ancienne. Les mousses ont été réparties en 2 groupes : 'jeune' et 'vieux'.

Les figures 74 et 75 présentent les longueurs des brins de *T. ruralis* et l'état d'hydratation en fonction de l'âge. Après avoir vérifié que le groupe d'individus supposé plus ancien possédait effectivement une longueur de brins significativement plus importante, nous avons évalué l'état d'hydratation des 2 populations, ce paramètre ayant également une influence sur les paramètres métaboliques de l'organisme. Nous avons observé un état d'hydratation significativement plus faible chez les organismes les plus âgés.

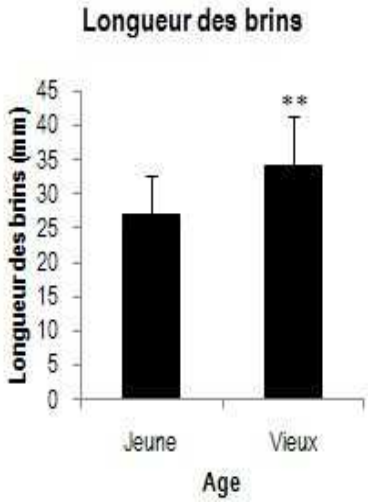


Figure 75: Longueur moyenne des brins de Tortula ruralis *selon leur âge (Test t de Student, n=9 ; ** : différence significative p<0,01)*

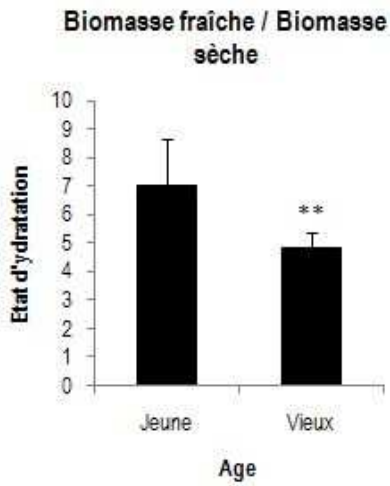


Figure 74: Rapport de la biomasse fraîche sur la biomasse sèche chez Tortula ruralis *selon son âge (Test t de Student, n=9 ; ** : différence significative p<0,01)*

a) Influence de l'âge de la mousse sur les concentrations en protéines et les activités de l'ascorbate et de la guaïacol peroxydases

Les figures 76, 77 et 78 présentent les concentrations en protéines totales et les activités de l'APOX et de la GPOX chez *T. ruralis* en fonction de l'âge.

La concentration en protéines totales n'est pas différente chez les 2 populations. Par contre, les activités des enzymes mises en jeu dans les mécanismes de compensation du stress oxydant, diffèrent. Tandis que l'activité de l'ascorbate peroxydase semble plus faible chez la population la plus âgée, la guaïacol peroxydase présente une activité significativement augmentée.

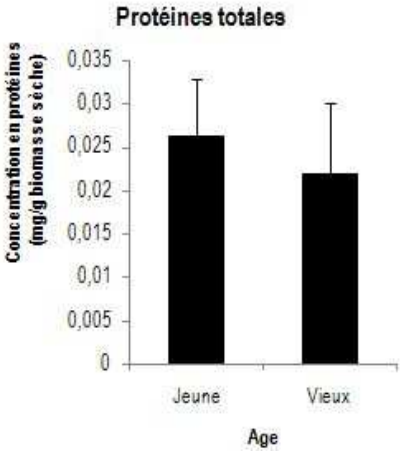


Figure 78: Concentrations en protéines totales chez Tortula ruralis *selon son âge (Test t de Student, n=9)*

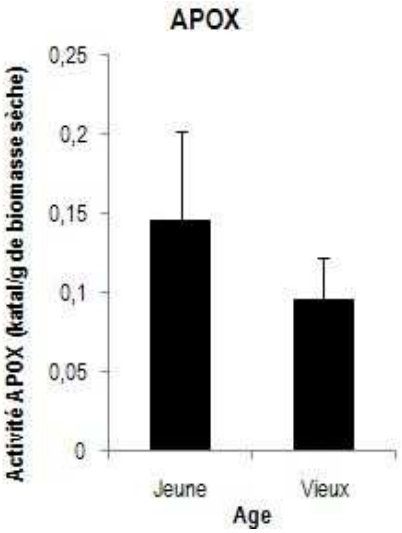


Figure 76: Activité de l'APOX chez Tortula ruralis *selon son âge (Test t de Student, n=9)*

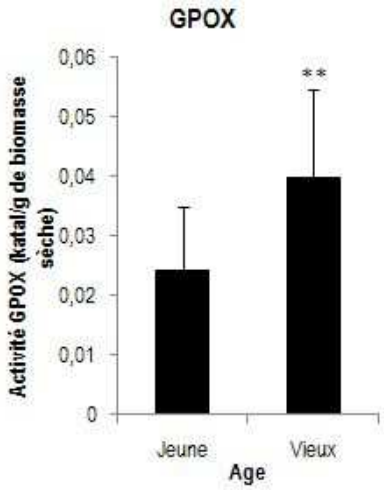


Figure 77: Activité de la GPOX chez Tortula ruralis *selon son âge (Test t de Student, n=9 ; ** : différence significative p<0,01)*

b) Influence de l'âge de la mousse sur l'intégrité des membranes lipidiques

Les concentrations en MDA en fonction de l'âge de *T. ruralis* sont présentées dans la figure 79.

Les concentrations en malondialdéhyde mesurées chez la population la plus jeune sont plus élevées. Cet aldéhyde indique une peroxydation des lipides membranaires. Une variabiltié importante de ce paramètre est à souligner, notamment chez la population la plus jeune.

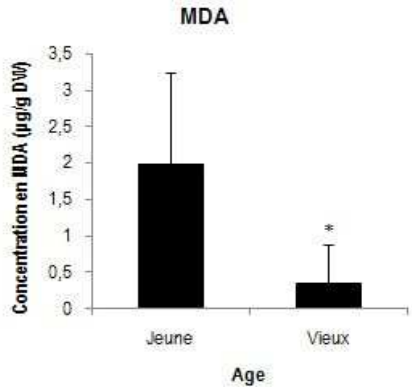


Figure 79: Concentration en MDA chez Tortula ruralis *selon son âge (test t de Student, n=9 ; ** : différence significative p<0,01)*

c) Influence de l'âge de la mousse sur les teneurs en chlorophylles et l'indice de phéophytinisation

Les concentrations en chlorophylles et l'indice de phéophytinisation chez *T. ruralis* en fonction de l'âge sont présentés dans les figures 80 et 81.

Les concentrations en chlorophylle sont significativement plus faibles chez les individus les plus âgés. Par contre, l'indice de phéophytinisation n'est pas différent, c'est-à-dire que la chlorophylle a n'est pas plus dégradée chez la population la plus âgée. Ainsi, les concentrations plus élevées en chlorophylles chez les organismes plus jeunes semblent liées à une activité photosynthétique plus élevée et non à une dégradation plus faible des pigments chlorophylliens.

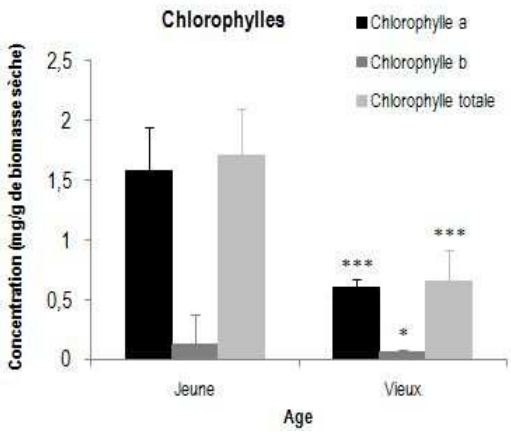


*Figure 81: Concentrations en chlorophylle a, b et totale chez Tortula ruralis selon l'âge (Test t de Student, n=9 ; différence significative * : p<0,05 ; *** : p<0,001)*

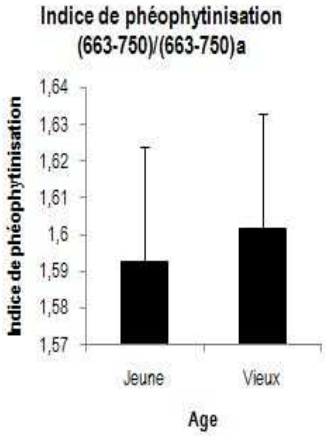


Figure 80: Indice de phéophytinisation chez Tortula ruralis *selon l'âge (Test t de Student, n=9)*

d) Discussion

Les concentrations du MDA et des chlorophylles sont significativement plus élevées chez la mousse jeune. Toutefois, l'étude du stress hydrique a mis en évidence une corrélation entre le MDA et la chlorophylle d'une part, et l'état d'hydratation, d'autre part. Comme la jeune mousse présente un état d'hydratation significativement plus élevé que celui de la mousse âgée, nous ne pouvons pas conclure à une influence de l'âge de la mousse sur les concentrations de MDA et des chlorophylles.

L'activité de la GPOX est significativement plus importante chez la mousse plus âgée. Ceci tend à démontrer une augmentation des ERO produites chez l'organisme plus âgé.

En conclusion, il est préférable de s'assurer d'une récolte homogène de mousse afin de limiter la variations des paramètres biologiques de cette dernière. Il semble également indispensable d'acclimater les mousses récoltées avant leur usage, afin d'homogénéiser leur état d'hydratation.

C. Etudes de l'accumulation des BTEX chez les bryophytes

1) Études de l'accumulation des BTEX *in situ* en conditions réalistes

Les recherches relatives à l'accumulation des BTEX *in* situ visent à déterminer la capacité du modèle bryophytique pour l'évaluation d'une contamination atmosphérique en BTEX. Les deux études menées dans le cadre de ces travaux ont deux objectifs : la première étude a pour objectif d'observer le profil d'accumulation de BTEX chez des mousses et de définir l'espèce la mieux adaptée à cette étude; le but de la seconde étude

est d'estimer la relation entre les concentrations atmosphériques en BTEX et celles chez la mousse. La finalité est de définir s'il est possible de développer un modèle bryophytique pour la biosurveillance de l'air contaminé par les BTEX.

a) *1ère étude* in situ *de l'accumulation des BTEX chez 3 espèces bryophytiques*

L'objet de cette étude est d'observer l'accumulation des BTEX chez 3 mousses afin de définir l'espèce plus adaptée à l'étude des BTEX chez les bryophytes et d'aborder le comportement des mousses vis-à-vis des BTEX.

i- Teneurs en BTEX chez les 3 espèces bryophytiques

Site industriel

La figure 82 présente les teneurs en benzène, toluène, ethylbenzène, méta,para-xylènes et orthoxylène chez les 3 espèces exposées sur le site industriel. Ces teneurs ont été mesurées sur des échantillons réalisés en laboratoire avant le début de l'exposition (référent TR), au début de l'exposition (T0), après 1 semaine d'exposition (T1), 2 semaines (T2), 4 semaines (T4) et 8 semaines (T8). Cette stratégie d'échantillonnage visait à définir le temps d'exposition nécessaire à l'observation d'une accumulation en BTEX.

Malgré la réplication des mesures (5 réplicats), les quantités en BTEX présentent une forte variabilité intra-espèces.

Pour les 5 types de BTEX mesurés, les quantités aux temps TR et T0 ne sont pas négligeables, et nous n'observons pas de différences significatives entre TR et T0.

Pour les 5 types de BTEX, on observe une tendance à l'augmentation des quantités mesurées chez les trois espèces dès la 1ère semaine d'exposition (T1) : cette augmentation n'est significative que pour le benzène chez *C. purpureus* et *P. purum* et pour le toluène chez *P. purum.*

A l'exception du benzène chez les 3 espèces et de l'éthylbenzène et des méta,para-xylènes chez *P. purum*, les quantités mesurées continuent plus ou moins à augmenter après la 2nde semaine (augmentation significative par rapport à TR chez *C. purpureus* pour le 4 composés).

Dès la 4ème semaine, les quantités mesurées tendent à diminuer à l'exception de l'ortho-xylène chez *T. ruralis* chez qui les quantités de ce composé continuent à augmenter de manière significaitve (par rapport à TR).

À la 5ème semaine, les quantités mesurées sont toutes inférieures à celles mesurées chez les mousses entreposées au laboratoire. Ces diminutions sont significatives pour les 5 composés chez *C. purpureus* et *T. ruralis*.

Globalement sur le site industriel, la variation des teneurs en BTEX chez les 3 espèces dans le cadre de cette

expérimentation ne correspond pas à un phénomène d'accumulation, et aucune des 3 espèces ne présente un profil accumulateur. *P. purum* présente les quantités les plus importantes de BTEX, les valeurs maximales mesurées sont respectivement de 516, 4558, 318, 1035 et 1151 ng/g de biomasse sèche. Chez *C. purpureus*, les quantités maximales de BTEX sont de 411, 3328, 217, 659 et 187 ng/g de biomasse sèche. Les quantités maximales de BTEX mesurées chez *T. ruralis* sont les plus faibles des trois expèces : 164, 2107, 170, 574 et 186 ng/g de biomasse sèche.

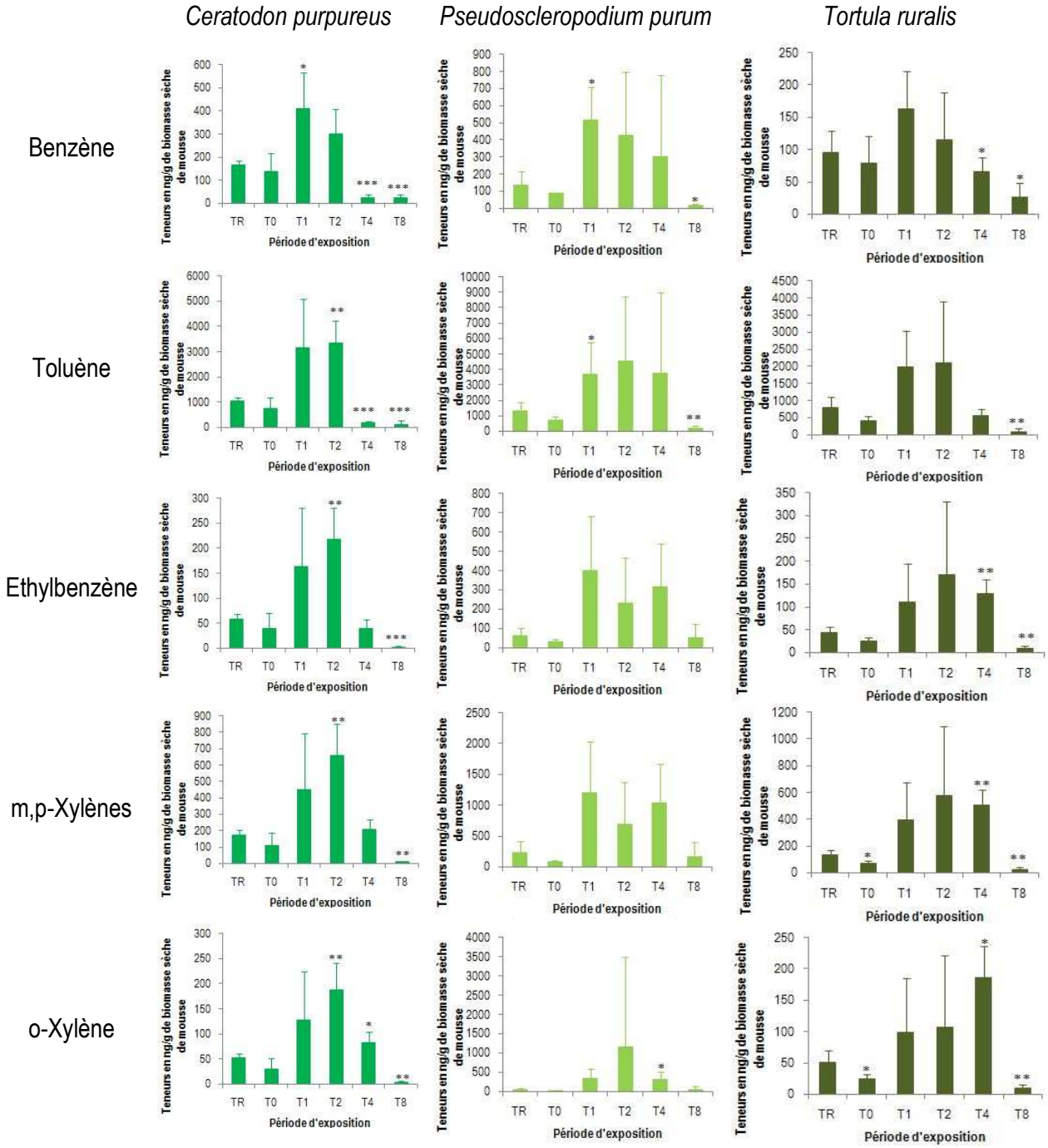


Figure 82: Concentrations en BTEX chez Ceratodon purpureus, Pseudoscleropodium purum *et* Tortula ruralis

*exposés sur le site industriel en ng/g de biomasse sèche de mousse (Test t Student pour échantillons appariés, n=5. Différence significative par rapport au référent TR à p<0,05 * ; p<0,01 **; p<0,001 ***)*

Site urbain

La figure 83 présente les teneurs en benzène, toluène, ethylbenzène, méta,para-xylènes et orthoxylène chez les 3 espèces de mousses exposées sur le site urbain. Sur ce site, les transplants de mousses ont été endommagés par des oiseaux au cours de la dernière période d'exposition. Aussi, l'analyse des teneurs en BTEX dans les mousses n'a pu être réalisée que pour les 4 premières semaines d'exposition.

L'analyse des résultats obtenus sur le site urbain est semblable à celle menée sur les résultats obtenus sur le site industriel. Les teneurs en BTEX augmentent dès la 1ère semaine d'exposition chez les 3 espèces. Cette augmentation est significative notamment chez *P. purum*. Tout comme observé dans l'analyse des résultats obtenus pour le site industriel, la variabilité intra-espèce observée ici est importante. La détérioration des transplants à la fin de l'exposition ne permet pas de déterminer si les teneurs en BTEX chez les mousses diminuent après les 8 semaines d'exposition. C'est pourquoi ce n'est pas vraiment semblable au site industriel. Chez *P. purum*, les valeurs mesurées à T0 sont significativement inférieures à celles à TR pour les 5 composés.

La tendance à l'augmentation à T2 est beaucoup moins nette que pour le site industriel, surtout chez *P. purum* chez qui on note une diminution des valeurs pour les 5 composés mesurés.

Dès la 4ème semaine, les quantités mesurées tendent à diminuer à l'exception de l'ortho-xylène chez *C. purpureus* chez qui les quantités de ce composé restent plus ou moins identiques.

Aucune des 3 espèces ne présente un profil accumulateur.

P. purum présente les quantités les plus importantes de BTEX, les valeurs maximales mesurées sont respectivement de 545, 8213, 746, 2052 et 565 ng/g de biomasse sèche. Chez *C. purpureus*, les quantités maximales de BTEX sont de 268, 2207, 144, 433 et 123 ng/g de biomasse sèche. Les quantités maximales de BTEX mesurées chez *T. ruralis* sont respectivement de : 231, 2634, 285, 970 et 589 ng/g de biomasse sèche.

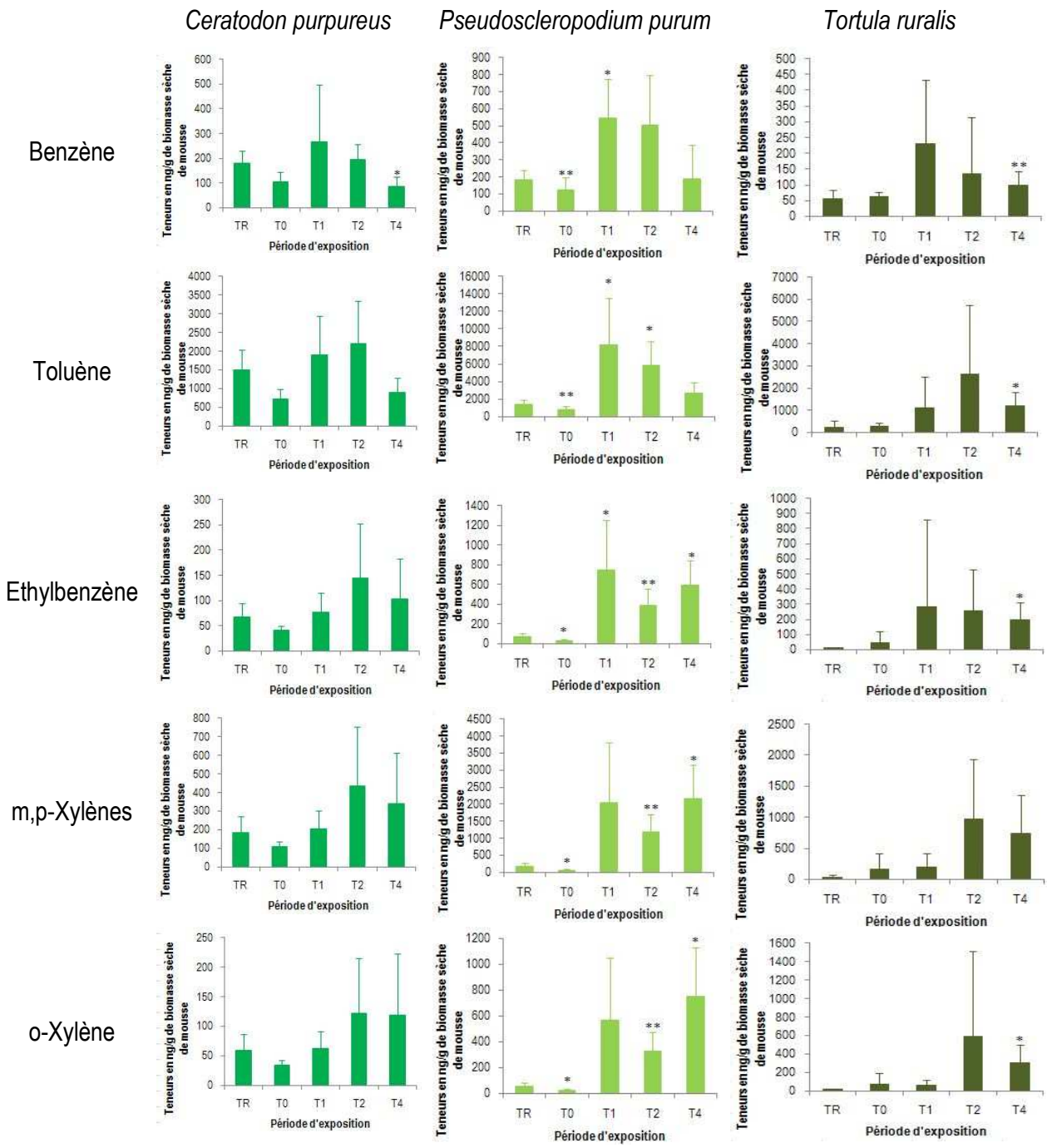


Figure 83: Concentrations BTEX chez Ceratodon purpureus, Pseudoscleropodium purum *et* Tortula ruralis *exposés sur le site urbain en ng/g de biomasse sèche de mousse (Test t Student pour échantillons appariés, n=5. Différence significative par rapport au référent TR à p<0,05 * ; p<0,01 ** ; p<0,001 ***)*

ii- Facteurs d'enrichissement en BTEX chez *Ceratodon purpureus, Pseudoscleropodium purum* et.*Tortula ruralis*

Pour approfondir l'analyse et la comparaison des capacités accumulatrices de BTEX pour les 3 espèces bryophytiques, nous calculons les facteurs d'enrichissement (FE) en BTEX. Les FE correspondent au rapport

entre la teneur en un composé à un temps d'exposition x et la teneur au temps de référence (TR).

FE = [BTEX]° Tx / [BTEX]° TR

Ce ratio permet de comparer les espèces entre elles.

Pour exprimer les différences des FE entre les espèces, le rapport entre les FE des espèces est calculé par paire d'espèces. Les figures 84 et 85 représentent les rapports des FE entre *P. purum* et *C. purpureus*, entre *T. ruralis* et *C. purpureus,* et entre *P. purum* et *T. ruralis*. Le calcul du rapport des FE permet de comparer deux espèces entre elles (FE_{sp1}/FE_{sp2}) : une valeur supérieure à 1 du ratio indique que l'espèce sp1 présente une capacité d'accumulation supérieure à celle de l'espèce sp2.

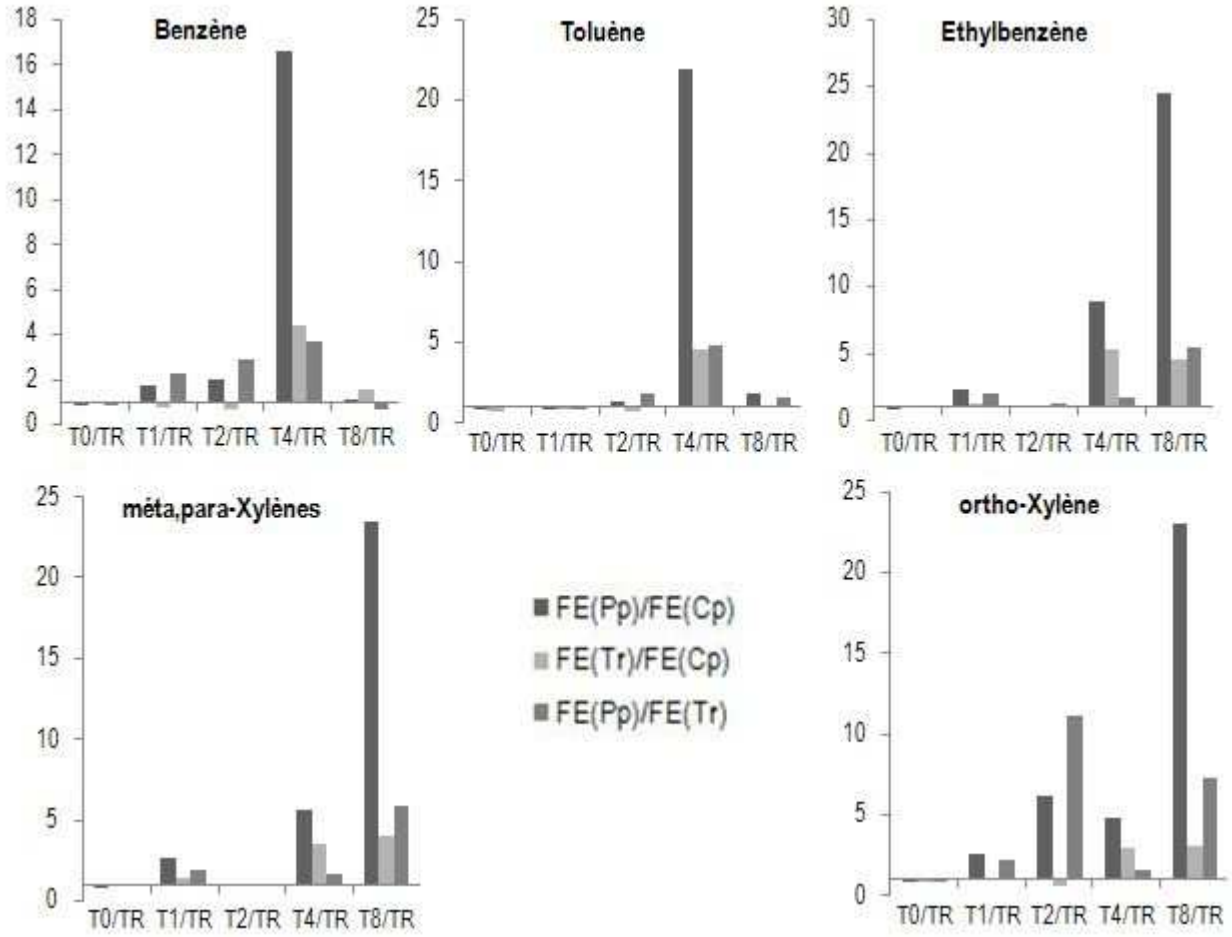


Figure 84: Rapports des facteurs d'enrichissement en BTEX chez les 3 espèces bryophytiques (FE : facteur d'enrichissement; Cp: Ceratodon purpureus*; Pp:* Pseudoscleropodium purum*; Tr:* Tortula ruralis*) pour le site industriel*

Quels que soient le site d'exposition et le composé, les facteurs d'enrichissement de *P. purum* et de *T. ruralis* sont le plus souvent supérieurs à ceux de *C. purpureus*.

Ainsi, sur le site industriel et pour les différences maximales observées, les FE pour les 5 BTEX chez *P purum* sont respectivement 16.7, 22.0, 24.4, 23.5 et 23.0 fois supérieures aux FE de *C. purpureus*. les FE pour les 5 BTEX chez *T. ruralis* sont respectivement 4.4, 4.6, 5.2, 4.0 et 3.2 fois supérieures aux FE de *C. purpureus*.

Sur le site urbain et pour les différences maximales observées, les FE pour les 5 BTEX chez *P. purum* sont respectivement 2.5, 4.7, 10.1, 11.5 et 11.3 fois supérieures aux FE de *C. purpureus*. les FE pour les 5 BTEX chez *T. ruralis* sont respectivement 5.0, 31.8, 50.4, 16.0 et 18.0 fois supérieures aux FE de *C. purpureus*.

Cette différence est plus prononcée en fin d'exposition, suggérant un accroissement de la différence de l'enrichissement en BTEX entre les espèces au cours de l'exposition. Ainsi, plus *P. purum* et *T. ruralis* sont exposées, plus l'augmentation de leurs teneurs en BTEX est supérieure à celle de *C. purpureus*.

Par contre, il n'existe pas de différence nette entre *T. ruralis* et *P. purum*. Les FE sont plus importants chez *T. ruralis* pour le site industriel, et plus importants chez *P. purum* pour le site urbain.

Aussi, dans un premier temps, ces 2 espèces présentent de meilleures aptitudes pour l'étude des BTEX.

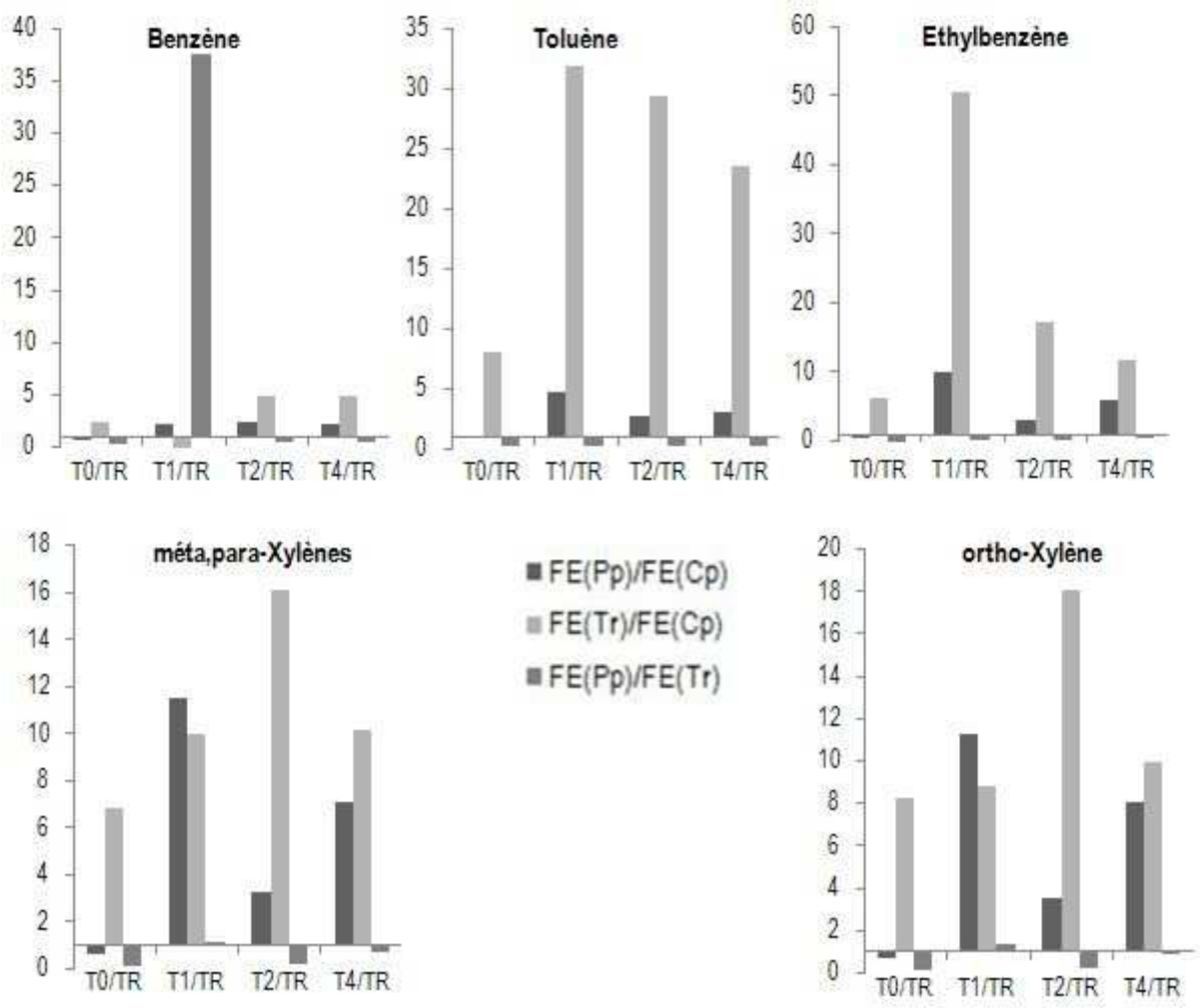


Figure 85: Rapports des facteurs d'enrichissement en BTEX chez les 3 espèces bryophytiques (FE: facteur d'enrichissement; Cp: Ceratodon purpureus*; Pp:* Pseudoscleropodium purum*; Tr:* Tortula ruralis*) pour le site urbain*

iii- Biomarqueurs de vitalité des mousses

Pour compléter l'étude du comportement des mousses vis-à-vis des BTEX, des biomarqueurs de vitalité ont été mesurés chez les 3 mousses, en parallèle des dosages en BTEX.

L'étude de ces biomarqueurs avait pour objectif de s'assurer de l'efficacité du système d'exposition pour chacune des 3 espèces (*cf*. III..B.5).

Les travaux, précédemment présentés, concernant l'impact du stress hydrique chez les bryophytes ont mis en évidence la nécessité de maintenir un taux d'hydratation de la mousse constant lors de l'étude du stress oxydant induit par des contaminants. En outre, nous ne savons pas si l'état d'hydratration constitue un paramètre favorisant l'accumulation ou la rétention des BTEX.

Les figures 86, 87 et 88 présentent respectivement l'état d'hydratation des mousses au cours de l'exposition et pour les deux sites, leur concentration en chlorophylle a et l'indice de phéophytinisation.

Concernant la mesure du taux d'hydratation chez les 3 espèces bryophytiques, les résultats obtenus lors de cette expérimentation de terrain a montré que le taux d'hydratation chez *P. purum* diminue très fortement dès la mise en place de la mousse sur les sites d'exposition. Chez *C. purpureus* et *T. ruralis*, l'état d'hydratation est constant sauf au cours de la dernière période d'exposition, correspondant au mois de juillet, pour laquelle ces 2 mousses se retrouvent très desséchées.

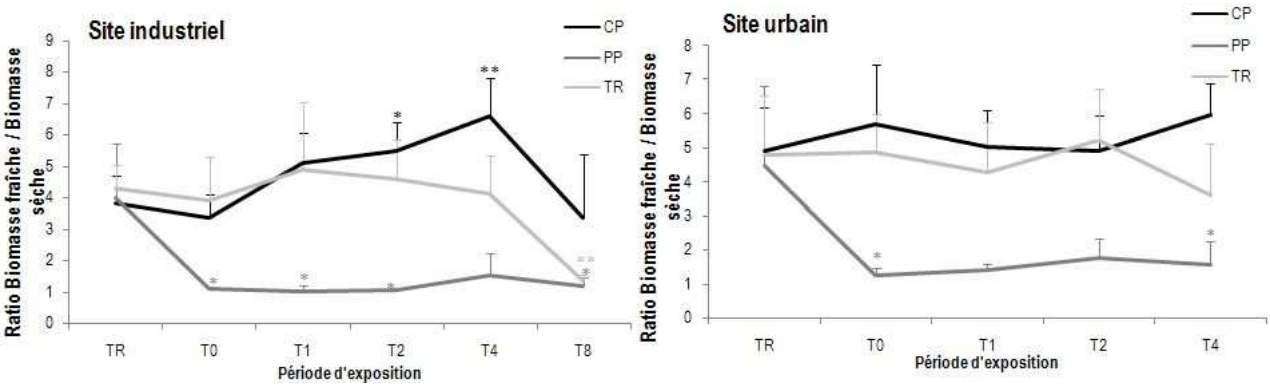


Figure 86: Etat d'hydratation chez les 3 espèces bryophytiques (CP : Ceratodon purpureus*; PP :* Pseudoscleropodium purum*; TR :* Tortula ruralis*) au cours des 8 semaines d'exposition sur les sites industriel et urbain (Test t de Student, n=5 ; différence significative * : p<0,05 ; ** : p<0,01 ; *** : p<0,001)*

Dans le cadre de cette expérience, la concentration en chlorophylle a chez *P. purum* diminue significativement au cours de l'exposition, tandis qu'elle se maintient chez les 2 autres espèces. Quant à l'indice de dégradation de la chlorophylle, il varie fortement chez *P. purum* et *C. purpureus* alors qu'il est très stable chez *T. ruralis*.

L'analyse des biomarqueurs de vitalité traduit un meilleur maintien de l'état sanitaire chez *T. ruralis*.

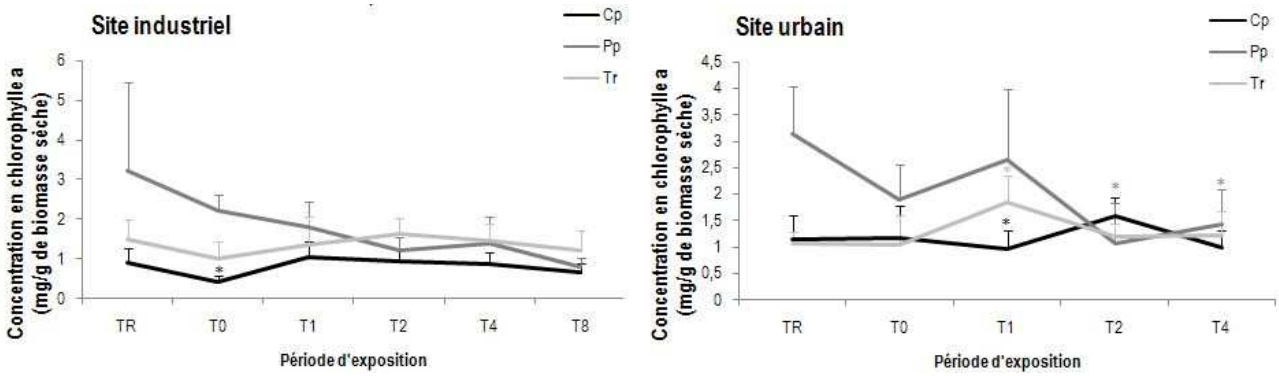


Figure 87: Concentration en chlorophylle a chez les 3 espèces bryophytiques (CP : Ceratodon purpureus*; PP :* Pseudoscleropodium purum*; TR :* Tortula ruralis*) au cours des 8 semaines d'exposition sur les sites industriel et urbain (Test t de Student, n=5 ; différence significative * : p<0,05 ; ** : p<0,01 ; *** : p<0,001)*

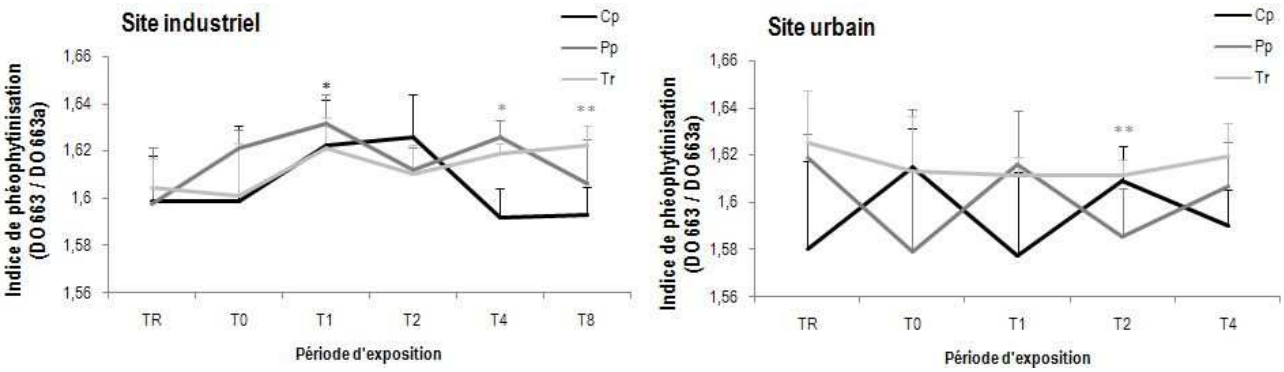


Figure 88: Indice de phéophytinisation chez les 3 espèces bryophytiques (CP : Ceratodon purpureus*; PP :* Pseudoscleropodium purum*; TR :* Tortula ruralis*) au cours des 8 semaines d'exposition sur les sites industriel et urbain (Test t de Student, n=5 ; différence significative * : p<0,05 ; ** : p<0,01 ; *** : p<0,001)*

Les informations obtenues à partir du calcul des facteurs d'enrichissement en BTEX chez les 3 espèces ont révélé un meilleur comportement de *P. purum* et de *T. ruralis.* L'étude des biomarqueurs de vitalité en relation avec un stress hydrique montre que *T. ruralis* est l'espèce présentant la meilleure stabilité. Le choix de *T. ruralis* s'impose donc pour la poursuite des expérimentations.

iv- Discussion de l'accumulation des BTEX chez les mousses

Dans l'ensemble, les teneurs en BTEX chez les mousses augmentent dans un premier temps puis diminuent en fin d'exposition. Ce phénomène ne correspond pas à un phénomène d'accumulation. De plus, ces résultats ne permettent pas de déterminer si les composés sont absorbés par les mousses ou simplement adsorbés à la surface de celles-ci. Compte tenu des caractéristiques physiologiques (poïkilohydrie) et morphologiques (absence de cuticule) des mousses, les cellules de ces dernières peuvent constituer une simple interface d'échange et les teneurs intracellulaires en BTEX s'équilibreraient ainsi en fonction des concentrations atmosphériques. Chez les végétaux supérieurs, il a pu être démontré que l'accumulation des COV est un phénomène actif résultant de relations d'équilibre entre les concentrations dans l'air et les concentrations dans la plante (Hiatt, 1999 ; Keymeulen *et al*. 1993, 1995 ; Collins & Bell, 2000).

