



AVERTISSEMENT

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

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

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

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

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

UNIVERSITE DE METZ

THESE

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE METZ

Spécialité « Toxicologie de l'Environnement »

Présentée et soutenue publiquement
le 28 janvier 2000

par

FRANCK-OLIVIER DENAYER

**ÉCOTOXICITE DES ELEMENTS TRACES METALLIQUES
CHEZ LES BRYOPHYTES**

Mise au point d'un bryocapteur des retombées atmosphériques
à l'aide de *Ceratodon purpureus* (Hedw.) Brid.

Directeurs de thèse :

Professeur C. VAN HALUWYN
Maître de Conférences B. CARON

Composition du jury :

M. J.-M. Haguenoer, Professeur,
M. R. Schumacker, Professeur,

Université de Lille 2
Université de Liège

Rapporteur
Rapporteur

Mme A. Delelis, Professeur,
M. J.-F. F
M. P. Shi
Mme C. V
Mlle B. C

Université de Lille 2
de Metz
du Littoral
de Lille 2
de Lille 2

BIBLIOTHEQUE UNIVERSITAIRE DE METZ



022 421640 7

BIBLIOTHEQUE UNIVERSITAIRE - METZ	
N° inv.	2000155S
Cote	S/MZ 09/51
Loc	magasin

UNIVERSITE DE METZ

THESE

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE METZ

Spécialité « Toxicologie de l'Environnement »

Présentée et soutenue publiquement

le 28 janvier 2000

par

FRANCK-OLIVIER DENAYER

ÉCOTOXICITE DES ELEMENTS TRACES METALLIQUES

CHEZ LES BRYOPHYTES

Mise au point d'un bryocapteur des retombées atmosphériques
à l'aide de *Ceratodon purpureus* (Hedw.) Brid.

Directeurs de thèse :

Professeur C. VAN HALUWYN
Maître de Conférences B. CARON

Composition du jury :

M. J.-M. Haguenoer, Professeur,	Université de Lille 2	Rapporteur
M. R. Schumacker, Professeur,	Université de Liège	Rapporteur
Mme A. Delelis, Professeur,	Université de Lille 2	
M. J.-F. Ferard, Professeur,	Université de Metz	
M. P. Shirali, Maître de Conférences,	Université du Littoral	
Mme C. Van Haluwyn, Professeur,	Université de Lille 2	
Mlle B. Caron, Maître de Conférences,	Université de Lille 2	

Savoir que l'on sait ce que l'on sait, et savoir que l'on ne sait pas ce que l'on ne sait pas : voilà la véritable science.

Confucius

孔子

Ne regarde pas avec tes yeux, n'écoute pas avec tes oreilles, ne pense plus avec ton cœur. Unis le corps et l'esprit, adopte un état désintéressé, suis la nature et laisse-la être ton guide.

Tchouang Tseu

庄子

Je dédie cette thèse à :

Alexandra,

*mes parents, qu'ils trouvent ici l'aboutissement d'un travail
auquel ils ont grandement participé. Merci pour toutes ces
années d'encouragement et de soutien,*

ma sœur,

ma famille.

Je tiens à exprimer mes remerciements les plus sincères à :

Mme Chantal VAN HALUWYN

De simples mots ne suffisent pas pour exprimer ma profonde reconnaissance, mon respect et mon amitié. Ta bienveillance à mon égard, ton soutien et la confiance, que tu m'as accordés durant toutes ces années, resteront inoubliables pour moi.

Mlle Brigitte CARON

Je t'adresse tous mes remerciements pour m'avoir aidé dans ce travail et d'avoir accepté de juger cette étude.

Mme Annick DELELIS

Je vous adresse toute ma gratitude pour m'avoir accueilli au sein de votre laboratoire, m'avoir donné votre confiance, ainsi que pour avoir bien voulu juger ce travail.

Monsieur Jean-François FERARD

Je vous suis reconnaissant d'avoir suivi l'évolution de mes recherches et d'avoir accepté de juger ce travail.

Monsieur Jean-Marie HAGUENOER

Veillez recevoir toute ma gratitude pour m'avoir ouvert les portes de votre laboratoire, donné de précieux conseils et m'avoir fait l'immense honneur d'être le rapporteur de ce travail.

Monsieur René SCHUMACKER

Je tiens à t'exprimer ma plus profonde reconnaissance pour m'avoir fait découvrir la bryologie, m'avoir apporté de précieux conseils et de m'avoir fait l'immense honneur d'être le rapporteur de ce travail.

Monsieur Pirouz SHIRALI

Je t'adresse toute ma gratitude pour m'avoir aidé dans ce travail, apporté de précieux conseils et d'avoir bien voulu juger ce travail.

Je tiens à remercier plus particulièrement pour l'aide précieuse qu'ils m'ont apportée :
Inès Devred, Damien Cuny, Florence Languereau et Sophie Kints.

Je remercie M. Philippe Derouet (Entreprise Metaleurop), M. Michel Chiaffredo et M. Claude Figureau (Société Bryotec), sans qui une partie de ce travail n'aurait pu être réalisée.

Merci à toute l'équipe du laboratoire de botanique pour tous les bons moments passés et l'ambiance agréable qui y règne.