Cependant, les faibles variations des concentrations atmosphériques en BTEX observées ne permettent pas d'expliquer la diminution des teneurs en BTEX dans les mousses en fin d'exposition. En effet, les concentrations atmosphériques sont mesurées par échantillonnage passif sur des cartouches et représentent la moyenne des concentrations sur 1 semaine d'exposition. Les variations des concentrations susceptibles de se produire au cours d'une semaine ne sont donc pas connues. Dans la zone industrielle de Dunkerque, les sources d'émissions des BTEX émettent ces composés le plus souvent sous forme de bouffées, mais ce phénomène n'est pas décelable par des échantillonnages hebdomadaires de l'air. Ainsi, si les concentrations

étaient plus faibles au moment de l'échantillonnage des mousses à la fin de la 8ème semaine, la diminution des teneurs dans les mousses pourrait correspondre à un relargage des composés. En effet, l'équilibre des teneurs en BTEX entre les mousses et l'air pourrait se faire très rapidement, comme cela se produit chez les végétaux supérieurs. Collins *et al* (1998) ont ainsi pu mesurer que 50% du benzène absorbé par le chou pouvaient être relargués en moins de dix minutes. Par ailleurs, la diminution des teneurs en BTEX chez les mousses au cours de la 8ème semaine peut également être induite par une dégradation des composés adsorbés à la surface de la mousse sous l'effet notamment des rayons ultra-violet (Arroniz-Crespo *et al*, 2008) ou par les micro-organismes associés à la mousse (Ares *et al*., 2009).

Pour compléter cette analyse, les tableaux 23, 24 et 25 présentent une étude des corrélations entre les teneurs en BTEX dans les mousses exposées et les différents paramètres environnementaux (concentrations atmosphériques en BTEX, en dioxyde de soufre et en particules PM_{10}, conditions météorologiques). Cette étude montre que les concentrations en BTEX chez les mousses sont anti-corrélées avec celles de l'air. De plus, il existe une corrélation quasi systématique entre les concentrations en BTEX chez les trois espèces bryophytiques et la pression atmosphérique ainsi que l'humidité relative. Inversement, elles sont anti-corrélées avec la température et la force des vents. D'autre part, les concentrations atmosphériques sont corrélées avec la température et anti-corrélées avec la pression atmosphérique et l'humidité relative. Cependant, la force du vent et les concentrations atmosphériques ne sont pas corrélées. Nous pouvons supposer que le vent et la chaleur seraient défavorables à l'accumulation des BTEX par les mousses. En somme, la force du vent serait le paramètre environnemental permettant d'expliquer la diminution des concentrations en BTEX dans les mousses sans que les concentrations atmosphériques ne diminuent. Le vent limiterait l'adsorption des COV sur la mousse ou favoriserait leur désorption (Hiatt, 1999).
Selon Smith et Jones (2000), les BTEX atmosphériques se trouveraient exclusivement sous forme gazeuse. Selon Grover (1991), les molécules organiques sous forme vapeur peuvent se trouver dans les gouttelettes d'eau ou adsorbées sur les particules atmosphériques. Ceci influence donc la biodisponibilité des composés.
Cependant, nos résultats montrent que les concentrations atmosphériques des particules PM_{10} sont corrélées avec les concentrations des BTEX chez les mousses. Nous pouvons donc émettre l'hypothèse que les mousses accumuleraient les BTEX par l'intermédiaire de ces particules. Les mousses, et plus particulièrement les mousses acrocarpes, sont bien adaptées au piégeage des particules. Faburé *et al*. (soumis) ont comparé les performances d'accumulation des éléments traces métalliques par une mousse acrocarpe et une mousse pleurocarpe sur trois sites français dont le site industriel de Dunkerque. Les résultats ont montré une importante contamination métallique de la mousse acrocarpe sur le site de Dunkerque, en relation avec les capacités de piégeage des particules. Les BTEX seraient donc en réalité adsorbés sur les particules, elles

mêmes, piégées par les mousses. Les BTEX peuvent donc rester adsorbés sur les particules avant d'être dégradés, absorbés par la mousse ou désorbés.

C. purpureus	Biomasse fraîche/Biomasse sèche	Concentration en chlorophylle a (mg/g BS)	Indice de phéophytinisation	Conc. Air Benzène (µg/m^3)	Conc. Air Toluène (µg/m^3)	Conc. Air Ethylbenzène (µg/m^3)	Conc. Air mp-Xylènes (µg/m^3)	Conc. Air o-Xylène (µg/m^3)	Température (°C)	Pression atmosphérique	Humidité relative (%)	Force des vents (km/h)	Conc. Air Dioxyde de soufre (µg/m^3)	Conc. Air Particules PM_{10} (µg/m^3)
Temps	0,057	-0,257	-0,316	0,147	0,935	0,973	0,973	0,973	1,000	-0,887	-1,000	0,094	-0,385	-0,789
Benzène (ng/g BS)	0,062	0,332	0,487	-0,133	-0,719	-0,811	-0,805	-0,805	-0,814	0,745	0,814	-0,278	0,533	0,764
Toluène (ng/g BS)	0,173	0,408	0,471	-0,178	-0,661	-0,753	-0,769	-0,769	-0,764	0,672	0,764	-0,380	0,447	0,683
Ethylbenzène (ng/g BS)	0,364	0,418	0,398	-0,069	-0,419	-0,571	-0,579	-0,579	-0,565	0,395	0,565	-0,521	0,283	0,443
mp-xylènes (ng/g BS)	0,465	0,382	0,353	0,093	-0,276	-0,443	-0,396	-0,396	-0,402	0,190	0,402	-0,594	0,195	0,252
o-xylène (ng/g BS)	0,518	0,381	0,285	0,143	-0,252	-0,419	-0,366	-0,366	-0,373	0,145	0,373	-0,556	0,136	0,182
Biomasse fraîche / Biomasse sèche	1,000	0,481	0,005	0,245	0,164	0,028	0,050	0,050	0,057	-0,329	-0,057	-0,300	-0,385	-0,364
Concentration en chlorophylle a (mg/g BS)	0,481	1,000	0,271	-0,313	-0,184	-0,194	-0,204	-0,204	-0,257	0,148	0,257	-0,364	-0,044	0,294
Indice de phéophytinisation	0,005	0,271	1,000	0,150	-0,318	-0,390	-0,281	-0,281	-0,316	0,325	0,316	-0,310	0,552	0,413
Conc. Air Benzène (µg/m^3)	0,245	-0,313	0,150	1,000	0,036	-0,071	0,214	0,214	0,147	-0,220	-0,147	0,147	0,250	-0,321
Conc. Air Toluène (µg/m^3)	0,164	-0,184	-0,318	0,036	1,000	0,946	0,873	0,873	0,935	-0,935	-0,935	-0,037	-0,546	-0,800
Conc. Air Ethylbenzène (µg/m^3)	0,028	-0,194	-0,390	-0,071	0,946	1,000	0,929	0,929	0,973	-0,863	-0,973	0,092	-0,500	-0,750
Conc. Air mp-Xylènes (µg/m^3)	0,050	-0,204	-0,281	0,214	0,873	0,929	1,000	1,000	0,973	-0,863	-0,973	0,092	-0,321	-0,714
Conc. Air o-Xylène (µg/m^3)	0,050	-0,204	-0,281	0,214	0,873	0,929	1,000	1,000	0,973	-0,863	-0,973	0,092	-0,321	-0,714
Température (°C)	0,057	-0,257	-0,316	0,147	0,935	0,973	0,973	0,973	1,000	-0,887	-1,000	0,094	-0,385	-0,789
Pression atmosphérique	-0,329	0,148	0,325	-0,220	-0,935	-0,863	-0,863	-0,863	-0,887	1,000	0,887	0,170	0,642	0,899
Humidité relative (%)	-0,057	0,257	0,316	-0,147	-0,935	-0,973	-0,973	-0,973	-1,000	0,887	1,000	-0,094	0,385	0,789
Force des vents (km/h)	-0,300	-0,364	-0,310	0,147	-0,037	0,092	0,092	0,092	0,094	0,170	-0,094	1,000	0,128	0,018
Conc. Air Dioxyde de soufre (µg/m^3)	-0,385	-0,044	0,552	0,250	-0,546	-0,500	-0,321	-0,321	-0,385	0,642	0,385	0,128	1,000	0,679
Conc. Air Particules PM_{10} (µg/m^3)	-0,364	0,294	0,413	-0,321	-0,800	-0,750	-0,714	-0,714	-0,789	0,899	0,789	0,018	0,679	1,000

Tableau 23: Corrélation des teneurs en BTEX et des biomarqueurs chez Ceratodon purpureus *avec les paramètres environnementaux (concentrations atmosphériques en BTEX, particules et dioxyde de soufre; paramètres météorologiques) des 2 sites d'exposition (industriel et urbain) au cours des 8 semaines d'exposition (Corrélation de Spearman, n=40 ; en rouge corrélation significative p<0,05)*

P. purum	Biomasse fraîche/Biomasse séche	Concentration en chlorophylle a (mg/g BS)	Indice de phéophyti-nisation	Conc. Air Benzène (µg/m^3)	Conc. Air Toluène (µg/m^3)	Conc. Air Ethylbenzène (µg/m^3)	Conc. Air mp-Xylènes (µg/m^3)	Conc. Air o-Xylène (µg/m^3)	Température (°C)	Pression atmosphérique	Humidité relative (%)	Force des vents (km/h)	Conc. Air Dioxyde de soufre (µg/m^3)	Conc. Air Particules PM_{10} (µg/m^3)
Temps	0,092	-0,475	-0,223	0,147	0,935	0,973	0,973	0,973	1,000	-0,887	-1,000	0,094	-0,385	-0,789
Benzène (ng/g BS)	0,013	0,358	-0,019	-0,144	-0,636	-0,689	-0,679	-0,679	-0,716	0,556	0,716	-0,280	0,184	0,543
Toluène (ng/g BS)	0,226	0,379	-0,093	-0,311	-0,542	-0,566	-0,629	-0,629	-0,635	0,462	0,635	-0,327	-0,023	0,417
Ethylbenzène (ng/g BS)	0,332	0,345	0,064	-0,289	-0,200	-0,297	-0,422	-0,422	-0,398	0,151	0,398	-0,142	-0,368	0,136
mp-xylènes (ng/g BS)	0,360	0,301	-0,015	-0,276	-0,130	-0,238	-0,355	-0,355	-0,337	0,076	0,337	-0,177	-0,406	0,089
o-xylène (ng/g BS)	0,353	0,312	0,014	-0,207	-0,104	-0,212	-0,314	-0,314	-0,294	0,028	0,294	-0,201	-0,410	0,021
Biomasse fraîche / Biomasse sèche	1,000	-0,041	-0,330	-0,494	0,146	0,223	0,083	0,083	0,092	-0,155	-0,092	-0,089	-0,508	-0,115
Concentration en chlorophylle a (mg/g BS)	-0,041	1,000	0,418	0,049	-0,393	-0,457	-0,480	-0,480	-0,475	0,307	0,475	0,067	-0,080	0,164
Indice de phéophytinisation	-0,330	0,418	1,000	0,540	-0,249	-0,316	-0,176	-0,176	-0,223	0,126	0,223	0,277	0,110	-0,014
Conc. Air Benzène (µg/m^3)	-0,494	0,049	0,540	1,000	0,036	-0,071	0,214	0,214	0,147	-0,220	-0,147	0,147	0,250	-0,321
Conc. Air Toluène (µg/m^3)	0,146	-0,393	-0,249	0,036	1,000	0,946	0,873	0,873	0,935	-0,935	-0,935	-0,037	-0,546	-0,800
Conc. Air Ethylbenzène (µg/m^3)	0,223	-0,457	-0,316	-0,071	0,946	1,000	0,929	0,929	0,973	-0,863	-0,973	0,092	-0,500	-0,750
Conc. Air mp-Xylènes (µg/m^3)	0,083	-0,480	-0,176	0,214	0,873	0,929	1,000	1,000	0,973	-0,863	-0,973	0,092	-0,321	-0,714
Conc. Air o-Xylène (µg/m^3)	0,083	-0,480	-0,176	0,214	0,873	0,929	1,000	1,000	0,973	-0,863	-0,973	0,092	-0,321	-0,714
Température (°C)	0,092	-0,475	-0,223	0,147	0,935	0,973	0,973	0,973	1,000	-0,887	-1,000	0,094	-0,385	-0,789
Pression atmosphérique	-0,155	0,307	0,126	-0,220	-0,935	-0,863	-0,863	-0,863	-0,887	1,000	0,887	0,170	0,642	0,899
Humidité relative (%)	-0,092	0,475	0,223	-0,147	-0,935	-0,973	-0,973	-0,973	-1,000	0,887	1,000	-0,094	0,385	0,789
Force des vents (km/h)	-0,089	0,067	0,277	0,147	-0,037	0,092	0,092	0,092	0,094	0,170	-0,094	1,000	0,128	0,018
Conc. Air Dioxyde de soufre (µg/m^3)	-0,508	-0,080	0,110	0,250	-0,546	-0,500	-0,321	-0,321	-0,385	0,642	0,385	0,128	1,000	0,679
Conc. Air Particules PM_{10} (µg/m^3)	-0,115	0,164	-0,014	-0,321	-0,800	-0,750	-0,714	-0,714	-0,789	0,899	0,789	0,018	0,679	1,000

Tableau 24: Corrélation des teneurs en BTEX et des biomarqueurs chez Pseudoscleropodium purum *avec les paramètres environnementaux (concentrations atmosphériques en BTEX, particules et dioxyde de soufre; paramètres météorologiques) des 2 sites d'exposition (industriel et urbain) au cours des 8 semaines d'exposition (Corrélation de Spearman, n=40 ; en rouge corrélation significative p<0,05)*

T. ruralis	Biomasse fraîche/Biomasse sèche	Concentration en chlorophylle a (mg/g BS)	Indice de phéophytinisation	Conc. Air Benzène (µg/m^3)	Conc. Air Toluène (µg/m^3)	Conc. Air Ethylbenzène (µg/m^3)	Conc. Air mp-Xylènes (µg/m^3)	Conc. Air o-Xylène (µg/m^3)	Température (°C)	Pression atmosphérique	Humidité relative (%)	Force des vents (km/h)	Conc. Air Dioxyde de soufre (µg/m^3)	Conc. Air Particules PM_{10} (µg/m^3)
Temps	-0,434	-0,202	0,252	0,147	0,935	0,973	0,973	0,973	1,000	-0,887	-1,000	0,094	-0,385	-0,789
Benzène (ng/g BS)	0,164	0,079	-0,296	0,125	-0,239	-0,376	-0,328	-0,328	-0,348	0,207	0,348	-0,203	0,181	0,265
Toluène (ng/g BS)	0,264	0,061	-0,362	-0,031	-0,292	-0,412	-0,386	-0,386	-0,411	0,260	0,411	-0,336	0,167	0,351
Ethylbenzène (ng/g BS)	0,262	0,045	-0,360	0,021	0,084	-0,055	-0,050	-0,050	-0,058	-0,179	0,058	-0,457	-0,214	-0,082
mp-xylènes (ng/g BS)	0,414	0,062	-0,310	-0,003	0,010	-0,122	-0,091	-0,091	-0,128	-0,125	0,128	-0,506	-0,185	0,007
o-xylène (ng/g BS)	0,302	0,013	-0,235	0,003	0,125	-0,017	0,004	0,004	-0,037	-0,260	0,037	-0,462	-0,362	-0,119
Biomasse fraîche / Biomasse sèche	1,000	0,305	-0,234	-0,024	-0,349	-0,434	-0,395	-0,395	-0,434	0,213	0,434	-0,478	0,011	0,243
Concentration en chlorophylle a (mg/g BS)	0,305	1,000	0,096	-0,001	-0,196	-0,199	-0,263	-0,263	-0,202	0,147	0,202	-0,048	-0,062	-0,040
Indice de phéophytinisation	-0,234	0,096	1,000	0,266	0,210	0,205	0,277	0,277	0,252	-0,186	-0,252	0,316	0,027	-0,161
Conc. Air Benzène (µg/m^3)	-0,024	-0,001	0,266	1,000	0,036	-0,071	0,214	0,214	0,147	-0,220	-0,147	0,147	0,250	-0,321
Conc. Air Toluène (µg/m^3)	-0,349	-0,196	0,210	0,036	1,000	0,946	0,873	0,873	0,935	-0,935	-0,935	-0,037	-0,546	-0,800
Conc. Air Ethylbenzène (µg/m^3)	-0,434	-0,199	0,205	-0,071	0,946	1,000	0,929	0,929	0,973	-0,863	-0,973	0,092	-0,500	-0,750
Conc. Air mp-Xylènes (µg/m^3)	-0,395	-0,263	0,277	0,214	0,873	0,929	1,000	1,000	0,973	-0,863	-0,973	0,092	-0,321	-0,714
Conc. Air o-Xylène (µg/m^3)	-0,395	-0,263	0,277	0,214	0,873	0,929	1,000	1,000	0,973	-0,863	-0,973	0,092	-0,321	-0,714
Température (°C)	-0,434	-0,202	0,252	0,147	0,935	0,973	0,973	0,973	1,000	-0,887	-1,000	0,094	-0,385	-0,789
Pression atmosphérique	0,213	0,147	-0,186	-0,220	-0,935	-0,863	-0,863	-0,863	-0,887	1,000	0,887	0,170	0,642	0,899
Humidité relative (%)	0,434	0,202	-0,252	-0,147	-0,935	-0,973	-0,973	-0,973	-1,000	0,887	1,000	-0,094	0,385	0,789
Force des vents (km/h)	-0,478	-0,048	0,316	0,147	-0,037	0,092	0,092	0,092	0,094	0,170	-0,094	1,000	0,128	0,018
Conc. Air Dioxyde de soufre (µg/m^3)	0,011	-0,062	0,027	0,250	-0,546	-0,500	-0,321	-0,321	-0,385	0,642	0,385	0,128	1,000	0,679
Conc. Air Particules PM_{10} (µg/m^3)	0,243	-0,040	-0,161	-0,321	-0,800	-0,750	-0,714	-0,714	-0,789	0,899	0,789	0,018	0,679	1,000

Tableau 25: Corrélation des teneurs en BTEX et des biomarqueurs chez Tortula ruralis *avec les paramètres environnementaux (concentrations atmosphériques en BTEX, particules et dioxyde de soufre; paramètres météorologiques) des 2 sites d'exposition (industriel et urbain) au cours des 8 semaines d'exposition (Corrélation de Spearman, n=40 ; en rouge corrélation significative p<0,05)*

b) 2nde expérimentation in situ *(octobre 2008) : étude des capacités accumulatrices des BTEX chez* Tortula ruralis

Les études précédentes ont orienté le choix de la mousse pour cette expérimentation sur *T. ruralis*.

Cette 2nde expérimentation *in situ* va constituer une affirmation ou une infirmation sur une plus grande échelle et avec des sources émettrices de typologies différentes, de ce qui s'est passé au cours de la 1ère expérimentation.

L'analyse en GC/MS des échantillons de *T. ruralis* prélevés avant et après les 2 semaines d'exposition sur les 24 sites du littoral dunkerquois n'ont pas permis de déterminer des teneurs en BTEX. En effet, les pics chromatographiques observés (figure 89) sont inférieurs aux limites de détection de l'appareil et de ce fait, ils ne peuvent être ni mesurés ni quantifiés.

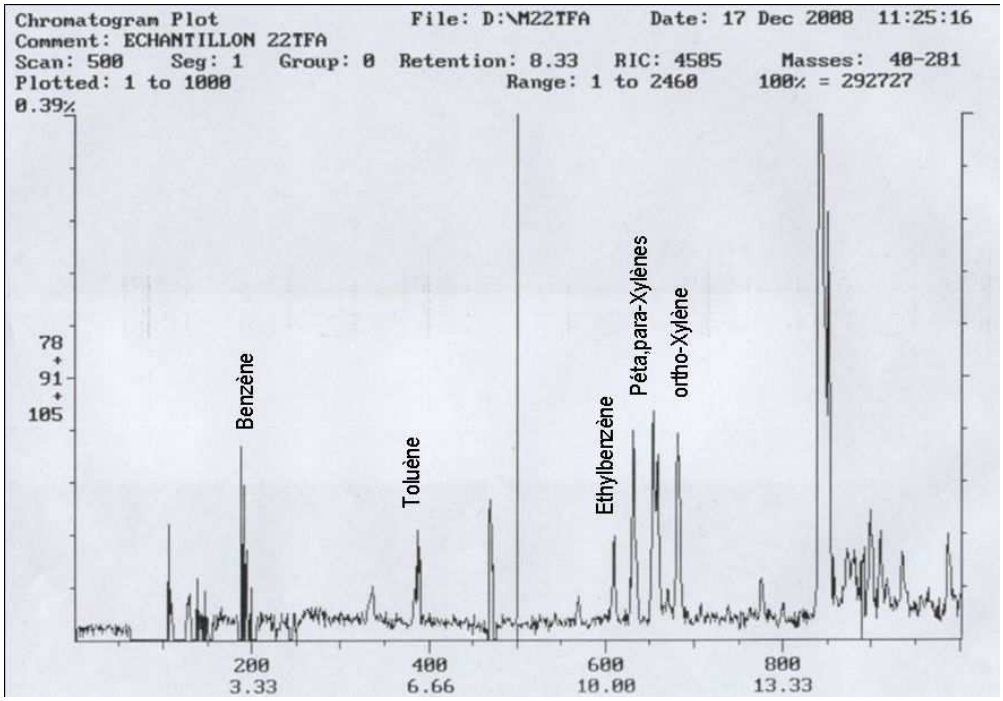


Figure 89: Exemple de chromatogramme observé au cours de l'analyse des échantillons de Tortula ruralis après exposition

Toutes les conditions étaient requises pour obtenir des résultats similaires à la 1ère expérimentation *in situ*. Lors de la 2nde expérimentation *in situ*, les concentrations atmosphériques en BTEX mesurées par tubes passifs étaient comparables à celles enregistrées lors de la 1ère. D'autre part, nous avons exposé la mousse la plus performante et ce, pendant deux semaines, cette période s'étant révélée suffisante pour obtenir des variations significatives des quantités de BTEX dans les mousses. Par contre, les paramètres météorologiques ont différé d'une expérimentation à l'autre. En effet, lors de la récolte des mousses en fin de seconde semaine, les vents étaient majoritairement du sud. Ils étaient également plus forts que lors de la 1ère

exposition (*cf*. figure 19 et tableau 8). Compte tenu de la localisation de notre zone d'étude par rapport aux sources émettrices de BTEX, des vents de sud ne rabattent pas les polluants sur nos sites d'exposition mais favorisent leur dispersion vers la Mer du Nord. Cela a pu être vérifié par une étude de modélisation des BTEX atmosphériques sur le littoral Calais-Dunkerque.

Rappelons que pour la 1ère expérimentation, nous avions mis en évidence une anticorrélation entre la force des vents et les teneurs en BTEX mesurés chez les mousses sans qu'il n'y ait de corrélation entre la force des vents et les teneurs atmsophériques en BTEX. Des vents à la fois de sud et de force importante ont pu soit favoriser la désorption, soit limiter la fixation des BTEX chez les mousses exposées. (Hiatt, 1999)

c) Conclusion sur les études d'accumulation in situ

Le comportement des mousses vis-vis des BTEX serait fonction de plusieurs paramètres :

- selon l'espèce, les concentrations en BTEX chez la mousse ainsi que les facteurs d'enrichissement diffèrent. Ainsi, dans le cadre de nos expériences, *P. purum* et *T. ruralis* présentent des quantités de BTEX et des facteurs d'enrichissement supérieurs ou égaux à ceux de *C. purpureus* ;
- en fonction des conditions météorologiques, l'adsorption des BTEX chez la mousse varie. Le vent constitue l'un des principaux facteurs limitant l'adsorption ou favorisant la désorption des BTEX chez les mousses et l'analyse des corrélations corrobore cette hypothèse ;
- enfin, il semble que l'accumulation des BTEX chez les mousses soit corrélée aux concentrations atmosphériques en particules PM_{10}. Ces particules sont facilement piégées par les mousses et constituent un support sur lesquels les BTEX s'adsorbent.

Par contre, dans le cadre de ces expériences, il n'est pas établi que les concentrations atmosphériques en BTEX influencent les concentrations chez les mousses, et ceci pour deux raisons principales : d'une part, le vent joue sur la désorption des BTEX par les mousses mais pas sur ceux adsorbés par la cartouche de prélèvement des BTEX atmosphériques ; d'autre part, les concentrations atmosphériques représentent des moyennes hebdomaires de BTEX dans l'air, tandis que les teneurs chez les mousses résultent d'un équilibre permanant avec les concentrations dans l'air.

L'étude des marqueurs de vitalité chez les mousses, et notamment l'état d'hydratation, montre une plus forte stabilité de *T. ruralis*. Thomas (1984) a démontré l'influence de l'état d'hydratation sur l'accumulation des HAP par les mousses. Si cette influence se vérifie pour l'accumulation des COV, le choix de *T. ruralis* s'impose pour l'étude de l'accumulation des BTEX.

Étant donné les nombreux paramètres environnementaux qui existent en situations réelles de terrain et qui peuvent influencer l'accumulation des BTEX par les mousses, seules des expérimentations en conditions contrôlées (utilisant des composés marqués et des techniques de flux) permettent d'approfondir la compréhension les mécanismes d'échange des BTEX entre l'air et la mousse.

2) Etudes de l'accumulation des BTEX en conditions contrôlées

Les études *in situ* ont montré des variations des teneurs en BTEX chez les mousses sans toutefois pouvoir établir de lien entre ces teneurs et les concentrations du milieu d'exposition. Pour répondre à cette question, nous avons réalisé des expositions monopolluantes en conditions contrôlées afin de limiter l'influence des paramètres environnementaux. Les objectifs de ces expériences étaient d'une part, d'observer s'il pouvait exister un lien entre les concentrations d'exposition en benzène et celles dans la mousse, d'autre part d'étudier le rapport entre le temps d'exposition au benzène et sa concentration chez l'organisme exposé. Enfin, pour tenter de comprendre quel phénomène a engendré une diminution des concentrations en BTEX chez les 3 espèces de mousses exposées *in situ*, une expérience a été réalisée pour observer l'évolution des concentrations en benzène à l'issue d'une exposition en benzène, puis plusieurs heures après la fin de l'exposition.

Pour l'étude de la relation entre la concentration d'exposition et les teneurs, deux types d'expériences ont été menées : dans un premier temps, des concentrations d'exposition élevées ont été utilisées pour observer le comportement accumulateur de la mousse à de fortes teneurs en benzène et pour s'assurer d'obtenir des teneurs chez la mousse détectables en GC/MS; dans un second temps, des expositions à des concentrations plus faibles, proches des concentrations mesurées *in situ*, ont été réalisées afin de comprendre les phénomènes observés *in situ* et de déterminer les limites d'exposition pour lesquelles le benzène n'est pas détecté chez la mousse.

L'étude de la cinétique de l'accumulation du benzène chez *T. ruralis* a été menée dans des conditions de forte concentration en benzène.

a) Etude de l'accumulation du benzène chez Tortula ruralis *en fonction de la concentration d'exposition*

Il était prévu d'éprouver la reproductibilité de l'étude de l'accumulation de fortes concentrations de benzène chez *T. ruralis,* par 3 expériences consécutives. Pour des problèmes techniques inhérents au laboratoire, la troisième a été réalisée 6 mois plus tard, avec une autre récolte de mousse. Pour chaque exposition, les expositions aux 3 concentrations en benzène et l'exposition témoin étaient réalisées simultanément pour garantir des conditions d'exposition comparables.

i- Etude de l'accumulation du benzène à fortes concentrations

Résultats :

Le choix des concentrations d'exposition en benzène permet d'établir des courbes de relation 'concentrations d'exposition' / 'concentrations accumulées'. Les concentrations de 20, 200 et 2000 ppm ont été déterminées d'après le volume de l'enceinte d'exposition qui est de 20 litres. De telles concentrations ne peuvent pas être obtenues avec le dispositif d'exposition à débit continu. Aussi, les concentrations d'exposition dans ce cas présent sont obtenues par la mise en présence d'une quantité de benzène dans un volume d'air donné. Ainsi, 20, 200 et 2000 ppm correspondent respectivement à des quantités de 1 290, 12 900 et 129 000 µg de benzène.

Les figures 90, 91, 92, 93, 94 et 95 présentent les concentrations en benzène chez *T. ruralis* avant et après exposition ainsi que les quantités accumulées en fonction des concentrations d'exposition.

D'une manière générale, les concentrations à l'issue de l'exposition en benzène mesurées chez *T. ruralis* au cours des 3 expositions sont significativement supérieures aux concentrations initiales sauf dans l'exposition témoin sans benzène. Autrement dit, une accumulation du benzène est observée chez la mousse. Lors de la 3ème expérience, l'augmentation des teneurs en benzène chez la mousse est moins prononcée. Ceci a pu être induit par les variations des conditions ambiantes du laboratoire ou cela peut être imputable à la récolte de *T. ruralis*.

Notons que les concentrations initiales et celles de l'exposition témoin sont inférieures aux limites de détection du GC/MS (<10 ng par vial). Aussi, par défaut, nous avons considéré la valeur limite basse de 10 ng pour tous les échantillons non quantifiables.

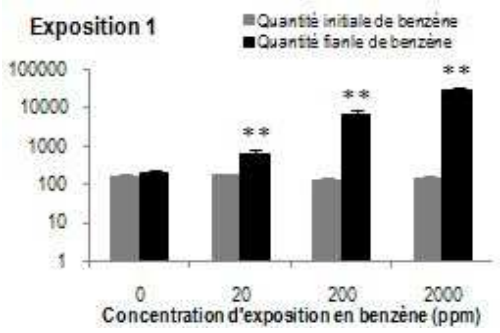


Figure 91: Teneurs en benzène chez Tortula ruralis *après l'exposition 1 à différentes concentrations de benzène (Test t de Student, n=4. * : différence significative p<0,05; ** : différence significative p<0,01; *** : différence significative p<0,001)*

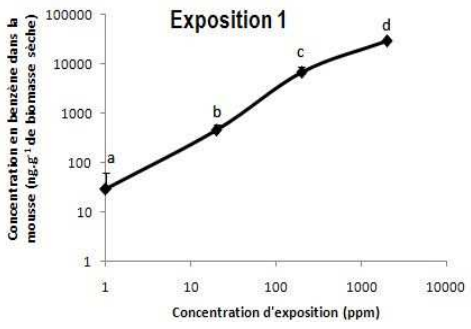


Figure 90: Quantité de benzène accumulée chez Tortula ruralis *selon les concentrations d'exposition au benzène (Test t de Student, n=4 ; des lettres différentes signalent des différences significatives p<0,05) au cours de l'exposition 1*

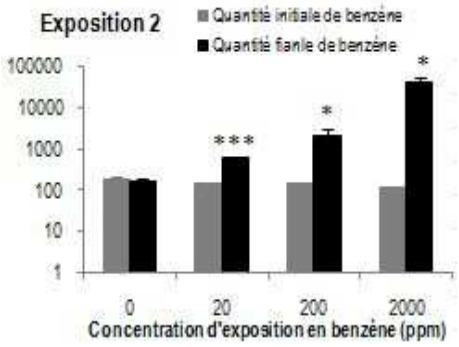


Figure 93: Teneurs en benzène chez Tortula ruralis *après l'exposition 2 à différentes concentrations de benzène (Test t de Student, n=4. * : différence significative p<0,05; ** : différence significative p<0,01; *** : différence significative p<0,001)*

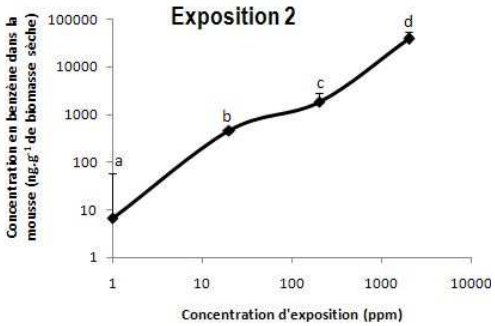


Figure 92: Quantité de benzène accumulée chez Tortula ruralis *selon les concentrations d'exposition au benzène (Test t de Student, n=4 ; des lettres différentes signalent des différences significatives p<0,05) au cours de l'exposition 2*

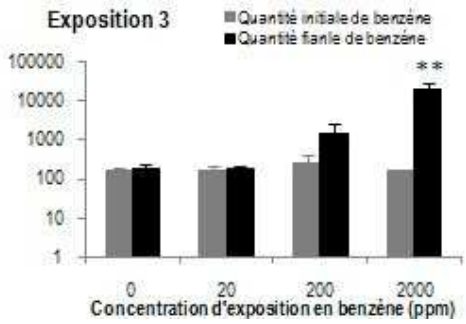


Figure 95: Teneurs en benzène chez Tortula ruralis *après l'exposition 3 à différentes concentrations de benzène (Test t de Student, n=4. * : différence significative p<0,05; ** : différence significative p<0,01; *** : différence significative p<0,001)*

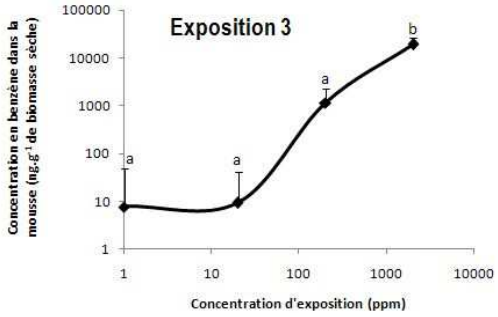


Figure 94: Quantité de benzène accumulée chez Tortula ruralis *selon les concentrations d'exposition au benzène (Test t de Student, n=4 ; des lettres différentes signalent des différences significatives p<0,05) au cours de l'exposition 3*

En calculant les variations des teneurs en benzène dans la mousse (la quantité initiale soustraite à la quantité finale) aux différentes concentrations d'exposition, et en les comparant entre elles, il apparaît que l'accumulation de benzène est significativement plus importante lorsque la concentration d'exposition est plus élevée.

Discussion sur l'accumulation du benzène en conditions contrôlées en fonction des concentrations d'exposition – fortes concentrations

Le tableau 26 présente les corrélations entre les concentrations d'exposition et la quantité de benzène accumulée dans la mousse. Ainsi, plus la concentration d'exposition en benzène est élevée, plus la teneur dans la mousse l'est également. Notons qu'aucun phénomène de saturation n'est observé même lors de l'exposition à la plus forte concentration (2000 ppm).

Nous avons mentionné précédemment que les concentrations de benzène dans un végétal sont en équilibre permanent avec celles de l'air ambiant (Hiatt, 1999, Keymeulen *et al*, 1993 ; 1995). Nous avons aussi suggéré que le même phénomène pouvait se produire chez les mousses.

Si l'exposition *in situ* semble montrer qu'une part du benzène accumulé chez les mousses est liée aux dépôts particulaires, cette exposition en conditions contrôlées démontre que *T. ruralis* peut également accumuler le benzène sous forme exclusivement gazeuse.

Corrélation de Pearson Quantité d'exposition // Quantité accumulée	Coefficient de corrélation (r)	Significativité (p)
Exposition 1 (n=16)	0,979	0,000
Exposition 2 (n=16)	0,935	0,000
Exposition 3 (n=16)	0,935	0,000
Globale (n=48)	0,897	0,000

Tableau 26: Corrélation des quantités de benzène accumulées chez Tortula ruralis *avec les concentrations d'exposition en benzène, lors des 3 expositions en conditions contrôlées (Corrélation de Pearson, n=16; n=48)*

En résumé, il existe un lien entre les concentrations d'exposition de benzène et les concentrations retrouvées chez *T. ruralis.* Cependant, il est important de remarquer que les quantités de benzène accumulées dans la mousse sont de quelques microgrammes par gramme de biomasse sèche de mousse, alors que les quantités de benzène dans l'enceinte sont supérieures à 12 000 µg. Par conséquent, l'accumulation du benzène chez *T. ruralis* ne correspond donc pas à un phénomène de bioaccumulation, les quantités accumulées étant trop faibles en comparaison avec les concentrations d'exposition.

ii- Etude de l'accumulation des BTEX à concentrations réalistes

L'objectif de cette expérience était d'étudier, chez *T. ruralis*, l'accumulation du benzène ainsi que celle du toluène, de l'ethylbenzène et des xylènes, lorsque la mousse est soumise à des concentrations intermédiaires

entre les très fortes concentrations et les concentrations réalistes. Dans le cadre de ces expositions, la mousse était exposée à un flux continu d'un mélange de BTEX. L'exposition a été réalisée à 3 concentrations. Le tableau 11 présente les quantités de BTEX auxquelles la mousse a été exposées, quantités calculées d'après la concentration, le débit de l'air et la durée de l'exposition.

L'analyse en GC/MS des échantillons de mousses prélevés avant et après les expositions n'a pas détecté de quantité de BTEX supérieure aux limites de détection.

Ainsi, la mousse exposée à des concentrations en benzène de 13,22 $\mu g.m^{-3}$ (soit, sur 24 heures,une quantité de 104,7 µg), 27,02 $\mu g.m^{-3}$ (soit, sur 24 heures,une quantité de 214,0 µg) et 103,92 $\mu g.m^{-3}$ (soit, sur 24 heures,une quantité de 822,9 µg) ne présente pas d'accumulation de benzène (*cf*. tableau 11 les quantités équivalentes pour le toluène, l'éthylbenzène et les xylènes). Les toluène, éthylbenzène et xylènes ne sont pas non plus accumulés chez *T. ruralis* dans le cadre de notre expérimentation.

Deux hypothèses peuvent être émises pour expliquer cela :

- La quantité d'exposition importe moins que la concentration dans l'enceinte d'exposition, et les concentrations d'exposition ici sont trop faibles pour que le benzène puisse être accumulé en quantité décelable chez la mousse.
- Toutefois, les concentrations *in situ* lors de la première expérimentation de terrain étaient beaucoup plus faibles, et on a pu mesurer du benzène chez les mousses. Mais l'une des différences majeures entre les expositions de terrain et les expositions en laboratoire est la forme sous laquelle se trouve le contaminant dans l'air. En effet, en laboratoire, nous ne travaillons qu'avec une forme gazeuse alors qu'*in situ*, le benzène (et les autres COV) peuvent être adsorbés sur des particules. Les particules sont particulièrement bien accumulées par les mousses. Ceci renforce l'hypothèse selon laquelle l'accumulation des BTEX par les mousses *in situ* est favorisée par les concentrations en particules.

En définitive, il n'est pas possible de conclure quant à l'accumulation de BTEX chez *T. ruralis* dans le cadre de cette expérience. Pour compléter cette étude, des études de l'évolution des concentrations en BTEX dans l'enceinte d'exposition en présence et en absence de mousse sera menée (*cf*. paragraphe C.2.c.ii.) afin de déterminer si la mousse adsorbe une partie des BTEX présents dans l'enceinte.

b) Étude de la cinétique de l'accumulation du benzène chez Tortula ruralis

Précédemment, *T. ruralis* a été exposée pendant 24 heures à des concentrations élevées de benzène, et il l'a accumulé significativement. Nous ne savons pas si le temps d'exposition de 24 heures constitue une durée optimale d'exposition. Dans la mesure où les mousses sont exposées à des quantités fixes et non à un flux continu de benzène, l'étude de la cinétique d'accumulation permet de déterminer le temps nécessaire à l'accumulation maximale du benzène chez la mousse.

i- Résultats

T. ruralis a été exposée à 200 ppm de benzène pendant différentes durées s'échelonnant de 75 minutes (1 heure et 15 minutes) à 6000 minutes (4 jours et 4 heures). La concentration de 200 ppm retenue pour cette expérience assure des mesures de benzène dans la mousse supérieures aux limites de détection. Toutes les expositions à 200 ppm de benzène se sont déroulées à la même période, à l'exception de l'exposition témoin.
Les teneurs en benzène dans la mousse à l'issue de l'exposition sont présentées dans la figure 96. Ces teneurs sont systématiquement supérieures aux teneurs initiales, excepté pour l'exposition pendant 6000 minutes et pour l'exposition témoin.

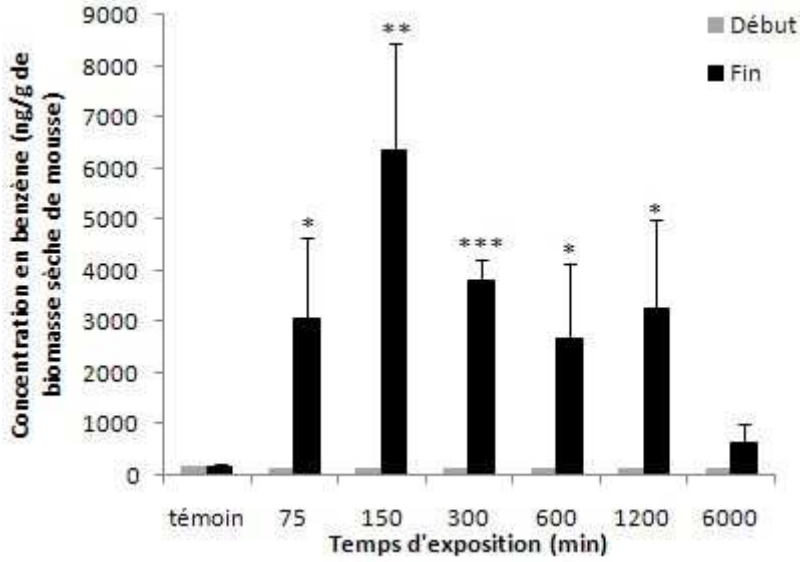


Figure 96: Quantités de benzène chez Tortula ruralis *avant et après exposition à 200 ppm de benzène pendant différentes durées (75, 150, 300, 600; 1200 et 6000) (Test t de Student, n=5; différence significative * : p<0,05; ** : p<0,01; *** : p<0,001)*

L'accumulation de benzène dans la mousse est maximale après 150 minutes d'exposition, puis cette accumulation est de moins en moins importante à mesure que la durée d'exposition augmente (*cf.* figure 97). Cette diminution de l'accumulation à partir de 300 minutes d'exposition pourrait correspondre à la 'disparition' d'une partie du benzène accumulé sous l'effet de mécanismes de métabolisation. Il se peut également que cette perte de benzène soit induite par un phénomène de relargage dans l'atmosphère d'exposition avec laquelle les teneurs chez la mousse s'équilibre. Enfin, le benzène présent dans l'enceinte peut être dégradé tout au long de l'exposition.

ii- Discussion sur l'accumulation du benzène en conditions contrôlées en fonction de la durée d'exposition

Il existe plusieurs hypothèses permettant d'expliquer à quoi correspond cette durée de 150 minutes d'exposition pour laquelle on observe une accumulation maximale de benzène :

- l'accumulation du benzène dans la mousse augmenterait au fur et à mesure que la durée d'exposition augmente, jusqu'à l'établissement d'un équilibre entre la concentration dans l'enceinte et les teneurs dans la mousse, et la durée nécessaire pour atteindre cet équilibre serait de 150 minutes ;
- le benzène déposé à l'état liquide dans l'enceinte ne serait volatilisé dans sa totalité qu'après 150 minutes ; ce qui expliquerait le pic d'accumulation observé.

Plusieurs hypothèses permettent d'expliquer la diminution de la quantité de benzène dans la mousse observée au delà des 150 minutes d'exposition :

- le benzène serait pris en charge par les mécanismes de métabolisation de la mousse ; la mousse accumulerait du benzène jusqu'à la mise en place d'un système de métabolisation du benzène; l'activation du processus de métabolisation nécessiterait un délai de 150 minutes ;
- les teneurs en benzène dans la mousse s'équilibreraient avec celles de l'atmosphère d'exposition; ainsi l'accumulation maximale du benzène après 150 minutes d'exposition correspondrait à un pic d'accumulation ; ce pic serait suivi d'un relargage permettant d'équilibrer les teneurs en benzène entre l'air de l'enceinte et la mousse. Les phénomènes de métabolisation et de relargage peuvent coexister et participer conjointement à la diminution des teneurs en benzène chez *T. ruralis* (Collins & Bell, 2000)
- le temps de vie du benzène troposphérique est d'environ 6 jours (Atkinson, 1994). En admettant que la dégradation du benzène dans l'enceinte subisse la même dégradation au cours de l'exposition, la diminution des concentrations en benzène dans la mousse (en équilibre avec les concentrations dans l'air) n'est que le reflet de l'évolution de la concentration dans l'enceinte.

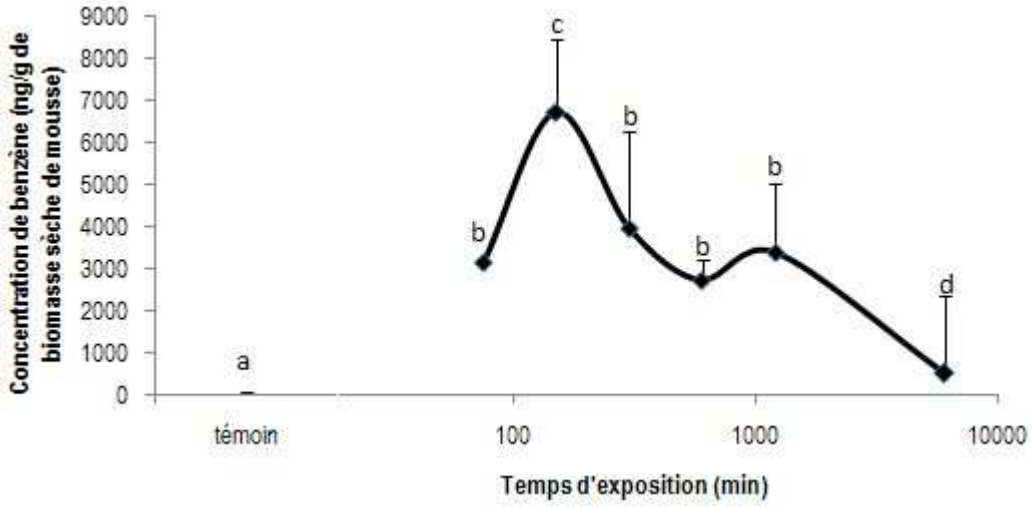


Figure 97: Quantités de benzène accumulées chez Tortula ruralis *exposée à 200 ppm de benzène pendant différentes durées (75, 150, 300, 600, 1200 et 6000) (Test t de Student, n=5 ; des lettres différentes signalent des différences significatives p<0,05)*

c) Phénomène de relargage des BTEX par la mousse : étude des phénomènes d'absorption et de désorption des BTEX chez Tortula ruralis

i- Étude du phénomène de relargage du benzène chez *Tortula ruralis*

De par la volatilité du benzène et l'absence de cuticule chez la mousse, il est vraisemblable que le benzène puisse être relargué. Afin de vérifier cette hypothèse, *T. ruralis* a été exposé pendant 20 heures (1200 minutes) à 200 ppm de benzène, dans les conditions similaires aux précédentes expositions, à l'exception de la quantité de mousse, plus importante pour cette expérience puisqu'elle nécessite davantage de prélèvements. Des prélèvements de mousses ont été réalisés à l'issue de l'exposition, puis 2 heures, 4 heures et 8 heures après la fin de l'exposition.

La figure 98 présente la quantité de benzène accumulée dans la mousse après 20 heures d'exposition. Cette quantité accumulée était en moyenne de 2 746 ng .g^{-1} de biomasse sèche de mousse. Cette quantité diminue très rapidement après la fin de l'exposition. En effet, les quantités de benzène mesurées chez la mousse 2 heures après la fin de l'exposition (806 ng .g^{-1} de biomasse sèche) sont significativement inférieures à celles mesurées juste après l'exposition. 4 heures après l'exposition (236 ng .g^{-1} de biomasse sèche), les quantités de benzène dans la mousse diminuent encore et sont significativement inférieures à celles mesurées 2 heures auparavant. La décroissance de la quantité de benzène accumulé dans la mousse est plus faible 8 heures après la fin de l'exposition (208 ng .g^{-1} de biomasse sèche). Compte tenu de la vitesse à laquelle près de 600 ng .g^{-1} de biomasse sèche ont été éliminés, l'hypothèse d'un phénomène de relargage semble tout à fait probable et expliquerait cette perte de benzène chez la mousse.

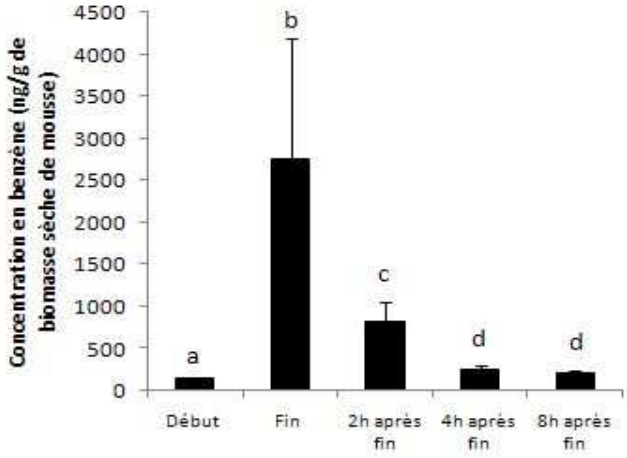


Figure 98: Teneurs en benzène chez Tortula ruralis *avant et après exposition à 200 ppm de benzène pendant 24 heures, puis 2, 4 et 8 heures à l'issue de l'exposition (Test t de Student pour échantillons appariés, n=5 ; des lettres différentes signalent des différences significatives p<0,05)*

Le relargage de benzène par la mousse n'est pas incompatible avec le phénomène de métabolisation. Aussi pour approfondir la compréhension des mécanismes induits chez la mousse lors d'exposition au benzène, nous avons procédé à des expérimentations complémentaires en enceinte contrôlée, permettant le suivi des concentrations en BTEX dans l'atmosphère d'exposition.

ii- Étude de l'absorption et de la désorption des BTEX chez *Tortula ruralis*

Les expériences précédentes ont mis en évidence d'une part, l'accumulation de benzène chez *T. ruralis* et la disparition de ce benzène accumulé, expliquée en partie par un phénomène de relargage. Toutefois, il peut exister un phénomène de métabolisation qui n'a pu être mis en évidence au travers des expériences précédentes. Pour étudier ce phénomène, la mousse a été disposée en enceinte à température, humidité relative et concentrations en BTEX contrôlées. Un faible débit d'un mélange de BTEX a été injecté en continu dans l'enceinte et l'évolution des concentrations dans cette enceinte a été enregistrée pendant 24 heures.

Ces mêmes conditions ont été répétées en absence de mousse, et les variations des concentrations de l'enceinte ont été comparées. L'hypothèse était qu'une part des BTEX injectée dans l'enceinte serait adsorbée par la mousse et que, par conséquent, les quantités de BTEX en sortie d'enceinte seraient inférieures en présence de mousse.

Les quantités de BTEX par débit d'air expulsé de l'enceinte (débit de sortie) sont présentées dans les figures 99, 100, 101, 102 et 103. L'analyse de l'évolution des quantités de BTEX dans l'enceinte d'exposition au cours du temps montre des quantités de benzène et de toluène plus faibles lorsque la mousse est présente dans

l'enceinte. Cette différence représente un peu moins de 10% de la quantité mesurée à l'issue des 24 heures d'exposition. Cette observation n'est pas vérifiable statistiquement dans les conditions de l'expérience et constitue une tendance nécessitant un approfondissement.

Compte tenu que les quantités de BTEX chez *T. ruralis* exposées à de faibles concentrations, étaient inférieures aux limites de détection du GC/MS, il n'est pas possible de conclure à une accumulation de BTEX chez la mousse. Cependant, il est possible que les quantités « manquantes » de BTEX aient été prises en charge par la mousse.

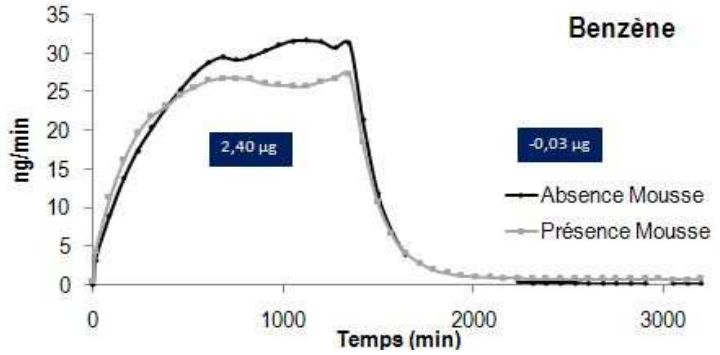


Figure 99: Evolution des teneurs en benzène sorties de l'enceinte (ng/min) au cours des 2 expositions (présence ou en absence de Tortula ruralis*) - Cadre bleu : différence de quantité de benzène (µg) entre les 2 expositions*

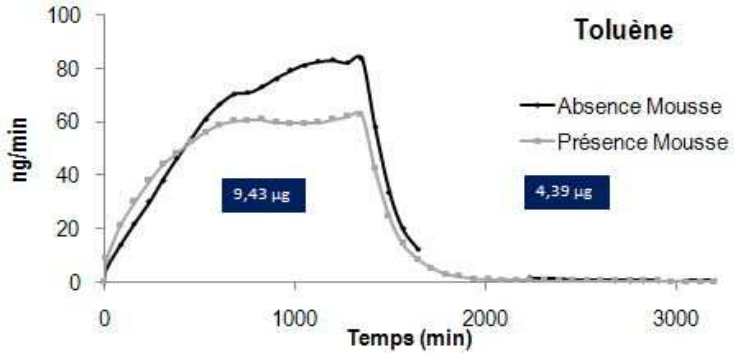


Figure 100: Evolution des teneurs en toluène sorties de l'enceinte (ng/min) au cours des 2 expositions (présence ou en absence de Tortula ruralis*) - Cadre bleu : différence de quantité de toluène (µg) entre les 2 expositions*

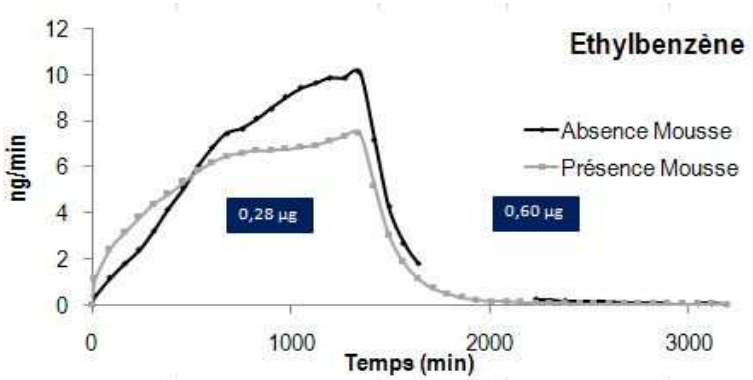


Figure 101: Evolution des teneurs en éthylbenzène sorties de l'enceinte (ng/min) au cours des 2 expositions (présence ou en absence de Tortula ruralis*) - Cadre bleu : différence de quantité de éthylbenzène (µg) entre les 2 expositions*

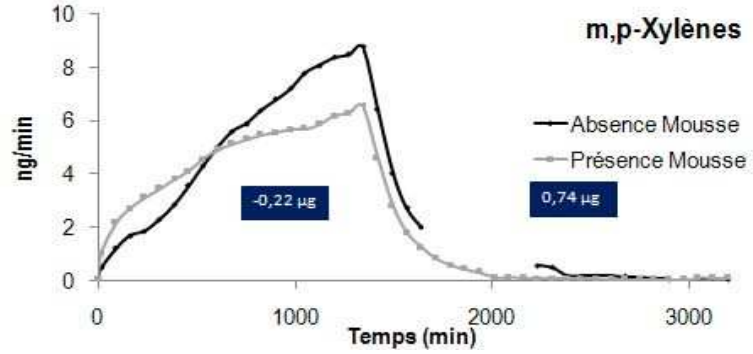


Figure 102: Evolution des teneurs en méta, para-xylènes sorties de l'enceinte (ng/min) au cours des 2 expositions (présence ou en absence de Tortula ruralis*) - Cadre bleu : différence de quantité de méta, para-xylènes (µg) entre les 2 expositions*

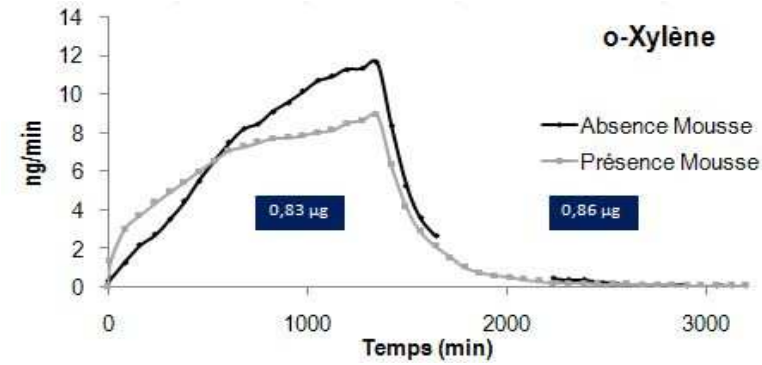


Figure 103: Evolution des teneurs en orthoxylène sorties de l'enceinte (ng/min) au cours des 2 expositions (présence ou en absence de Tortula ruralis*) - Cadre bleu : différence de quantité de orthoxylène (µg) entre les 2 expositions*

Après les 24 heures d'exposition, l'injection de BTEX a été stoppée et substituée par de l'air zéro (sans BTEX), et l'évolution des concentrations dans l'enceinte ont été enregistrées pendant 24 heures. L'hypothèse était que la part de BTEX accumulée par la mousse serait relarguée. Ainsi, la quantité de BTEX mesurée en sortie d'enceinte lorsque l'on injectait uniquement de l'air zéro, serait supérieure en présence de mousse. Compte tenu que les quantités de benzène et de toluène mesurées dans l'enceinte en présence de mousse étaient inférieures à celles mesurées en l'absence de mousse, il est supposé que la mousse en a absorbé. Cependant, ces quantités n'ont pas du tout, ou partiellement, été retrouvées après l'arrêt de l'injection de BTEX. Ainsi, ces composés n'auraient pas été relargués, ou seulement en partie dans le cas du toluène. Par conséquent, le benzène et le toluène seraient soit accumulés dans la mousse, soit métabolisés par la mousse. Les limites de détection des BTEX chez la mousse par GC/MS ne permettent pas de déterminer si la mousse accumule du benzène et/ou du toluène lors d'une exposition à une concentration du même ordre. C'est pourquoi il n'est pas possible de conclure à une accumulation ou à une métabolisaiton du benzène et du toluène.

d) Conclusions relatives à l'accumulation en conditions contrôlées des BTEX chez Tortula ruralis

Les expositions de *T. ruralis* au benzène en conditions contrôlées montrent que les concentrations de benzène chez la mousse sont fonction des concentrations d'exposition. Ce phénomène serait réversible, c'est-à-dire qu'on observe une diminution des concentrations dans la mousse lorsque la concentration d'exposition diminue. L'évolution des concentrations après l'arrêt d'une exposition semble indiquer la désorption des BTEX par la mousse, mais on peut envisager l'existence de mécanismes de métabolisation chez la mousse, qui prendraient en charge les composés absorbés. Seules des études de la métabolisation du benzène chez les mousses permettraient de confirmer ou d'infirmer cette hypothèse.

3) Conclusions relatives à l'accumulation des BTEX chez *Tortula ruralis*

Parmi les 3 espèce testées, *T. ruralis* est la mieux adaptée pour l'étude de l'accumulation des BTEX.

Après analyse des paramètres environnementaux au cours des expérimentations de terrain, l'augmentation des concentrations des BTEX chez la mousse correspondrait en réalité à l'accumulation de dépôts particulaires sur lesquels les BTEX seraient adsorbés. Ces BTEX adsorbés sur la mousse sont susceptibles d'être dégradés par différents paramètres environnementaux (UV, radicaux) et le vent favoriserait leur désorption. Toutefois, nous ne pouvons pas exclure l'existence de phénomène de métabolisation mais l'état des connaissances actuelles ne permet pas d'étayer cette hypothèse.

Les études en conditions contrôlées démontrent que les teneurs en benzène chez la mousse s'équilibrent en

fonction des concentrations dans l'air.

Cependant, cet équilibre se passe à une échelle de temps très courte, c'est pourquoi, lors d'études de terrain, les concentrations atmosphériques ne sont pas nécessairement corrélées avec les concentrations dans la mousse. En biosurveillance des contaminants atmosphériques, les mousses sont reconnues et même recommandées comme matrices de dosage des éléments traces métalliques (Smodis & Parr, 1999), des HAP (Ötvös *et al,* 2004) et des dioxines (Carballeira *et al*, 2006). Par contre, leur utilisation pour les COV et plus particulièrement le benzène, est beaucoup plus aléatoire. Cette conclusion se base cependant sur deux campagnes de terrain et avec trois espèces de bryophytes. Nous tenons toutefois à préciser que lors de l'étude du screening des COV présents chez *T. ruralis*, nous avons pu mettre en évidence d'autres composés « légers » comme le toluène, les xylènes, le styrène. Mais dans l'état actuel de nos connaissances, nous ne pouvons pas conclure si les concentrations observées sont le reflet de ce qui existe dans l'air.

D. Étude de toxicité : influence du benzène et d'un stress environnemental sur l'expression de biomarqueurs du stress oxydant chez *Tortula ruralis*

Les études de terrain ont montré que la représentativité des teneurs en BTEX chez les mousses, et notamment chez *T. ruralis*, par rapport aux concentrations atmosphériques en BTEX était fortement liée aux conditions environnementales. Toutefois, les expérimentations en conditions contrôlées ont mis en évidence que des concentrations non négligeables de BTEX pouvaient être mesurées chez *T. ruralis* lorsque celle-ci était exposée à de fortes concentrations. De ce fait, les composés sont susceptibles d'interagir avec l'organisme bryophytique et générer des dommages cellulaires. L'étude des teneurs en BTEX chez la mousse ne permet pas de révéler l'exposition globale de la mousse à ces composés, puisque l'organisme ne les accumule pas. L'étude des effets de ces composés pourrait permettre de rendre compte de cette exposition. La mise en place de mécanismes enzymatiques de compensation du stress oxydant et les dommages potentiellement occasionnés au niveau membranaire et chloroplastiques sont des biomarqueurs susceptibles de révéler de façon précoce la toxicité des BTEX. Ainsi ces études permettront d'une part, de révéler si les BTEX induisent un stress oxydant chez les mousses, et si les biomarqueurs de stress oxydant développer dans le cadre de ces travaux pourraient constituer des outils de biosurveillance de la qualité de l'air.

1) Biomarqueurs de stress oxydant chez *Tortula ruralis* : effets de l'exposition au benzène en conditions contrôlées

Parallèlement à l'étude de l'accumulation du benzène par *T. ruralis*, la recherche d'un éventuel stress oxydant lié aux expositions a été menée. L'objectif était d'étudier les variations de l'expression de différents

biomarqueurs de stress oxydant en fonction des concentrations en benzène utilisées. Les différents biomarqueurs retenus sont le dosage des protéines totales, l'expression de l'APOX et de la GPOX, l'évaluation de la peroxydation des lipides membranaires, le dosage des concentrations en chlorophylles et l'indice de phéophytinisation.

Les expérimentations ont été réalisées trois fois. Les résultats obtenus sont identiques pour les trois expériences. Nous présenterons les résultats obtenus au cours de l'une d'entre elles.

Les expériences préliminaires ont montré l'influence de l'état d'hydratation sur l'expression des biomarqueurs de stress oxydant. Aussi nous présentons, figure 104, la variation de l'état d'hydratation des mousses au cours des expositions au benzène, afin de connaître si des variations sont susceptibles d'interférer avec les résultats obtenus pour les différents biomarqueurs. Les mousses sont disposées en enceinte hermétiquement fermée. Notons, qu'à l'issue des 24 heures d'exposition, *T. ruralis* présente un taux d'hydratation plus élevée qu'à l'origine, bien que cette différence ne soit pas significative (à l'exception de l'exposition à 20 ppm).

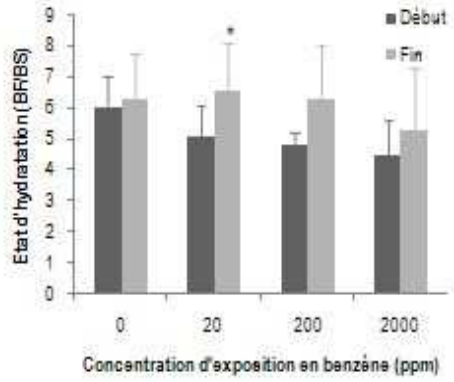


Figure 104: Etat d'hydratation chez Tortula ruralis *avant puis après exposition à différentes concentrations de benzène pendant 24 heures (Test t de Student pour échantillons appariés, n=4)(différence significative p<0,05 : *)*

a) Étude de l'expression de biomarqueurs du stress oxydant chez Tortula ruralis en fonction de la concentration d'exposition au benzène

i- Influence des concentrations d'exposition au benzène sur les concentrations en protéines totales chez *Tortula ruralis*

Les concentrations en protéines totales avant et après exposition aux différentes concentrations en benzène sont présentées dans la figure 105.

Les concentrations en protéines totales chez *T. ruralis* ne varient pas de manière significative après l'exposition aux différentes concentrations de benzène. Toutefois, les concentrations finales sont généralement plus faibles que les concentrations initiales. Quoiqu'il en soit, les expositions au benzène ne

semblent pas induire une augmentation de la synthèse protéique et n'engendreraient pas de dégradation globale des protéines et ce, pour la durée d'exposition mise en jeu dans l'expérience.

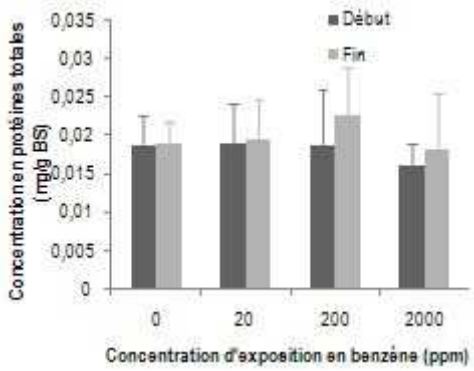


Figure 105: Concentrations en protéines totales chez Tortula ruralis *avant puis après exposition à différentes concentrations de benzène pendant 24 heures (Test t de Student pour échantillons appariés, n=4)*

ii- Influence des concentrations d'exposition au benzène sur l'activité de l'ascorbate et de la guaïacol peroxydases chez *Tortula ruralis*

Les activités de l'APOX et de la GPOX avant et après exposition aux différentes concentrations en benzène sont présentées dans les figures 106 et 107. En comparant les variations des activités enzymatiques de l'APOX et de la GPOX chez le témoin (0 ppm) avec celles chez les mousses exposées, l'exposition au benzène induirait une augmentation de l'activité enzymatique d'APOX. Ce phénomène pourrait correspondre à la mise en place des mécanismes de compensation de stress oxydant. Toutefois, dans le cadre de notre expérience, les activités de ces peroxydases ne sont pas corrélées avec les concentrations d'exposition au benzène. En effet, l'augmentation des activités enzymatiques ne sont pas significatives, excepté celle de la GPOX à 20 ppm. Il est cependant possible que les fortes concentrations (200 et 2000 ppm) induisent une réponse anarchique de l'organisme. Ce phénomène serait lié à l'induction d'un stress que les mécanismes de compensation du stress ne sont pas capables de prendre en charge.

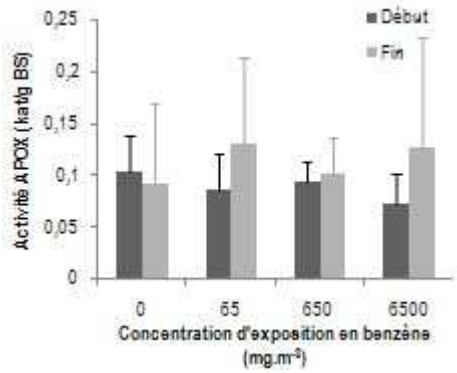


Figure 106: Activité de l'APOX chez Tortula ruralis *avant puis après exposition à différentes concentrations de benzène pendant 24 heures (Test t de Wilcoxon pour échantillons appariés, n=4*

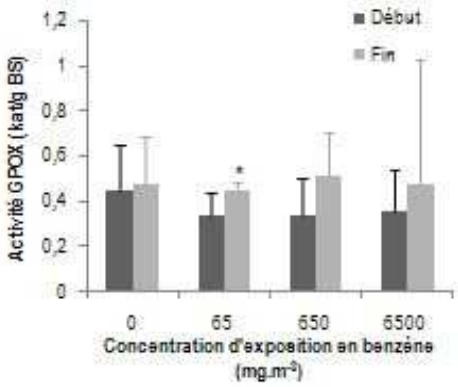


Figure 107: Activité de la GPOX chez Tortula ruralis *avant puis après exposition à différentes concentrations de benzène pendant 24 heures (Test de Student pour échantillons appariés, n=4 ; différence significative * : p<0,05)*

iii- Influence des concentrations d'exposition au benzène sur la péroxydation des lipides membranaires chez *Tortula ruralis*

Les concentrations en MDA avant et après exposition aux différentes concentrations en benzène sont présentées dans la figure 108. La concentration en MDA a tendance à augmenter chez *T. ruralis* exposée à 200 ppm de benzène. Par contre, lors des expositions à 20 et 2000 ppm, les concentrations ont tendance à diminuer. Nous ne pouvons pas conclure à l'induction d'une lipopeoroxydation des membranes chez *T. ruralis*, induite par le benzène. Cependant, il est intéressant de noter que les variations des concentrations en MDA ne suivent pas celles de l'état d'hydratation de la mousse. Au cours de l'étude du stress hydrique, une corrélation entre l'état d'hydratation et les concentrations en MDA avait été établie. Cette observation enrichit l'hypothèse précédemment évoquée selon laquelle, les concentrations d'exposition induiraient une perturbation des réponses au stress chez la mousse. En présence d'agents stressants trop puissants, l'expression des biomarqueurs d'une réponse précoce de l'organisme à un stress est confondue dans les effets importants engendrés par les fortes concentrations de contaminant.

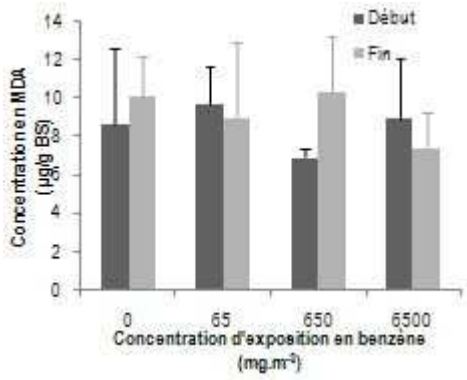


Figure 108: Concentrations en MDA chez Tortula ruralis *avant puis après exposition à différentes concentrations de benzène pendant 24 heures (Test de Wilcoxon pour échantillons appariés, n=4)*

iv- Influence des concentrations d'exposition au benzène sur les concentrations chlorophylles et sur l'indice de phéophytinisation chez *Tortula ruralis*

Les concentrations en chlorophylles avant et après exposition aux différentes concentrations en benzène sont présentées dans les figures 109, 110 et 111. Les concentrations en chlorophylles ne varient pas de façon significative après l'exposition aux fortes concentrations de benzène. La variabilité intra-espèce est élevée, et cette variabilité peut masquer les variations induites par l'exposition au benzène.

L'indice de phéophytinisation avant et après exposition aux différentes concentrations en benzène sont présentées dans la figure 112. L'analyse de la variation de l'indice de phéophytinisation ne met pas en évidence de dégradation de la chlorophylle en phéophytine. Au contraire, après les expositions, cet indice est plus élevé, ce qui indique un état de stress moins important chez l'organisme bryophytique. Comme observé lors de l'étude du stress hydrique chez *T. ruralis*, l'augmentation de l'indice de phéophytinisation est semblable à celle de l'état d'hydratation. L'hydratation des mousses serait ainsi un paramètre essentiel à l'homéostasie de la mousse.

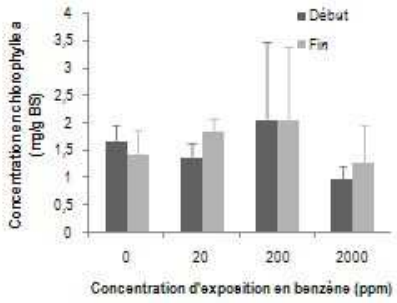


Figure 110: Concentrations en chlorophylle a chez Tortula ruralis *avant puis après exposition à différentes concentrations de benzène pendant 24 heures (Test de Wilcoxon pour échantillons appariés, n=4)*

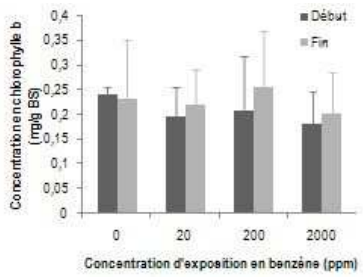


Figure 111: Concentrations en chlorophylle b chez Tortula ruralis *avant puis après exposition à différentes concentrations de benzène pendant 24 heures (Test t de Student pour échantillons appariés, n=4)*

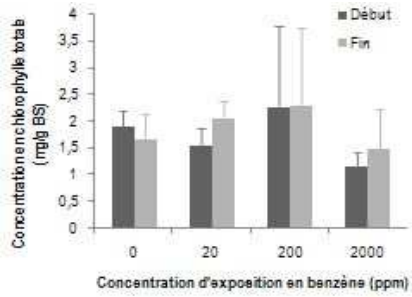


Figure 109: Concentrations en chlorophylle totale chez Tortula ruralis *avant puis après exposition à différentes concentrations de benzène pendant 24 heures (Test de Wilcoxon pour échantillons appariés, n=4)*

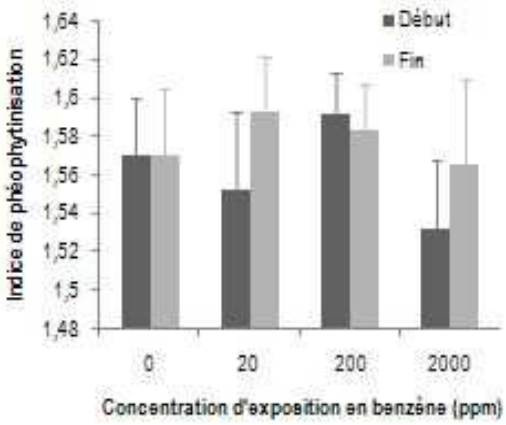


Figure 112: Indice de phéophytinisation chez Tortula ruralis *avant puis après exposition à différentes concentrations de benzène pendant 24 heures (Test t de Student pour échantillons appariés, n=4)*

v- Discussion

Dans le cadre de nos expériences, les résultats obtenus ne montrent pas de relation entre les différentes concentrations d'exposition au benzène et les variations des biomarqueurs de stress oxydant. L'augmentation de l'état d'hydratation de la mousse mesuré à la fin des expositions pourrait être une des causes des variations des biomarqueurs étudiés. De par sa nature poïkilohydrique, la mousse développe des mécanismes lui permettant de supporter des modifications rapides de l'état d'hydratation, ce qui masquerait les variations induites par l'exposition au benzène. Cependant, des concentrations de benzène aussi élevées que 65 (20ppm), 650 (200ppm) et 6500 $mg.m^{-3}$ (2000ppm), sont susceptible de générer des effets. A titre de

comparaison, des concentrations maximales de toluène et de xylène sans effet sur la croissance chez les végétaux sont respectivement de 60 et 160 $mg.m^{-3}$ (Cape, 2003).

On pourrait aussi supposer que la durée d'exposition de 24 heures ne soit pas suffisante pour l'expression de certains effets. La formation de MDA et la dégradation de la chlorophylle peuvent avoir lieu dans un délai supérieur aux 24 heures d'exposition. Cela a déjà été observé par Smeets *et al* (2005). Ils mettent en évidence chez *Phaseolus vulgaris* une augmentation des activités de l'APOX et de la GPOX après 24 heures d'exposition à une concentration réaliste (2 µM) de sulfate de cadmium, alors que l'augmentation des concentrations du MDA n'est observée qu'après 48 heures d'exposition et la chlorose, après 72 heures. D'autre part, Roy *et al* (1992) décrivent que les espèces végétales sensibles aux pollutions présentent des activités peroxydasiques élevées tandis que les espèces végétales tolérantes ne montrent que de faibles activités. Ainsi, les faibles variations des activités peroxydasiques chez *T. ruralis* exposé au benzène traduirait la tolérance de cette espèce à ce composé.

Un autre aspect à prendre en considération est la forte variabilité entre réplicats observée pour chaque marqueur. Les fortes concentrations appliquées peuvent expliquer la non reproductibilité des réponses biologiques.

b) Étude de l'expression de biomarqueurs du stress oxydant chez Tortula ruralis *en fonction de la durée d'exposition au benzène*

L'étude de la cinétique d'accumulation du benzène a mis en évidence que le maximum de benzène était accumulé après 150 minutes d'exposition. De la même manière qu'il n'y pas de proportionnalité entre les durées d'exposition et la quantité de benzène accumulée chez *T. ruralis*, il est possible que la réponse des biomarqueurs de stress oxydant diffère en fonction de la durée d'exposition au benzène. L'exposition de la mousse à une forte concentration de benzène peut induire une réaction de l'organisme. Ainsi, l'objectif de cette expérience est de déterminer si des variations de l'expression des biomarqueurs de stress peuvent être mises en évidence après des durées d'exposition plus courtes.

Les expériences préliminaires ont montré l'influence de l'état d'hydratation sur l'expression des biomarqueurs de stress oxydant. Aussi nous présentons, figure 113, la variation de l'état d'hydratation des mousses au cours des différentes durées d'exposition à 200 ppm de benzène.

La mousse est systématiquement plus hydratée à la fin de l'exposition qu'au début.

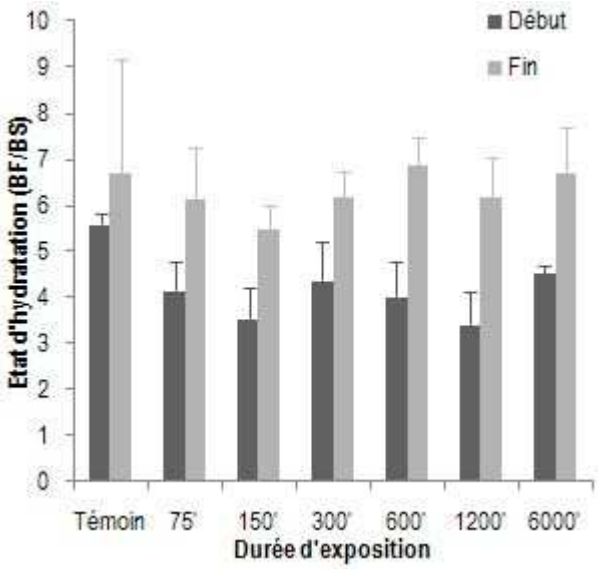


Figure 113: Etat d'hydratation chez Tortula ruralis *avant et après exposition à 200 ppm de benzène pendant différentes durées (Test de Wilcoxon pour échantillons appariés, n=5)*

Remarque : l'exposition témoin a été réalisée à une autre période que celle des expositions au benzène.

Il est possible que les concentrations initiales de certains biomarqueurs soient très différentes des concentrations mesurées dans les autres échantillons. Toutefois, ceci n'empêche pas l'étude des variations entre l'état initial et l'état final de l'expostion témoin, et permet de comparer les variations observées entre les différentes expositions.

i- Influence de la durée d'exposition au benzène sur les concentrations en protéines totales chez *Tortula ruralis*

Les concentrations en protéines totales en fonction des différentes durées d'exposition au benzène sont présentées dans la figure 114.

D'une manière générale, les concentrations finales en protéines totales chez *T. ruralis* sont légèrement plus élevées que les concentrations initiales. Cependant, cette différence n'est pas significative.

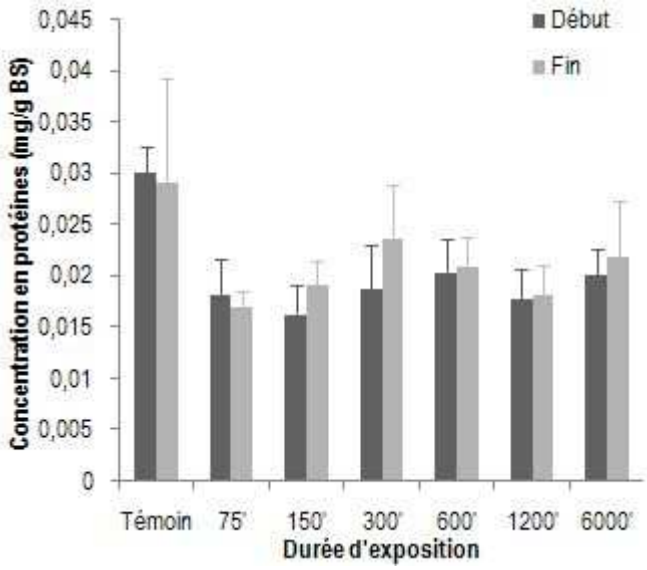


Figure 114: Concentrations en protéines totales chez Tortula ruralis *avant et après exposition à 200 ppm de benzène pendant différentes durées (Test de Wilcoxon pour échantillons appariés, n=5)*

L'augmentation de la concentration en protéines atteint la valeur maximale pour l'exposition pendant 300 minutes.

ii- Influence de la durée d'exposition au benzène sur l'activité de l'ascorbate et de la guaïacol peroxydases chez *Tortula ruralis*

Les activités de l'APOX et de la GPOX en fonction des différentes durées d'exposition au benzène sont présentées dans les figures 115 et 116.

Globalement, les activités enzymatiques de l'ascorbate et de la guaïcol péroxydases ont tendance à augmenter suite à l'exposition au benzène, et ce quelle que soit la durée d'exposition. L'expérience précédente avait déjà mis en évidence cette tendance lors de l'exposition à trois concentrations de benzène différentes.

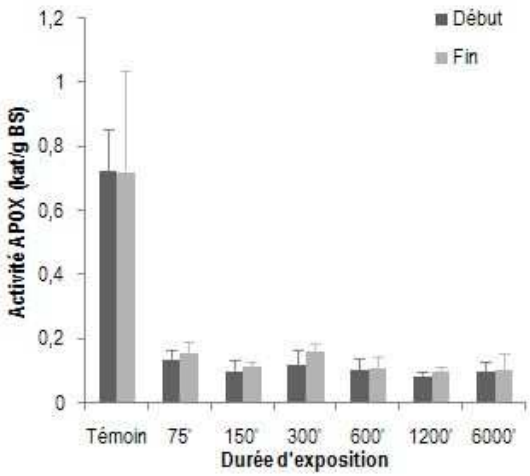


Figure 115: Activité de l'APOX chez Tortula ruralis *avant et après exposition à 200 ppm de benzène pendant différentes durées (Test t de Student pour échantillons appariés, n=5)*

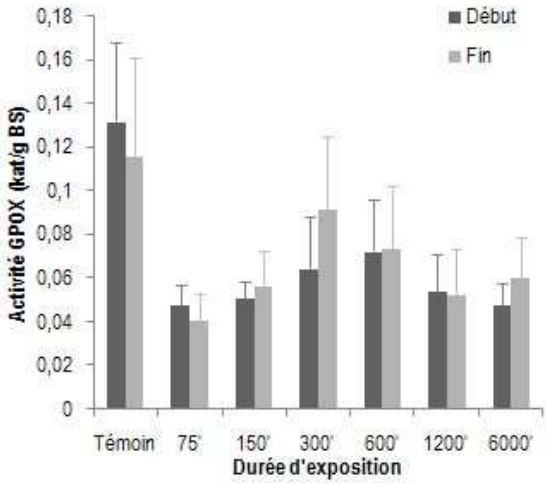


Figure 116: Activité de la GPOX chez Tortula ruralis *avant et après exposition à 200 ppm de benzène pendant différentes durées (Test t de Student pour échantillons appariés, n=5)*

Cette expérience fait apparaître un pic d'augmentation des activités enzymatiques pour l'exposition d'une durée de 300 minutes. Les mesures d'accumulation de benzène en fonction des durées d'exposition (présentées dans les figures 117 et 118) ont montré un pic d'accumulation du benzène pour une durée d'exposition de 150 minutes. Ce pic d'activités enzymatiques peut correspondre à une réponse différée à ce pic d'accumulation en benzène. Une autre hypothèse serait que la réponse métabolique de l'organisme à la présence de benzène est déclenchée à partir du pic d'accumulation après 150 minutes d'exposition, ce qui entraîne l'observation d'une activité métabolique maximale après 300 minutes, et une diminution des concentrations en benzène chez la mousse à cette durée d'exposition.