Je tiens également à associer à ce travail :

R. Courtecuisse, B. de Foucault, M. Leterme du Laboratoire de Botanique de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Lille ;

J. Champion, G. Garçon, M.H. Hannautiaux, L. Jérôme, S. Crépin, du Laboratoire de Toxicologie Professionnelle, de l'Institut de Médecine du Travail ;

P. Colein, du Laboratoire de Toxicologie de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Lille ;

F. Zerimech, A. Martin, le personnel du Laboratoire de Biochimie de l'Hôpital Huriez de Lille ;

Mes amis de la Société Botanique du Nord de la France, de la Société Mycologique du Nord, de l'Association Française de Lichénologie, et de l'Association Avicenne.

Je vous remercie de m'avoir aidé et soutenu.

LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

- Denayer F.O., Van Haluwyn C., de Foucault B., Schumacker R. & Colein P., 1999. Use of bryological communities as a diagnostic tool of heavy metal soil contamination (Cd, Pb, Zn) in the northern France. *Plant ecology*, **140**, 191-201.
- Denayer F.O., Cuny D., Van Haluwyn C., de Foucault B. & Colein, P., 1999. Uses of bryophytes and lichens communities as a diagnostic tool of the heavy metal soil contamination (Cd, Pb, Zn) in the northern France. *Plant ecology* (soumis).
- Denayer F.O., 1999. Potential uses of bryophytes biomarkers: a review. *Journal of bryology*, (soumis).
- Cuny D., Denayer F.O., Van Haluwyn C., 1998. Uses of bryophytes and lichens in the evaluation of atmospheric impact of the non ferrous metal from metallurgic plants in the Nord Pas de Calais Region. *Colloque BIOMAP, International workshop on biomonitoring of atmospheric pollution*, Lisbonne (Portugal).
- Cuny D., Languereau F., Denayer F.O., Van Haluwyn C., Caron B.& Delelis A, 1997. Caractérisation *in situ* et *in vitro* de la bioaccumulation des éléments traces métalliques par deux modèles symbiotiques. L'après charbon. *Conférence mondiale sur le développement durable des anciens pays charbonniers*. Lille (France).

SOMMAIRE

Sommaire	1
Liste des abréviations	5
Introduction	6
Synthèses bibliographiques	10
I. Les sols et les métaux	11
I.1. Les différents types de métaux	11
I.2. Les différentes origines des éléments traces métalliques	15
I.3. Éléments traces métalliques et environnement	17
I.4. Les normes relatives à la qualité des sols	19
II. Généralités sur les bryophytes	21
II.1. L'appareil végétatif	21
II.2. La reproduction	23
II.3. Particularité physiologique	25
II.4. Écologie et biogéographie des bryophytes	27
II.4.1. L'humidité	27
II.4.2. La nature du substrat	28
II.4.3. L'éclairement	29
II.4.4. La température	29
II.4.5. Les facteurs biotiques	29
II.5. Étude communautaire des bryophytes	30
II.5.1. Milieux naturels et végétation bryophytique, approche bryosociologique	30
II.5.2. Les milieux anthropisés	31
III. Les bryophytes et les métaux	35
III.1. Sources de nutrition minérale et de contamination par les éléments traces métalliques : rôle du substrat	35
III.2. Mécanismes de piégeage et de rétention des métaux	36
III.2.1. Propriétés d'échanges ioniques au sein des cellules de bryophytes et mécanismes d'adsorption extracellulaire	36
III.2.2. Absorption intracellulaire	38
III.2.3. Toxicité et tolérance des bryophytes vis-à-vis des éléments traces métalliques	41
III.2.3.1. Atteintes morphologiques	41
III.2.3.2. Action sur la croissance	41
III.2.3.3. Désordres physiologiques	42
III.2.3.4. Action sur la biodiversité	43
III.2.4. Variations génétiques de la tolérance	45
III.2.5. Tolérance extrême	47
III.2.6. Utilisation des bryophytes en biomonitoring des dépôts d'éléments traces métalliques	49
III.2.6.1. Les bryophytes <i>in situ</i> en biomonitoring passif	51
III.2.6.2. Transplants de bryophytes vivantes : biomonitoring actif	53
III.2.6.3. Exposition d'échantillons de bryophytes standards : la technique des « moss bags »	54
IV. Les cultures de bryophytes	57
V. Impacts cellulaires des éléments traces chez les bryophytes	61
V.1. Définitions des biomarqueurs de stress	61
V.2. Généralités sur le stress oxydant et les espèces réactives de l'oxygène (ERO)	65
V.2.1 Les espèces réactives de l'oxygène (ERO)	65

V.2.2. Les principaux dommages cellulaires causés par les ERO	71
V.3. Les systèmes de défense anti-oxydants.	73
V.3.1. Les systèmes anti-oxydants enzymatiques	75
V.3.2. Les systèmes anti-oxydants non enzymatiques	79
V.4. Impacts du stress environnemental chez les bryophytes	87
V.4.1. Stress environnemental non anthropique	87
V.4.2. Stress environnemental anthropique dû aux polluants	89
V.5. Utilisation de biomarqueurs physiologiques et biochimiques en écotoxicologie	91
V.5.1. Les biomarqueurs physiologiques	91
V.5.2. Les biomarqueurs biochimiques	93
Matériel et Méthodes	96
I. Étude bryosociologique	97
I.1. Sites d'étude	99
I.2. Prélèvements et analyses des sols	100
I.2.1. Protocole de dosage des éléments traces, norme AFNOR X 31-151	100
I.2.2. Protocole de dosage de la matière organique (MO), norme AFNOR NF X 31-109	101
I.2.3. Détermination de la capacité d'échanges cationiques (CEC), norme AFNOR NF X 31-130	101
I.2.4. Détermination de la teneur en azote total, méthode de Kjeldahl modifiée, norme AFNOR X31-111	102
I.2.5. Détermination du pH, norme NF X 31-103	103
I.3. Relevés des bryophytes	103
I.4. Traitement des données	105
II. Étude bryolichénosociologique	107
II.1. Description des sites étudiés	107
II.1.1. Les sources d'éléments traces métalliques du secteur d'étude du Programme de Recherches Concertées (PRC)	107
II.1.2. Description des sites métallifères	107
II.1.3. Description des terrils miniers	108
II.1.4. Description du site témoin	109
II.2. Méthodologie des relevés bryolichénosociologiques	109
II.3. Détermination des caractéristiques physico-chimiques des sols	111
II.4. Traitements statistiques des résultats	111
II.4.1. Caractéristiques physico-chimiques des sols	111
II.4.2. Traitement des données floristiques	113
III. Élaboration d'un bryocapteur de retombées atmosphériques métalliques à l'aide de <i>Ceratodon purpureus</i> (Hedw.) Brid.	115
III.1. Description des sites d'étude	115
III.2. Le matériel biologique	117
III.3. Plan expérimental	121
III.3.1. Extractions et dosages des biomarqueurs de stress oxydant et des éléments traces métalliques	123
III.3.1.1. Les protéines totales et les activités enzymatiques	123
III.3.1.1.1. Réactifs utilisés	127
III.3.1.1.2. Protocole expérimental d'extraction	127
III.3.1.1.3. Dosage des protéines	127
III.3.1.1.4. Dosage de l'activité totale des SOD	127
III.3.1.2. Extraction et dosage du malondialdéhyde (MDA)	129
III.3.1.2.1. Réactifs utilisés	129
III.3.1.2.2. Extraction du MDA chez les bryophytes	129
III.3.1.3. Le GSH et le GSSG	129

III.3.1.3.1. Réactifs utilisés	131
III.3.1.3.2. Extraction du GSH et du GSSG	131
III.3.1.4. Dosages des ETM, norme AFNOR X 31-151	132
III.3.1.5. Protocole d'éluion séquentielle	132
III.3.1.6. Préparation des « moss bags »	133
III.3.1.7. Analyse statistique des résultats	133
Résultats et discussions	134
I. Impacts des éléments traces métalliques sur les communautés bryophytiques	135
I.1. Classement des sites par la bryoflore	135
I.2. Classement des sites par les variables édaphiques	135
I.3. Comparaison entre les classements bryofloristique et édaphique des sites	135
I.3.1. La valeur bioindicatrice des groupements bryologiques	141
I.3.2. Conclusion	144
II. Impacts des éléments traces métalliques sur les communautés bryolichéniques	147
II.1. Les caractéristiques physico-chimiques des sols	147
II.1.1. Les caractéristiques édaphiques	147
II.1.2. Les concentrations en éléments traces métalliques	153
II.2. Résultats des analyses statistiques sur les relevés floristiques	157
II.3. Résultats de l'ACP	159
III. Mécanismes d'accumulation et impacts cellulaires des éléments traces métalliques chez <i>Ceratodon purpureus</i> Hedw. (Brid.), implications dans le stress oxydant	163
III.1. L'exposition aux éléments traces métalliques	163
III.2. Réponses des biomarqueurs de stress oxydant	167
III.2.1. Réponses biologiques en fonction du mois d'exposition	167
III.2.2. Réponses biologiques par site	175
III.3. Traitement statistique des données	177
III.3.1. ACP exposition avril/mai 1999 (mois 1)	177
III.3.2. ACP exposition mai/juin 1999 (mois 2)	177
III.3.3. ACP exposition juin/juillet 1999 (mois 3)	182
III.3.4. ACP exposition juillet/août 1999 (mois 4)	183
III.3.5. ACP exposition août/septembre-octobre 1999 (mois 5)	183
III.4. Éluion séquentielle	185
III.5. Interprétation des résultats par analyse de régression	191
III.6. La technique du « moss bag »	193
Conclusion générale et perspectives	197
Références bibliographiques	201
Liste des illustrations	232
Annexes	238