Malgré de nombreuses réplications, notons qu'il existe une forte variabilité intra-espèce des activités enzymatiques notamment chez le témoin.

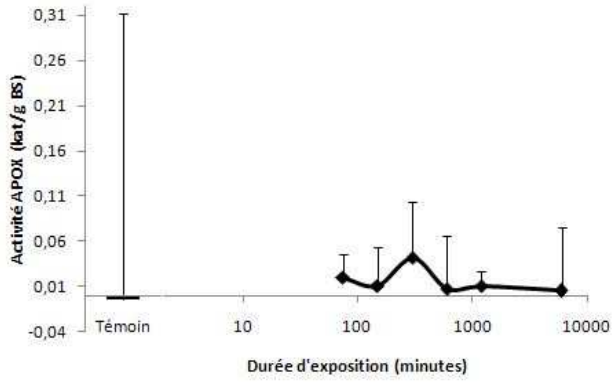


Figure 117: Variation de l'activité de l'APOX chez Tortula ruralis *après exposition (activité finale - activité initiale) à 200 ppm de benzène pendant différentes durées (Test t de Student pour échantillons appariés, n=5)*

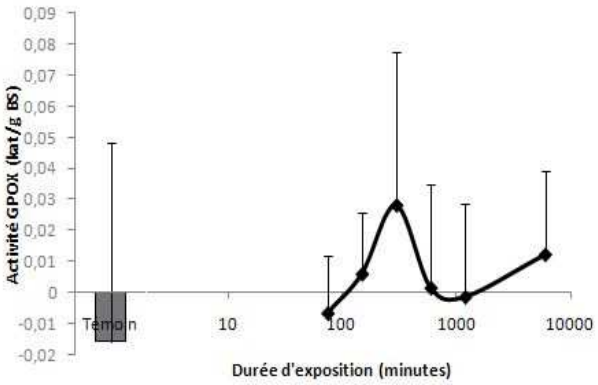


Figure 118: Variation de l'activité de la GPOX chez Tortula ruralis *après exposition (activité finale - activité initiale) à 200 ppm de benzène pendant différentes durées (Test t de Student pour échantillons appariés, n=5)*

iii- Influence de la durée d'exposition au benzène sur la péroxydation des lipides membranaires chez *Tortula ruralis*

Les concentrations en MDA en fonction des différentes durées d'exposition au benzène sont présentées dans la figure 119. Les concentrations en MDA augmentent systématiquement au cours de l'exposition sauf pour le témoin. Cependant, cette augmentation n'est pas significative. La valeur maximale de concentration en MDA est obtenue pour l'exposition à 150 minutes. Compte tenu de l'augmentation tout aussi systématique du taux d'hydratation dans le cadre de ces expositions, le lien établi précédemment entre l'hydratation de la mousse et les concentrations en MDA est à nouveau mis en évidence.

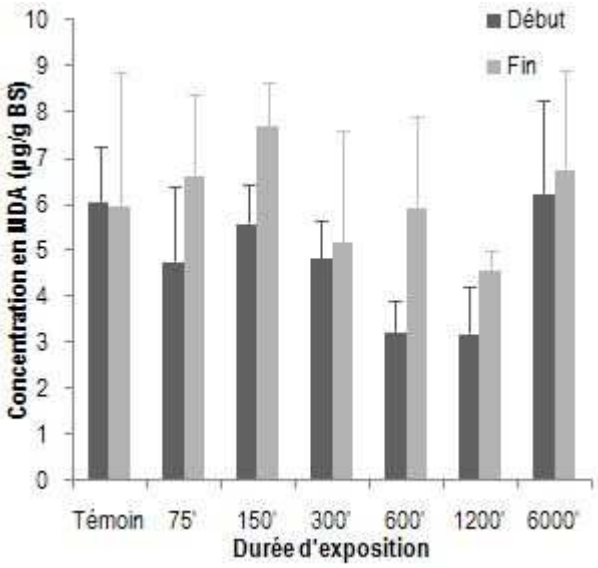


Figure 119: Concentrations en MDA chez Tortula ruralis *avant et après exposition à 200 ppm de benzène pendant différentes durées (Test de Wilcoxon pour échantillons appariés, n=5)*

iv- Influence de la durée d'exposition au benzène sur les concentrations chlorophylles et l'indice de phéophytinisation chez *Tortula ruralis*

Les concentrations en chlorophylles en fonction des différentes durées d'exposition au benzène sont présentées dans les figures 120, 121 et 122. Les durées d'exposition au benzène ne semblent pas interférer avec les concentrations en chlorophylles. Les biomarqueurs chlorophylliens semblent peu sensibles aux expositions à 200 ppm de benzène, quelle que soit la durée de l'exposition.

La figure 123 présente l'indice de phéophytinisation en fonction des différentes durées d'exposition au benzène. L'augmentation de l'indice de phéophytinisation n'est pas significative.

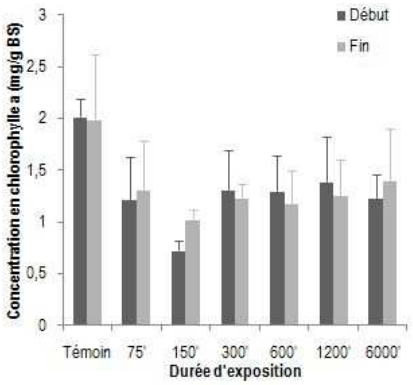


Figure 120: Concentrations en chlorophylle a chez Tortula ruralis *avant et après exposition à 200 ppm de benzène pendant différentes durées (Test de Wilcoxon pour échantillons appariés, n=5)*

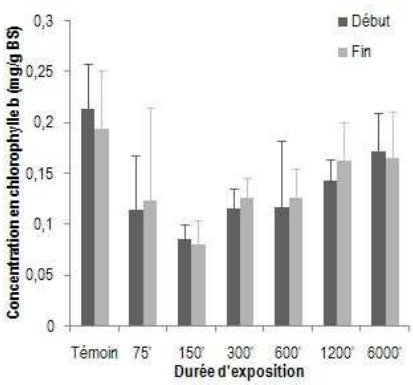


Figure 121: Concentrations en chlorophylle b chez Tortula ruralis *avant et après exposition à 200 ppm de benzène pendant différentes durées (Test de Wilcoxon pour échantillons appariés, n=5)*

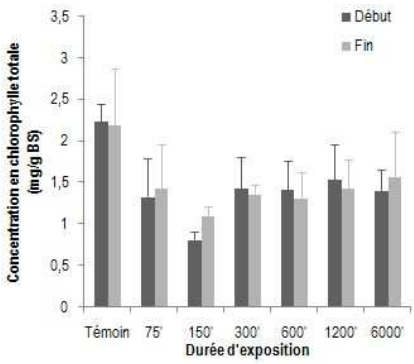


Figure 122: Concentrations en chlorophylle totale chez Tortula ruralis *avant et après exposition à 200 ppm de benzène pendant différentes durées (Test de Wilcoxon pour échantillons appariés, n=5)*

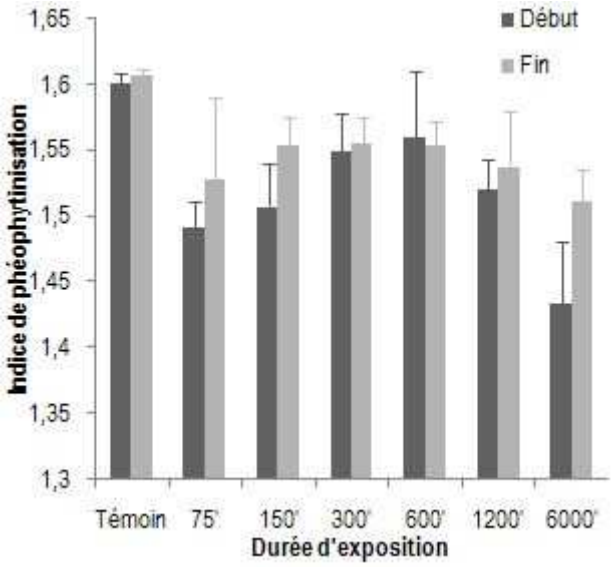


Figure 123: Indice de phéophytinisation chez Tortula ruralis *avant et après exposition à 200 ppm de benzène pendant différentes durées (Test de Wilcoxon pour échantillons appariés, n=5)*

v- Discussion

Au cours des expositions à 200 ppm de benzène avec des durées croissantes d'exposition, seules les concentrations en MDA ont augmenté significativement, à l'exception des témoins et des expositions de durées intermédiaires (300 et 600 minutes). Cette augmentation s'observe après 75 minutes d'exposition, ce qui infirme l'hypothèse précédente selon laquelle les variations en MDA nécessiteraient une durée d'exposition supérieure à 24 heures. Toutefois, il faut noter que les variations des concentrations du MDA et celles de l'état d'hydratation de la mousse vont dans le même sens. Un lien de cause à effet pourrait exister entre ces deux paramètres. En effet, Breuil-Sée (1995) observe une modification de la conformation membranaire chez la mousse en reviviscence. Cette modification peut s'accompagner d'une modification de la composition en acides gras insaturés des membranes et parois. Une telle modification pourrait être à l'origine d'une variation des concentrations en MDA mesurées chez la mousse lorsque l'état d'hydratation est augmenté.

Les durées d'exposition au benzène ne semblent pas avoir d'effet sur les activités des peroxydases et sur les chlorophylles chez *T. ruralis* car ces variations se confondent avec celles induites par la variabilité intrinsèque de la mousse.

c) Évolution de l'expression de biomarqueurs du stress oxydant chez Tortula ruralis après une exposition à une forte concentration de benzène

Les travaux menés sur l'accumulation du benzène chez *Tortula ruralis* a montré une forte désorption de ce composé volatil chez la mousse après qu'elle y ait été exposée. Il serait intéressant de déterminer si les biomarqueurs de stress oxydant sont également susceptibles de varier lorsque la mousse passe d'un milieu très contaminé en benzène à un milieu non contaminé.

Le taux d'hydratation avant et après exposition pendant 20 heures à 200 ppm de benzène , puis 2 heures, 4 heures et 8 heures après l'arrêt de l'exposition, est présentée dans la figure 124. Le taux d'hydratation suite à l'exposition pendant 20 heures en enceinte hermétique à 200 ppm de benzène est plus élevée qu'au début, excepté 4 heures après l'arrêt de l'exposition.

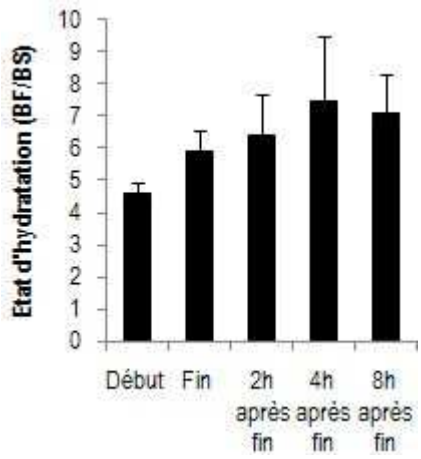


Figure 124: Etat d'hydratation chez Tortula ruralis *avant et après exposition à 200 ppm de benzène pendant 24 heures, puis 2, 4 et 8 heures à l'issue de l'exposition (Test de Wilcoxon pour échantillons appariés, n=5)*

i- Évolution de la concentration en protéines totales et des activités de l'ascorbate et de la guaïacol peroxydases chez *Tortula ruralis* après son exposition au benzène

Les concentrations en protéines totales et les activités de l'APOX et de la GPOX avant et après exposition pendant 20 heures à 200 ppm de benzène , puis 2 heures, 4 heures et 8 heures après l'arrêt de l'exposition, sont présentées dans les figures 125, 126 et 127. Les concentrations en protéines totales ne varient pas à l'issue de l'exposition ni plusieurs heures après. Le benzène n'engendrerait ni la dégradation de protéines ni la synthèse protéique. L'activité de l'APOX augmente à l'issue de l'exposition puis diminue légèrement, sans que ces variations ne soient significatives. Par contre, l'activité de la GPOX ne varie pas.

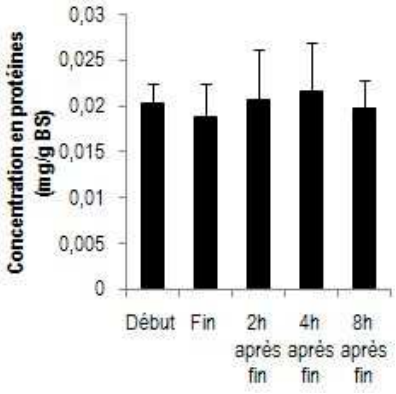


Figure 126: Concentrations en protéines totales chez Tortula ruralis *avant et après exposition à 200 ppm de benzène pendant 24 heures, puis 2, 4 et 8 heures à l'issue de l'exposition (Test t de Student pour échantillons appariés, n=5)*

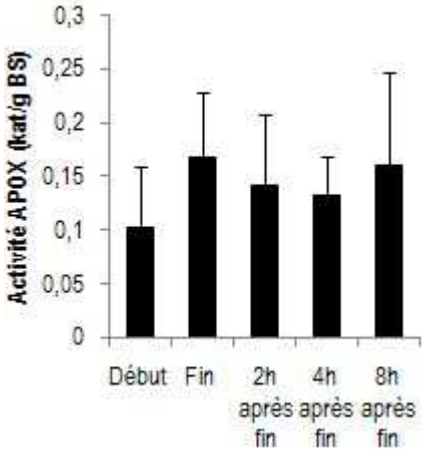


Figure 125: Activité de l'APOX chez Tortula ruralis *avant et après exposition à 200 ppm de benzène pendant 24 heures, puis 2, 4 et 8 heures à l'issue de l'exposition (Test de Wilcoxon pour échantillons appariés, n=5)*

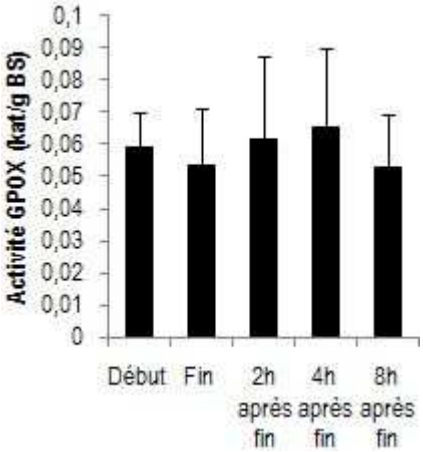


Figure 127: Activité de la GPOX chez Tortula ruralis *avant et après exposition à 200 ppm de benzène pendant 24 heures, puis 2, 4 et 8 heures à l'issue de l'exposition (Test t de Student pour échantillons appariés, n=5)*

ii- Évolution des concentrations en malondialdéhyde chez *Tortula ruralis* après son exposition au benzène

Les concentrations en MDA avant et après exposition pendant 20 heures à 200 ppm de benzène , puis 2 heures, 4 heures et 8 heures après l'arrêt de l'exposition, est présentée à la figure 128. Les concentrations en MDA chez *T. ruralis* diminuent suite à l'exposition sans que cela soit significatif. Dans les précédentes expérimentations, les concentrations en MDA variaient de la même manière que l'état d'hydratation. Dans le cadre de cette expérience, les concentrations en MDA varient en sens inverse.

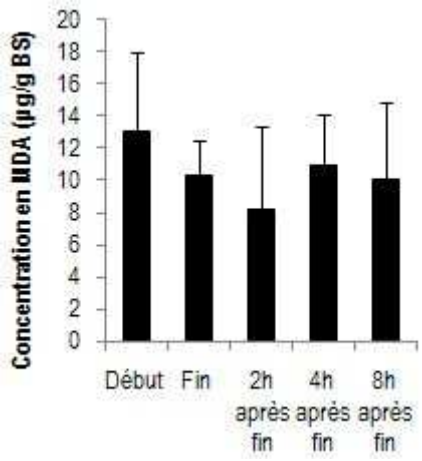


Figure 128: Concentrations en MDA chez Tortula ruralis *avant et après exposition à 200 ppm de benzène pendant 24 heures, puis 2, 4 et 8 heures à l'issue de l'exposition (Test de Wilcoxon pour échantillons appariés, n=5)*

iii- Évolution des concentrations en chlorophylles et de l'indice de phéophytinisation chez *Tortula ruralis* après son exposition au benzène

Les concentrations en chlorophylles avant et après exposition pendant 20 heures à 200 ppm de benzène , puis 2 heures, 4 heures et 8 heures après l'arrêt de l'exposition, sont présentées dans les figures 129, 130 et 131. La concentration en chlorophylle-a a tendance à évoluer suivant le même profil que l'état d'hydratation de la mousse, bien que l'augmentation observée ne soit pas significative. La chlorophylle b varie au cours de l'exposition sans qu'il ne soit pas possible d'établir de lien avec l'exposition au benzène.

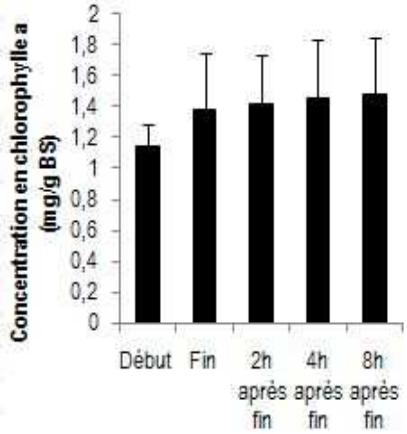


Figure 129: Concentrations en chlorophylle a chez Tortula ruralis *avant et après exposition à 200 ppm de benzène pendant 24 heures, puis 2, 4 et 8 heures à l'issue de l'exposition (Test de Wilcoxon pour échantillons appariés, n=5)*

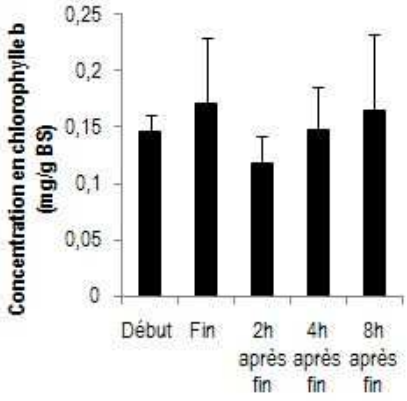


Figure 130: Concentrations en chlorophylle b chez Tortula ruralis *avant et après exposition à 200 ppm de benzène pendant 24 heures, puis 2, 4 et 8 heures à l'issue de l'exposition (Test de Wilcoxon pour échantillons appariés, n=5)*

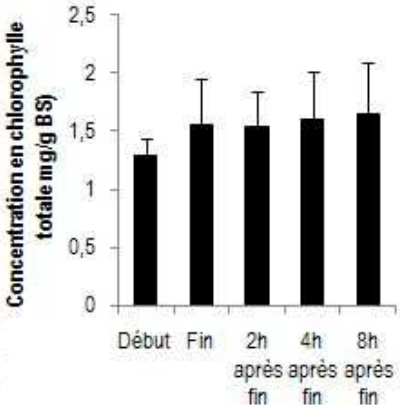


Figure 131: Concentrations en chlorophylle totale chez Tortula ruralis *avant et après exposition à 200 ppm de benzène pendant 24 heures, puis 2, 4 et 8 heures à l'issue de l'exposition (Test de Wilcoxon pour échantillons appariés, n=5)*

L'indice de phéophytinisation avant et après exposition pendant 20 heures à 200 ppm de benzène , puis 2 heures, 4 heures et 8 heures après l'arrêt de l'exposition, est présentée dans la figure 132. L'indice de phéophytinisation, comme lors de précédentes expériences, suit l'évolution du taux d'hydratation. Ainsi, cet indice a tendance à augmenter après 20 heures d'exposition.

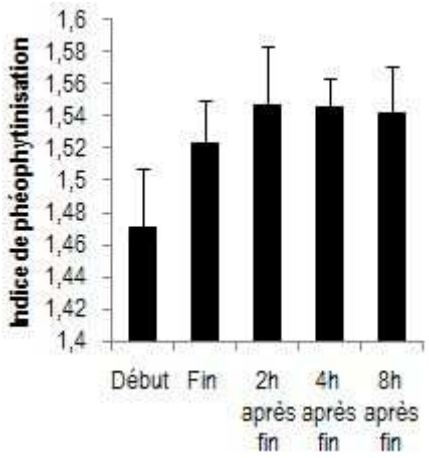


Figure 132: Indice de phéophytinisation chez Tortula ruralis *avant et après exposition à 200 ppm de benzène pendant 24 heures, puis 2, 4 et 8 heures à l'issue de l'exposition (Test de Wilcoxon pour échantillons appariés, n=5)*

iv- Discussion de l'évolution de l'expression des biomarqueurs de stress oxydant chez *Tortula ruralis* après l'arrêt d'une exposition au benzène en conditions contrôlées

À l'issue de l'exposition de *T. ruralis* durant 20 heures à 200 ppm de benzène, les concentrations en protéines et en chlorophylle totales ainsi que l'activité de la GPOX n'ont pas été modifiées. Par contre, l'activité de l'APOX augmente significativement à l'issue de l'exposition tandis que la concentration en MDA diminue 2 heures après la fin de l'exposition. Mais 2 heures après l'arrêt de l'exposition, les valeurs observées pour ces deux paramètres redevienent identiques aux valeurs initiales. La diminution des concentrations en MDA pourrait être induite par l'augmentation de l'activité de l'APOX qui permet de diminuer la quantité d'ERO dans la cellule (Kumar-Tewari *et al*, 2002). Très rapidement, l'organisme retrouverait son statut initial, traduisant ainsi une très forte capacité de réactions et d'adaptation aux variations des conditions environnementales.

L'état d'hydratation de la mousse augmente après l'exposition et se maintient après l'arrêt de cette exposition. De la même manière, l'indice de phéophytinisation augmente dans un premier temps puis se stabilise. Cette augmentation est liée aux concentrations de la chlorophylle a qui, au cours de cette expérience, tendent à augmenter bien que cela ne soit pas significatif. L'augmentation de l'indice de phéophytinisation serait donc plus liée à une augmentation des concentrations de la chlorophylle a que par une diminution de phéophytine a. Des résultats similaires ont été obtenus par Bignal *et al* (2008) chez *Rhytidiadelphys squarrosus* exposé en milieu contaminé par le trafic routier.

2) Etude *in situ* de la réponse de biomarqueurs du stress oxydant chez *Tortula ruralis* exposée à un stress environnemental global

Dans le cadre de l'expérimentation *in situ* menée à grande échelle sur le littoral dunkerquois (octobre 2008), nous avons étudié les mêmes biomarqueurs de stress oxydant que ceux étudiés lors des expositions en conditions contrôlées. Ainsi *T. ruralis* a été exposée sur 3 sites de typologie théoriquement différente : un site (Ind) localisé dans la zone industrielle de Dunkerque, juste à côté d'une usine de fabrication de polyethylène; un site urbain (Urb) au coeur de Saint-Pol-sur-Mer située à proximité de la zone industrielle; un site périurbain (Péri-Urb) distant de la zone industrielle d'une dizaine de kilomètres.

Les conditions météorologiques et les concentrations en BTEX au cours de l'exposition sur ces 3 sites ont été présentées précédemment (tableau 8). Nous rappelons que les concentrations atmosphériques en BTEX sont légèrement plus élevées sur le site industriel au cours de la première semaine d'exposition, tandis qu'au cours de la seconde semaine, c'est le site ubain qui présente des teneurs supérieures en BTEX.

En conditions réelles d'exposition, le degré d'hydratation devient un paramètre de première importance puisque les mousses, de par leur nature poïkilohydrique, réagiront aux variations de l'umidité ambiante. Il risque donc d'y avoir une interférence entre la compensation au stress hydrique et celle liée à l'exposition aux contaminants atmosphériques.

Les résultats montrent que le taux d'hydratation de *T. ruralis* est systématiquement plus faible à la fin de l'expérimentation qu'au début sans que cette différence soit cependant statistiquement significative (figure 133).

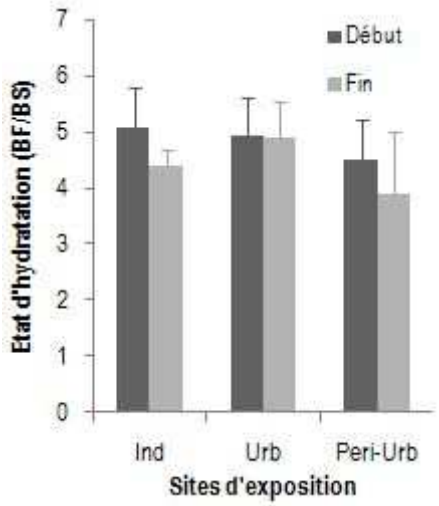


Figure 133: Etat d'hydratation chez Tortula ruralis *avant et après l'exposition durant 2 semaines sur 3 sites du littoral dunkerquois (22 : site industriel; 23 : site urbain; 24 : site périurbain - Test t de Student pour échanitllons appariés, n=5)*

a) Variation de la concentration en protéines totales et des activités de l'ascorbate et de la guaïacol peroxydases chez Tortula ruralis *soumis à un stress environnemental global*

Les figures 134, 135 et 136 présentent les concentrations en protéines totales et les activités de l'APOX et de la GPOX avant et après exposition sur les 3 sites. Dans l'ensemble, les concentrations en protéines totales et les activités enzymatiques de l'APOX et de la GPOX diminuent après l'exposition de *T. ruralis in situ*, notamment sur le site industriel. Cette diminution est significative pour les activités enzymatiques de mousses exposées sur le site périurbain. Sur le site urbain, on note aussi une tendance à la diminution des concentrations en protéines et de l'activité de l'APOX ; par contre, l'acitivité de la GPOX tend à augmenter.

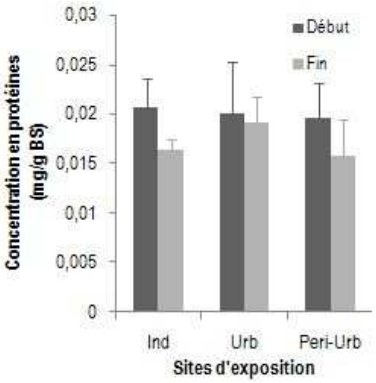


Figure 134: Concentrations en protéines totales chez Tortula ruralis *avant et après l'exposition durant 2 semaines sur 3 sites du littoral dunkerquois (Ind : site industriel; Urb : site urbain; Péri-Urb : site périurbain - Test de Wilcoxon pour échantillons appariés, n=5)*

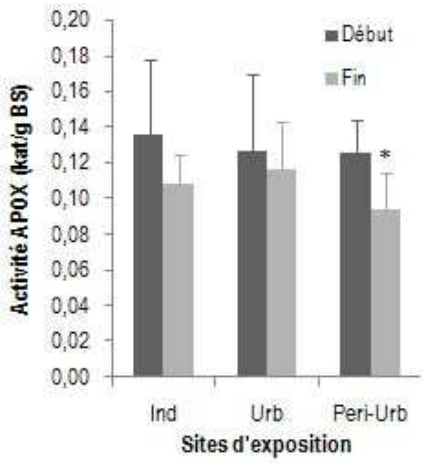


Figure 135: Activité de l'APOX chez Tortula ruralis *avant et après exposition durant 2 semaines sur 3 sites de littoral dunkerquois (Ind : site industriel; Urb : site urbain; Péri-Ur : site péri-urbain - Test de Wilcoxon pour échantillons appariés, n=5; différence significative * : p<0,05)*

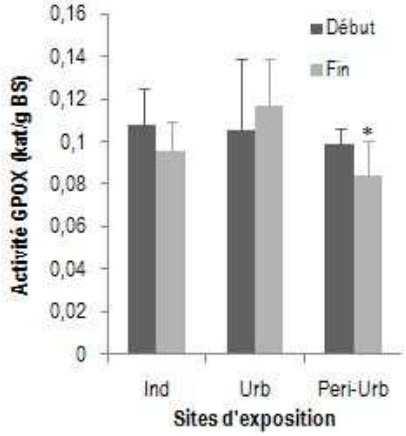


Figure 136: Activité de la GPOX chez Tortula ruralis *avant et après exposition durant 2 semaines sur 3 sites du littoral dunkerquois (Ind : site industriel; Urb : site urbain; Péri-Urb : site péri-urbain – test t de Student pour échantillons appariés, n=5 ; différence significative * : p<0,05)*

b) Variation des concentrations en malondialdéhyde chez Tortula ruralis *soumis à un stress environnemental global*

La figure 137 présente les concentrations en MDA avant et après exposition sur les 3 sites. Les concentrations en MDA tendent à augmenter chez *T. ruralis* exposé sur le site industriel et urbain, la peroxydation des membranes lipidiques serait donc plus importante sur les 2 sites les plus contaminés et les

plus proches des sources de contaminations (industrielles - trafic automobile).

Sur le site périurbain, on note une tendance à la diminution des concentrations, toutefois les variations observées ne sont pas significatives.

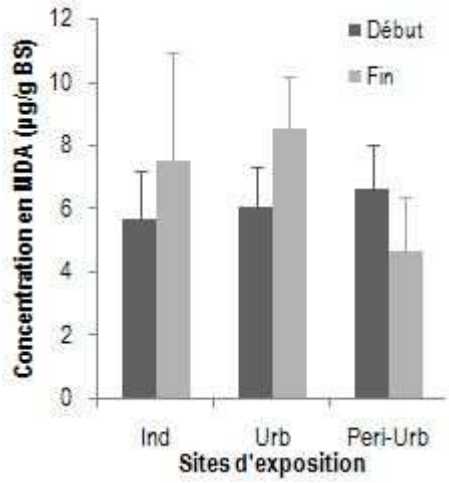


Figure 137: Concentrations en MDA chez Tortula ruralis *avant et après l'exposition durant 2 semaines sur 3 sites du littoral dunkerquois (Ind : site industriel; Urb : site urbain; Péri-Urb : site périurbain - Test de Wilcoxon pour échantillons appariés, n=5)*

c) Variation des concentrations en chlorophylles et de l'indice de phéophytinisation chez Tortula ruralis soumis à un stress environnemental global

Les figures 138, 139 et 140 montrent que les concentrations en chlorophylles (a, b et totale) tendent à diminuer sur le site indusitrel et à augmenter sur le site urbain (augmentation significative de la chlorophylle b sur le site urbain). Les concentrations en chlorophylle a et totale tendent à diminuer sur le site péri-urbain alors que la chlorophylle b montre une tendance à l'augmentation.

La figure 141 présente l'indice de phéophytinisation. Ce dernier a tendance à diminuer sur les sites industriel et péri-urbain mais à augmenter sur le site urbain. Cependant, il n'est pas possible de conclure à une dégradation des pigments chlorophylliens induite par l'exposition puisque les concentrations en chlorophylle b augmentent de manière significative sur le site exposé aux contaminations industrielles et urbaines.

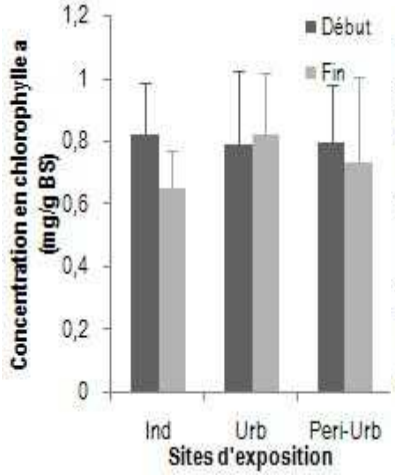


Figure 138: Concentrations en chlorophylle a chez Tortula ruralis *avant et après l'exposition durant 2 semaines sur 3 sites du littoral dunkerquois (Ind : site industriel; Urb : site urbain; Péri-Urb : site périurbain - Test t de Student pour échantillons appariés, n=5)*

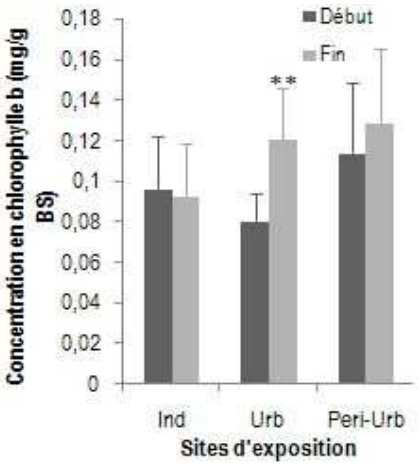


Figure 139: Concentrations en chlorophylle b chez Tortula ruralis *avant et après exposition durant 2 semaines sur 3 sites du littoral dunkerquois (Ind : site industriel; Urb : site urbain; Péri-Urb : site péri-urbain – Test t de Student pour échantillons appariés, n=5; différence significative ** : p<0,01))*

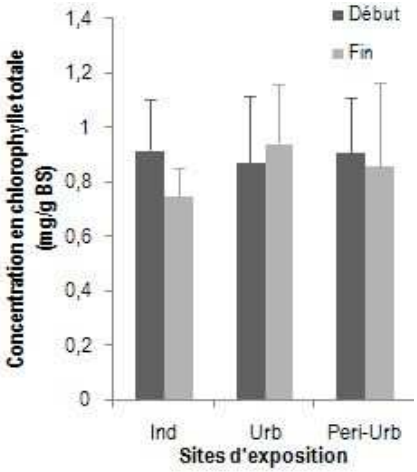


Figure 140: Concentrations en chlorophylle totale chez Tortula ruralis avant et après exposition durant 2 semaines sur 3 sites du littoral dunkerquois (Ind : site industriel; Urb : site urbain; Péri-Urb : site péri-urbain - Test t de Student pour échantillons appariés, n=5)

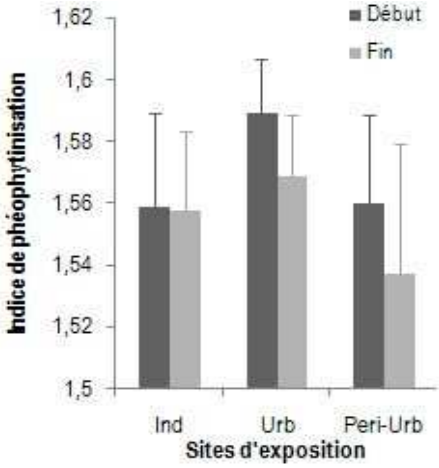


Figure 141: Indice de phéophytinisation chez Tortula ruralis *avant et après exposition durant 2 semaines sur 3 sites du littoral dunkerquois (Ind : site industriel; Urb : site urbain; Péri-Urb : site péri-urbain - test t de Student pour échantillons appariés, n=5)*

d) Discussion

Les concentrations des protéines et les activités enzymatiques chez *T. ruralis* ont tendance à diminuer après l'exposition *in situ*. Inversement, les concentrations du MDA ont tendance à augmenter sauf sur le site périurbain (site le plus éloigné de la zone industrielle). La diminution des activités des enzymes peroxydases peut engendrer une augmentation des concentrations des ERO dans la cellule, à l'origine de la peroxydation des lipides membranaires (augmentation du MDA). Selon Dhindsa (1982), la peroxydation lipidique inhibe probablement la synthèse de protéines en relarguant des produits toxiques pouvant réagir avec ou inactiver des constituants du complexe de synthèse des protéines. Ceci pourrait expliquer la diminution (significative sur le site industriel) des concentrations des protéines totales chez les mousses exposées.

Les expositions en milieux contaminés peuvent dégrader les pigments chlorophylliens (Tretiach *et al*, 2007). Dans le cadre de notre expérience, les concentrations des chlorophylles tendent à diminuer à l'issue de l'exposition, à l'exception de la chlorophylle b chez la mousse exposée sur le site urbain. Cette augmentation peut être induite par la nature des contaminants présents sur ce site. Effectivement, le trafic routier en milieu urbain est à l'origine d'une forte contamination en composés azotés. Bignal *et al* (2008) suggèrent que de telles sources d'azote favorisent la croissance des mousses et, de ce fait, peuvent induire une augmentation de l'activité photosynthétique et de la concentration des chlorophylles.

Par ailleurs, sur le site industriel, l'indice de phéophytinisation diminue, bien que cela ne soit pas significatif. Dans ce cas, la variation de cet indice semble causée par la diminution de la concentration de la chlorophylle a.

Toutefois, compte tenu de la variabilité importante observée pour les différents biomarqueurs, il est difficile de conclure sur les dommages oxydatifs générés chez *T. ruralis* par l'exposition à un stress environnemental. Par ailleurs, il semble exister un lien important entre les paramètres biologiques mesurés et l'état d'hydratation de l'organisme. Aussi, les variations observées pourraient être induites, au moins en partie, par la variation des teneurs en eau chez la mousse.

3) Conclusion sur l'expression des biomarqueurs de stress oxydant chez *Tortula ruralis*

Dans le cadre de nos différentes expériences, nous n'observons ni une dégradation des protéines ni une augmentation de leurs concentrations. Dhindsa (1982) décrit l'inhibition de la synthèse protéique causée par la peroxydation lipidique et la génération de produits toxiques qui en découle. L'auteur démontre également l'induction de la synthèse protéique chez *T. ruralis* suite à un stress hydrique (Dhindsa, 1987a). Nous pouvons alors émettre deux hypothèses : soit les expositions réalisées n'ont eu aucun effet sur les protéines totales, soit la dégradation des protéines engendrée par les expositions au benzène est compensée par une synthèse protéique induite par la variation de l'état d'hydratation de la mousse.

Il apparaît également difficile de conclure sur l'effet des expositions en conditions contrôlées et *in situ* sur les activités de l'APOX et de la GPOX. Roy *et al* (1992) décrivent de faibles activités peroxydasiques, chez les organismes tolérants à la pollution, alors qu'elles sont élevées chez les organismes sensibles. Paciolla et Tommasi (2003) démontrent que le stress hydrique n'a pas d'influence sur la teneur en ascorbate chez les mousses alors qu'il engendre une diminution chez les hépatiques. L'ascorbate étant impliqué, par l'intermédiaire de l'APOX, dans le recyclage du glutathion, cette observation suggère une forte activité de l'APOX chez les mousses qui assure le recyclage de l'ascorbate. La tolérance de *T. ruralis* au stress hydrique est maintenant bien établie (Proctor *et al,* 2007b) et la faible activité de l'APOX semble indiquer sa tolérance aux contaminations. La GPOX exprime l'activité de l'ensemble des peroxydases de l'organisme. Ces enzymes sont impliquées dans la compensation de nombreux processus à l'origine de stress oxydant, notamment la respiration, la sénescence etc... En conséquence, la variation de l'activité de la GPOX imputable aux expositions au benzène peut être masquée par les variations naturelles de cette enzyme.

De même, les concentrations en MDA varient au cours des expositions, sans que l'on puisse conclure à un effet du benzène. Guschina *et al* (2002) ont mis en évidence une modification de la composition lipidique des membranes chez la mousse *Rhytidiadelphus squarrosus* exposée au plomb. La polarité des lipides chez les mousses exposées se trouve modifiée et le nombre d'acides gras possédant au moins 3 doubles liaisons diminue. Or, on sait que le MDA résulte de la peroxydation des acides gras insaturés à 3 ou plus de 3 doubles liaisons. Ainsi, les expositions en milieu contaminé pourraient entraîner une diminution des concentrations du MDA. De plus, Breuil-Sée (1995) suggère une modification de la conformation des lipides membranaires lors de l'anhydrobiose et de la reviviscence des mousses. L'état d'hydratation de la mousse peut ainsi créer une modification (augmentation ou diminution) des quantités de lipides susceptibles de former du MDA par peroxydation. C'est pourquoi, la formation de MDA chez *T. ruralis* en relation avec l'état d'hydratation peut interférer avec celle induite par les expositions au benzène.

Les concentrations des chlorophylles chez *T. ruralis* présentent une variabilité importante, inhérente à la mousse, mais nous ne pouvons pas conclure à une dégradation des pigments chlorophylliens du fait des expositions au benzène. Tretiach *et al* (2007) montrent une diminution des concentrations de la chlorophylle chez *Hypnum cupressiforme* exposé en milieu urbain. Inversement, Bignal *et al* (2008) et Bakken (1995) suggèrent que l'augmentation des concentrations en chlorophylle observée chez des mousses exposées en milieu urbain est liée à l'émission de composés azotés. Selon ces auteurs, les composés azotés favoriseraient la croissance des mousses et donc l'activité photosynthétique. En fait, *in situ*, les phénomènes de dégradation et de stimulation de la chlorophylle tendent à s'équilibrer car, si certains xénobiotiques ont un effet délétère sur la chlorophylle, d'autres comme les composés azotés stimulent la synthèse chlorophyllienne. En conditions contrôlées, l'augmentation de l'état d'hydratation lors des expositions a pu favoriser la croissance de la mousse. D'ailleurs, les expériences de stress hydrique ont montré une corrélation entre les

teneurs en eau et les concentrations en chlorophylles chez *T. ruralis*. C'est pourquoi les variations des concentrations des chlorophylles ne sont pas nécessairement imputables au benzène.

L'indice de phéophytinisation est quant à lui décrit comme un bon indicateur de la qualité d'un milieu. Peñuelas *et al* (1984) démontrent l'intérêt de cet indice chez *F. antipyretica* pour apprécier la qualité de l'eau d'une rivière. Cependant, l'indice de phéophytinisation augmente avec la croissance de la mousse, du fait de la synthèse de chlorophylle (Margalef, 1982). Comme pour les chlorophylles, nous avons observé, après des expositions en conditions contrôlées, une augmentation conjointe de l'état d'hydratation et de l'indice de phéophytinisation chez *T. ruralis*. D'autre part, Lopez (1989) note des indices de phéophytinisation faibles (1,55) chez les espèces résistances aux stress environnementaux, et des indices élevés (1,65) chez les espèces sensibles. Au regard des valeurs de l'indice observées chez *T. ruralis* au cours de nos expérimentations, notre espèce semble appartenir à la catégorie des espèces tolérantes.

Le comportement des biomarqueurs chez *T. ruralis* lors des expositions au benzène indiquerait une tolérance importante de cette espèce à ce composé. Cette espèce est réputée pour sa résistance au stress hydrique, nous avions aussi émis l'hypothèse selon laquelle elle possédait des mécanismes lui permettant de résister au stress hydrique et que ces mécanismes pourraient lui permettre de supporter le stress induit par des expositions en milieu contaminé. Ces résultats vont dans ce sens.