LISTE DES ABREVIATIONS

8OHdG :	8-hydroxy- 2'-desoxyguanosine
ACP :	analyse en composantes principales
ADN :	acide désoxyribonucléique
AFCM :	analyse factorielle des correspondances multiples
AFD :	analyse factorielle discriminante
APX :	ascorbate peroxydase
AsA :	ascorbate
BCA :	acide bicinchonique
C/N :	rapport carbone sur azote
CAPS :	acide (3-cyclohexylamino-1-propanesulfonique)
CEC :	capacité d'échanges cationiques
DHA :	deshydroascorbate
DHAR :	deshydroascorbate réductase
EDTA :	acide éthylènediaminetétraacétique
ERO :	espèce réactive de l'oxygène
ETM :	élément trace métallique
FAD :	flavine adénine dinucléotide
Fd :	ferredoxine
G6PD :	glucose-6-phosphate deshydrogénase
GPx Se ind :	glutathion peroxydase sélénium indépendante
GPx :	glutathion peroxydase
GR :	glutathion réductase
GSH :	glutathion réduit (L- γ -glutamyl-L-cystéinyglycine)
GSSG :	glutathion oxydé
GST :	glutathion transférase
HAP :	hydrocarbure aromatique polycyclique
HPLC :	chromatographie liquide haute performance
ICP/MS :	plasma couplé à un système d'induction hautes fréquences / spectromètre de masse
INT :	(2-(4-iodophényl)-3-(4-nitrophénol)-5-phenyltétrazolium)
MDA :	malondialdéhyde
MDA [*] :	radical monodeshydroascorbate
MDHAR :	monodeshydroascorbate réductase
MO :	matière organique
N :	azote organique
NADH :	β -nicotinamide-adénine dinucléotide (réduit)
NADP :	β -nicotinamide-adénine dinucléotide phosphate (oxydé)
NADPH :	β -nicotinamide-adénine dinucléotide phosphate (réduit)
OSA :	octane 1-sulfonic acid sodium
PC :	phytochélatine (γ -Glu-Cys)n-Gly (n=2-11)
PLHGPx :	phospholipide hydroperoxyde glutathion peroxydase
PRC :	programme de recherches concertées
PS1 :	photosystème 1 lors de la photosynthèse
PS2 :	photosystème 2 lors de la photosynthèse
SAA :	spectrométrie d'absorption atomique
sAPX :	ascorbate peroxydase stromatique
SeGPx :	glutathion peroxydase sélénium dépendante
SOD :	superoxyde dismutase
tAPX :	ascorbate peroxydase intra-thylacoïdienne
TBA :	acide thiobarbiturique
TEP :	1,1,3,3, tétrahydroxypropane
UBF :	unité biologique fonctionnelle

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Les problèmes de pollution existent depuis des millénaires mais étaient jusqu'au début de l'ère industrielle d'importance limitée. Divers facteurs de nature socio-économique les ont aggravés. En premier lieu, l'urbanisation accélérée des pays industrialisés a eu pour corollaire une concentration incessante des industries et de l'habitat, multipliant ainsi les sources de contamination de l'environnement et les causes de nuisance. Quelques spectaculaires affaires de pollution ont fait prendre conscience de la gravité des conséquences pouvant résulter de la contamination accidentelle ou chronique de l'environnement.

Le nord de la France compte plus de 140 sites pollués, ce qui représente 15,6 % de la totalité des sols pollués déclarés, de France. Cette région est donc fortement concernée par les problèmes de pollution. La diminution des activités liées à l'exploitation minière et à l'industrie métallurgique a favorisé la mise en place, dans la Région Nord-Pas-de-Calais, d'une politique de reconversion économique, sociale et environnementale (le Développement Durable).

Le Conseil Régional Nord-Pas-de-Calais a lancé depuis 1993 un Programme de Recherches Concertées (PRC) portant sur l'étude de la pollution de l'environnement et intitulé « Environnement et activités humaines, évaluation d'un site pollué en vue de sa requalification ». Financé par le contrat de plan Etat-Région 1994-1999 et par des fonds de l'Union Européenne (FEDER), le PRC a incité, dès l'élaboration du programme, des équipes de recherches appartenant à des disciplines et des organismes variés, à travailler en relation les unes avec les autres. En effet, la multidisciplinarité et la concertation des chercheurs sont apparues nécessaires pour aborder les phénomènes nombreux et complexes qui caractérisent les systèmes environnementaux.

Le PRC comporte trois volets (Étude d'un secteur pollué par les métaux ; approche géologique, géomécanique et hydrologique ; aspects socio-économiques des interactions entre environnement et activités humaines) qui ont en commun une zone particulière de la Région Nord-Pas-de-Calais : le bassin minier. Cette zone s'étend plus particulièrement de Lens à Aubry et de Courcelles-les-Lens à Libercourt (fig. 1).

Le volet « Étude d'un secteur pollué par les métaux » a cherché à fédérer les équipes autour d'un secteur contaminé par les éléments traces métalliques (ETM, principalement cadmium, plomb et zinc) issus d'émissions industrielles provenant d'une usine située à Noyelles-Godault (Metaleurop) et d'une autre, toute proche, implantée à Aubry (Union Minière). A certains endroits, les concentrations en cadmium des sols dépassent 20 mg.kg^{-1} , celles en plomb $1\ 000 \text{ mg.kg}^{-1}$, et celles en zinc atteignent $40\ 000 \text{ mg.kg}^{-1}$ (fig. 2). Ce secteur est donc tout désigné pour étudier en grandeur réelle les nombreuses voies d'impact des éléments traces métalliques dans l'environnement. L'objectif général est de décrire les mécanismes qui régissent la dynamique des ETM et leurs interactions avec l'eau, le sol et les organismes vivants.

Au sein du PRC, le Laboratoire de Botanique et de Cryptogamie de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques (Université de Lille 2) étudie les impacts des éléments traces sur différents composants de la flore métallicole.

Trois thématiques principales ont été développées au sein du laboratoire sous la direction scientifique du Pr. C. Van Haluwyn :

- impacts des éléments traces métalliques sur la symbiose lichénique (travaux de D. Cuny) ;
- étude des mécanismes de tolérance d'*Arrhenatherum elatius* (L.) Beauv. ex J. et C. Presl (*Poaceae*) aux éléments traces métalliques (travaux de F. Languereau) ;
- écotoxicité des éléments traces métalliques chez les bryophytes.

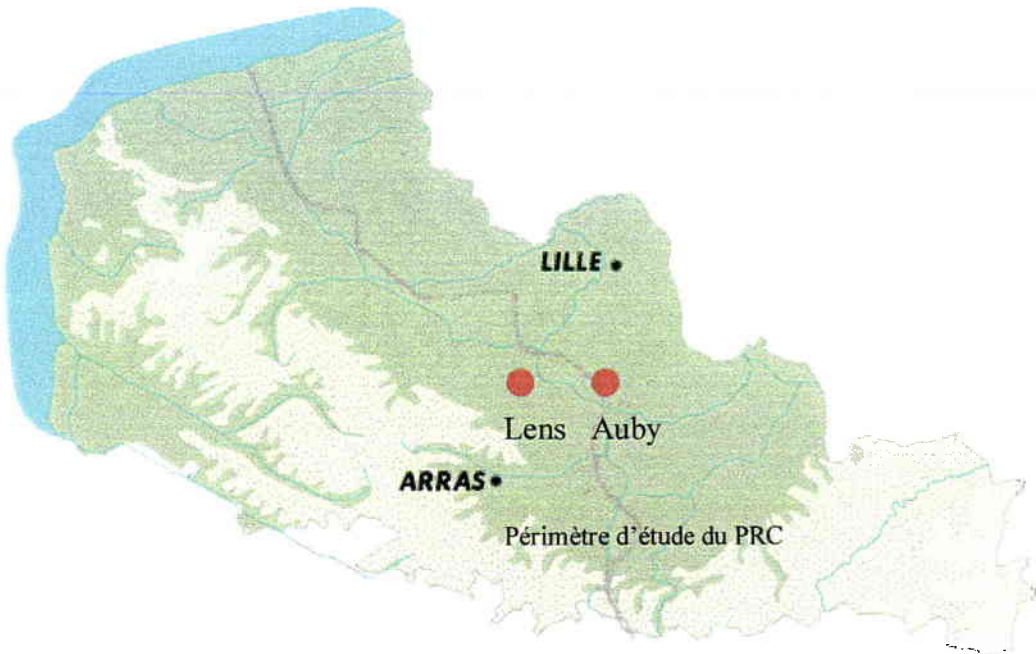


Figure 1 : Localisation du secteur d'étude du Programme de Recherches Concertées (P.R.C.).

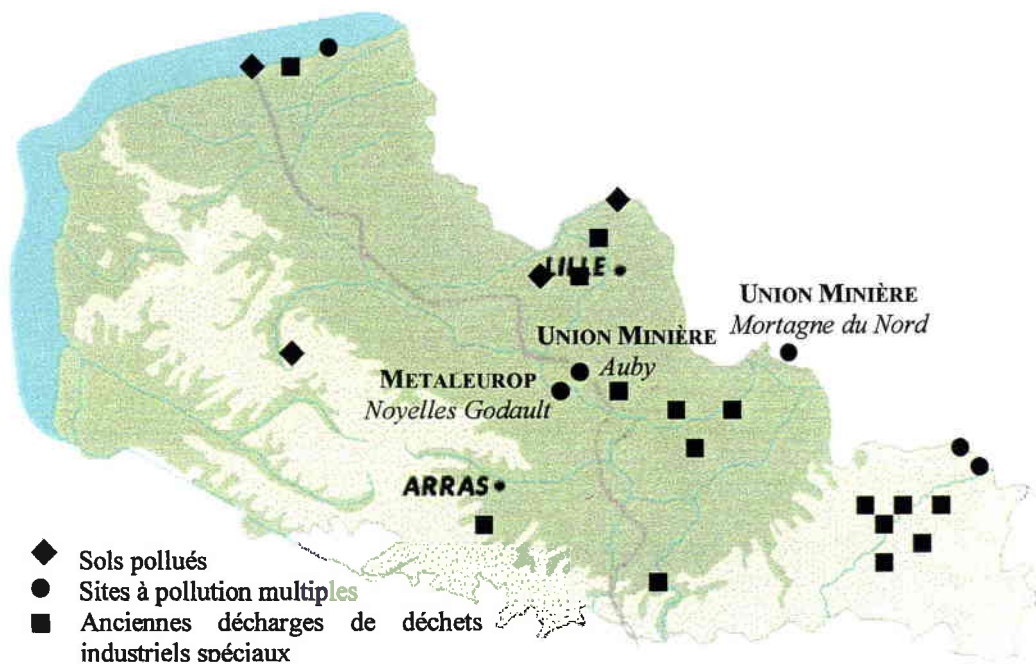


Figure 2 : Localisation des principaux sites pollués par les installations de fonderie, de sidérurgie, de métallurgie et de traitement de surface métallique dans la région Nord-Pas de Calais (d'après DRIRE, 1996).

Le but de ce travail est, grâce à une démarche pluridisciplinaire, de mieux comprendre les différents mécanismes d'impacts des éléments traces métalliques sur les bryophytes. Nous avons étudié quatre éléments présents sur la zone d'étude : le cadmium, le plomb (éléments non essentiels), le zinc (élément essentiel).