E. Analyse croisée des conditions d'expositions, des teneurs en benzène et des réponses des biomarqueurs de stress oxydant chez *Tortula ruralis* - Synthèse

1) Synthèse sur les capacités accumulatrices des BTEX chez *Tortula ruralis :* études en conditions contrôlées et *in situ*

L'étude de l'accumulation du benzène en conditions contrôlées fait ressortir les résultats suivants. Lors d'exposition à fortes concentrations, l'accumulation du benzène est corrélée avec la concentration appliquée. L'étude des cinétiques d'accumulation met en évidence une décroissance des concentrations en benzène après 150 minutes d'exposition, ce qui serait en faveur de processus de métabolisation. Enfin, le suivi des concentrations de benzène après arrêt de l'exposition montrerait un phénomène de désorption par la mousse.

In situ, ce phénomène de désorption est favorisé par les conditions météorologiques et notamment la force du vent. Ainsi, les concentrations en BTEX dans les mousses au cours de la première période d'exposition (juin-juillet 2007) sont anti-corrélées avec la force des vents.

De plus, les concentrations de BTEX chez les mousses sont corrélées avec les concentrations atmosphériques en PM_{10}, ce qui supposerait que l'accumulation des BTEX serait d'origine particulaire.

2) Expositions en conditions contrôlées : corrélation entre les concentrations en benzène et les réponses des biomarqueurs de stress oxydant chez *Tortula ruralis*

Nous avons pu observer les liens entre la réponse des biomarqueurs de stress oxydant et les teneurs en benzène chez *T. ruralis et* la durée d'exposition.

a) Réponse des biomarqueurs de stress oxydant en fonction des concentrations en benzène chez Tortula ruralis

Le tableau 27 présente les résultats de l'étude de corrélation entre les biomarqueurs de stress oxydant et les concentrations de benzène et l'état d'hydratation de la mousse pour les 3 expositions (n = 96). Rappelons que les mousses sont exposées à des concentrations de benzène de 0, 20, 200 et 2000 ppm pendant 24h. Les concentrations de benzène de la mousse sont corrélées avec les concentrations de MDA et des chlorophylles et avec l'activité de la GPOX; par contre, elles sont anti-corrélées avec l'activité de l'APOX. L'état d'hydratation est corrélé quant à lui avec les teneurs en MDA et en chlorophylles, avec l'activité de la GPOX et avec l'indice de phéophytinisation. Par contre, il est anti-corrélé avec les teneurs en protéines et avec l'activité de l'APOX. Par ailleurs, les teneurs en benzène sont corrélées avec l'état d'hydratation. Il convient de noter que les coefficients de corrélation, bien que significatifs, sont assez faibles, surtout en ce qui concerne les corrélations entre les concentrations de benzène et les biomarqueurs.

n=96	MDA	Proteines	APOX	GPOX	CHL a	CHL b	CHL tot	Ip	Biomasse fraîche / Biomasse
$[benzène]^{\circ}_{mousse}$	0,25	-0,15	-0,24	0,20	0,22	0,27	0,24	0,01	0,50
Biomasse fraîche / Biomasse sèche	0,47	-0,36	-0,68	0,56	0,69	0,66	0,71	0,26	1,00

Tableau 27: Corrélations entre les biomarqueurs de stress oxydant et les concentrations de benzène et l'état d'hydratation chez Tortula ruralis *exposé à différentes concentrations de benzène (0,20, 200 et 2000 ppm). (corrélation de Spearman, n=96 ; en rouge, les coefficients de corrélation significatifs à p<0,05)*

b) Réponse des biomarqueurs de stress oxydant en fonction de la durée d'exposition au benzène chez Tortula ruralis

Le tableau 28 présente les résultats de l'étude de corrélation entre les biomarqueurs de stress oxydant et les durées d'exposition au benzène (200 ppm de 75 à 6000 minutes) et l'état d'hydratation de la mousse. Les concentrations de benzène de la mousse sont corrélées avec les concentrations de MDA et des protéines.

L'état d'hydratation est corrélé avec les teneurs en MDA, en protéines et en chlorophylles, avec l'activité de la GPOX et avec l'indice de phéophytinisation. Il est anti-corrélé avec l'activité de l'APOX. Par ailleurs, les teneurs en benzène sont relativement bien corrélées avec l'état d'hydratation. Il convient de noter que les coefficients de corrélation, bien que significatifs, sont assez faibles, surtout en ce qui concerne les corrélations entre les concentrations de benzène et les biomarqueurs.

n=70	MDA	Proteines	APOX	GPOX	CHL a	CHL b	CHL tot	Ip	Biomasse fraîche / Biomasse sèche
[benzène]°$_{mousse}$	0,38	0,25	-0,20	0,10	0,14	0,13	0,15	0,17	0,79
Biomasse fraîche / Biomasse sèche	0,42	0,54	-0,39	0,37	0,47	0,47	0,48	0,26	1,00

Tableau 28: Corrélation entre les biomarqueurs de stress oxydant et les concentrations de benzène et l'état d'hydratation chez Tortula ruralis *lors d'expositions pendant différentes durées à 200 ppm benzène (Corrélation de Spearman, n=70 ; en rouge les coefficients de corrélation significatifs à p<0,05)*

c) Réponse des biomarqueurs de stress oxydant à l'exposition au benzène pendant 20 heures puis après arrêt de l'exposition, chez Tortula ruralis

Le tableau 29 présente les résultats de l'étude de corrélation entre les biomarqueurs de stress oxydant et les concentrations de benzène de la mousse après arrêt de l'exposition au benzène (exposition à 200 ppm pendant 20 heures, suivi pendant 2, 4 et 8 heures après arrêt de l'exposition). On n'observe aucune corrélation significative entre les concentrations de benzène de la mousse et les biomarqueurs ni avec l'état d'hydratation. Par contre, l'état d'hydratation est corrélé avec les teneurs en protéines et en chlorophylles et avec l'indice de phéophytinisation.

n=25	MDA	Proteines	APOX	GPOX	CHL a	CHL b	CHL tot	Ip	Biomasse fraîche / Biomasse sèche
[benzène]°$_{mousse}$	-0,13	0,06	-0,35	0,06	0,27	0,20	0,25	0,37	0,38
Biomasse fraîche / Biomasse sèche	0,21	0,58	-0,29	0,16	0,63	0,52	0,60	0,58	1,00

Tableau 29: Corrélation entre les biomarqueurs de stress oxydant et les concentrations de benzène et l'état d'hydratation chez Tortula ruralis *lors d'une exposition de 20 heures à 200 ppm de benzène, suivi pendant 2, 4 et 8 heures après l'arrêt de l'exposition (Corrélation de Spearman, n=25 ; en rouge les coefficients de corrélation significatifs à p<0,05)*

3) Expositions *in situ* : corrélation entre les paramètres environnementaux et les réponses des biomarqueurs de stress oxydant chez *Tortula ruralis*

En conditions réelles d'exposition, lors de la seconde période (octobre 2008), on n'observe pas d'augmentation de l'expression des biomarqueurs de stress oxydant chez *T. ruralis.*

En raison de la non accumulation du benzène par la mousse au cours de cette expérience, nous étudions les éventuelles corrélations entre les variations des biomarqueurs de stress oxydant chez la mousse et les teneurs en polluants mesurées par le réseau Atmo Nord Pas de Calais sur les sites industriel (site n°22) et urbain (site n°23) (*cf* tableau 21). Les résultats sont présentés dans le tableau 30.

Les concentrations en protéines totales sont corrélées avec les concentrations atmosphériques en benzène et xylènes. L'activité de l'APOX est corrélée avec les xylènes. L'activité de la GPOX est corrélée avec le benzène. L'indice de phéophytinisation est corrélé avec les concentrations atmosphériques en ozone. Notons toutefois que les concentrations en ozone, fournies par le réseau Nord Pas-de-Calais, ne sont renseignées que pour le site urbain. Enfin, l'état d'hydratation est corrélé avec le benzène.

n=30	Benzène air	Toluène air	Ethylbenzène air	mpXylènes air	oXylène air	SO_2	NO	NO_2	O_3	PM_{10}
MDA	0,047	-0,204	-0,318	0,082	0,082	0,208	0,243	0,243	0,434	0,208
Proteines	0,533	0,098	0,145	0,486	0,486	0,165	0,208	0,208	0,208	0,165
APOX	0,353	-0,177	-0,039	0,490	0,490	0,028	0,017	0,017	0,139	0,028
GPOX	0,416	-0,047	0,008	0,384	0,384	0,231	0,330	0,330	0,434	0,231
CHL a	0,373	0,161	0,137	0,278	0,278	0,123	0,156	0,156	0,087	0,123
CHL b	-0,012	0,369	-0,004	-0,204	-0,204	0,071	0,087	0,087	-0,364	0,071
CHL tot	0,357	0,235	0,145	0,227	0,227	0,132	0,139	0,139	0,052	0,132
Ip	0,169	-0,082	-0,055	0,180	0,180	0,311	0,399	0,399	0,486	0,311
Biomasse fraîche / Biomas:	0,432	0,016	0,216	0,369	0,369	0,156	0,225	0,225	0,442	0,156

Tableau 30: Corrélation entre les biomarqueurs de stress oxydant chez Tortula ruralis *et les concentrations atmosphériques en BTEX, dioxyde de soufre, monoxyde et dioxyde d'azote, ozone et particules PM_{10} (Corrélation de Spearman, n=30 ; en rouge les coefficients de corrélation significatifs à p<0,05)*

L'étude des corrélations entre les biomarqueurs de stress oxydant et les paramètres météorologiques est présentée dans le tableau 31. Ceci montre que les concentrations en protéines et l'activité de l'APOX sont corrélées significativement avec la température et l'humidité relative, et anticorrélées avec la force des vents.

À l'exception des concentrations de MDA et de chlorophylle b, l'expression de l'ensemble des biomarqueurs est corrélée à l'état d'hydratation de la mousse.

n=30	Biomasse Fraîche / Biomasse sèche	Température	Humidité relative	Force des vents
MDA	0,284	-0,158	-0,158	0,158
Proteines	0,773	0,412	0,412	-0,412
APOX	0,676	0,443	0,443	-0,443
GPOX	0,712	0,158	0,158	-0,158
CHL a	0,618	0,173	0,173	-0,173
CHL b	0,201	-0,281	-0,281	0,281
CHL tot	0,582	0,150	0,150	-0,150
Ip	0,425	0,227	0,227	-0,227
Biomasse fraîche / Biomasse sèche	1,000	0,231	0,231	-0,231

Tableau 31: Corrélation entre l'expression des biomarqueurs de stress oxydant chez Tortula ruralis et les paramètres météorologiques (Corrélation de Spearman, n=30 ; en rouge les coefficients de corrélation significatif à p<0,05)

Le tableau 32 présente les corrélations entre les concentrations atmosphériques en BTEX et les paramètres météorologiques. Ces résultats montre que les concentrations atmosphériques en benzène et xylènes sont corrélées avec la température et l'humidité relative, et anticorrélées avec la force des vents. Les concentrations en protéines totales et l'activité de l'APOX chez *T. ruralis* présentant les mêmes liens avec ces paramètres météorologiques, il n'est pas possible de conclure à une relation de cause à effet pour les corrélations entre ces 2 biomarqueurs et les concentrations atmosphériques en benzène et xylènes.

n=30	Température	Humidité relative	Force des vents
Benzène air	0,577	0,577	-0,577
Toluène air	-0,289	-0,289	0,289
Ethylbenzène air	0,000	0,000	0,000
mpXylènes air	0,866	0,866	-0,866
oXylène air	0,866	0,866	-0,866

Tableau 32: Corrélation entre les concentrations atmosphériques en BTEX et les paramètres météorologiques (Corrélation de Spearman, n=30 ; en rouge les coefficients de corrélation significatif à p<0,05)

4) Synthèse des réponses des biomarqueurs de stress oxydant aux différents facteurs de stress chez *Tortula ruralis* : part du stress hydrique et de l'âge dans l'expression des biomarqueurs

Les études préliminaires avaient pour objectif de déterminer l'impact oxydatif du stress hydrique et de définir la variation des biomarqueurs de stress oxydant en fonction de l'âge de la mousse. Ces études ont mis en évidence une influence de l'état d'hydratation de la mousse sur l'expression des biomarqueurs du stress oxydant. D'autre part, les concentrations des protéines totales, du MDA et des chlorophylles ainsi que les

activités de l'APOX et de la GPOX varient en fonction de l'âge de la mousse.

On sait donc que l'état d'hydratation et l'âge de la mousse jouent sur l'expression des biomarqueurs de stress oxydant. Il est nécessaire de déterminer la part de variations des biomarqueurs induites par ces paramètres par rapport aux variations induites au cours d'exposition à des contaminants (en conditions contrôlées et *in situ*).

La figure 142 présente les variations de l'expression des biomarqueurs au cours des différentes expérimentations. Ces variations sont calculées par la différence entre les concentrations ou activités à l'issue de l'exposition et celles au début de l'exposition. La codification des expériences est la suivante :

- valeur initiale soustraite à la valeur après déshydratation (DH) ou réhydratation (RH) au cours des expériences A, B, C ou D ;
- valeur chez la mousse âgée soustraite à la valeur chez la mousse jeune : J-V ;
- valeur au début de l'exposition à 0 ppm de benzène soustraite à la valeur finale : B0 ;
- valeur au début de l'exposition à 20 ppm de benzène soustraite à la valeur finale : B20 ;
- valeur au début de l'exposition à 200 ppm de benzène soustraite à la valeur finale :B200 ;
- valeur au début de l'exposition à 2000 ppm de benzène soustraite à la valeur finale : B2000 ;
- valeur au début de l'exposition témoin de 75 minutes soustraite à la valeur finale : 75 témoin ;
- valeur au début de l'exposition à 200 ppm de benzène pendant 75 minutes soustraite à la valeur finale : B75 ;
- valeur au début de l'exposition à 200 ppm de benzène pendant 150 minutes soustraite à la valeur finale : B150b ;
- valeur au début de l'exposition à 200 ppm de benzène pendant 300 minutes soustraite à la valeur finale : B300 ;
- valeur au début de l'exposition à 200 ppm de benzène pendant 600 minutes soustraite à la valeur finale : B600 ;
- valeur au début de l'exposition à 200 ppm de benzène pendant 1200 minutes soustraite à la valeur finale : B1200 ;
- valeur au début de l'exposition à 200 ppm de benzène pendant 6000 minutes soustraite à la valeur finale : B6000 ;
- valeur au début de l'exposition *in situ* sur le site 22 (industriel) soustraite à la valeur finale : site 22 ,
- valeur au début de l'exposition *in situ* sur le site 23 (urbain) soustraite à la valeur finale : site 23 ;
- valeur au début de l'exposition *in situ* sur le site 24 (péri-urbain) soustraite à la valeur finale : site 24.

Pour chacun des marqueurs biologiques étudié, les variations imputables au stress hydrique et à l'âge ne sont

pas négligeables par rapport à celles observées lors des expositions au benzène ou à un stress environnemental global. Cette analyse renforce la nécessité d'une part, de limiter la variation de l'état d'hydratation de la mousse au cours d'une exposition en disposant un système d'irrigation favorisant une stabilité « hydrique » et, d'autre part, de réaliser une récolte de mousses homogènes en terme d'âge. En effet, ces dispositions permettraient de limiter les variations intra-espèces de l'expression des paramètres biologiques inhérentes à l'état physiologique de la mousse et indépendantes des facteurs abiotiques étudiés.

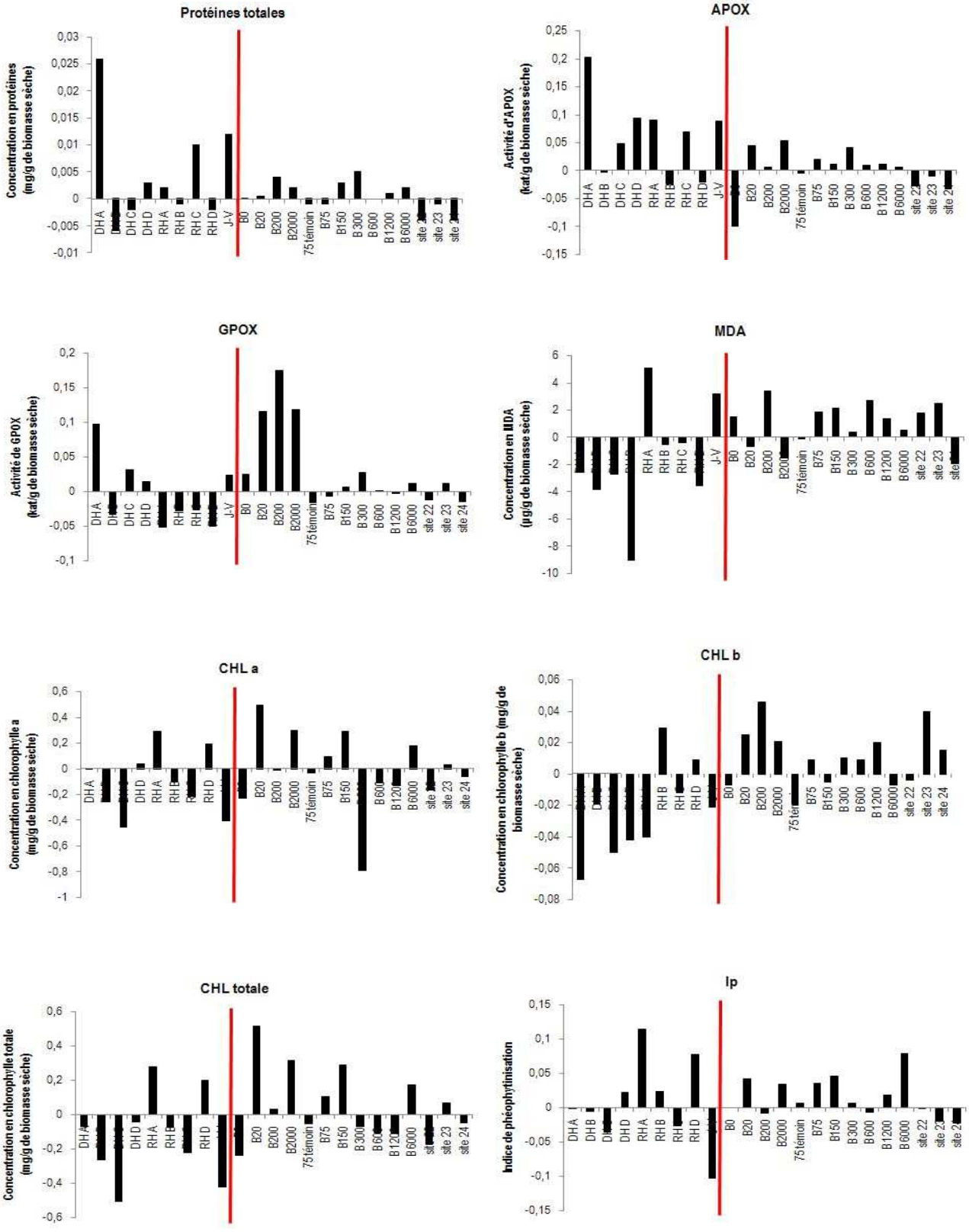


Figure 142: Comparaison des variations des biomarqueurs de stress oxydant au cours des différentes expériences (la barre rouge sépare les variations induites par des facteurs naturelles (eau, âge) de celles induites par des expositions en milieu contaminé)

BILAN ET PERSPECTIVES

VI. Bilan et perspectives

Il n'existe à l'heure actuelle aucune étude sur l'accumulation des COV par les bryophytes, et très peu de travaux traitent du stress oxydant induit chez les bryophytes terrestres sous l'éffet de contaminants atmosphériques. Les expérimentations mises en place dans le cadre de cette thèse avaient pour objectifs de déterminer si les mousses pouvaient constituer de bons accumulateurs de COV, comme ils le sont pour les métaux et les composés organiques lourds (HAP, PCB, dioxines). Ainsi, nous avons cherché à déterminer si des mousses exposées aux BTEX accumulaient ces composés ou si , compte tenu des propriétés volatiles de ces composés, des phénomènes de désorption pouvaient être observés. Enfin, nous avons recherché les effets des BTEX chez les bryophytes en étudiant les variations de biomarqueurs de stress oxydant.

Une première expérience *in situ* a eu pour objectif d'observer les variations au cours du temps des concentrations de BTEX chez trois espèces bryophytiques exposées sur le littoral dunkerquois : deux espèces acrocarpes (*Ceratodon purpureus* et *Tortula ruralis*) et une espèce pleurocarpe (*Pseudoscleropodium purum*). Les résultats obtenus ne font pas apparaître de phénomène d'accumulation, les concentrations chez les mousses augmentant dans un premier temps, puis diminuant en fin d'exposition. *Pseudoscleropodium purum* et *Tortula ruralis* présentent de meilleures capacités d'absorption des COV que *Ceratodon purpureus*.
Cette étude a permis de mettre en évidence l'influence de paramètres environnementaux tels que la force du vent et la pollution particulaire. La force du vent semble soit limiter la fixation des BTEX chez les mousses soit favoriser leur désorption. On a pu observer une corrélation significative entre les concentrations des BTEX dans les mousses et celles des particules atmosphériques PM_{10}. De nombreuses espèces bryophytiques et plus particulièrement les acrocarpes piègent les particules (Clough, 1975; Faburé *et al*, soumis) et c'est par ce biais que les BTEX seraient susceptibles d'être retrouvés chez les mousses. Les particules atmosphériques constitueraient donc une matrice adsorbant les BTEX. D'ailleurs, lors de l'exposition en conditions contrôlées de la mousse à une concentration de 10 $\mu g.m^{-3}$ de benzène (c'est-à-dire cinq fois la concentration moyenne mesurée *in situ*), les teneurs en benzène chez *T. ruralis* sont inférieures aux limites de détection. Puisqu'on ne trouve pas de benzène chez la mousse exposée à une concentration de benzène exclusivement gazeux, cette expérience confirme l'hypothèse selon laquelle les BTEX *in situ* sont accumulés par la mousse via les particules. Mais *in situ*, les composés organiques peuvent aussi se retrouver dans les gouttelettes d'eau (Grover, 1991) susceptibles de se déposer sur la mousse qui, de par sa nature poïkilohydrique, va rapidement absorber l'eau.
Cependant, les teneurs en BTEX chez les mousses n'augmentent pas au cours de l'exposition, aussi le choix de l'espèce la mieux adaptée pour la poursuite des études en conditions contrôlées ne peut pas se fonder

uniquement sur les aptitudes accumulatrices de COV. Thomas (1984) a souligné l'importance de l'état d'hydratation de la mousse sur l'accumulation des HAP. Par la suite, d'autres auteurs ont fait les mêmes constatations pour l'accumulation des éléments traces métalliques (Al-Radady *et al*, 1993 ; Amblard-Gross *et al*, 2002 ; Couto *et al*, 2004a,b), sans qu'aucun d'entre eux n'en fasse la preuve. Nous avons donc conçu un système d'exposition spécifique permettant de maintenir l'état d'hydratation des mousses pendant toute la durée de l'exposition *in situ.* Afin de suivre la pertinence de ce système, nous avons suivi l'évolution des paramètres de vitalité (chlorophylle et indice de phéophytinisation) tout au long de l'exposition. Cette étude a mis en évidence une meilleure efficacité du système chez les deux espèces acrocarpes (*C. purpureus* et *T. ruralis*). *Tortula ruralis* ayant montré également de bonnes aptitudes à l'absorption des COV, c'est donc l'espèce qui a été retenue pour les expérimentations en conditions contrôlées. Il est important de souligner que notre travail est le premier à démontrer le rôle du maintien de l'hydratation sur la vitalité de la mousse lorque celle-ci est transplantée pour des études de biosurveillance.

Afin de mieux comprendre les observations réalisées lors de l'expérience *in situ*, des études en conditions contrôlées ont donc été réalisées. Les objectifs étaient de déterminer si, en l'absence des paramètres environnementaux interférents, il existait un lien entre les concentrations d'exposition au benzène et les concentrations de benzène chez *T. ruralis*. Bien que les teneurs en benzène chez la mousse n'augmentent pas avec la durée de l'exposition au benzène, les concentrations en benzène chez la mousse sont corrélées avec les concentrations d'exposition.

Plusieurs auteurs (Hiatt, 1999 ; Keymeulen *et al*. 1993, 1995 ; Collins & Bell, 2000) s'accordent à dire que les concentrations de COV dans les végétaux et celles dans l'air s'équilibrent rapidement. D'ailleurs, Collins *et al* (1998) ont ainsi pu mesurer que 50% du benzène absorbé par le chou pouvaient être relargués en moins de dix minutes. Les études de l'accumulation du benzène en conditions contrôlées tendent à mettre en évidence un phénomène d'équilibre qui s'établit entre le benzène dans l'air et celui dans la mousse. D'une part, plus les teneurs dans l'air sont importantes, plus elles le sont dans les mousses ; toutefois les quantités dans les mousses représentent à peine 3% des quantités auxquelles elles ont été exposées. Après 150 minutes d'exposition à 200 ppm de benzène, on observe une diminution des concentrations de benzène dans la mousse. De plus, après arrêt de l'exposition, les teneurs de la mousse diminuent rapidement au cours des heures qui suivent. Deux hypothèses peuvent expliquer le phénomène observé. La durée de vie du benzène dans l'atmosphère (plus exactement la troposhère) est de 6 jours (Atkinson, 1994). On pourrait concevoir un début de dégradation du benzène dans l'enceinte ce qui correspondrait à la diminution des teneurs mesurées dans la mousse, la mousse étant en équilibre constant avec l'atmosphère ambiante. Mais on pourrait concevoir également un processus biologique. Compte tenu de la nature organique des composés étudiés, des mécanismes de métabolisation pourraient être mis en jeu par la mousse après 150 minutes d'exposition.

De plus, l'étude en enceinte contrôlée en présence et en absence de mousse suggère une prise en charge d'une partie du benzène (et du toluène) à laquelle la mousse a été exposée. Le fait que des quantités de benzène et de toluène ne soient pas restituées par la mousse après arrêt de l'exposition tend à confirmer l'existence de phénomène de métabolisation. Dans le cadre de nos expériecnes, aucun élément ne permet de nier l'existence de mécanismes de métabolisation mais rien ne permet non plus de le confirmer. Pourtant, on connaît l'existence de cytochromes P450 chez les bryophytes (Asakawa, 2001) mais leur rôle dans la détoxification des contaminants organiques n'a encore jamais été décrite. D'autres études supplémentaires sont indispensables pour vérifier cette hypothèse.

En conclusion, il existe des échanges et un équilibre entre les concentrations de BTEX dans l'air et celles dans la mousse. Les résultats obtenus au cours de la seconde exposition *in situ* montrent l'absence de BTEX dans la mousse alors que celle-ci est exposée à des concentrations atmosphériques identiques à celles de la première exposition, mais dans des conditions météorologiques plus défavorables. Il reste encore à définir si le composé est adsorbé ou absorbé par la mousse, à déterminer les « sites » de fixation ou/et d'échanges du benzène chez la mousse, et à découvrir si le benzène pénétre dans les cellules, et le cas échéant, comprendre comment il y pénètre et s'il est métabolisé.

Pour expliquer l'accumulation des contaminants organiques chez les végétaux supérieurs, on met en exergue le caractère lipophile de ces composés et leur affinité pour les constituants lipidiques foliaires et notamment ceux de la cuticule (Beattie & Seibel, 2007; Keymeulen *et al*, 1995; Dienum *et al*, 1995). Les bryophytes sont dépourvus de cuticule mais renferment toutefois un certain nombre de composés lipidiques. Ainsi, les mousses renferment des teneurs non négligeables en triacylglycérol, en cires et en «esters stéryls» (Karunen, 1981). Elles renferment également de fortes teneurs en acide gras polyinsaturés (Dembitsky, 1993 ; Gellerman *et al*, 1972). Différents lipides polaires sont présents dans les chloroplastes, notamment le diacylglycéryltriméthylhomosérine, composé majeur chez les cryptogames mais dont le rôle n'est pas encore connu (Gushina e*t al*, 2002). Ces différents composés interviendraient dans l'adaptation des mousses aux conditions environnementales extrêmes (Karunen *et al,* 1988 ; Hakala & Sewon, 1992).

Les lipides des parois et des membranes apparaîtraient donc comme des éléments clé dans l'étude de l'accumulation des COV chez les mousses, car ils pourraient constituer des sites de fixation. Mais ils peuvent également être déterminants dans la recherche des effets des COV. En effet, selon Gushina *et al* (2002), des contaminants comme les métaux modifient la composition lipidique et affectent le métabolisme des lipides des bryophytes. Des modifications qualitatives et quantitatives des lipides membranaires en relation avec des paramètres environnementaux et des pollutions métalliques ont aussi été mis en évidence chez les lichens, organismes également dépourvus de cuticule et poïkilohydriques (Dembitsky *et al*, 1994 ; Dertien *et al*, 1977 ; Piervittori *et al*, 1994, Cuny *et al;* 2004). On peut donc supposer qu'il en serait de même avec les polluants

organiques chez les bryophytes.

Toutefois, les études en conditions contrôlées de la peroxydation des lipides membranaires chez *T. ruralis* exposé au benzène, n'ont pas permis de mettre en évidence un impact oxydatif induit par le benzène. Mais la composition lipidique peut être altérée par les contaminants et, comme le MDA résulte de la peroxydation d'acides gras polyinsaturés (AGPI) possédant au moins trois doubles liaisons (Doyotte, 1998), toute modification des teneurs en AGPI est susceptible d'engendrer une modification (augmentation ou diminution) des concentrations en MDA.

De plus, d'après Breuil-Sée (1995), la conformation des lipides membranaires est également susceptible d'être modifiée lors de variations de l'état d'hydratation de la mousse. Cette modification correspondrait à un mécanisme d'adaptation et de tolérance au stress hydrique et participerait aussi à la forte résistance des mousses aux conditions environnementales. D'ailleurs, compte tenu de l'absence de variations significatives de l'expression des autres biomarqueurs de stress oxydant (APOX, GPOX, Chlorophylles, indice de phéophytinisation) en rapport avec les expositions au benzène, il semblerait que les mécanismes développés chez la mousse pour résister aux conditions environnementales difficiles, lui confèrent des capacités de tolérance aux contaminants particulièrement importantes. L'analyse des corrélations entre les différents paramètres biologiques révèle un lien (corrélation ou anticorrélation) entre l'expression des biomarqueurs et l'état d'hydratation. Cela confirmerait la prépondérance de l'état d'hydratation sur les concentrations en benzène chez la mousse dans l'expression des biomarqueurs de stress oxydant. Les variations des biomarqueurs du stress oxydant induites par le benzène présentent la même tendance que celles observées lors d'un stress hydrique. Des expérimentations préliminaires ont effectivement montré une variation de l'expression des biomarqueurs, notamment des variations corrélées des concentrations du MDA et des chlorophylles avec l'état d'hydratation. L'augmentation de l'état d'hydratation de la mousse constitue des conditions propices à la croissance, c'est peut être pour cette raison que les concentrations des chlorophylles augmentent après les expositions en conditions contrôlées. Toutefois, il faudrait vérifier cette hypothèse par le suivi de l'activité photosynthétique chez la mousse. Par exemple, Tretiach *et al* (2007) expliquent l'augmentation de l'activité photosynthétique de mousses exposées au trafic routier par une stimulation de la croissance par les composés azotés émis. Enfin, les activités des peroxydases seraient susceptibles de limiter la formation de MDA en neutralisant les ERO, mais il s'avère que les activités de ces enzymes varient peu au cours de nos expériences. D'après Roy *et al* (1992), cette faible activité traduirait une forte tolérance de *T. ruralis* aux pollutions, dans la mesure où les espèces les plus sensibles possédent, quant à elles, de fortes activités.

On ne peut pas négliger les variations liées au protocole analytique. En effet, il faut noter que le dosage du MDA par spectrophotométrie n'est pas spécifique et que d'autres aldéhydes peuvent interférer dans le dosage. Le dosage des hydroxyacides en HPLC est probablement beaucoup plus sensible, plus spécifique et

plus performant (Doyotte, 1998).

En résumé, les biomarqueurs de stress oxydant ne semblent pas être performants pour l'étude des effets des BTEX chez les mousses terrestres. En effet, les variations naturelles de ces biomarqueurs liées à des facteurs intrinsèques à la mousse, comme sa teneur en eau ou son âge, peuvent interférer avec les effets du benzène. Ces variations naturelles maquent les variations induites par le benzène. Elles peuvent aussi représenter des mécanismes de résistance au stress ce qui confère à ces organismes adaptés au stress hydrique, une résistance à d'autres types de stress comme celui engendré par la pollution.
C'est d'ailleurs pour cette capacité de résistance que les mousses constituent un modèle très intéressant pour l'étude de l'accumulation de métaux ou de composés organiques lourds. Elles sont effectivement capables de supporter des expositions en milieux fortement contaminés. C'est peut-être ce qui explique la faible quantité de travaux publiés sur les réponses des biomarqueurs de stress oxydant aux contaminants organiques et inorganiques chez les mousses terrestres. Par contre, l'étude de ces mêmes biomarqueurs chez les mousses aquatiques a été beaucoup plus développée mais il faut préciser que ces mousses ne sont pas soumises au stress hydrique (*cf* Roy *et al*, 1996 et Dazy *et al*., 2009, pour revue).

Afin de poursuivre l'étude des effets des COV, nous pourrions nous orienter vers la recherche de marqueurs de génotoxicité. Le matériel génétique présente plusieurs intérêts : d'une part, les lésions qu'il peut subir (cassures, mutations...) sont moins susceptibles d'être engendrés par un stress hydrique ; d'autre part, il est le support de l'information. Aussi, la réponse de la cellule à une exposition est l'expression de l'induction de gènes. Des premiers essais de mise au point de tests de génotoxicité, comme le test des comètes (*T. ruralis*), le test des micronoyaux (*C. purpureus, T. ruralis*) ou le dosage d'adduits à l'ADN (8-hydroxy-2'-déoxyguanoisine) (*C. purpureus, P. purum*), ont mis en évidence la faible quantité d'ADN chez le modèle bryophytique, ce qui accroît la difficulté d'adaptation de ces tests chez cet organisme. Aussi, bien qu'à court terme il soit possible d'améliorer les protocoles de ces tests, à plus long terme, il apparaît pertinent de poursuivre des recherches sur l'activation de gènes induite par l'exposition à des contaminants.
Pour se faire, il serait d'ailleurs également intéressant de développer des cultures standardisées de mousses afin de réduire la variabilité génétique intra-espèce et d'éviter des différences imputables au développement, autrement dit à l'âge.

Enfin, les résultats relatifs à l'accumulation des BTEX chez les mousses amènent à poursuivre les recherches pour comprendre les mécanismes d'échanges des COV entre l'air et la mousse, déteminer les voies potentielles de passage des composés dans les cellules et rechercher les voies de métabolisation.
Quant au modèle bryophytique, ses capacités de résistance aux contaminants et son aptitude à se développer

dans les milieux très contaminés et peu propices à la vie, laissent entrevoir l'existence de mécanismes de défense et d'adaptation très performants mais jusqu'alors peu connus.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

VII. Références bibliographiques

- Aboal J.R., Couto J.A., Fernandez J.A., Carballeira A. 2008. Physiological responses to atmospheric fluorine pollution in transplants of *Pseudoscleropodium purum*. Environmental Pollution. 153, 602-609.
- Alpert P. 1984. Analysus if chlorophyll content in mosses through extraction in DMSO. The Bryologist. 87, 363-685.
- Alscher .G., Donahue J.L., Cramer C.L. 1997. Reactive oxygene species and antioxidants relationships in green cells. Physiologia plantarum. 100. 224-233.
- Al-Radady A.S., Davies B.E., French M.J. 1993. A new design of moss bag to monitor metal deposition both indoors and outdoors. The science of the total environment. 133, 275-283.
- Amako K., Chen G-X., Asada K. 1994. Separate assays specific for ascorbate peroxidase and guaiacol peroxydase and for chloroplastic and cytosolic isozymes of ascorbate peroxydase in plants. Plan cell physiology. 35. 497-504.
- Amblard-Gross G., Férard J.F., Carrot F., Boonin-Mosbah M., Maul S., Ducruet J.M., Caddeville P., Béguinel P., Ayrault S. 2002. Biological fluxes conversion and SXRF experiment with a new active biomonitoring tool for atmospheric metals and trace element deposition. Environmental Pollution. 120, 47-58.
- Amiard J-C, Caquet T., Lagadic L. 1997. Les biomarqueurs parmi les méthodes d'évluation de la qualité de l'environnement. *In* Lagadic L. Caquet T., Amiard J-C., Radame F (Eds). Utilisation de biomarqueurs pour la surveillance de la qualité de l'environnement. Tec&Doc., Lavoisier. Paris. pp. XXI-XXXI.
- Ares A., Aboal J.R., Fernandez J.A., Real C., Carballeira A. Use of the terrestrial moss Pseudoscleropodium purum to detect sources of small scale contamination by PAHs. Atmospheric Environment (2009), doi: 10.1016/j.atmosenv.2009.07.005
- Arkeboom T.P.M. & Sies H., 1990. Glutathione transport and its significative inoxidative stress. *In*: VIÑA, J. (Eds), Glutathione: metabolism and physiological functions, CRC Press Publisher, Boston, pp. 45-54
- Arnon D.I. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. Plant Physiology. 24, 1-15.
- Arroniz-Crespon M., Nunez-Olivera E., Martinez-Abaigar J. 2008. Hydroxycinnamic acid derivatives in an aquatic liverwort as possible bioindicators of enhanced UV radiation. Environmental Pollution. 151, 8-16.
- Asakawa Y. 2001. Recent advances in phytochemistry of bryophytes-acetogenins, terpenoids and

bis(bibenzyls)s from selected Japanese, Taiwanese, New Zealand, Argentinean and Eyropean liverworts. Phytochemistry. 56, 297-312.

- Atkinson R., 1994. Gaz phase tropospheric chemistry of organic compounds. Monographie n°2. American Chemistry Society and the American Institue of Physics. 216p.
- Baccouch S., Chaoui A., El Ferjani E. 1998. Nickel-induced oxidative damage and antioxidant responses in *Zea mays* shoots. Plant Physiol. Biochem., 36(9), 689-694.
- Bakken S. 1995. Effects if nitrogen supply and irradiance on growth and nitrogen status in the moss *Dicranum majus* from differently polluted areas. Journal of Bryology. 18, 707-721.
- Barkman J.J., 1958. Phytosociology and ecology of cryptogamic epiphytes. Van Gorcum, Assen, The Netherlands.
- Barnes J.D., Balaguer L., Manrique E., Elvira S., Davison A.W. 1992. A reappraisal of the use of DMSO for the extraction and determination of chlorophylls a and b in lichens and higher plants. Environmental and Experimental Botany. 32, 85-100.
- Beattie G.A & Seibel J.S. 2007. Uptake and localization of gaseous phenol and p-cresol in plant leaves. Chemosphere. 68, 528-536.
- Beckman K.B. & Ames B.N. 1997. Oxidative decay of DNA? J. Biol. Chem. 272. 19633-19636.
- Bewley J.D. 1979. Physiological aspects of desiccation tolerance. Annual Review of Plant Physiology. 30, 195-238.
- Biaglow J.E. 1989. Role of glutathione ant other thiols in cellular response to radiation and drugs. Drug Metab. Rev. 20, 1-12.
- Bidar G. 2007. Intérêt du phytomanagement dans la gestion durable des sols pollués. Recherche des mécanismes biologiques de transfert et de localisation des métaux lourds (Cd, Pb, Zn) dans les strates herbacées et arborées. Thèse de doctorat de l'université du Littoral Côte d'Opale, soutenue en novembre 2007. 228 p. + annexes.
- Bignal K.L., Ashmore M.R., Headley A.D. 2008. Effects of air pollution from road transport on growth and physiology of six transplanted bryophyte species. Environmental Pollution. 156, 332-340.
- Bleuel C., Wesenberg D., Suttr K., Miersch J., Braha B., Bärlocher F., Krauss G.-J. 2005. The use of the aquatic moss Fontinalis antipyretica L. ex Hedw. As a bioindicator for heavy metals. 3. Cd^{2+} accumulation capacities and biochemical stress response of two Fontinalis species. Science of the Total Environment. 345, 13-21.
- Blokhina O., Virolainen E., Fagerstedt K. 2003. Antixoydants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. Annals of botany. 91. 179-194.
- Bonnefoy B., Frère S., Maramotti I., Moch A., Roussel I. 2003. La perception de la pollution atmosphérique d'origine industrielle par les habitants de l'agglomération de Dunkerque. Pollution

atmosphérique. 178. 251-259.

- Borghini F., Grimalt J.O., Sanchez-Hernandez J.C., Bargagli R. 2005. Organochlorine pollutants in soils and mosses form Victoria Land (Antartica). Chemosphere. 58, 271-278.
- Bray T.M. a Taylor C.G. 1993. Tissue glutathione, nutrition and oxidative stress. Canadian journal of physiology and pharmacology, 71, 746-751.
- Breen A.P. & Murphy J.A. 1995. Reactions of oxyl radicals with DNA. Free Rad. Biol. Med. 18: 1033-1077.
- Brennan R.J., Swoboda B.E. Sciesti R.H. 1994. Oxidative mutagens induce intrachromosomal recombination in yeast. Mutual. Res. 308, 159-167.
- Breuil-Sée A., 1995. Critères ultrastructuraux d'anhydrobiose et de reviviscence de thalles hépatiques du genre *Riccia L*. (Marchantiales – Bryophytes). Thèse pour l'obtention de grade de docteur de l'Université de l'Ecole Pratique des Hautes Etudes. Paris. 323p.
- Bruns I., Sutter K., Menge S., Neumann D., Krauss G-J. 2001. Cadmium lets increase the glutathione pool in bryophytes. Journal of plant physiology. 158, 79-89.
- Brunschön-Harti S., Fangmeier A., Jager H.J. 1995. Influence of ozone and ethylenediurea on the antioxidant systems in beans (Phaseolus vulgaris). Environmental Pollution. 90, 89-94.
- Bunkelmann J-R. & Trelease R.N. 1996. Ascorbate peroxidase. A prominent membrane protein in oilseed glyoxysomes. Plant physiology. 110. 589-598.
- Byczkowski J.L. & Gressner T. 1988. Biological rôle of superoxide dismutase. International Journal of view of Biochemistry. 58. 79-110.
- Cadenas E. 1989. Biochemistry of oxygen toxicity. Annual reetabolism in mammalian organs. Physiological review. 59. 527-589.
- Cape J.N. 2003. Effects of airborne volatile organic compounds on plants. Environmental Pollution. 122, 145-157.
- Carballeira A. Fernandez J.A., Aboal J.R., Real C., Couto J.A. 2006. Moss: A powerful tool for dioxin monitoring. Atmospheric Environment. 40, 5776-5786.
- Carlberg G.E., Baumann Ofstad E., Drangsholt H. 1983. Atmospheric deposition of organic micropollutants in Norway studied by means of moss and lichen analysis. Chemosphere. 12, 341-356.
- Chance B., Sies H., Boveris A. 1979. Hyperoxide metabolism in mammalian organs. Physiological Review. 59, 527-605.
- Chaoui A., Mazhoudi S. Ghordal M.H., El Ferjani E. 1997. Cadmium and zinc induction of lipid peroxidation and effects on antioxidant enzyme activities in bean *Phaseolus vulgaris* L. Plant science. 127. 139-147.
- Chaudhry Q., Schroder P., Werck-Reichhart D., Grajek W., Marecik R. 2002. Prospects and limitations

of phytoremediation for the removal of persistent pesticides in the environment. Environmental science and pollution research international. 9. 4-17.