Notre démarche initiale est d'étudier les communautés bryophytiques (Denayer *et al.*, 1999), puis bryolichéniques se développant sur des sites présentant des degrés de contamination croissants. Les objectifs de cette première étape sont de mieux comprendre la structure de ces groupes de bryophytes et de lichens se développant sur de tels sites et d'élaborer un nouvel outil diagnostique de bioestimation de la qualité des sols à l'aide de ces communautés.

Suite à ces premiers résultats, notre travail s'est orienté vers un niveau d'investigation infra-individuel, en essayant de mieux appréhender l'écophysiologie d'une espèce de bryophyte, *Ceratodon purpureus* (Hedw.) Brid.¹, rencontrée au sein même de nos communautés et se comportant comme un organisme tolérant vis-à-vis de ces éléments traces métalliques. En effet, cette mousse, retrouvée sur de nombreux sites contaminés de la région Nord-Pas-de-Calais, a été choisie comme modèle d'étude pour la mise en place d'un bryocapteur des retombées atmosphériques. Elle a été mise en culture de manière standardisée par la Société Bryotec, avec laquelle nous collaborons, qui a déposé en 1998 un brevet européen, américain et japonais à ce sujet. Nous avons exposé cette mousse aux retombées atmosphériques aux alentours de Metaleurop, sur les sites des capteurs physico-chimiques de cette entreprise et avons pu ainsi évaluer les impacts physiologiques et biochimiques des éléments traces métalliques sur cette bryophyte, afin de le valider comme capteur biologique.

¹ Nomenclature selon Corley *et al.* (1981), Corley et Crundwell (1991) pour les mousses, selon Grolle (1983) pour les hépatiques et selon Purvis *et al.* (1992) pour les lichens

**SYNTHESES
BIBLIOGRAPHIQUES**

I. LES SOLS ET LES METAUX

Dans les sols naturels, la teneur en métaux dépend de la nature de la roche mère (Robert, 1996). Les roches magmatiques basiques et les roches sédimentaires pélitiques présentent des teneurs relativement élevées en métaux à l'état de traces (Merian, 1991 ; Pendias & Pendias, 1992). Ces éléments à l'état de traces sont originellement présents en association avec des éléments majeurs au sein des phases minérales primaires ; c'est ce que l'on appelle le fond géochimique.

En dehors des gisements de minerai, le plomb, le zinc, le cadmium et le cuivre devraient être trouvés à l'état de traces. La plupart d'entre eux interviennent dans les processus industriels d'extraction, de transformation et de manufacture, dans lesquels leurs propriétés sont exploitées pour de nombreux usages liés aux activités humaines, occasionnant des rejets depuis quelques décennies dans l'environnement.

Certains sels métalliques présents dans le sol, l'air et les eaux sont indispensables à la vie en faible quantité, mais peuvent devenir toxiques à de trop fortes concentrations. D'autres sels métalliques, même à de très faibles doses sont toxiques pour les êtres vivants. C'est pourquoi de nombreuses études écotoxicologiques visent à mieux comprendre les impacts de ces éléments traces métalliques dans les divers compartiments de l'environnement.

I.1. LES DIFFERENTS TYPES DE METAUX

De nombreuses études font ou ont fait référence au terme de « métaux lourds ». Ce terme regroupe une famille d'éléments assez hétérogène. Cette notion de « métaux lourds » a évolué au fil du temps. L'« Encyclopedia of Chemical Science » (1964) définissait les métaux lourds comme des éléments métalliques de densité supérieure à 4. La toxicologie des métaux de densité élevée ne cessant de se développer, de nombreux auteurs ont pris l'habitude de désigner sous le terme de « métaux lourds » tous les éléments susceptibles de présenter une certaine toxicité. Ce terme, encore fréquemment rencontré, est de nos jours à proscrire, car peu représentatif des éléments étudiés. Il est remplacé par le terme « éléments traces métalliques » ou ETM. C'est l'une des conclusions du congrès sur la biogéochimie des éléments traces qui s'est déroulé en 1995 à Paris (Prost, 1997).

Les neuf éléments majeurs d'un sol sont dans l'ordre décroissant d'importance : l'oxygène, le silicium, l'aluminium, le calcium, le sodium, le magnésium, le phosphore, le fer et le titane. Ces éléments constituent plus de 99 % de la croûte terrestre. Le reste représente les éléments traces à une concentration inférieure à 0,1 % et regroupe 68 éléments minéraux. Le tableau 1 reprend les principaux éléments traces et leurs concentrations respectives.

D'un point de vue toxicologique, tous les éléments n'ont pas les mêmes impacts sur les organismes vivants. Il existe des éléments qualifiés d'essentiels et d'autres qualifiés de non essentiels. Le Ca, Cl, K, Na, Mg, P, S sont des éléments majeurs indispensables aux fonctions biologiques des animaux et des végétaux. Aux côtés de ces macro-éléments, on retrouve les oligo-éléments, indispensables aux organismes à de très faibles concentrations : As, Co, Cr, Cu, Fe, I, Mn, Ni, Sc, Se, Si, Va, Zn.

Eléments	Concentrations dans la lithosphère (mg.kg ⁻¹)	Gamme de concentrations dans les sols (mg.kg ⁻¹)	Concentrations moyennes des sols (mg.kg ⁻¹)
d'après Fagot, 1993			
As	5	1 - 50	5
Cd	0,2	0,01 - 1,1	0,06
Cr	200	1 - 1 000	100
Hg	0,1	0,01 - 0,3	0,03
Ni	100	5 - 500	40
Pb	16	2 - 200	10
Zn	80	10 - 300	50
Cu	-	-	-

Tableau 1 : Concentrations de quelques éléments traces métalliques dans les sols « normaux » et dans la lithosphère (d'après Fagot, 1993).

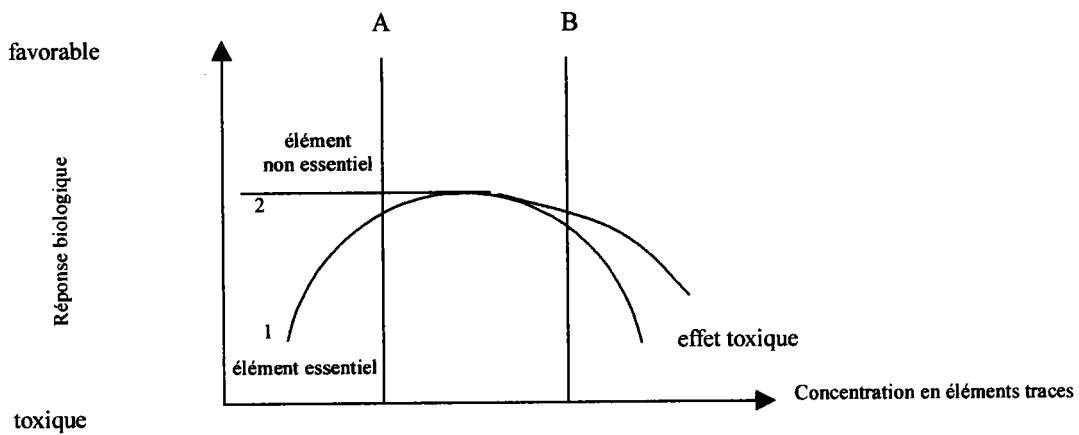


Figure 3 : Représentation schématique des relations entre la concentration en éléments traces et la réponse biologique d'un organisme vivant (d'après Spivey Fox & Tao, 1981).

H																	He														
Li	Be											B	C	N	O	F	Ne														
Na	Mg											Al	Si	P	S	Cl	Ar														
K	Ca	Sc	Ti	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Ga	Ge	As	Se	Br	Kr														
Rb	Sr	Y	Zr	Nb	Mo	Tc	Ru	Rh	Pd	Ag	Cd	In	Sn	Sb	Te	I	Xe														
Cs	Ba	La ¹	Hf	Ta	W	Re	Os	Ir	Pt	Au	Hg	Tl	Pb	Bi	Po	At	Rn														
Fr	Ra	Ac ²																													
			¹ <table border="1" style="display: inline-table; margin-left: 20px;"> <tr> <td>Ce</td><td>Pr</td><td>Nd</td><td>Pm</td><td>Sm</td><td>Eu</td><td>Gd</td><td>Tb</td><td>Dy</td><td>Ho</td><td>Er</td><td>Tm</td><td>Yb</td><td>Lu</td> </tr> </table>															Ce	Pr	Nd	Pm	Sm	Eu	Gd	Tb	Dy	Ho	Er	Tm	Yb	Lu
Ce	Pr	Nd	Pm	Sm	Eu	Gd	Tb	Dy	Ho	Er	Tm	Yb	Lu																		
			² <table border="1" style="display: inline-table; margin-left: 20px;"> <tr> <td>Th</td><td>Pa</td><td>U</td><td>Np</td><td>Pu</td><td>Am</td><td>Cm</td><td>Bk</td><td>Cf</td><td>Es</td><td>Fm</td><td>Md</td><td>No</td><td>Lr</td> </tr> </table>															Th	Pa	U	Np	Pu	Am	Cm	Bk	Cf	Es	Fm	Md	No	Lr
Th	Pa	U	Np	Pu	Am	Cm	Bk	Cf	Es	Fm	Md	No	Lr																		

Figure 4 : Classification périodique simplifiée des éléments montrant la répartition des ions métalliques et métalloïdes dans les différentes classes : classe A, classe B et éléments de transition. Le Pb et le Cu en fonction de leur état électronique appartiennent soit à la classe B soit aux éléments de transition (Pb^{2+} et Cu^{2+}). ¹ Famille du lanthane ; ² famille de l'actinium (d'après Nieboer & Richardson, 1980).

Ligands des éléments de classe A	Autres types de ligands pouvant établir des liaisons en solution aqueuse avec les éléments de la classe B	Ligands des éléments de classe B
F^- , O_2^- , OH^- , H_2O CO_3^{2-} , SO_4^{2-} , $ROSO_3^-$, NO_3^- HPO_4^{2-} , $RO-POO^-OR$ ROH , $RCOO^-$, CO , ROR	Cl^- , Br^- , N_3^- , NO_2^- SO_3^{2-} , NH_3 , N_2 , RNH_2 R_2NH , R_3N , $=N^-$, $-CO-N-R$ O_2 , O_2^- , O_2^{2-}	H^- , I^- , R^- , CN^- CO , S^{2-} , RS^- , R_2S , R_3As

Tableau 2 : Principaux ligands des éléments en fonction de leur classe. R symbolise dans la majorité des cas un radical carboné aliphatique (d'après Nieboer & Richardson, 1980).