- Chen G.-X. & Asada K. 1989. Ascorbate peroxidase in tea leaves: occurrence of two isoenzymes and the differences in their enzymatic and molecular properties. Plant and Cell Physiology. 30, 987-998.
- Chobot V., Kubica L., Nabbout S., Jahodar L., Vytlocilova J. 2006. Antioxidant and free radical scavenging activities of fiv moss species. Fitoterapia. 77, 598-600.
- Clough W.S. 1975. The deposition of particles on moss and grass surfaces. Atmospheric Environment. 12, 1113-1119.
- Collins C.D., Startin J., Bell J.N.B., Crews C., MacFarlane A. 1998. Uptake and metabolism of benzene by horticultural crops. In: De Kok L.J., Stulen I. (Eds) Responses of plant metabolism to air pollution and global change. Backhuys Publishers. Leiden. The Netherlands. pp 287-290.
- Collins C.D., Bell J.N.B., Crews C. 2000. Benzene accumulation in horticultural crops. Chemosphere. 40, 109-114.
- Collins C.D. & Bell J.N.D., 2002. Effects of volatile organic compounds. In: Air pollution and Plant life (Eds). John Wiley & Sons. Ltd.
- Cossu C., Doyotte A., Jacquin M.-C., Vasseur P. 1997. Biomarqueurs de stress oxydant chez les animaux aquatiques. *In* : Lagadic L., Caquet T., Amiard J.-C., Ramade F. (Eds). Biomarqueurs en écotoxicologie. Aspects fondamentaux. Collection Ecologie. Paris. Masson. pp149-161.
- Couto J.A., Fernandez J.A., Aboal J.R., Carballeira A. 2004a. Active biomonitoring of element uptake with terrestrial mosses: a comparison of bulk and dry deposition. Science of The Total Environment. 324, 211-222.
- Couto J.A., Aboal J.R., Fernandez J.A., Carballeira A. 2004b. A new method for testing the sensitivity of active biomonitoring: an example of its application to a terrestrial moss. Chemosphere. 57, 303-308.
- Cotgreave I.A., Weis M., Atzor, L., Moldeus P., 1990. Glutathione and proteinfunction. *In*: VIÑA, J. (Eds), Glutathione: metabolism and physiological functions,CRC Press Publisher, Boston, pp. 155-176.
- Cove D.J. 1984. The role of cytokinin and auxin in protonemal development in *Physcomitrella patens* and *Physcomittrium sphaericum*. J. Hattori lab. 55. 79-86.
- Cove D.J., Knight C.D., Lamparter T. 1987. Trends plant Sci. 2. 99-105.
- Cuny D., Van Haluwyn C., Shirali P., Zerimech F., Jérôme L., Haguenoer J-M. 2004. Cellular impact of metal trace elements in terricollous lichen *Diploschistes muscorum* (Scop) R.sant. - Identification of oxidative stress biomarkers. Water, Air and Soil pollution. 152. 55-69.
- Cuypers A., Vangronsveld J., Clijsters H. 2001. The redox status of plant cells (AsA and GSH) is sensitive to zinc imposed oxidative stress in roots and primary leaves of *Phaseolus vulgaris*. Plant

physiology and biochemistry. 39. 657-664.

- Cuypers A., Vangrosveld J., Clijters H. 2002. Peroxidases in roots and primary leaves of *Phaseolus vulgaris* Copper and Zinc Phytotoxicity: a comparison. Journal of Plant Physiology. 159, 869-876.
- Cuypers A., Koistinen K.M., Kokko H., Kärenlampi S., Auriola S., Vangrosveld J. 2005. Analysis of bean (*Phaseolus vulgaris L.*) protein affected by copper stress. Journal of Plant Physiology. 162, 383-392.
- Dazy M., Béraud E., Cotelle S., Meux E., Masfaraud J.-F., Férard J.-F. 2008. Antioxidant enzyme activities as affected by trivalent an hexavalent chromium species in *Fontinalis antipyretica Hedw.* Chemosphere. 73, 281-290.
- Dazy M., Masfaraud J.-F., Férard J.-F. 2009. Induction of oxidative stress biomarkers associated with heavy metal stress in *Fontinalis antipyretica Hedw*. Chemosphere. 75, 297-302.
- DeKempeneer L., Sercu B., Vanbraban W., Van Langenhove H., Verstraete W. 2004. Bioaccumulation of the phyllosphere for the removal of toluene from indoor air. Applied microbiological biotechnology. 64. 284-288.
- Deleve L.D. & Kaplowitz N. 1991. Glutathione metabolism and its role on hepatotoxicity. Pharmacology & Therapeutics. 52. 587-305.
- Deltoro V.I., Gimeno C., Calatayud A., Barreno E. 1999. Effects of SO_2 fumigations on photosynthetic CO_2 gas exchange, chlorophyll a fluorescence emission and antioxidant enzymes in the lichens Evernia prunastri and Ramalina farinacea. Physiologia Plantarum. 105, 648-654.
- Dembitsky V.M. 1993. Lipid of bryophytes. Progress in lipid Resarch. 32, 281-356.
- Demming-Adams B. & Adams W.W. 1992. Photoprotection and other responses of plants to high light stress. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology. 43, 599-626.
- Denayer F-O. 2000. Ecotoxicité des éléments traces métalliques chez les bryophytes. Mise au point d'un bryocapteur des retombées atmosphériques à l'aide de *Ceratodon purpureus* (Hedw.) *Brid*. Thèse pour l'obtention de grade de docteur de l'Université de Metz. Metz. 238p.
- Deneke S.M. & Fanburg B.L. 1989. Regulation of cellular glutathione. American journal of Physiology. 257. 163-173.
- Dertien B.K., De Kok L.J., Kuiper P.J.C. 1977. Lipid and fatty acid composition of tree-growing and terrestrial lichens. Physiologia Plantarum. 40, 175-180.
- Dhindsa R.S. 1982. Inhibition of protein synthesis by products of lipid peroxidation. Pytochemistry. 21(2), 309-313.
- Dhindsa R. 1987a. Glutathione status and protein synthesis during drought and subsequent rehydration of *Tortula ruralis*. Plant Physiology. 83, 816-819.
- Dhindsa R. 1987b. Protein synthesis during rehydration of rapidly dried *Tortula ruralis*. Plant

Physiology. 85, 1094-1098.

- Dhindsa R.S. 1991. Drought stress, enzymes of glutathione metabolism, oxidation injury, and protein synthesis in Tortula ruralis. Plant Physiology. 95, 648-651.
- Dienum G., Baart A., Bakker D.J., Duyzer J.H., Van Den Hout D. 1995. The influence of uptake by leaves on atmospheric deposition of vapour-phase organics. Atmospheric Environment. 29, 997-1005.
- Dix T.A., Mmett L.J. 1983. Metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbon derivatives to ultimate carcinogens during lipid peroxidation. Science. 221. 77-79.
- Dobretsov, G., Borschebskaya, T., Petrov, V., Vladimirov, Y., 1977. The increase of phospholipids bilayer rigidity after lipid peroxidation. *FEBS Lett*, 84, 125-129
- Doyotte A. 1998. Etude de la lipoperoxydate et de la 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine en tant que biomarqueurs de toxicité cjez *Unio tumidus*, bivalve dulçaquicole, expozsés *in situ* à des sédiments contaminés et en conditions de stress chimique. Thèse pour l'obtention du grade de Docteur de l'Université de Metz. Metz. 122p.
- During H.J. 1992. Ecological classification of bryophytes and lichens. *In*: Bates J.W., Farmer A.M. (Eds) Bryophytes and lichens in a changing environment. Clarendon press. Oxford. 1-31.
- Durmishidze S. V. & UgrekhelidzeD. Sh. 1975. Absorption and transformation of methane by plants. Physiol. Rastenii.22. 70-73.
- Esterbauer H. Zollner H., Lang J. 1985. Metabolism of the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal by isolated hepatocytes and by liver cytosolic fractions. Biochem. 228. 363-373.
- Esterbauer H. Zollner H. 1989. Methods for determination of aldehic lipid peroxidation products. Free Radical Biol. Med. 7. 197-203.
- Esterbauer H., Schaur R.J. Zollner H. 1991. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. Free Radical Biol. Med. 11. 81-128.
- Estrela J.M. & Pallardo F.V. 1990. Role of glutathione in the regulation of protein synthesis and degradation in eukaryotes. *In* Vina J. (Eds). Glutathione: metabolism and physiological functions. CRC press publisher, Boston. 177-185.
- Ezzine M. & Ghorl M.H. 2006. Physiologicale and biochemical responses resulting from nitrite accumulation in tomato (Lycopersicon esculentum Mill. cv. Ibiza F1). Journal of Plant Physiology. 163, 1032-1039.
- Faburé J., Meyer C., Denayer F-O, Gaudry A., Gilbert D., Bernard N., Atmospheric metal trace element deposition at three differently polluted sites (industrial, urban and rural: comparison of accumulation capacity between an acrocarpour and a pleurocarpous moss. Atmospheric Environment. *Soumis.*
- Ferrari R., Ceconi C., Curello S., Cargnoni A., Alfieri O., Pardini A., Marzollo P., Visiolo O. 1991.

Oxygen free radicals and myocardial damage: protective rôle of thiol-containing agents. Am. J. Med. 91 (suppl. 3C). 95s-105s.

- Folly P. 2000. Catabolisme de la chlorophyll b. Structures Mécanismes et synthèses. Thèse pour l'obtention du titre de docteur de l'université de Fribourg. pp192.
- Foyer C.H., Lelandais M., Kunert K.H. 1994. Photooxidative stress in plants. Physiology Plantarum. 92, 696-717.
- França M.B., A.D. Panek, E.C.A. Eleutherio. 2007. Oxidative stress and its effects during dehydration. Comparative Biochemistry and Physiology, Part A 146, 621–631
- Frankel E.N. & Neff W.E. 1983. Formation of malondialdehyde from lipid oxidation products. Biochem.Biophys.Acta. 754. 264-270.
- Gallego S.M., Benavides M.P., Toalro M.L. 1996. Effect of heavy metal ion excess on sunflower leaves evidence for involvement of oxidative stress. Plant science. 121. 151-159.
- Galsomiès L., Letrouit M.A., Deschamps C., Savanne D., Avniam M. 1999. Atmospheric metal deposition in France : initial results on moss calibration from the 1996 biomonitoring, The Science of the Total Environment. 232. 39-47.
- Galsomiès L., Ayrault S., Carrot F., Deschamps C., Letrouit-Galinou. 2003. Interspecies calibration in mosses at regional scale—heavy metals and trace elements results from Ille-de-France. Atmospheric Environment. 37, 241-251.
- Galuszka A. 2007. Distribution patterns of PAHs and trace elements in mosses *Hylocomium splendens* (Hedw.) B.S.G. and *Pleurozium schreberi* (Brid.) Mitt. From different forest communities: a case study, south-central Poland. Chemosphere. 67, 1415-1422.
- Garrec J-P. & Van Haluwyn C. 2002. Biosurveillance végétale de la qualité de l'air. Tech&Doc., Lavoisier. Paris. 116p.
- Gaskell M., McLuckie K.I.E., Farmer P.B. 2004. Comparison of the mutagenic activity of the benzene metabolites, hydroquinone and para-benzoquinone in the *supF* forward mutation assay: a role for minor DNA adducts formed from hydorquinone in benzene mutagenicity. Mutation Research. 554, 387-398.
- Gaskell M., McLuckie K.I.E., Farmer P.B. 2005. Gentoxicity of the benzene metabolites para-benzoquinone and hydroquinone. Chemico-Biological Interactions. 153-154. 267-270.
- Gellerman J.L., Anderson W.H., Schlenk H. 1972. Highly unsatured lipids of *Mnium, Poltrichum, Marchantia* and *Matteuccia*. The Bryologist. 75, 550-557.
- Ghamsari L., Keyhani E., Golkhoo S. 2007. Kinetics properties of guaiacol peroxidase activity in *Crocus sativus L*. Corm during rooting. Iranian Biomedical Journal. 11, 137-146.
- Gerdol R., Bragazza L., Marchesini R., Medici A., Pedrini P., Benedetti S., Bovolenta A., Coppi S.

2002. Use of moss (Tortula muralis Hedw.) for monitoring organic and inorganic air pollution in urban and rural sites in Northern Italy. Atmospheric Environment. 36, 4069-4075.

- Gichner T., Cabrera Lopez G., Wagner E.D., Plewa M.J. 1994. Induction of somatic mutations in *Tradescantia* clone 4430 by three phenylene isomers and the antimutagenic mechanisms of diethyldithiocarbamate and ammonium metavanadate. Mutation research. 306. 165-172.
- Gilmore A.M. 1997. Mechanistic aspects of xanthophyll cycle-dependant photoprotection in higher-plant chloroplasts and leaves. Physiologia Plantarum. 99, 197-209.
- Goel A., Goel A.K., Sheoran I.S. 2003. Changes in oxidative stress enzymes during artificial ageing in cotton (*Gossypium hirsutum L.*) seeds. Journal of Plant Physiology. 160. 1093-1100.
- Gombert S., 2005. Pollution par les métaux : Biosurveillance des retombées. Primequal. Ed.EDP Sciences et ADEME Editions.
- Gregus Z. & Klaasen C.D. 2001 Mechanisms of toxicity. In: Klaasen C.D. (Eds). Casarett and Dull's Toxicology. The basis science of poison. 6th ed. (Chapter3). McGraw-Hill. New York. pp 35-81.
- Grover R. 1991. Nature. Trnasport and fate of airborne residues. *In*: Grover R., Cessna A.J. (Eds). Environmental Chemistry of herbicides vol II. CRC Press. Boca Raton. F.L. pp89-117.
- Guengerich F.P. 1991. Reactions and significance of cytochrome P450 enzymes. Journal of Biological Chemistry. 266(16), 10019-10022.
- Guschina I.A., Harwood J.L., Smith M., Beckett R.P. 2002. Abscisic acid modofoes the changes in lipids brought about by water stress in the moss *Atrichum androgynum*. New Phytologist. 156, 255-264.
- Hains J.J. 1985. Practical considerations for routine chlorophyll measurements: precautions and comparison of extraction methods. Journal of Freshwater Ecology. 3, 175-179.
- Hakala K. & Sewon P. 1992. Reserve lipid accumulation and translocation of 14C in the photosynthetically active and senescent shoot parts of *Dicranum elongatum*. Physiologia plantarum. 85, 11-119.
- Haliwell B. & Gutteridge J.M.C. 1989. Free radicals in biology and medicine. 2nd ed. Clarendon Press. Oxford.
- Haliwell B., Dizdaroglu M. 1992. Commentary: the measurement of oxidative damahe of DNA by HPLC and GC/MS techniques. Free Rad.Res. Comms. 16(2), 75-87.
- Haliwell B. 1996. Mechanisms involved in the generation of free radicals. Pathologie-biologie. 44(1), 6-13.
- Harmens H., Norris D.A., Koerber G.R., Buse A., Steinnes E., Rühling B. 2007. Temporal trends in the concentration of arsenic, chromium, copper, iron, nickel, vanadium and zinc in mosses across Europe between 1990 and 2000. Atmospheric Environment. 41, 6673-6687.

- Heckathorn S.A., Mueller J.K., LaGuidice S., Ahu B., Banett T., Blair B. Dong Y. 2004. Chloroplast small heat-shock proteins protect photosynthesis during heavy metals stress. Annual Journal of Botany. 91, 1312-1318.
- Hendry G.A.F., Houghton J., Brown S.B. 1987. The degradation of chlorophyll – a biological enigma. The New Phytologist. 107, 255-302.
- Herbe U., Bukhov N.G., Shuvalov V.A., Koyabishi Y. ,Lange O.L. 2001. Protection of the photosynthetic apparatus against damage by excessive illumination in homoiohydric leaves and poikilohydric mosses and lichens. Journal of Experimental Botany. 52, 1999-2006.
- Herbe U., Lange O.L., Shuvalov V.A. 2006. Conservation and dissipation of light energy as complementary processes: homoiohydric and poikilohydric autotrophs. Journal of Experimental Botany. 57, 1211-1223.
- Hettche H.O. 1971. Pflanzenwachse als Sammler für polyzyklischeAromaten in der Luft von Wonhngebieten. Staub. Reinhalt.Luft 31, 72-76.
- Hiatt M.H. 1999. Leaves as an indicator of exposure to airborne volatils organic compounds. Environmental Science and Techniology. 33, 4126-4133.
- Himberg K.K., Parkarinen P. 1994. Atmospheric PCB deposition in finland and during 1970s and 1980s on the basis of concentrations in ombrophic peat mosses (*Sphagnum*). Chemosphere. 29, 431-440.
- Holoubek I., Korinck P., Seda Z., Schneiderova E., Houbkova I., Pacl A., Triska J., Cudlin P., Caslavsky J. 2000. The use of mosses and pine needles to detect persistent organic pollutants at local and regional scales. Environment pollution. 109, 283-292.
- Horton A.A. & Fairhurst S. 1987. Lipid peroxidation and mechanisms of toxicity. Critical Reviews in Toxicology. 18, 27-79.
- Inskeep W.P. & Bloom P.R. 1985. Extinction coefficients of chlorophyll a and b in N,N-Dimethylformamide and 80% Acetons. Plant Physiology. 77, 483-485.
- Ishikawa T., Sakai K., Yoshirama K., Takeda T., Shigeaka S. 1996a. cDNAs encoding spinach stroma and thylakoid-bound ascorbate peroxidase, differing in the presence or absence of their 3'-coding regions. FEBS Letters. 384, 289-293.
- Ishikawa T., Takeda T., Kohno H., Shigeaka S. 1996b. Molecular characterization of Euglena ascorbate peroxidase using monoclonal antibody. Biochimica and Biophysica Acta. 1290, 69-75.
- Ishikawa T., Yoshirama K., Sakai K., Tamoi M., Takeda T., Shigeaka S. 1998. Molecular characterization and physiological role of a glyoxysome-bound ascorbate peroxidase from spinach. Plant and Cell Physiology. 39, 23-34.
- Jahns H.M. 1989. Guide des fougères, mousses et lichens d'Europe. Ed. BLV Munich. pp 258.

- Jiménez A., Hernandez J.A., del Rio LA, Sevilla F. 1997. Evidence for the presence of the ascorbate-glutathione cycle in mitochondria and pperoxisome of pea leaves. Plant Physiology. 114, 275-284.
- Kadota A., Sato Y., Wada M. 2000. Intracellular nuclear- and plastome- encoded energy-converting plastid enzymes. Planta. 201. 261-272.
- Karunen P. 1981. The rôle of neutral lipids in the physiology and ecology of subartic Dicranum elongatum. Canadian Journal of Botany. 59, 1902-1909.
- Karunen P., Hakala K., Mikola H. 1988. Combined effect of light and temperature on triacylglycerol accumulation in Dicranum elongatum. Physiologia Plantarum. 73, 335-338.
- Keymeulen R., Schamp N., Vanlangenhove H. 1993. Factors affecting airborne monocyclic aromatic hydrocarbonn uptake by plants. Atmospheric Environment Part A – General Topics 27, 175-180.
- Keymeulen R., Schamp N., Vanlangenhove H. 1995. Uptake of gaseous toluene in plant leaves: a two compartment model. Chemosphere. 31, 3961-3975.
- Kranner I. & Grill D. 1995. The role of glutathione and related enzymes in seeds and poikilohydric plants during dessication and rehydratation. Acta pharmacology. 45. 157-163.
- Kumar Tewari R., Kumar P., Sharma P.N., Bisht S.S. 2002. Modulation of oxidative stress responsive enzymes by excess cobalt . Plant Science. 162, 381-388.
- Lagadic L. & Caquet T. 1997a. Marqueurs biologiques de pollution. Phytoma. 480, 10-13.
- Lagadic L., Caquet T., Amiard J.C. 1997b. Biomarqueurs en écotoxicologie : principes et définitions. *In* Lagadic L., Caquet T., Amiard J-C., Ramade F. Biomarqueurs en écotoxicologie. Aspects fondamentaux. Masson. Paris. 1-9.
- Lagriffoul A., Mocquot B., Mench M., Vangronsveld J. 1998. Cadmium toxicity effects on growth, mineral and chlorophyll contents, and activities of stress related enzymes in young maize plants (*Zea mays* L.). Plant and Soil. 200, 241-250.
- Larsen B.R., Lokke H., Rasmussen L. 1985. Accumulation of chlorinatef hydrocarbons in moss from artificial rainwater. Oikos. 44, 423-429.
- Leblond S. 2003. Etude pluridisciplicaire du transfert des métaux de l'atmosphère vers les mousses (*Scleropodium purum* (Hedw.) Limpr.) : Suivi sur un site rural (Vouzon, France). Thèse pour l'obtention du titre de docteur de l'Université Paris 7. Paris. 159p + annexes.
- Leblond S., Gombert S., Colin J.L., Losno R., Rausch de Traubenberg C., 2004. Biological and temporal variations of trace element concentration in the moss species *Scleropodium purum*. Journal of Atmospheric Chemistry. 49, 95-110.
- Leguille-Cossu C. 1996. Activités de systèmes antioxydants chez *Unio tumidus*, bivalve dulçaquicole en conditions physiologiques et de stress chimique. Thèse pour l'obtention du grade de docteur de l'Université de Metz. Metz. 99p.

- Leonardis S.D., Dipierro N., Dipierro S. 2000. Purification and characterization of an ascorbate peroxidase from potato tuber mitochondria. Plant Physiology and Biochemistry. 38, 773-779.
- Lim T.B., Xu R., Tan B., Obbard J.P., 2006. Persistant organic pollutants in moss as bioindicators of atmospheric pollution in Singapore. Chemosphere. 64, 596-602.
- Liu X., Zhang G., Jones K.C., Li X., Peng X., Qi S. 2005. Compositional fractionation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH)s in mosses (*Hypnum plumaeformae* WILS.) from the northern slope of Nanling Mountains South China. Atmospheric Environment. 39, 5490-5499.
- Logan B. 2005. Reactive oxygen and photosynthesis. *In* N. Smirnoff (ed.) Antioxidants and Reactive oxygen species in plants. Blackwell Publishing Ltd., Oxford. 150-267
- Lopez J., Carballeira A. 1989. A comparative study of pigment contents and response to stress in five species of aquatic bryophytes. Lindbergia. 15, 188-194.
- Lopez J., Retuerto R., Carballeira A. 1997. D665/D665a index vs. frequencies as indicators of bryophyte response to physicochemical gradients. Ecology. 78, 261-271.
- Luna C.M., Gonzales C.A., Trippi V.S., 1994. Oxidative damage caused by an excess of copper in oat leaves. Plant Cell Physiol. 35. 11-15.
- Margalef R. 1982. Ecologia. Editorial Omega. Barcelona.
- Marshall M. & Proctor M.C.F. 1999. Desiccation tolerance and recovery of the leafy liverwort *Porella platyphylla* (L.) Pfeiff.: chlorophyll-fluorescence measurements. Journal of Bryology. 21, 261-267.
- Marshall M. & Proctor M.C.F. 2004. Are bryophytes shade plants? Photosynthetic light responses and proportions of chlorophyll a, chlorophyll b and total carotenoids. Annal of Botany. 94, 593-603.
- Martin C.E. 1980. Chlorophyll a/b ratios of eleven North Carolina mosses. The Bryologist. 83, 84-87.
- Martin C.E. & Churchill S.P. 1982. Chlorophyll concentrations and a/b ratios in mosses collected from exposed and shaded habitats in Kansas. Journal of Bryology. 12, 297-304.
- Martinez-Abaiger J. & Nunez-Olivera E. 1998. Ecophysiology of photosynthethic pigments in aquatic bryophytes. In: Bates J.W., Ashton N.W., Duckett J.G. (Eds), Bryology in the Twenty-first Century. Maney Publishers and BBS, Leeds, pp277-292. dans Bignal 2008
- McKersie B. 1991. The role of oxygen free radicals in mediating freezing and desiccation stress in plants. *In* E. Pell & K. Staffen (eds.), Active oxygen and oxidative stress and plant metabolism. Current Topics in Plant Physiology. 8, 107-118.
- Mehelman M.A & Borek C. 1987. Toxicity and biochemical mechanisms of ozone. Environmental Research. 42, 36-53.
- Meister A., Anderson M.E. 1983. Gluthatione. Annual reviews of biochemistry. 52. 711-760.
- Mittler R. 2002. Oxidative stress, antioxydants and stress tolerance. Trends in Plant Science. 7(9). 405-410.

- Miyake C., Cao W.-H., Asada K. 1993. Purification and molecular properties of thylakoid-bound ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts. Plant and Cell Physiology. 34, 881-889.
- Moretti E.C. & Mukhopashyay N. 1993. VOC Control: Current Practices and Future Trends. Chemical Engineering Progress. 89, 20-26.
- Morosini M., Schreltmüller J., Reuter U., Ballschmiter K. 1993. Correlation between C-6/C-14 chlorinated hydrocarbons levels in the vegetation and in the boundary layer of the troposphere. Environmental Science and Technology. 27, 1517-1523.
- Munday R. & Winterburn C.C. 1989. Reduced gluthatione in combination with superoxyde dismutase as an important biological antioxidant defence mechanism. Biochemical pharmacology. 38(24). 4349-4352.
- Nguyen-Viet H., Gilbert D., Bernard N., Mitchell E.A.D., Badot P.-M.. 2004. Relationship between atmospheric pollution characterized by NO_2 concentrations and testate amoebae density and diversity. Acta Protozoologica 43, 233-239.
- Nguyen-Viet H., Bernard N., Mitchell E.A.D., Cortet J., Badot P.-M., Gilbert D.. 2007. Relationship between testate amoeba (Protist) communities and atmospheric heavy metals accumulated in *Barbula indica* (Bryophyta) in Vietnam. Microbial Ecology. 51(1), 53-65.
- N'Guyen-Viet H., Bernard N., Mitchell E.A., Badot P.M., Gilbert D. 2008. Effect of lead pollution on testate amoebe communities living in *Sphagnum fallax*: an experimental study. Ecotoxicological Environmental Safety. 69, 130-138.
- Nakano Y. & Asada K. 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts.Plant and Cell Physiology. 22, 867-880.
- Nepomuceno A.L., Oosterhuis D.M., Stewart J.M. 1998. Physiological responses of cotton leaves and roots to water deficit induced by polyethylene glycol. Environmental and Experimental Botany. 40, 29-41.
- Nimis P.L. 1999. The future of the bioindication with lichens. International lichenological news letter. 32.
- Oechel W.C. & Collins N.J. 1976. Comparative CO_2 exchange patterns in mosses from two tundra habitats at Barrow, Alaska. Canadian Journal of Botonay. 54, 1355–1369.
- OgawaY., Kosaka H., Nakanishi T., Shimizu A., Ohoi N., Shouji H., Yanagihara T., Sakosa S. 1998. Stability of Mutant Superoxide Dismutase-1 Associated with Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis Determines the Manner of Copper Release and Induction of Thioredoxin in Erythrocytes. Biochemical and Biophysical Research Communications. 244(2), 605.
- Oliver M.J.1991. Influence of protoplasmic water loss on the control of protein synthesis in the

desiccation-tolerant moss *Tortula ruralis*: Ramifications for a repair-based mechanism of desccation tolerance. Plant Physiology. 97, 1501-1511.

- Oliver M.J. & Bewley J.D. 1997. Desiccation tolerance of plant tissues: a mechanism overview. Horticultural Reviews. 18, 171-214.
- Oliver M.J., Velten J., Wood A.J. 2000a. Bryophytes as experimental models for the study of environmental stress tolerance: *Tortula ruralis* and desiccation-tolerance in mosses. Plant Ecology. 151, 73-84.
- Oliver M.J., Tuba Z., Mishler B.D. 2000b. The evolution of desiccation tolerance in land plants. Plant Ecology. 151, 85-100.
- Oliver M.J., Velten J., Mishler B.D. 2005. Desiccation tolerance in bryophytes: a reflection of the primitive strategy for plant survial in dehydrating habitats? Integrative and Comparative Biology. 45, 788-799.
- Onianwa P.C. 2001. Monitoring atmospheric metal pollution: a review of the use of mosses as indicators. Environmental Monitoring and Assessment. 71, 13-50.
- Orlinski R. 2002. Multipoint moss passive samplers assessment of urban airborne polycyclic hydrocarbons: concentrations profils and distribution along Warsaw main streets. Chemosphere. 48, 181-186.
- Orrenius S., Mc Conkey D., Bellomo G., Nicotera P. 1989. Role of Ca^{++} in toxic cell killing. Trends pharmacol Sci. 10. 281-285.
- Ötvös E., Kozak I.O., Fekete J., Sharma V.K., Tuba Z. 2004. Atmospheric deposition of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in mosses (Hypnum cupressiforme) in Hungary. Science of the Total Environment. 330, 89-99.
- Ozenda P. 1990. Les organismes végétaux. Tome 1 végétaux inférieurs. Masson. Paris. 219p.
- Paciolla C. & Tommasi F. 2003. The ascorbate system in two bryophytes: Brachythecium velutinum and Marchantia polymorpha. Biologica Plantarum. 47(3), 387-393.
- Pandolfini T., Gabbrielli R., Comparini C. 1992. Nickel toxicity and peroxidase activity in seedlings of *Triticum aestivum* L. Plant cell Environ. 15. 719-725.
- Parent C., Capelli N., Dat J. 2008. Formes réactives de l'oxygène, stress et mort cellulaire chez les plantes. C.R. Biologies. 331, 255-261.
- Pennequin-Cardinal A., Plaisance H., Locoge N., Ramalho O., Kirchner S., Gallo J-C. 2005. Dependence on sampling rates of Radiello diffusion sampler for BTEX measurements with the concentration level and exposure time. Talanta, 15. Vol. 65 (5). 1233-1240.
- Peñuelas J. 1984. Pigments of aquatic mosses of the river Muga, NE Spain, and their response to water pollution. Lingbergia. 10, 127-132.

- Piervittori R., Alessio F., Maffei M. 1994. Fatty acid variations in lichen *Xanthoria parietina.* Phytochemistry. 36, 853-856.
- Plewa M.J. & Wagner E.D. 1993. Activation of promutagens by green plants. Annual Review of Genetics. 27, 93-113.
- Porra R.J. Thompson W.A., Kriedemann P.E. 1989. Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic adsorption spectroscopy. Biochimica et Biophysica Acta. 975, 384-394.
- Porter T.D., Coon M.J. 1991. Cytochrome P-450. Multiplicity of isoforms, substrates, and catalytic and regulatory mechanisms. Journal of Biological Chemistry.266(21),13469–13472.
- Prasad T.K, Anderson M.D., Stewart C.R. 1995. Localization and characterization of peroxidases in the mitochondria of chilling-acclimated maize seedlings. Plant physiology. 108. 1597-1605.
- Pré J. 1991. Lipid peroxidation. Pathological Biology. 39, 716-736.
- Pré J. 1992. Radicaux libres et peroxydation lipidique: I. Aspects biologiques généraux. Sem. Hôp. Paris. 68, 1430-1437.
- Préfecture du Nord Pas-de-Calais. 2000. Plan régional de la qualité de l'air (PRQA). 127p.
- Proctor M.C.F. 1980. Diffusion resistances in bryophytes. *In*: Grace J., Ford E.D., Jarvis P.G. (Eds). Plants and their Atmospheric Environment Blackwell. Oxford. pp 219-229.
- Proctor M.C.F. 2000. The bryophyte paradox: tolerance of desiccation, evasion of drought. Plant Ecology. 151, 44-49.
- Proctor M.C.F. & Tuba Z. 2002. Poikilohydry and homoihydry: antithesis or spectrum of possibilities? New Phytologist. 156, 327-349.
- Proctor M.C.F., Duckett J.G., Ligrone R. 2007a. Desiccation tolerance in the moss *Polytrichum formosum* Hedw.: physiological and fins-structural changes during desiccation and recovery. Annals of Botany. 99, 75-93.
- Proctor M.C.F., Oliver M.J., Wood A.J., Alpert P., Stark L.R., Cleavitt N.L., Mishler B. 2007b. Desiccation-tolrance in bryophytes: a review. The Bryologist. 110, 595-621.
- Prouvost G., Fabre P., Declercq C. 2004. Particules en suspension et santé publique: les apports du programme APHEIS. Air pur. 66. 42-46.
- Raeymaekers G. 1986. Chlorophyll extraction in mosses through dimerthyl sulfoxide (DMSO). The Bryological Times. 38, 4-5.
- Rau S., Miersch J., Neumann D., Weber E., Krauss G.-J. 2007. Biochemical responses of the aquatic moss *Fontinalis antipyretica* to Cd, Cu,Pb and Zn determined by chlorophyll fluorescence and protein levels. Environmental and Experimental Botany. 59, 299–306.

- Raven P., Evert R., Eichhorn S. 2000. Biologie végétale. De Boeck Université. Paris. Chap. 18: 400-423. 944p.
- Renneberg H. & Lamoureux G. 1990. *In* Rennenberg H., Brunold C., De Kok L-J., Stulen I. (Eds). Sulfur nutrition and sulfur assimilation in higher plants. SPB Academic Publishing, The Hague. pp 53.
- Rice-Evans C.A., Diplock A.T., Symons M.C.R. 1991. Techniques in free radical research. In: Burton R.H. & Van Knippenberg P.H. (Eds). Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology. Elsevier Science Publishers B.V. The Netherlands.
- Richardson A.D., Duigan S.P., Berlyn G.P. 2002. An evaluation of non invasive methods to estimate foliar chlorophyll content. New Phytologist. 153, 185-194.
- Roland J-C., Vina B. 1999. Biologie végétale. Tome 1, Organisation des plantes sans fleurs. Dunod, Paris. Chap. 3 : 61-80. 143p.
- Rousseau G., Véronneau M., Des Rosiers C., Varin F. 1999. Effects of lovastatin and pravastatin on ubiquinone and 4-hydroxynonenal tissue levels in the hypercholesterolemic hamster. Cur. Thera.Res. 60, 87-104.
- Roy S., Ihantola R., Hänninen O. 1992 . Peroxidase activity in lake macrophytes and its relation to pollution tolerance. Environmental and Experimental Botany. 32,457-464.
- Roy S., Sen C.K., Hänninen O. 1996. Monitoring polycyclic aromatic hydrocarbons using 'moss bags': bioaccumulation and responses of antioxidant enzymes in *Fontinalis antipyretica Hedw*. Chemosphere 32, 2305–2315.
- Rzepka M-A. 2008. Mécanismes d'accumulation et de toxicité des composés organiques voltatils chez les végétaux supérieurs. Thèse de doctorat de l'université de Lille II, soutenue en janvier 2008. 248 p. + annexes.
- Schaefer D.G., Chakhparonian M., Zrÿd J-P. 2001. *Physcomittrella patens*: un système expérimental modèle en génomique végétale. Institut d'écologie. Laboratoire de phytogénétique cellulaire. Université de Lausanne, Suisse. (http://www.isv.cnrs-gif.fr/ebv/schaeffer.pdf).
- Schonbeck M.W. & Bewley J.D. 1981a. Responses of the moss Tortula ruralis to desiccation treatments. I. Effects of minimum water content and rates of dehydration and rehydration. Canadian Journal of Botany. 59, 2698-2706.
- Schonbeck M.W. & Bewley J.D. 1981b. Responses of the moss Tortula ruralis to desiccation treatments. II. Variations in desiccation tolerance. Canadian Journal of Botany. 59, 2707-2712.
- Schöneich C., Asmus K-D., Dillinger U., von Bruchhausen F. 1989. Thiyl radical attack on polyunsatured fatty acids: a possible route to lipid peroxidation. Biochem.Biophys.Res.Commun. 161(1). 113-120.
- Schreiber L. & Schönherr J. 1992. Uptake of organic chemicals in conifer needles: surface adsorption

and permeability of cuticles. Environmental Science and technology. 26. 153-159.

- Seel W., Hendry G.A.F., Lee J.A. 1992. The combined effects of desccation and irradiance on mosses from xeric and hydric habitats. Journal of Experimental Botany. 43, 1023-1030.
- Shang T.Q., Doty S.L., Wilson A.M., Howald W.N., Gordon M.P. 2001. Trichlorethylene oxidative metabolism in plants: the trichloroethanol pathway. Phytochemistry. 58. 1055-1065.
- Sharma S. 2009. Study on impact of heavy metal accumulation in *Brachythecium populeum (Hedw.)* B.S.G. Ecological Indicators. 9, 807-811.
- Shigeoka S., Ishikawa T., Tamoi M., Miyagawa Y., Takeda T., Yabuta Y., Toshimura K. 2002. Regulation anfd function of ascorbate peroxidase isoenzymes. Journal of Experimental Botany. 53, 1305-1319.
- Sies, H. 1991. Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants. Academic Press, San Diego, CA
- Signoret S. 2002. Etude méthodologique de la qualité de l'air en Lorraine-Nord par les lichens : contribution en tant que bioindicateurs écologiques, bioaccumulateurs d'éléments chimiques et biomarqueurs du stress oxydant. Thèse pour l'obtention du titre de docteur de l'université de Metz. Metz.
- Simonich S.L. & Hites R.A. 1995. Organic pollutant accumulation in vegetation. Environmental Science and Technology. 29, 2905-2914.
- Smeets K., Cuypers A., Lambrechts A., Semaine B., Hoet P., Van Laere A., Vangrosveld J. 2005. Induction of oxidative stress and antioxidative mechanisms in *Phaseolus vulgaris* after Cd application. Plant Physiology and Biochemistry 43, 437–444.
- Smirnoff N. 1993. Role of active oxygen in the response of plants to water dificit and desiccation. New Phytologist. 125, 27-58.
- Smirnoff N. 1996. the function and metabolism of escorbic acid in plants. Annals of Botany. 78, 661-669.
- Smirnoff N. 2005. Antioxidants and reactive oxygen species in plants. Blackwell Publishing Ltd., Oxford.
- Smith I.K., Polle A., Rennenberg H. 1990. *In* Alscher R.G., Cumming J.R. (Eds). Année. Stress responses in plants: adaptation mechanisms, Wiley-Liss Inc., New-York. 201p.
- Smith K.E.C. & Jones K.C. 2000. Particles and vegetation: implications for the transfer of particle-bound organic contaminants to vegetation. The Science of the Total Environment. 246 (2-3). 207-236.
- Smodis B. & Parr R.M. 1999. Biomonitoring of air pollution as exemplified by recent IAEA Programs. Biological Trace Element Research. 71-72, 257-266.
- Snell K. & Mullock B. 1987. Biochemical Toxicology: a practical approch. Snell K & Mullock B. (Eds).

IRL Press. Oxford.

- Sohal R.S., Agarwal S., Sohal B.H., 1995. Ooxidative stress and aging in the Mogolian gerbill (*Meriones unguicylatus*). Mechanisms of Ageing and Developement. 81, 15-25.
- Sommers C.H. & Schiestl R.H. 2006. Effeect of benzene and its closed ring metabolites on intrachromosomal recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. Mutation Research. 593, 1-8.
- Spencer D.F. & Ksander G.G. 1987. Comparison of three methods for extracting chlorophyll form aquatic macrophytes. Journal of Freshwater Ecology. 4, 201-208.
- Stark L.R., Oliver M.J., Mishler B.D., McLetchie D.N. 2007. Generational differences in response to desiccation stress in the desert moss *Tortula inermis*. Annals of Botany. 99, 53-60.
- Stavreva D.A., Wagner E.D., Plewa M.J., Gichner T. 1997. Characterization of a macromalecular matrix isolated from tobacco suspension cell cultures and its rôle in the activation of promutagenic m-phenylenediamine. Mutation Research. 379, 191-199.
- Stegeman J-J., Brouwer M., Digiulio R.T., Förlin L., Fowler B.A., Sanders B.M., Van Peld P.A. 1992. Molecular responses to environmental contamination: enzyme and protein systems as indicators of chemical exposure adn effect. *In* Hugget R.J., Kimerle R.A., Mehrle Jr. P.M., Bergman H.L. (eds). Biomarkers. Lewis Publishers, London. 235-335.
- Stiborova M., Schmeiser H.H., Frei E. 2000. Oxidation of xenobiotics by plant microsomes, a reconstituted cytochrome P4501 system and peroxidase: a comparative study, Phytochemistry. 54, 353-362.
- Stout R.G. & Al-Niemi T.S. 2002. Heat-tolerant flowering plants of active geothermal areas in Yellostone National Park. Annual Botanica. 90, 259-267.
- Tait M.A. & Hik D.S. 2003. Is dimethylsulfoxide a reliable solvent for extracting chlorophyll under field conditions? Photosynthesis Research. 78, 87-91.
- Thomas W. 1979. Monitoring organic and inorganic substances by epiphytic mosses – a regional pattern of air pollution. In Proceedings of the 13th International Conference on Trace Substances in Environmental Health. Columbia. p285-9.
- Thomas W. 1983. Über die Verwendung von Pflanzen zur Analyse räumlicher Spurensubstanz-Immissionsmuster. Staub-Reinhalt.Luft. 43, 141-8.
- Thomas W. 1984. Statistical models for the accumulation of PAH, Chlorinated hydrocarbons and trace metals in epiphytic *Hypnum cupressiforme*. Water, Air and Soil Pollution. 22, 351-371.
- Tretiach M., Adamo P., Bargagli R., Baruffo L., Carletti L., Crisafulli P., Giordano S., Modenesi P., Orlando S., Pittao E. 2007. Lichen and moss bags as monitoring devices in urban areas. Part I: Influence of exposure on sample vitality. Environmental Pollution. 146, 380-391.
- Tuba Z., Czintalan Z., Badacsonyi A., Proctor M.C.F. 1987. Chlorophyll fluorescence as an exploratory

tool for ecophysiological studies on mosses and other small poïkilohydric plants. Journal of Bryology. 19, 401-407.

- Tuba Z., Proctor M.C.F., Czintalanz Z., 1998. Ecophysiological responses of homiochlorophyllous and poikilochlorophyllous dessication tolerant plants : a comparison and an ecological perspective. Plant Growth Regulation. 24. 211-217.
- Ugrekhelidze D. Sh. 1976. Metabolism of Exogenous Alkanes and Aromatic Hydrocarbons in Plants, Metsniereba, Tbilisi p. 223– .
- Ugrekhelidze D. Sh. & Durmishidze S. V. 1984. Penetration and Detoxication of Organic Xenobiotics in Plants, Metsniereba, Tbilisi p. 230– .
- Ugrekhelidze D. Korte F., Kveesitadze G. 1997. Uptake and transformation of benzene and toluene by plant leaves. Ecotoxicology and Environmental Safety. 37. 24-29.
- Vaca C.E., Wilhelm J., Hams-Ringdahl M. 1988 Interaction of lipid peroxidationproducts with DNA. *A* review. Mutation Research, 195, 137-149.
- Valanne N. 1984. Photosynthesis and photosynthetic products in mosses. The Experimental Biology of Bryophytes. 257-273.
- Van Gestel C.A.M., Van Brumelen T.C. 1996. Incorporation of the biomarker concept in ecotoxicology calls for a redefinition of terms.Ecotoxicology. 5. 217-225.
- Vandenhove H., Cuypers A., Van Hees M., Koppen G., Wannijn J. 2006. Oxidative stress reactions induced in beans (*Phaseolus vulgaris*) following exposure to uranium. Plant Physiology and Biochemistry. 44, 11-12.
- Vasseur P. & Cossu-Leguille C. 2006. Linking molecular interactions to consequent effects of persistent organic pollutants (POPs) upon populations. Chemosphere. 62, 1033-1042.
- Verma S. & Dubey R.S. 2003. Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. Plant Science. 164, 645-655.
- Wade C. & Van Rij A. 1985. *In vivo* lipid peroxidation in man as measured by respiration excretion of ethane, pentane and other low molecular weight hydrocarbons. Analytical biochemistry. 150. 1-7.
- Wang Y.J., Ho Y.S., Lo M.J., Lin J.K. 1995. Oxidation modification of DNA bases in rat liver and lung during chemical carcinogenesis and aging. Chem. Biol. Interact. 94. 135-145.
- Viskari E.-L., RekilÄ R., Roy S., Lehto O., Ruuskanen J., Kärenlampi. 1997. Airborne pollutants along a roaside: assessment using snow analyses and moss bags. Environmental Pollution. 97, 153-160.
- Wegener J.W.M., van Schaik M.J.M., Aiking H. 1992. Active biomonitoring of polycyclic aromatic hydrocarbons by means of mosses. Environmental Pollution. 76, 15-18.
- Wellburn A.R. 1994. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotomerters of different resolution. Journal of Plant Physiology.

144, 307-313.

- Werck-Reichhart D., Hehn A. Didierjean L. 2000. Cytochromes P450 for engineering herbicide tolerance. Trends in Plant Science. 5. 116-123.
- Wu L., Chan Y., Yi Y., Shen Z. 2009. Responses to copper by the moss Plagiomnium cuspidatum: hydrogen peroxide accumulation and the antioxidant defense system. Chemosphere. 74, 1260-1265.
- Xie Z., Zhang Y., Guliaev A.B., Shen H., Hang B., Singer B., Wang Z. 2005. The p-benzoquinone DNA adducts derived form benzene are highly mutagenic. DNA Repair. 4, 1399-1409.
- Yamagushi K., Mori H., Nishimura M. 1995a. A novel isoenzyme of ascorbate peroxidase localized on glyoxysomal and leaf peroxisomal membranes in pumpkin. Plant and Cell Physiology. 36, 1157-1162.
- Yamagushi K., Takeushi H., Mori H., Nishimura M. 1995b. Development of microbody membrane proteins during the transformation of glyoxysomes to leaf peroxysome in pumpkin cotyledons. Plant and Cell Physiology. 36, 455-464.
- Yoshimura K., Ishikawa T., Nakamura Y., Tamoi M., Takeda T., Tada T., Nishimura M., Shigeaka S. 1998. Comparative study on recombinant chloroplastic and cytosolic ascorbate peroxidase isoenzymes of spinach. Archives of Biochemistry and Biophysics. 353, 55-63.
- Yu B.P. 1994. Cellular defenses against damage fron reactive oxygen species. Physiological reviews. 74(1). 139-163.
- Yunus M. & Iqbal M. 1996. Plant response to air pollution. John Wiley & Sons. Chichester. pp545.
- Zechmeister H.G., Grodzinska K., Szarek-Lukaszewska G. 2003. Bioindicators and biomonitors: Principles, concepts adn applications. Elsevier science, Oxford. Chap. 10: 329-376. 997p.
- Zhu Z., Wei G., Li J., QianQ., Yu J. 2004. Silicon alleviates salt stress and increases antioxidant enzymes activity in leaves of salt-stressed cucumber (*Cucumis sativus* L.). Plant Science. 167, 527-533.

Webographie

- http://antmoss.nipr.ac.jp/ham/en/search_photo.htm
- Argaud 2003 : http://jos-argaud.free.fr/cadres.php consulté en juin 2009.
- Atmo Nord Pas-de-Calais : www.atmo-npdc.fr consulté en octobre 2007 et décembre 2008
- IRE 2008 - DRIRE « l'industrie au regard de l'environnement »; 2007 : http://www.nord-pas-de-calais.drire.gouv.fr/environnement/ire2008/IRE2007_web/IRE2008.html consullté en décembre 2008
- www.ineris.fr Ineris, fiches toxicologiques et environnementales des substances chimiques. Consulté en mars 2007.
- www.portdedunkerque.fr. Consulté en mars 2007
- Université Joseph Fourier, Grenoble. http://web.ujf-grenoble.fr

GLOSSAIRE

VIII. Glossaire

* **Acrocarpe** : Mousse à archégone se développant au sommet d'une tige ou d'un rameau principal.
Cette sexualisation de l'apex entraîne une forme de croissance en coussinet, à tiges dréssées, peu ou non ramifiées.

* **Anthéridie** : Organe sexuel mâle; gamétange mâle : structure uni- ou pluricellulaire sphérique, ovale-oblongue ou cylindrique, obtuse au sommet, stipitée à la base; produisant les anthérozoïdes.

* **Anthérozoïde** : Gamète mâle différencié, généralement cilié ou flagellé donc mobile; souvent plus petit que le gamète femelle.

* **Anthocyane** : Pigment hydrosoluble coloré contenu dans le liquide cytoplasmique des cellules de nombreux végétaux et auquel ces derniers doivent leur couleur bleue, rouge, mauve ou violette.

* **Archégone** : Organe sexuel femelle; gamétange femelle : structure pluricellulaire, en forme de bouteille, comportant un pied, une paroi protectrice stérile (ventre), dans laquelle se différencie une seule oosphère.

* **Autotrophe** : Organe capable de synthétiser les substances nutritives nécessaire à partir des éléments minéraux de son environnement.

* **Capsule** : Partie terminale du sporophyte contenant les spores (= sporange).

* **Commensalisme** : Association entre deux organismes d'espèces différentes dans laquelle l'un des deux profite de la relation sans nuire à l'autre.

* **Cutinisé** : Recouvert de cutine, substance grasse déposée dans de nombreuses parois cellulaires végétales et à la surface externe des parois des cellules épidermiques, où elle forme la cuticule.

* **Dioïque** : Unisexué, dont les éléments mâles et femelles se trouvent sur des individus différents de la même espèce.

* **Diploïde** : Qui possède 2 lots de chromosomes, le nombre chromosomique 2n est caractéristique de la

phase sporophytique.

* **Exine** : Couche externe de la paroi sporale, issue de la spore elle-même.

* **Gamétophore** : Stipe fertile portant les gamétanges.

* **Gamétophyte** : Génération haploïde, sexuée, produisant les gamètes; phase dominante chez les bryophytes;

* **Haploïde** : Qui possède 1 seul lot de chromosome (n), par opposition au diploïde (2n).

* **Hydroïde** : Cellule conductrice de l'eau chez les mousses. Les hydroïdes ressemblent aux éléments vasculaires mais sont dépourvues d'épaississements spécialisés des parois.

* **Intine** : Couche la plus interne de la paroi sporale.

* **Leptoïde** : Cellule conductrice de la sève organique associée aux hydroïdes dans certains gamétophytes et sporophytes de mousses.

* **Macronémata** : Rhizoïdes longs, ramifiés, issus du pourtour du primordium du rameau situé à l'aisselle d'une feuille.

* **Méristème** : Tissu végétal indifférencié, en division mitotique active, perpétuellement jeune, dont proviennent les nouvelles cellules.

* **Micronémata** : Rhizoïdes courts, à peine ramifiés, situés sur les tiges entre les feuilles.

* **Oosphère** : Gamète femelle immobile, haploïde, localisé dans le ventre de l'archégone, généralement plus volumineuxqu'un gamète mâle de la même espèce.

* **Pédicelle** : *cf.* soie

* **Phéophytinisation** : Dégradation des pigments de chlorophylle en phéophytine par perte de l'élément magnesium.

* **Pleurocarpe** : Mousse à archégone, et par conséquent, à sporophytes au sommet de courts rameaux spécialisés, ou se développant latéralement à partir d'un bourgeon périchétial plutôt qu'au sommet d'une tige.

* **Poïkilohydrique** : Capacité d'un organisme à faire varier son hydatation en fonction de l'humidité ambiante.

* **Protonéma** : Premier stade de développement du gamétophyte chez les mousses et chez certaines hépatiques, résultant de la germination de la spore. Les protonémas peuvent être filamenteux ou foliacés.

* **Reviviscence** : Capacité pour un organisme de passer rapidement, réversiblement et répétitivement de l'état sec à l'état hydaté.

* **Rhizoïde** : Structure en forme de poils racinaires développée par des gamétophytes indépendants, ayant une fonction d'absorption et d'ancrage.

* **Soie** : Tige qui porte la capsule et fait partie du sporophyte.

* **Spore** : Cellule reprodutrice, formée à l'intérieur de la capsule, à la suite de la meïose; généralement petit, sphérique; donnant naissance par germination à un protonéma; capable de se développer en organisme adulte sans s'unir à une autre cellule.

* **Sporogone** : *cf*. sporophyte

* **Sporophyte** : génération diploïde, issu d'un zygote et ayant pour rôle la production de spores; implanté dans le gamétophyte et dépendant de lui partiellement, composé généralement d'une partie renflée (pied) et d'une capsule sessile ou pédicellée.

* **Sporopollénine** : Substance offrant des capacités de conservation et de résistance vis-à-vis d'agents corrosifs à l'enveloppe des spores; composant l'exine, c'est un alcool cyclique très résistant à la décomposition.

* **Stomate** : Structure, trouvée chez quelques bryophytes et chez les végétaux supérieurs, constituée de deux cellules stomatiques ménageant une ouverture dans l'épiderme des feuilles et des tiges, permettent des échanges gazeux.

* **Thalle** : Gamétophyte aplati, à symétrie dorsiventrale, non différencié en racine, tige et feuilles.

* **Xénobiotique** : « qui est étranger à la vie ». Bien que son acceptation ne fasse donc aucune référence à la toxicité, il est en pratique largement employé dans son usage courant pour désigner un groupe majeur de polluant, toxiques à de très faibles concentrations pour les êtres vivants.

* **Xérophile** : Désinge les espèces vivant dans les biotopes arides.

* **Zygote** : Cellule diploïde, résultant de la fécondation d'une oosphère; à la première division, le zygote devient un embryon (*cf.* sporophyte).

ABBREVIATIONS

IX. Liste des abbréviations

- ADN : acide desoxyribonucléique
- AGPI : acide gras poly insaturé
- APOX : ascorbate peroxydase
- ATP : adénosine tri phosphate
- BTEX : benzène, toluène, éthylbenzène, xylènes
- CHL : chlorophylle
- COV : composés organiques volatils
- COVNM : composés organiques volatils non méthaniques
- CUD : communauté urbaine de Dunkerque
- CYT P450 : cytochrome P450
- DMSO : dimethylsulfoxide
- ERO : espèce réactive de l'oxygène
- ETM : élément trace métallique
- GIS : groupement d'intérêt scientifique
- GPOX : guaïacol peroxydase
- GSH : glutathion réduit
- GSSG : glutathion oxydé
- HAP : hydrocarbure aromatique polycyclique
- HCl : acide chlorhydrique
- IRE : industrie au regard de l'environnement
- IRENI : institut de recherche en environnement industriel
- LEA : late embryogenesis abundant
- MDA : malondialdéhyde
- NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
- PCB : polychlorobiphényles
- PSI : photosystème I
- PSII : photosystème II
- SOD : superoxydismutase
- USEPA : United State environmental protection agency (Agence de protection de l'environnement des Etats-Unis)

TABLE DES MATIERES

X. Table des matières

I. Introduction....7

II. Contexte scientifique de la thèse....13

A. La politique régionale de recherche en environnement industriel....13

B. Le littoral dunkerquois....15

1) L'agglomération dunkerquoise....15

a) Description générale....15

b) Caractéristiques météorologiques....15

2) État sanitaire de la population dunkerquoise....15

3) Les sources de COV sur le littoral....16

a) Les sources industrielles....16

b) Les sources du secteur résidentiel....17

c) Les sources mobiles....17

III. État de l'art....21

A. Les Composés Organiques Volatils....21

1) Généralités sur les COV....21

2) Les sources de COV....21

3) La toxicité des COV chez l'Homme....22

4) Les bryophytes et les composés organiques volatils....24

B. Biosurveillance de la qualité de l'air....24

1) Contexte général - l'écotoxicologie....24

2) La biosurveillance....26

a) Les biomarqueurs....27*

b) Les bioindicateurs....28*

c) Les biointégrateurs....28*

3) Les bioaccumulateurs*....28

C. Intérêts des bryophytes pour l'étude de la qualité de l'air....28

1) Généralités sur les bryophytes....28

*a) Cycle de développement des bryophytes (*cf. *annexe 2)....29*

i- Description....29

ii- Multiplication végétative....32

iii- Reproduction....34

b) Écologie des mousses....35

i- L'eau....35
ii- La lumière....37
iii- La température....37
iv- Le sol....37
v- Les facteurs biotiques....38
c) Biogéographie....38
2) Intérêt du modèle bryophyte pour les études écotoxicologiques....38
3) L'accumulation de contaminants chez les bryophytes : les composés organiques....40
D. Composés Organiques Volatils et les végétaux....43
1) Composés Organiques Volatils et végétaux : état des connaissances pour les végétaux supérieurs – comparaison avec les bryophytes....43
a) Adsorption....43
b) Absorption....44
2) Métabolisation des COV chez les végétaux....44
3) Effets des COV chez les végétaux....46
E. Le stress oxydant chez les végétaux....46
1) Généralités sur le stress oxydant....46
a) Définition du stress oxydant....46
b) Les espèces réactives de l'oxygène (ERO)....47
c) Les facteurs à l'origine du stress oxydant....50
d) Les principaux dommages cellulaires causés par les ERO....50
e) Exemple de dommages : les dommages membranaires liés aux ERO....52
i- Péroxydation des lipides membranaires....52
ii- Formation d'aldéhydes issus de la lipoperoxydation....53
f) Les mécanismes de défense antioxydants....57
i- Les mécanismes antioxydants enzymatiques....57
ii- Les mécanismes antioxydants non enzymatiques....57
iii- Le glutathion (L-γ-glutamyl-L-cystéinylglycine) : rôle et fonctionnement....58
g) Impacts du stress oxydant sur les protéines cellulaires....59
2) Les spécificités chez les végétaux....60
a) L'ascorbate peroxydase (APOX) et la guaïacol peroxydase (GPOX) : enzymes spécifiques....60
i- L'ascorbate peroxydase : description et fonctions dans la cellule....60
ii- La guaïacol peroxydase : description et fonctions dans la cellule....61
b) Une protéine particulière du monde végétal : la chlorophylle....62
i- Description des pigments....62
ii- Fonctionnement - Rôle....63

3) Les spécificités chez les bryophytes : répercussion du stress hydrique sur l'expression de biomarqueurs du stress oxydant....64
a) Les mécanismes de défense vis-à-vis du stress hydrique....65
b) Les dommages cellulaires et les réponses métaboliques au stress hydrique....65
4) Usage de ces paramètres comme biomarqueurs....66
a) Agents antioxydants et effets du stress oxydant utilisés comme biomarqueurs....66
b) APOX et GPOX comme biomarqueurs du stress oxydant....67
i- Intérêt de l'utilisation de l'APOX et de la GPOX comme biomarqueurs....67
ii- Etat des lieux concernant l'APOX et la GPOX....67
c) MDA comme biomarqueur du stress oxydant....68
i- Intérêt de son utilisation comme biomarqueur....68
ii- Etat des lieux des études sur le MDA....68
d) GSH comme biomarqueur du stress oxydant....69
i- Intérêt de son utilisation comme biomarqueur....69
ii- Etat des lieux des études sur le GSH....69
e) La chlorophylle comme biomarqueur du stress....70
i- Intérêt comme biomarqueur de stress....70
ii- Etat des lieux des études sur la chlorophylle en tant que biomarqueur....72
IV. Matériel et Méthodes....77
A. Caractérisation des sites d'étude *in situ*....77
1) Présentation et objectifs des expériences *in situ*....77
2) Sites d'exposition....77
a) Sites de la 1ère expérimentation....77
b) Sites de la 2nde expérimentation....78
3) Conditions météorologiques....79
a) Conditions météorologiques de la 1ère expérimentation....79
i- Durée d'exposition....79
ii- Paramètres météorologiques d'exposition....80
b) Paramètres météorologiques de la 2nde expérimentation....81
i- Durée d'exposition....81
ii- Conditions météorologiques d'exposition....81
4) Caractérisation des profils atmosphériques en COV et teneurs en BTEX sur les sites d'exposition...82
a) Échantilonnage des COV atmosphériques....82
b) Analyse des COV atmosphériques....83
i- Dispositif analytique....83
ii- Analyse des cartouches....84

La désorption primaire : *84*
La désorption du piège de préconcentration *84*
La séparation chromatographique *85*
iii- Méthode d'étalonnage 86
Préparation des solutions étalons par gravimétrie *86*
Dopage des cartouches étalon par vaporisation *87*
iv- Analyse qualitative des COV *87*
Choix du tube adsorbant *87*
Position du tube à diffusion *88*
Durée d'échantillonnage *88*
Conservation des tubes *88*
Analyse des tubes *88*
B. Matériel biologique et protocole d'étude du stress hydrique chez les bryophytes 88
1) *Ceratodon purpureus* (Hedw.) *Brid.* 89
a) Systématique du Ceratodon purpureus *(Hedw.)* *89*
b) Caractéristiques de Ceratodon purpureus *(Hedw.)* *89*
c) Ecologie et répartition géographique de Ceratodon purpureus *(Hedw.)* *90*
d) Origine et intérêt de Ceratodon purpureus *(Hedw.) dans le cadre de notre étude* *90*
2) *Pseudoscleropodium purum* (Hedw.) *Limpr.* 91
a) Systématique de Pseudoscleropodium purum *(Hedw.)* *91*
b) Caractéristiques de Pseudoscleropodium purum (*Hedw.)* *91*
c) Ecologie et répartition géographique de Pseudoscleropodium purum *(Hedw.)* *92*
d) Origine et intérêt de Pseudoscleropodium purum *(Hedw.) dans le cadre de notre étude* *92*
3) *Tortula ruralis* (Hedw.) *Gärtn. (= Syntrichia ruralis* (Hedw.) *F. Weber & D. Mohr*) 93
a) Systématique de Tortula ruralis *(Hedw.)* *93*
b) Caractéristiques de Tortula ruralis *(Hedw.)* *93*
c) Ecologie et répartition géographique de Tortula ruralis *(Hedw.)* *93*
d) Origine et intérêt de Tortula ruralis *(Hedw.) dans le cadre de notre étude* *94*
4) Étude de l'impact du stress hydrique chez *Tortula ruralis* par l'expression des biomarqueurs du stress oxydant 94
a) Conditions d'exposition *95*
b) Durée d'exposition *95*
c) Matériel d'exposition *95*
i- Déshydratation rapide 95
ii- Déshydratation lente 96
iii- Réhydratation rapide 96

iv- Réhydratation lente....97
d) Échantillonnage....97
5) Efficacité du système d'hydratation adapté au matériel d'exposition des mousses....98
a) Matériel biologique....98
b) Conditions de l'expérimentation....98
i- Étude en conditions contrôlées....98
Matériel d'exposition....98
Durées et conditions hygrométriques d'exposition....99
Echantillonnage....99
ii- Étude in situ....99
Matériel d'exposition....99
Durées et conditions hygrométriques d'exposition....100
Echantillonnage....100
c) Conclusions et validation du système d'hydratation des mousses....101
6) Étude de l'influence de l'âge de *Tortula ruralis* sur l'expression des biomarqueurs du stress oxydant 103
a) Sélection du matériel biologique - conditionnement....103
b) Echantillonnage - conservation....103
i- Échantillonnage : 104
ii- Conservation : 104
C. Étude de l'accumulation et de la toxicité des BTEX chez les mousses....104
1) Étude in situ de l'accumulation de BTEX chez des mousses 104
a) Matériel d'exposition....104
b) Conditions d'exposition....105
c) Protocole d'échantillonnage....105
i- L'échantillonnage....105
ii- Prélèvement des mousses....105
d) Protocole de dosage des BTEX dans les mousses....105
2) Protocole d'étude en conditions contrôlées de l'accumulation et de la toxicité des BTEX chez *Tortula ruralis*....106
a) Protocole d'étude de l'accumulation et de la toxicité de fortes concentrations de benzène chez Tortula ruralis*....107*
i- Matériel d'exposition....107
ii- Protocole d'exposition au benzène en conditions contrôlées de *Tortula ruralis* : effets des concentrations de benzène....108
Nature et concentrations du polluant....108
Durée d'exposition....108

Échantillonnage....109
iii- Protocole d'exposition au benzène en conditions contrôlées de *Tortula ruralis* : effets de la durée d'exposition. .109
Nature et concentration du polluant....109
Durées d'exposition....109
Échantillonnage....109
iv- Dosage du benzène et paramètres biologiques....109
Mesure de l'état d'hydratation chez Tortula ruralis....110
Protocole de mesure des concentrations en benzène chez Tortula ruralis....110
Dosages des biomarqueurs de stress oxydant et de dégradation de la chlorophylle....111
b) Protocole d'étude de l'accumulation chez Tortula ruralis *exposée à des concentrations réalistes en BTEX (coll. H.Plaisance, Ecole des Mines de Douai)*....111
i- Conditions d'exposition....111
Matériel d'exposition....111
Nature et concentrations des polluants....113
Durée d'exposition....113
Échantillonnage....114
ii- Mesure de la réponse biologique....114
Mesure de l'état d'hydratation chez Tortula ruralis....114
Protocole de mesure des concentrations en BTEX chez Tortula ruralis....114
3) Protocoles d'étude de l'adsorption et de la désorption des BTEX chez *Tortula ruralis* en conditions contrôlées....114
a) Protocole mis en œuvre pour étudier le comportement de Tortula ruralis *après l'arrêt d'une exposition au benzène*....114
i- Nature et concentration du polluant....115
ii- Durée d'exposition....115
iii- Échantillonnage....115
iv- Dosage du benzène et paramètres biologiques....115
b) Protocoles d'étude de l'adsorption et de la désorption des BTEX en faibles concentrations chez Tortula ruralis *en conditions contrôlées (coll. H.Plaisance, Ecole des Mines de Douai)*....115
i- Conditions d'exposition....116
Matériel d'exposition....116
Nature et concentrations des polluants....117
Durée d'exposition....117
ii- Mesures des concentrations en BTEX dans l'enceinte....117
4) Protocole d'exposition *in situ* de *Tortula ruralis* : accumulation des BTEX et expression des biomarqueurs du stress oxydant....118
a) Conditions d'exposition....118
b) Durée d'exposition....118

c) Matériel d'exposition *118*
d) Étude de la réponse biologique *119*
D. Marqueurs biologiques **120**
1) Mesure du paramètre d'évaluation du stress hydrique : la teneur relative en eau ou Relative Water Content (RWC) 120
2) Dosage des activités enzymatiques de l'ascorbate peroxydase et du guaïacol peroxydase, et des protéines totales 120
a) Extraction des enzymes *120*
b) Dosage des enzymes *121*
i- Ascorbate Peroxydase (APOX) 121
ii- Guaïacol Peroxydase (GPOX) 121
c) Dosage des protéines *122*
i- Extraction des protéines 122
ii- Préparation de la gamme étalon de protéines 122
iii- Dosage des protéines totales 123
3) Dosage des concentrations en malondialdéhyde 123
a) Extraction du MDA *123*
b) Préparation de la gamme étalon de MDA *123*
c) Dosage du MDA *124*
4) Dosage des concentrations en chlorophylles et indice de phéophytinisation 124
a) Etat des connaissances des techniques d'analyse des pigments chlorophylliens *124*
i- Extraction 124
ii- Dosage 125
b) Protocole de comparaison de 2 techniques d'extraction des pigments chlorophylliens chez Tortula ruralis *127*
i- Conditions d'exposition - échantillonnage 127
ii- Protocoles d'extraction des pigments chlorophylliens 127
Extraction des pigments chlorophylliens à l'acétone 90% *127*
Extraction des pigments chlorophylliens au dimethyl sulfoxide (DMSO) *128*
iii- Préparation des gammes étalon de chlrophylle a 128
iv- Dosage des pigments chlorophylliens 128
v- Estimation de la dégradation de la chlorophylle a en phéophytine a 129
vi- Résultats de la comparaison des 2 techniques d'analyse des pigments chlorophylliens 129
c) Conclusions sur la comparaison des 2 techniques d'analyse des pigments chlorophylliens *132*
E. Traitement statistique des données **133**

V. Résultats 137

A. Caractérisation de la contamination atmosphérique des sites lors des deux périodes d'exposition 137

1) 1ère expérimentation *in situ* (juin-juillet 2007).....137

a) Caractérisation qualitative des composés organiques volatils sur les 2 sites d'exposition 137

b) Caractérisation quantitative des BTEX sur les 2 sites d'exposition 139

c) Contaminants atmosphériques non organiques.....141

2) 2nde expérimentation *in situ* (octobre 2008) 142

a) Caractérisation quantitative des BTEX sur les 24 sites d'exposition.....142

b) Contaminants atmosphériques non organiques.....146

B. Etudes préliminaires des impacts du stress hydrique chez les bryophytes 146

1) Impacts du stress hydrique – étude de biomarqueurs de stress oxydant.....146

a) États d'hydratation de Tortula ruralis *147*

b) Influence du stress hydrique sur les concentrations en protéines totales 148

c) Influence du stress hydrique sur les activités de l'ascorbate et de la guaïacol peroxydases.....149

i- APOX.....149

ii- GPOX.....151

d) Influence du stress hydrique sur l'intégrité des lipides membranaires.....152

e) Influence du stress hydrique sur les concentrations en chlorophylles et l'indice de phéophytinisation.....153

i- Chlorophylles a, b et totales.....153

ii- Indice de phéophytinisation.....155

f) Discussion.....156

2) Influence de l'âge de la mousse sur l'expression de biomarqueurs du stress oxydant.....158

a) Influence de l'âge de la mousse sur les concentrations en protéines et les activités de l'ascorbate et de la guaïacol peroxydases.....159

b) Influence de l'âge de la mousse sur l'intégrité des membranes lipidiques.....159

c) Influence de l'âge de la mousse sur les teneurs en chlorophylles et l'indice de phéophytinisation 160

d) Discussion.....161

C. Etudes de l'accumulation des BTEX chez les bryophytes.....161

1) Études de l'accumulation des BTEX in situ en conditions réalistes.....161

a) 1ère étude in situ *de l'accumulation des BTEX chez 3 espèces bryophytiques.....162*

i- Teneurs en BTEX chez les 3 espèces bryophytiques.....162

Site industriel.....162

Site urbain.....*164*
ii- Facteurs d'enrichissement en BTEX chez *Ceratodon purpureus, Pseudoscleropodium purum* et.*Tortula ruralis*.165
iii- Biomarqueurs de vitalité des mousses.....168
iv- Discussion de l'accumulation des BTEX chez les mousses.....170
b) 2nde expérimentation in situ *(octobre 2008) : étude des capacités accumulatrices des BTEX chez* Tortula ruralis.....*176*
c) Conclusion sur les études d'accumulation in situ.....*177*
2) Etudes de l'accumulation des BTEX en conditions contrôlées.....178
a) Etude de l'accumulation du benzène chez Tortula ruralis *en fonction de la concentration d'exposition*.....*178*
i- Etude de l'accumulation du benzène à fortes concentrations.....179
Résultats.....*179*
Discussion sur l'accumulation du benzène en conditions contrôlées en fonction des concentrations d'exposition – fortes concentrations.....*181*
ii- Etude de l'accumulation des BTEX à concentrations réalistes.....181
b) Étude de la cinétique de l'accumulation du benzène chez Tortula ruralis.....*182*
i- Résultats.....183
ii- Discussion sur l'accumulation du benzène en conditions contrôlées en fonction de la durée d'exposition.....184
c) Phénomène de relargage des BTEX par la mousse : étude des phénomènes d'absorption et de désorption des BTEX chez Tortula ruralis.....*185*
i- Étude du phénomène de relargage du benzène chez *Tortula ruralis*.....185
ii- Étude de l'absorption et de la désorption des BTEX chez *Tortula ruralis*.....186
d) Conclusions relatives à l'accumulation en conditions contrôlées des BTEX chez Tortula ruralis *189*
3) Conclusions relatives à l'accumulation des BTEX chez *Tortula ruralis*.....189
D. Étude de toxicité : influence du benzène et d'un stress environnemental sur l'expression de biomarqueurs du stress oxydant chez *Tortula ruralis*.....190
1) Biomarqueurs de stress oxydant chez *Tortula ruralis* : effets de l'exposition au benzène en conditions contrôlées.....190
a) Étude de l'expression de biomarqueurs du stress oxydant chez Tortula ruralis *en fonction de la concentration d'exposition au benzène*.....*191*
i- Influence des concentrations d'exposition au benzène sur les concentrations en protéines totales chez *Tortula ruralis*.....191
ii- Influence des concentrations d'exposition au benzène sur l'activité de l'ascorbate et de la guaïacol peroxydases chez *Tortula ruralis*.....192
iii- Influence des concentrations d'exposition au benzène sur la péroxydation des lipides membranaires chez *Tortula ruralis*.....193
iv- Influence des concentrations d'exposition au benzène sur les concentrations chlorophylles et sur l'indice de

phéophytinisation chez *Tortula ruralis*.....194
v- Discussion.....195
b) Étude de l'expression de biomarqueurs du stress oxydant chez Tortula ruralis *en fonction de la durée d'exposition au benzène.....196*
i- Influence de la durée d'exposition au benzène sur les concentrations en protéines totales chez *Tortula ruralis*....197
ii- Influence de la durée d'exposition au benzène sur l'activité de l'ascorbate et de la guaïacol peroxydases chez *Tortula ruralis*.....198
iii- Influence de la durée d'exposition au benzène sur la péroxydation des lipides membranaires chez *Tortula ruralis* 200
iv- Influence de la durée d'exposition au benzène sur les concentrations chlorophylles et l'indice de phéophytinisation chez *Tortula ruralis*.....201
v- Discussion.....203
c) Évolution de l'expression de biomarqueurs du stress oxydant chez Tortula ruralis *après une exposition à une forte concentration de benzène.....203*
i- Évolution de la concentration en protéines totales et des activités de l'ascorbate et de la guaïacol peroxydases chez *Tortula ruralis* après son exposition au benzène.....204
ii- Évolution des concentrations en malondialdéhyde chez *Tortula ruralis* après son exposition au benzène 205
iii- Évolution des concentrations en chlorophylles et de l'indice de phéophytinisation chez *Tortula ruralis* après son exposition au benzène 206
iv- Discussion de l'évolution de l'expression des biomarqueurs de stress oxydant chez *Tortula ruralis* après l'arrêt d'une exposition au benzène en conditions contrôlées.....208
2) Etude *in situ* de la réponse de biomarqueurs du stress oxydant chez *Tortula ruralis* exposée à un stress environnemental global.....209
a) Variation de la concentration en protéines totales et des activités de l'ascorbate et de la guaïacol peroxydases chez Tortula ruralis *soumis à un stress environnemental global.....210*
b) Variation des concentrations en malondialdéhyde chez Tortula ruralis *soumis à un stress environnemental global.....210*
c) Variation des concentrations en chlorophylles et de l'indice de phéophytinisation chez Tortula ruralis *soumis à un stress environnemental global.....211*
d) Discussion.....213
3) Conclusion sur l'expression des biomarqueurs de stress oxydant chez *Tortula ruralis*.....213
E. Analyse croisée des conditions d'expositions, des teneurs en benzène et des réponses des biomarqueurs de stress oxydant chez *Tortula ruralis* - Synthèse.....215
1) Synthèse sur les capacités accumulatrices des BTEX chez *Tortula ruralis* : études en conditions contrôlées et *in situ*.....215
2) Expositions en conditions contrôlées : corrélation entre les concentrations en benzène et les réponses des biomarqueurs de stress oxydant chez *Tortula ruralis*.....216

a) Réponse des biomarqueurs de stress oxydant en fonction des concentrations en benzène chez Tortula ruralis.....*216*
b) Réponse des biomarqueurs de stress oxydant en fonction de la durée d'exposition au benzène chez Tortula ruralis.....*216*
c) Réponse des biomarqueurs de stress oxydant à l'exposition au benzène pendant 20 heures puis après arrêt de l'exposition, chez Tortula ruralis.....*217*
3) Expositions *in situ* : corrélation entre les paramètres environnementaux et les réponses des biomarqueurs de stress oxydant chez *Tortula ruralis*.....218
4) Synthèse des réponses des biomarqueurs de stress oxydant aux différents facteurs de stress chez *Tortula ruralis* : part du stress hydrique et de l'âge dans l'expression des biomarqueurs.....219
VI. Bilan et perspectives 225
VII. Références bibliographiques.....233
VIII. Glossaire.....255
IX. Liste des abbréviations.....261
X. Table des matières.....265
XI. Tables des figures.....277
XII. Tables des tableaux.....287
XIII. Annexes.....291
XIV. Valorisation.....295

XI. Tables des figures

Figure 1: Répartition des rejets en composés organiques volatils non méthaniques par les émetteurs industriels dunkerquois en 2007 (IRE, 2008 consulté en décembre 2008).....17
Figure 2: Représentation de feuilles et tiges d'une mousse (Source : http://antmoss.nipr.ac.jp/ham/en/search_photo.html).....30
Figure 3: Sporogone de *Polytrichum* (A. op : opercule; s : soie; B. a : apophyse; cl : columelle; d : diaphragme; op : opercule; pe : péristome; s : spore; ts : tissu sporogène; t : assise nourricière) (source : université Joseph Fourier, Grenoble : http://web.ujf-grenoble.fr).....31
Figure 4: Anthéridiophore : A aspect général, B détail d'une anthéridie, C spermatozoïdes chez une hépatique à thalle (*Marchantia polymorpha*) (Source : université Joseph Fourier, Grenoble : http://web.ujf-grenoble.fr). .33
Figure 5: Archégoiophore chez une hépatique à thalle (*Marchantia polymorpha*) (Source : université Joseph Fourier, Grenoble : http://web.ujf-grenoble.fr).....33
Figure 6: Germination de la spore et évolution du protonéma (Source : université Joseph Fourier, Grenoble : http://webujf-grenoble.fr).....34
Figure 7: Sites de production intra-organites des formes réactives de l'oxygène (ROS) dans la cellule végétale (Parent et al, 2008).....49
Figure 8: Péroxydation d'une portion de chaîne lipidique (www.ulg.ac.be/cord/ChapIX.pdf).....54
Figure 9: Processus de peroxydation lipidique (www.ulg.ac.be/cord/ChapIX.pdf).....55
Figure 10: Synthèse des dommages induits par les espèces réactives de l'oxygène (França et al, 2007).....56
Figure 11: Cycle du glutathion (Rousseau, 1999).....59
Figure 12: Système de prise en charge des espèces réactives de l'oxygène chez les végétaux (Shigeoka et al., 2002).....61
Figure 13: Structure des chlorophylles a et b avec leur configuration absolue (Folly, 2000).....63
Figure 14: Le phénomène de la photosynthèse (Folly, 2000).....64
Figure 15: Pigments dérivés de la chlorophylle (Folly, 2000).....72
Figure 16: Sites d'exposition de la 1ère phase d'exposition (juin et juillet 2007).....78
Figure 17: Sites d'exposition de la 2nde phase d'exposition (octobre 2008).....79
Figure 18: Température et humidité relative sur l'agglomération dunkerquoise au cours des mois de juin et juillet 2007 (Source Atmo Nord Pas-de-Calais consulté en octobre 2007).....80
Figure 19: Roses des vents sur l'agglomération dunkerquoise au cours des mois de juin et juillet 2007 (source Atmo Nord Pas-de-Calais consulté en octobre 2007).....81
Figure 20: Schéma du principe de diffusion à travers un tube Radiello® 83
Figure 21: Schéma de la désorption primaire (Roukos, 2007 non publié).....84

Figure 22: Schéma de la désorption du piège de préconcentration (Roukos 2007 non publié).....85
Figure 23: Dispositif de dopage par vaporisation d'une solution de benzène sur une cartouche Radiello® (Roukos, 2007 non publié).....87
Figure 24: Dispositif de déshydratation rapide des mousses (Photo Faburé, 2007).....96
Figure 25: Dispositif de déshydratation lente des mousses (Photo Faburé, 2007).....96
Figure 26: Dispositif de réhydratation rapide des mousses (photo Faburé, 2007).....97
Figure 27 : Dispositif de réhydratation lente des mousses (photo Faburé, 2007).....97
Figure 28: Schéma du système d'hydratation de mousse conditionnée en barquette (Denayer, 2000).....99
Figure 29: Biostation - dispositif d'exposition des mousses *in situ*.....100
Figure 30: Variations des taux d'hydratation chez *Ceratodon purpureus* (Cp), *Pseudoscleropodium purum* (Pp) et *Tortula ruralis* (Tr) au cours des expérimentations en laboratoire et in situ (s/ss : avec/sans système d'hydratation; TR : avant exposition; T0 : début de l'exposition; T1 ; après 1 semaine; T2 : 2 semaines; T4 : 4 semaines; T8: 8 semaines) (Test t de Student pour échantillons appariés; n=5 ; * ou des lettres différentes signalent des différences significatives p<0,05)).....102
Figure 31: Dispositif d'exposition aux BTEX en enceinte, à faibles concentrations (d'après Pennequin-Cardinal, 2005) – (photo Faburé 2008).....112
Figure 32: Dispositif d'exposition de *Tortula ruralis* à de faibles concentrations en BTEX avec contrôle on-line des concentrations dans l'enceinte (d'après Cardinal-Pennequn, 2005).....116
Figure 33: Biostation A d'exposition des mousses *in situ*.....119
Figure 34: Biostation B d'exposition des mousses *in situ*.....119
Figure 35: Concentration en chlorophylle a chez *Tortula ruralis* avant application d'un stress thermique, en fonction du solvant d'extraction (Test t de Student, n=10).....130
Figure 36: Concentration en chlorophylle a chez *Tortula ruralis* après application d'un stress thermique, en fonction du solvant d'extraction (Test t de Student, n=10 ; différence significative * : p<0,05 ; ** : p<0,01 ; *** : p<0,001).....130
Figure 37: Comparaison des variations des concentrations en chlorophylles a b et totales, induites par un stress thermique, chez *Tortula ruralis*, en fonction des solvants d'extraction et des équations de calcul (Test t Student, n=10).....131
Figure 38: Comparaison des indices de phéophytinisation chez *Tortula ruralis* en fonction du solvant d'extraction. (Les 2 indices sont analysés indépendamment - test t Student, n=10; des lettres différentes signalent des différences significatives p<0,05).....132
Figure 39: Distribution des COV sur le site industriel (A).....138
Figure 40: Distribution des COV sur le site urbain (B).....138
Figure 41: Concentrations dans l'air (µg.m-3) en BTEX sur les 2 sites d'exposition (industriel-A et urbain-B) au

cours des 8 semaines d'étude.....140
Figure 42: Proportion des BTEX dans l'air, les uns par rapport aux autres, au cours des 8 semaines d'étude sur le site industriel.....141
Figure 43: Proportion des BTEX dans l'air, les uns par rapport aux autres, au cours des 8 semaines d'étude sur le siteurbain.....141
Figure 44: Concentration en particules de taille inférieures ou égales à 10 µm, au cours des 4 périodes d'exposition sur les sites industriel et urbain (Source Atmo Nord Pas-de-Calais consulté en octobre 2007). .142
Figure 45: Concentration en dioxyde de soufre au cours des 4 périodes d'exposition sur les sites industriel et urbain (Source Atmo Nord Pas-de-Calais consulté en octobre 2007).....142
Figure 46: Modélisation de la contamination atmosphérique en benzène sur la zone d'étude au cours de la 1ère semaine d'exposition (octobre 2008).....144
Figure 47: Modélisation de la contamination atmosphérique en benzène sur la zone d'étude au cours de la 2nde semaine d'exposition (octobre 2008).....144
Figure 48: Modélisation des concentrations en toluène sur la zone d'étude au cours de la 1ère semaine d'exposition (octobre 2008).....145
Figure 49: Modélisation des concentrations en toluène sur la zone d'étude au cours de la 2nde semaine d'exposition (octobre 2008).....145
Figure 50: Modélisation des concentrations en éthylbenzène sur la zone d'étude au cours de la 2nde semaine d'exposition (octobre 2008).....145
Figure 51: Modélisation des concentrations en éthylbenzène sur la zone d'étude au cours de la 1ère semaine d'exposition (octobre 2008).....145
Figure 52: Modélisation des concentrations en méta,para-xylènes sur la zone d'étude au cours de la 1ère semaine d'exposition (octobre 2008).....145
Figure 53: Modélisation des concentrations en méta,para-xylènes sur la zone d'étude au cours de la 2nde semaine d'exposition (octobre 2008).....145
Figure 54: Modélisation des concentrations en ortho-xylène sur la zone d'étude au cours de la 1ère semaine d'exposition (octobre 2008).....145
Figure 55: Modélisation des concentrations en ortho-xylène sur la zone d'étude au cours de la 2nde semaine d'exposition (octobre 2008).....145
Figure 56: Variations de l'état d'hydratation de *Tortula ruralis* au cours des 4 expériences A, B, C et D. (Test de Wilcoxon; n=6 ; des lettres différentes signalent des différences significatives p<0,05) (T0 : phase initiale; DH : déshydratation; RH : réhydratation).....148
Figure 57: Etat d'hydratation de *Tortula ruralis* à chaque étape (T0 : phase initiale; DH : déshydratation; RH : réhydratation) des 4 expériences(A, B, C, D) (Test U de Mann-Whitney pour échantillons indépendants; n=6 ;

des lettres différentes signalent des différences significatives p<0,05).....148
Figure 58: Variations des concentrations en protéines totales chez *Tortula ruralis* au cours des 4 expériences A, B, C, et D (Test de Wilcoxon, n=6) ; des lettres différentes signalent des différences significatives p<0,05) (T0 : phase initiale; DH : déshydratation; RH : réhydratation).....149
Figure 59: Concentrations en protéines totales chez *Tortula ruralis* à chaque étape (T0 : phase initiale; DH : deshydratation; RH : réhydratation) des 4 expériences (A, B, C, D) (Test U de Mann-Whitney pour échantillons indépendants; n=6 ; des lettres différentes signalent des différences significatives p<0,05).....149
Figure 60: Variations des activités de l'APOX chez *Tortula ruralis* au cours des 4 expériences A, B, C et D (Test de Wilcoxon, n=6; des lettres différentes signalent des différences significatives p<0,05) (T0 : phase initiales; DH : déshydratation; RH : réhydratation).....150
Figure 61: Activité de l'APOX chez *Tortula ruralis* à chaque étape (T0 : phase initiale; DH : déshydratation; RH : réhydratation) des 4 expériences (A,B,C,D) (Test U de Mann-Whitney pour échantillons indépendants; n=6; des lettres différentes signalent des différences significatives p<0,05).....150
Figure 62: Variations des activités de la GPOX chez *Tortula ruralis* au cours des 4 expériences A, B, C, et D (Test de Wilcoxon, n=6 ; des lettres différentes signalent des différences significatives p<0,05) (T0 : phase initiale; DH : déshydratation; RH : réhydratation).....151
Figure 63: Activité de la GPOX chez *Tortula ruralis* à chaque étape (T0 : phase initiale; DH : deshydratation; RH : réhydratation) des 4 expériences (A, B, C, D) (Test U de Mann-Whitney pour échantillons indépendants; n=6 ; des lettres différentes signalent des différences significatives p<0,05).....151
Figure 64: Variations des concentrations en MDA chez *Tortula ruralis* au cours des 4 expériences A, B, C, et D (Test de Wilcoxon, n=6 ; des lettres différentes signalent des différences significatives p<0,05) (T0 : phase initiale; DH : déshydratation; RH : réhydratation).....152
Figure 65: Concentrations en MDA chez *Tortula ruralis* à chaque étape (T0 : phase initiale; DH : deshydratation; RH : réhydratation) des 4 expériences (A, B, C, D) (Test U de Mann-Whitney pour échantillons indépendants; n=6 ; des lettres différentes signalent des différences significatives p<0,05).....152
Figure 66: Variations des concentrations en chlorophylle a chez *Tortula ruralis* au cours des 4 expériences A, B, C, et D (Test de Wilcoxon, n=6 ; des lettres différentes signalent des différences significatives p<0,05) (T0 : phase initiale ; DH : déshydratation ; RH : réhydratation).....153
Figure 67: Variations des concentrations en chlorophylle totale chez *Tortula ruralis* au cours des 4 expériences A, B, C, et D (Test de Wilcoxon, n=6 ; des lettres différentes signalent des différences significatives p<0,05) (T0 : phase initiale ; DH ; déshydratation ; RH : réhydratation).....153
Figure 68: Variations des concentrations en chlorophylle b chez *Tortula ruralis* au cours des 4 expériences A, B, C, et D (Test de Wilcoxon, n=6 ; des lettres différentes signalent des différences significatives p<0,05) (T0 : phase initiale ; DH : déshydratation ; RH : réhydratation).....153

Figure 69: Concentrations en chlorophylle a chez *Tortula ruralis* à chaque étape (T0 : phase initiale; DH : deshydratation; RH : réhydratation) des 4 expériences (A, B, C, D) (Test U de Mann-Whitney pour échantillons indépendants; n=6 ; des lettres différentes signalent des différences significatives p<0,05).....154
Figure 70: Concentrations en chlorophylle b chez *Tortula ruralis* à chaque étape (T0 : phase initiale; DH : deshydratation; RH : réhydratation) des 4 expériences (A, B, C, D) (Test U de Mann-Whitney pour échantillons indépendants; n=6 ; des lettres différentes signalent des différences significatives p<0,05).....154
Figure 71: Concentrations en chlorophylle totale chez *Tortula ruralis* à chaque étape (T0 : phase initiale; DH : deshydratation; RH : réhydratation) des 4 expériences (A, B, C, D) (Test U de Mann-Whitney pour échantillons indépendants; n=6 ; des lettres différentes signalent des différences significatives p<0,05).....154
Figure 72: Variations de l'indice de phéophytnisation chez *Tortula ruralis* au cours des 4 expériences A, B, C, et D (Test de Wilcoxon, n=6 ; des lettres différentes signalent des différences significatives p<0,05) (T0 : phase initiale; DH : déshydratation; RH : réhydratation).....155
Figure 73: Indice de phéophytinisation chez *Tortula ruralis* à chaque étape (T0 : phase initiale; DH : deshydratation; RH : réhydratation) des 4 expériences (A, B, C, D) (Test U de Mann-Whitney pour échantillons indépendants; n=6 ; des lettres différentes signalent des différences significatives p<0,05).....155
Figure 74: Rapport de la biomasse fraîche sur la biomasse sèche chez *Tortula ruralis* selon son âge (Test t de Student, n=9 ; ** : différence significative p<0,01).....158
Figure 75: Longueur moyenne des brins de *Tortula ruralis* selon leur âge (Test t de Student, n=9 ; ** : différence significative p<0,01).....158
Figure 76: Activité de l'APOX chez *Tortula ruralis* selon son âge (Test t de Student, n=9).....159
Figure 77: Activité de la GPOX chez *Tortula ruralis* selon son âge (Test t de Student, n=9 ; ** : différence significative p<0,01).....159
Figure 78: Concentrations en protéines totales chez *Tortula ruralis* selon son âge (Test t de Student, n=9)..159
Figure 79: Concentration en MDA chez *Tortula ruralis* selon son âge (test t de Student, n=9 ; ** : différence significative p<0,01).....160
Figure 80: Indice de phéophytinisation chez *Tortula ruralis* selon l'âge (Test t de Student, n=9).....161
Figure 81: Concentrations en chlorophylle a, b et totale chez *Tortula ruralis* selon l'âge (Test t de Student, n=9 ; différence significative * : p<0,05 ; *** : p<0,001).....161
Figure 82: Concentrations en BTEX chez *Ceratodon purpureus*, *Pseudoscleropodium purum* et *Tortula ruralis* exposés sur le site industriel en ng/g de biomasse sèche de mousse (Test t Student pour échantillons appariés, n=5. Différence significative par rapport au référent TR à p<0,05 * ; p<0,01 **; p<0,001 ***).....163
Figure 83: Concentrations BTEX chez *Ceratodon purpureus, Pseudoscleropodium purum* et *Tortula ruralis* exposés sur le site urbain en ng/g de biomasse sèche de mousse (Test t Student pour échantillons appariés, n=5. Différence significative par rapport au référent TR à p<0,05 * ; p<0,01 ** ; p<0,001 ***).....165

Figure 84: Rapports des facteurs d'enrichissement en BTEX chez les 3 espèces bryophytiques (FE : facteur d'enrichissement; Cp: *Ceratodon purpureus*; Pp: *Pseudoscleropodium purum*; Tr: *Tortula ruralis*) pour le site industriel.....166
Figure 85: Rapports des facteurs d'enrichissement en BTEX chez les 3 espèces bryophytiques (FE: facteur d'enrichissement; Cp: *Ceratodon purpureus*; Pp: *Pseudoscleropodium purum*; Tr: *Tortula ruralis*) pour le site urbain.....168
Figure 86: Etat d'hydratation chez les 3 espèces bryophytiques (CP : *Ceratodon purpureus*; PP : *Pseudoscleropodium purum*; TR : *Tortula ruralis*) au cours des 8 semaines d'exposition sur les sites industriel et urbain (Test t de Student, n=5 ; différence significative * : p<0,05 ; ** : p<0,01 ; *** : p<0,001).....169
Figure 87: Concentration en chlorophylle a chez les 3 espèces bryophytiques (CP : *Ceratodon purpureus*; PP : *Pseudoscleropodium purum*; TR : *Tortula ruralis*) au cours des 8 semaines d'exposition sur les sites industriel et urbain (Test t de Student, n=5 ; différence significative * : p<0,05 ; ** : p<0,01 ; *** : p<0,001).....169
Figure 88: Indice de phéophytinisation chez les 3 espèces bryophytiques (CP : *Ceratodon purpureus*; PP : *Pseudoscleropodium purum*; TR : *Tortula ruralis*) au cours des 8 semaines d'exposition sur les sites industriel et urbain (Test t de Student, n=5 ; différence significative * : p<0,05 ; ** : p<0,01 ; *** : p<0,001).....170
Figure 89: Exemple de chromatogramme observé au cours de l'analyse des échantillons de *Tortula ruralis* après exposition.....176
Figure 90: Quantité de benzène accumulée chez *Tortula ruralis* selon les concentrations d'exposition au benzène (Test t de Student, n=4 ; des lettres différentes signalent des différences significatives p<0,05) au cours de l'exposition 1.....179
Figure 91: Teneurs en benzène chez *Tortula ruralis* après l'exposition 1 à différentes concentrations de benzène (Test t de Student, n=4. * : différence significative p<0,05; ** : différence significative p<0,01; *** : différence significative p<0,001).....179
Figure 92: Quantité de benzène accumulée chez *Tortula ruralis* selon les concentrations d'exposition au benzène (Test t de Student, n=4 ; des lettres différentes signalent des différences significatives p<0,05) au cours de l'exposition 2.....180
Figure 93: Teneurs en benzène chez *Tortula ruralis* après l'exposition 2 à différentes concentrations de benzène (Test t de Student, n=4. * : différence significative p<0,05; ** : différence significative p<0,01; *** : différence significative p<0,001).....180
Figure 94: Quantité de benzène accumulée chez *Tortula ruralis* selon les concentrations d'exposition au benzène (Test t de Student, n=4 ; des lettres différentes signalent des différences significatives p<0,05) au cours de l'exposition 3.....180
Figure 95: Teneurs en benzène chez *Tortula ruralis* après l'exposition 3 à différentes concentrations de benzène (Test t de Student, n=4. * : différence significative p<0,05; ** : différence significative p<0,01; *** :

différence significative p<0,001).....180
Figure 96: Quantités de benzène chez *Tortula ruralis* avant et après exposition à 200 ppm de benzène pendant différentes durées (75, 150, 300, 600; 1200 et 6000) (Test t de Student, n=5; différence significative * : p<0,05; ** : p<0,01; *** : p<0,001).....183
Figure 97: Quantités de benzène accumulées chez *Tortula ruralis* exposée à 200 ppm de benzène pendant différentes durées (75, 150, 300, 600, 1200 et 6000) (Test t de Student, n=5 ; des lettres différentes signalent des différences significatives p<0,05).....185
Figure 98: Teneurs en benzène chez *Tortula ruralis* avant et après exposition à 200 ppm de benzène pendant 24 heures, puis 2, 4 et 8 heures à l'issue de l'exposition (Test t de Student pour échantillons appariés, n=5 ; des lettres différentes signalent des différences significatives p<0,05).....186
Figure 99: Evolution des teneurs en benzène sorties de l'enceinte (ng/min) au cours des 2 expositions (présence ou en absence de *Tortula ruralis*) - Cadre bleu : différence de quantité de benzène (µg) entre les 2 expositions 187
Figure 100: Evolution des teneurs en toluène sorties de l'enceinte (ng/min) au cours des 2 expositions (présence ou en absence de *Tortula ruralis*) - Cadre bleu : différence de quantité de toluène (µg) entre les 2 expositions 187
Figure 101: Evolution des teneurs en éthylbenzène sorties de l'enceinte (ng/min) au cours des 2 expositions (présence ou en absence de *Tortula ruralis*) - Cadre bleu : différence de quantité de éthylbenzène (µg) entre les 2 expositions 188
Figure 102: Evolution des teneurs en méta, para-xylènes sorties de l'enceinte (ng/min) au cours des 2 expositions (présence ou en absence de *Tortula ruralis*) - Cadre bleu : différence de quantité de méta, para-xylènes (µg) entre les 2 expositions 188
Figure 103: Evolution des teneurs en orthoxylène sorties de l'enceinte (ng/min) au cours des 2 expositions (présence ou en absence de *Tortula ruralis*) - Cadre bleu : différence de quantité de orthoxylène (µg) entre les 2 expositions 188
Figure 104: Etat d'hydratation chez Tortula ruralis avant puis après exposition à différentes concentrations de benzène pendant 24 heures (Test t de Student pour échantillons appariés, n=4)(différence significative p<0,05 : *).....191
Figure 105: Concentrations en protéines totales chez *Tortula ruralis* avant puis après exposition à différentes concentrations de benzène pendant 24 heures (Test t de Student pour échantillons appariés, n=4).....192
Figure 106: Activité de l'APOX chez *Tortula ruralis* avant puis après exposition à différentes concentrations de benzène pendant 24 heures (Test t de Wilcoxon pour échantillons appariés, n=4.....193
Figure 107: Activité de la GPOX chez *Tortula ruralis* avant puis après exposition à différentes concentrations de benzène pendant 24 heures (Test de Student pour échantillons appariés, n=4 ; différence significative * :

p<0,05).....193
Figure 108: Concentrations en MDA chez *Tortula ruralis* avant puis après exposition à différentes concentrations de benzène pendant 24 heures (Test de Wilcoxon pour échantillons appariés, n=4).....194
Figure 109: Concentrations en chlorophylle totale chez *Tortula ruralis* avant puis après exposition à différentes concentrations de benzène pendant 24 heures (Test de Wilcoxon pour échantillons appariés, n=4).....195
Figure 110: Concentrations en chlorophylle a chez *Tortula ruralis* avant puis après exposition à différentes concentrations de benzène pendant 24 heures (Test de Wilcoxon pour échantillons appariés, n=4).....195
Figure 111: Concentrations en chlorophylle b chez *Tortula ruralis* avant puis après exposition à différentes concentrations de benzène pendant 24 heures (Test t de Student pour échantillons appariés, n=4).....195
Figure 112: Indice de phéophytinisation chez *Tortula ruralis* avant puis après exposition à différentes concentrations de benzène pendant 24 heures (Test t de Student pour échantillons appariés, n=4).....195
Figure 113: Etat d'hydratation chez *Tortula ruralis* avant et après exposition à 200 ppm de benzène pendant différentes durées (Test de Wilcoxon pour échantillons appariés, n=5).....197
Figure 114: Concentrations en protéines totales chez *Tortula ruralis* avant et après exposition à 200 ppm de benzène pendant différentes durées (Test de Wilcoxon pour échantillons appariés, n=5).....198
Figure 115: Activité de l'APOX chez *Tortula ruralis* avant et après exposition à 200 ppm de benzène pendant différentes durées (Test t de Student pour échantillons appariés, n=5).....199
Figure 116: Activité de la GPOX chez *Tortula ruralis* avant et après exposition à 200 ppm de benzène pendant différentes durées (Test t de Student pour échantillons appariés, n=5).....199
Figure 117: Variation de l'activité de l'APOX chez *Tortula ruralis* après exposition (activité finale - activité initiale) à 200 ppm de benzène pendant différentes durées (Test t de Student pour échantillons appariés, n=5) 200
Figure 118: Variation de l'activité de la GPOX chez *Tortula ruralis* après exposition (activité finale - activité initiale) à 200 ppm de benzène pendant différentes durées (Test t de Student pour échantillons appariés, n=5) 200
Figure 119: Concentrations en MDA chez *Tortula ruralis* avant et après exposition à 200 ppm de benzène pendant différentes durées (Test de Wilcoxon pour échantillons appariés, n=5).....201
Figure 120: Concentrations en chlorophylle a chez *Tortula ruralis* avant et après exposition à 200 ppm de benzène pendant différentes durées (Test de Wilcoxon pour échantillons appariés, n=5).....202
Figure 121: Concentrations en chlorophylle b chez *Tortula ruralis* avant et après exposition à 200 ppm de benzène pendant différentes durées (Test de Wilcoxon pour échantillons appariés, n=5).....202
Figure 122: Concentrations en chlorophylle totale chez *Tortula ruralis* avant et après exposition à 200 ppm de benzène pendant différentes durées (Test de Wilcoxon pour échantillons appariés, n=5).....202
Figure 123: Indice de phéophytinisation chez *Tortula ruralis* avant et après exposition à 200 ppm de benzène

pendant différentes durées (Test de Wilcoxon pour échantillons appariés, n=5).....202
Figure 124: Etat d'hydratation chez *Tortula ruralis* avant et après exposition à 200 ppm de benzène pendant 24 heures, puis 2, 4 et 8 heures à l'issue de l'exposition (Test de Wilcoxon pour échantillons appariés, n=5) 204
Figure 125: Activité de l'APOX chez *Tortula ruralis* avant et après exposition à 200 ppm de benzène pendant 24 heures, puis 2, 4 et 8 heures à l'issue de l'exposition (Test de Wilcoxon pour échantillons appariés, n=5) 205
Figure 126: Concentrations en protéines totales chez *Tortula ruralis* avant et après exposition à 200 ppm de benzène pendant 24 heures, puis 2, 4 et 8 heures à l'issue de l'exposition (Test t de Student pour échantillons appariés, n=5).....205
Figure 127: Activité de la GPOX chez *Tortula ruralis* avant et après exposition à 200 ppm de benzène pendant 24 heures, puis 2, 4 et 8 heures à l'issue de l'exposition (Test t de Student pour échantillons appariés, n=5)205
Figure 128: Concentrations en MDA chez *Tortula ruralis* avant et après exposition à 200 ppm de benzène pendant 24 heures, puis 2, 4 et 8 heures à l'issue de l'exposition (Test de Wilcoxon pour échantillons appariés, n=5) 206
Figure 129: Concentrations en chlorophylle a chez *Tortula ruralis* avant et après exposition à 200 ppm de benzène pendant 24 heures, puis 2, 4 et 8 heures à l'issue de l'exposition (Test de Wilcoxon pour échantillons appariés, n=5).....207
Figure 130: Concentrations en chlorophylle b chez *Tortula ruralis* avant et après exposition à 200 ppm de benzène pendant 24 heures, puis 2, 4 et 8 heures à l'issue de l'exposition (Test de Wilcoxon pour échantillons appariés, n=5).....207
Figure 131: Concentrations en chlorophylle totale chez *Tortula ruralis* avant et après exposition à 200 ppm de benzène pendant 24 heures, puis 2, 4 et 8 heures à l'issue de l'exposition (Test de Wilcoxon pour échantillons appariés, n=5).....207
Figure 132: Indice de phéophytinisation chez *Tortula ruralis* avant et après exposition à 200 ppm de benzène pendant 24 heures, puis 2, 4 et 8 heures à l'issue de l'exposition (Test de Wilcoxon pour échantillons appariés, n=5).....208
Figure 133: Etat d'hydratation chez *Tortula ruralis* avant et après l'exposition durant 2 semaines sur 3 sites du littoral dunkerquois (22 : site industriel; 23 : site urbain; 24 : site périurbain - Test t de Student pour échanitllons appariés, n=5).....209
Figure 134: Concentrations en protéines totales chez *Tortula ruralis* avant et après l'exposition durant 2 semaines sur 3 sites du littoral dunkerquois (Ind : site industriel; Urb : site urbain; Péri-Urb : site périurbain - Test de Wilcoxon pour échantillons appariés, n=5).....210
Figure 135: Activité de l'APOX chez *Tortula ruralis* avant et après exposition durant 2 semaines sur 3 sites de

littoral dunkerquois (Ind : site industriel; Urb : site urbain; Péri-Ur : site péri-urbain - Test de Wilcoxon pour échantillons appariés, n=5; différence significative * : p<0,05).....210
Figure 136: Activité de la GPOX chez *Tortula ruralis* avant et après exposition durant 2 semaines sur 3 sites du littoral dunkerquois (Ind : site industriel; Urb : site urbain; Péri-Urb : site péri-urbain – test t de Student pour échantillons appariés, n=5 ; différence significative * : p<0,05).....210
Figure 137: Concentrations en MDA chez *Tortula ruralis* avant et après l'exposition durant 2 semaines sur 3 sites du littoral dunkerquois (Ind : site industriel; Urb : site urbain; Péri-Urb : site périurbain - Test de Wilcoxon pour échantillons appariés, n=5).....211
Figure 138: Concentrations en chlorophylle a chez *Tortula ruralis* avant et après l'exposition durant 2 semaines sur 3 sites du littoral dunkerquois (Ind : site industriel; Urb : site urbain; Péri-Urb : site périurbain - Test t de Student pour échantillons appariés, n=5).....212
Figure 139: Concentrations en chlorophylle b chez *Tortula ruralis* avant et après exposition durant 2 semaines sur 3 sites du littoral dunkerquois (Ind : site industriel; Urb : site urbain; Péri-Urb : site péri-urbain – Test t de Student pour échantillons appariés, n=5; différence significative ** : p<0,01)).....212
Figure 140: Concentrations en chlorophylle totale chez *Tortula ruralis* avant et après exposition durant 2 semaines sur 3 sites du littoral dunkerquois (Ind : site industriel; Urb : site urbain; Péri-Urb : site péri-urbain - Test t de Student pour échantillons appariés, n=5).....212
Figure 141: Indice de phéophytinisation chez *Tortula ruralis* avant et après exposition durant 2 semaines sur 3 sites du littoral dunkerquois (Ind : site industriel; Urb : site urbain; Péri-Urb : site péri-urbain - test t de Student pour échantillons appariés, n=5).....212
Figure 142: Comparaison des variations des biomarqueurs de stress oxydant au cours des différentes expériences (la barre rouge sépare les variations induites par des facteurs naturelles (eau, âge) de celles induites par des expositions en milieu contaminé).....222

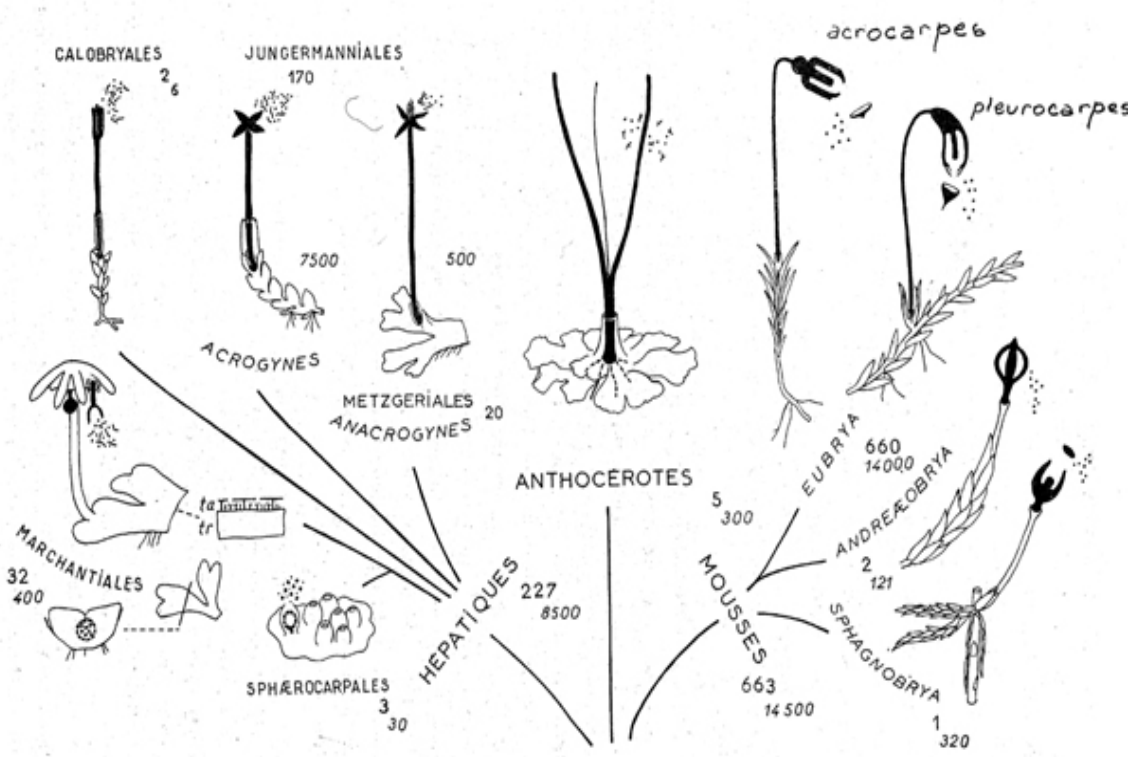
XII. Tables des tableaux

Tableau 1: Axes de recherche du Groupement d'Intérêt Scientifique de l'Institut de Recherche en Environnement Industriel....13
Tableau 2: Toxicité des composés organiques volatils majeurs : benzène, toluène, ethylbenzène, xylènes et styrène (d'après fiches toxicologiques de l'INERIS consulté en mars 2007)....23
Tableau 3: L'eau chez les bryophytes (d'après Barkman, 1958)....36
Tableau 4: Etat des lieux des études d'accumulation de composés organiques chez les bryophytes....42
Tableau 5: Localisation et mécanismes de production des espèces réactives de l'oxygène dans les cellules végétales (Bidar, 2007)....49
Tableau 6: Localisation et action des composés antioxydants dans les cellules végéatales (Bidar, 2007)....58
Tableau 7: Utilisation des biomarqueurs du stress oxydant chez les bryophytes 70
Tableau 8: Température, humidité relative et roses des vents sur l'agglomération dunkerquoise au cours du mois d'octobre 2008 (source Atmo Nord Pas-de-Calais consulté en décembre 2008)....82
Tableau 9: Conditions analytiques du GC/MS-FID pour l'analyse des cartouches Radiello® (Roukos, 2007 non publié) 86
Tableau 10: Equivalences des fortes concentrations d'exposition de benzène....108
Tableau 11: Equivalences des faibles concentrations d'exposition en conditions contrôlées....113
Tableau 12: Conversions des faibles concentrations d'exposition aux BTEX pour l'étude de l'adsorption et de la désorption chez *Tortula ruralis*....117
Tableau 13: Gamme des concentrations-étalon de serum albumine bovin....123
Tableau 14: Gamme des concentrations-étalon de malondialdéhyde....124
Tableau 15: Synthèse des équations établies pour le calcul des concentrations en chlorophylles....126
Tableau 16: Gamme d'étalonnage de la chlorophylle a 128
Tableau 17: Liste des COV discriminant les 2 types de site d'exposition (A : site industriel; B : site urbain; > supériorité de la présence d'un composé sur un site)....139
Tableau 18: Concentrations moyennes, minimales et maximales en BTEX sur les 2 sites d'exposition (industriel-A et urbain-B)....140
Tableau 19: Concentrations atmosphériques moyennes, maximales et minimales en BTEX pour l'ensemble des sites d'étude....142
Tableau 20: Concentrations ($\mu g.m^{-3}$) en BTEX sur les 24 sites et au cours des 2 semaines de l'étude 143
Tableau 21: Concentrations moyennes ($\mu g.m^{-3}$) en dioxyde de soufre, monoxyde d'azote, dioxyde d'azote, ozone et PM10 pour les villes localisées dans la zone d'étude, au cours des 2 semaines (Source Atmo Nord Pas-de-Calais consulté en décembre 2008)....146
Tableau 22: Corrélation entre l'état d'hydratation et l'expression des biomarqueurs de stress chez *Tortula ruralis* (Corrélation de Spearman, n=72; coefficient de corrélation en rouge : significatif à $p<0,05$)....156
Tableau 23: Corrélation des teneurs en BTEX et des biomarqueurs chez *Ceratodon purpureus* avec les paramètres environnementaux (concentrations atmosphériques en BTEX, particules et dioxyde de soufre; paramètres

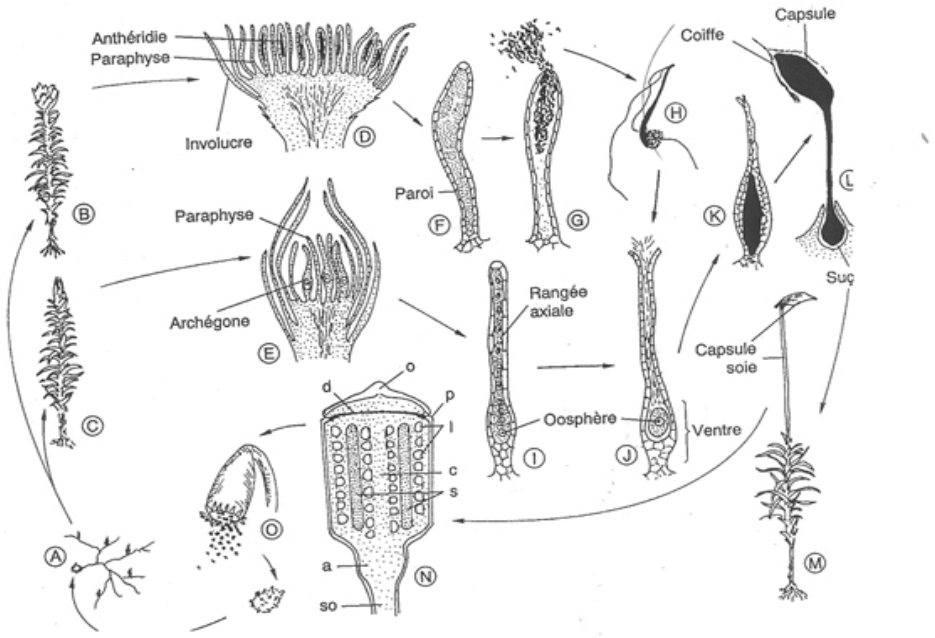
météorologiques) des 2 sites d'exposition (industriel et urbain) au cours des 8 semaines d'exposition (Corrélation de Spearman, n=40 ; en rouge corrélation significative p<0,05).....173
Tableau 24: Corrélation des teneurs en BTEX et des biomarqueurs chez *Pseudoscleropodium purum* avec les paramètres environnementaux (concentrations atmosphériques en BTEX, particules et dioxyde de soufre; paramètres météorologiques) des 2 sites d'exposition (industriel et urbain) au cours des 8 semaines d'exposition (Corrélation de Spearman, n=40 ; en rouge corrélation significative p<0,05).....174
Tableau 25: Corrélation des teneurs en BTEX et des biomarqueurs chez *Tortula ruralis* avec les paramètres environnementaux (concentrations atmosphériques en BTEX, particules et dioxyde de soufre; paramètres météorologiques) des 2 sites d'exposition (industriel et urbain) au cours des 8 semaines d'exposition (Corrélation de Spearman, n=40 ; en rouge corrélation significative p<0,05).....175
Tableau 26: Corrélation des quantités de benzène accumulées chez *Tortula ruralis* avec les concentrations d'exposition en benzène, lors des 3 expositions en conditions contrôlées (Corrélation de Pearson, n=16; n=48).....181
Tableau 27: Corrélations entre les biomarqueurs de stress oxydant et les concentrations de benzène et l'état d'hydratation chez *Tortula ruralis* exposé à différentes concentrations de benzène (0,20, 200 et 2000 ppm). (corrélation de Spearman, n=96 ; en rouge, les coefficients de corrélation significatifs à p<0,05).....216
Tableau 28: Corrélation entre les biomarqueurs de stress oxydant et les concentrations de benzène et l'état d'hydratation chez *Tortula ruralis* lors d'expositions pendant différentes durées à 200 ppm benzène (Corrélation de Spearman, n=70 ; en rouge les coefficients de corrélation significatifs à p<0,05) 217
Tableau 29: Corrélation entre les biomarqueurs de stress oxydant et les concentrations de benzène et l'état d'hydratation chez *Tortula ruralis* lors d'une exposition de 20 heures à 200 ppm de benzène, suivi pendant 2, 4 et 8 heures après l'arrêt de l'exposition (Corrélation de Spearman, n=25 ; en rouge les coefficients de corrélation significatifs à p<0,05) 217
Tableau 30: Corrélation entre les biomarqueurs de stress oxydant chez *Tortula ruralis* et les concentrations atmosphériques en BTEX, dioxyde de soufre, monoxyde et dioxyde d'azote, ozone et particules PM_{10} (Corrélation de Spearman, n=30 ; en rouge les coefficients de corrélation significatifs à p<0,05) 218
Tableau 31: Corrélation entre l'expression des biomarqueurs de stress oxydant chez *Tortula ruralis* et les paramètres météorologiques (Corrélation de Spearman, n=30 ; en rouge les coefficients de corrélation significatif à p<0,05).....219
Tableau 32: Corrélation entre les concentrations atmosphériques en BTEX et les paramètres météorologiques (Corrélation de Spearman, n=30 ; en rouge les coefficients de corrélation significatif à p<0,05).....219

ANNEXES

XIII. Annexes



Annexe 1: Les grands groupes de Bryophytes (les chiffres indiquent le nombre de genres et d'espèces dans chaque catégorie - source : http://web.ujf-grenoble.fr)



Annexe 2: Cycle de développement du Polytric (http://web.ujf-grenoble.fr)

Chez les bryophytes, le cycle est fondamentalement ***haplo-diplophasique à haplophase dominante***. Il est très nettement ***hétéromorphe*** et le sporophyte ou ***sporogone*** (diploïde), ***vit aux dépens du gamétophyte feuillé***.

Un exemple classique est le cycle du Polytric. (*Polytrichum juniperinum*)

A. ***Protonéma*** en développement

B. & C. Gamétophytes haploïde mâle et femelle sur des pieds séparés, l'espèce est donc ***dioïque***.

D. F G & H. Corbeille à gamétanges mâles ou ***anthéridies*** entourées de filaments stériles les ***paraphyses***.(D), anthéridie (F), déhiscence de l'anthéridie(G) et libération des *spermatozoïdes* (H).

E, I & J. Gamétanges femelles ou ***archégones*** à l'extrémité des rameaux entourés de paraphyses. Archégone en développement (I), puis mature (J) lors de la dégénérescence des cellules de la rangée axiale ce qui libère le col de l'archégone et donc l'accès de l'***oosphère*** pour les spermatozoïdes.

K. Après la fécondation par ***oogamie*** (zoïdogamie), l'***embryon*** se développe dans l'archégone ***aux dépens du gamétophyte***.

L. L'embryon se développe en ***sporogone*** ou sporophyte qui reste fixé au gamétophyte.

M. le sporogone est formé d'une ***capsule*** et d'une soie. Il est relié au gamétophyte par un suçoir ou placenta. La coiffe qui recouvre la jeune capsule est d'origine gamétophytique, c'est le reste de l'archégone.

N. la soie (so) rejoint la capsule au niveau de l'apophyse (a). Dans la capsule on distingue le tissu sporifère (s) qui par méiose donne des ***spores***, haploïdes, entourées de lacunes aérifères (l). Au centre de la capsule se trouve une ***columelle*** (c). La partie apicale de la capsule comprend un opercule (o), un diaphragme membraneux (d) et un péristome formé de dents (p).

O. à maturité l'opercule et le diaphragme tombent, les dents du péristome s'écartent si l'hygrométrie de l'air est suffisante, et libèrent les spores. Ces spores sont des formes de résistance entourées d'une molécule d'origine lipidique la sporopollénine. Quand les conditions sont favorables la spore germe et donne un ***protonéma*** (A).

VALORISATION

XIV. Valorisation

Publications internationales

- **FABURÉ J.,** PLAISANCE H., CAZIER F., DELBENDE A., CUNY D., VAN HALUWYN C. 2009. Potential use of mosses for monitoring atmospheric BTEX. International journal of health and environment. *Submitted*.

- **FABURÉ J.**, C. MEYER, F. DENAYER, A. GAUDRY, D. GILBERT, N. BERNARD. 2009. Atmospheric trace element deposition at three differently polluted sites (industrial, urban and rural): a comparison of accumulation capacity between an acrocarpous and a pleurocarpous moss. Water, Air and Soil Pollution. *Accepted*.

- MEYER C., GILBERT D., GAUDRY A., FRANCHI M., N'GUYEN H., **FABURÉ J.**, BERNARD N. 2009. Relationship of Atmospheric Pollution characterized by gas (NO_2) and particles (PM_{10}) to Microbial Communities Living in Bryophytes at Three Differently Polluted Sites (Rural, Urban and Industrial). Microbial Ecology. *in press*. DOI 10.1007/s00248-009-9580-2.

- **FABURÉ J.**, DENAYER F.-O., VAN HALUWYN C., GAUDRY A., N. BERNARD. 2006. Biomarkers of oxidative stress induced by airborne matter and associated heavy metals in two bryophyte species: a new wy for environmental risk assessment. In: Air pollution and environmental health – From science to action: the challenge of particulate matter. Proceeding APPA Editions. 1-8.

Communications orales en congrès internationaux

- **FABURÉ J.**, PLAISANCE H., CAZIER F., DELBENDE A., CUNY D., VAN HALUWYN C. 2009. Biomonitoring of atmospheric volatile organic compounds in moss: review and news. 5th International Workshop on Biomonitoring of Atmospheric Pollution. 20-24 september, Buenos Aires, Argentine.

- **FABURÉ J.,**'GARÇON G., DENAYER F.-O., SHIRALI P., DERAM A., CUNY D., GAUDRY A., VAN HALUWYN C., BERNARD N. 2006. Biomarkers of oxidative stress induced by airborne matter and associated heavy metals in two bryophyte species. 4th International Workshop on Biomonitoring of Atmospheric Pollution (with emphasis on trace elements). 17-21 september, Agios Nikalaos, Crête.

- **FABURÉ J.**, DENAYER F.-O., VAN HALUWYN C., GAUDRY A., BERNARD N. 2006. Biomarkers of oxidative stress induced by airborne matter and associated heavy metals in two bryophytes species: a new way for environmental risk assessment. 15th IUAPPA regional conference – 17th EFCA speciality conference. « Air pollution and environmental health, from science to action : the challenge of particulate matter ». 5-8 september, Lille, France.

Étude de l'accumulation et des effets des composés organiques volatils (BTEX) chez les bryophytes

Les conséquences sanitaires et environnementales de la pollution atmosphérique sont devenues au cours des dernières décennies un des problèmes majeurs de notre société. Sensibilisée à cette problématique, la région Nord Pas-de-Calais a été l'une des premières régions à soutenir et à valoriser la biosurveillance végétale de la qualité de l'air. Les travaux scientifiques réalisés dans le cadre de cette thèse ont pour objectif d'étudier les phénomènes d'accumulation et les impacts des composés organiques volatils (COV) chez les bryophytes.

Articulées autour de deux axes, les recherches menées visaient à étudier, d'une part, l'accumulation des benzène, toluène, ethylbenzène et xylènes (BTEX), d'autre part, des effets au niveau cellulaire, du benzène chez *Tortula ruralis*, par l'analyse des variations de l'expression de biomarqueurs de stress oxydant.

Des expérimentations complémentaires *in situ* , sur le littoral dunkerquois, et en conditions contrôlées ont permis d'établir des phénomènes d'équilibre des concentrations en BTEX entre notre modèle végétal et l'air. *In situ*, les teneurs en BTEX chez les mousses sont fortement conditionnées par les paramètres météorologiques, et principalement la force des vents.De plus, les concentrations atmosphériques en particules PM_{10} favoriseraient l'accumulation des BTEX chez la mousse. Mais d'une manière générale, les mousses n'accumulent pas les BTEX de façon corrélée aux teneurs dans l'atmosphère.

Concernant l'expression des biomarqueurs de stress oxydant, des variations naturelles des paramètres biologiques mesurés sont observées chez la mousse. Ces variations seraient liées à la nature poïkilohydrique des mousses, leur capacité de reviviscence et aux aptitudes qu'elles ont développées pour résister aux variations de leur état d'hydratation. Ainsi, les biomarqueurs de stress oxydant souvent recherchés dans les études d'écotoxicologie, ne seraient pas adaptés pour l'étude des effets chez les bryophytes terrestres.

Mots clés : Bryophytes – BTEX – Accumulation – Stress oxydant

---

Study of the accumulation and the effects of volatile organic compounds (BTEX) in bryophytes

During the last decades, the atmospheric pollution becameone of the major environmental and health problems of our society. Because of its historic context, the region Nord Pas-de-Calais was one of the first regions to support and to value the vegetable biomonitoring of the air quality. The aim of this thesis is to study the phenomenon of accumulation and the impacts of volatile organic compounds (VOCs) in bryophytes.

These researches are built up around two axis: in the one hand, the accumulation of the benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes (BTEX); on the other hand, the intra-cellular effects on benzene in *Tortula ruralis*, analysing the variations of the expression of biomarkers of oxidative stress .

Experimentations both in controlled conditions and *in situ*, led on the littoral of Dunkirk, allowed to establish phenomenon of balance of the concentrations in BTEX between our plant model and the air. *In situ*, the contents of BTEX in mosses are strongly influenced by the meteorological factors, and mainly the strength of winds. Furthermore, the atmospheric concentrations in PM10 particles would facilitate the accumulation of the BTEX in moss. Nevertheless, BTEX contents in moss are generally not correlated with the atmospheric concentrations.

About the biomarkers of the oxidative stress, some variations of their expression are observed in mosses because of natural biological parameter. These variations would be due to the poïkilohydric characteristic of the mosses and their capacity to resist to the variations of their state of hydration. So, the biomarkers of oxidative stress which are often measured in the ecotoxicological studies, would not be adapted for the study of the effects in the terrestrial bryophytes.

Key words: Bryophytes – BTEX – Accumulation – Oxidative stress