Pays	Année	Sites suspectés	Sites contaminés
Danemark	1991	10 000	2 491
France	1994	150 000 ?	664
Allemagne (dont Allemagne de l'Est)	Nov. 1991	305 000 + 200 000	32 500
Pays-Bas	1980	4 300	360
	1986	600 000	1 600
	1990		111 000
Autriche		3 300	803
Norvège		2 452	
Grande-Bretagne	1991	100 000	
Italie			5 600
Belgique			8 300

Tableau 3 : Sites pollués recensés dans différents pays. La définition peut correspondre à des sites potentiellement ou effectivement pollués (d'après Doelman (1994) modifié par Robert, 1996).

Eléments	Air	Eau	Sol
Arsenic	18,8	41	82
Cadmium	7,6	9,4	22
Chrome	30	142	896
Cuivre	35	112	954
Mercure	3,6	4,6	8,3
Indium	0,02	-	-
Manganèse	38	262	1 670
Molybdène	3,3	11	88
Nickel	56	113	325
Plomb	332	138	796
Antimoine	3,5	18	26
Sélénium	3,8	41	41
Etain	6,4	-	-
Thallium	5,1	-	-
Vanadium	86	12	132
Zinc	132	226	1372

Tableau 4 : Emissions globales d'éléments traces dans la biosphère (air, eau et sol, en milliers de tonnes par an) (d'après McGrath, 1997).

Dans le cas d'éléments essentiels, la courbe 1 de la figure 3 comprend trois phases : la première est une phase déficiente en éléments, pendant laquelle la concentration en éléments est insuffisante pour assurer un fonctionnement normal de l'organisme ; la seconde est une phase optimale, durant laquelle la réponse biologique est indépendante de la concentration en éléments ; la troisième est une phase de diminution de la réponse biologique, durant laquelle la concentration en éléments est de plus en plus toxique.

En présence d'éléments non essentiels comme Ag, Au, Cd, Hg, Pb, Pt, Sr, la courbe 2 de la figure 3 ne comprend que deux phases : la première est une phase en plateau qui marque l'indépendance de la réponse biologique par rapport à la concentration en éléments traces ; la seconde est une phase de diminution de la réponse biologique qui met en évidence la toxicité de l'élément. Elle est directement corrélée à la forme physico-chimique de l'élément. C'est pourquoi évaluer le risque que représentent les éléments traces métalliques pour l'environnement passe par la connaissance la plus fine possible de leur état physico-chimique et de leur localisation dans la phase solide du sol. Nieboer & Richardson (1980) ont élaboré une classification des éléments traces métalliques en trois groupes (fig. 4) : groupe A, groupe B et groupe C (appelé également groupe d'éléments de transition). Cette classification est basée sur la propriété des éléments à s'adsorber sur certains ligands. Le tableau 2 résume les principaux ligands retenus par ces auteurs. Les cations du groupe A (K, Na, Mg, Ca...) forment des complexes préférentiellement avec des ligands ayant l'oxygène comme donneur d'électrons ou avec des fluorures (OH^- , CO_3^{2-} , PO_4^{3-}). Les éléments du groupe B (Pb, Hg, Ag...) se lient préférentiellement avec des ligands soufrés ou azotés. Les éléments de transition (Cd, Zn, Cu...) peuvent s'adsorber sur tous les types de ligands.

I.2. LES DIFFERENTES ORIGINES DES ELEMENTS TRACES METALLIQUES

Robert (1996) distingue deux types de contamination par les éléments traces : les pollutions diffuses et les pollutions localisées.

La contamination est diffuse lorsque la source et l'extension des contaminations ne sont pas localisables et lorsque les teneurs atteintes sont relativement faibles. Il existe une pollution diffuse de certains éléments minéraux comme le plomb ou le mercure que l'on peut retrouver dans les parties du monde les plus éloignées des sites d'émission. L'activité volcanique, les incendies de forêts, l'érosion éolienne des sols, mais également de grandes zones urbaines et/ou industrielles peuvent participer à cette pollution diffuse et des études dans les couches de glace de l'Antarctique ont été réalisées pour apprécier leur importance relative vis-à-vis des pollutions d'origine anthropique (Candelone *et al.*, 1995). Les activités agricoles, par l'utilisation de certains engrais phosphatés contenant du cadmium, des produits phytosanitaires contenant du cuivre ou l'épandage de boues de stations d'épuration participent également à la pollution diffuse des éléments traces métalliques.

Les pollutions localisées affectent essentiellement les sites d'anciennes mines et usines désaffectées appelées friches industrielles. A ces sites précis souvent fortement pollués, il faut ajouter les pollutions de proximité souvent par voie atmosphérique ou par les eaux superficielles, de sorte que l'on passera en fonction de la distance à la source, d'une pollution concentrée à une pollution diffuse avec tous les intermédiaires possibles (Robert, 1996).

C'est dans le Nord-Pas-de-Calais que l'on recense le plus de sites (15,6 %), suivie de près par la région Rhône-Alpes (12,7 %) et l'Île-de-France (12,1 %).

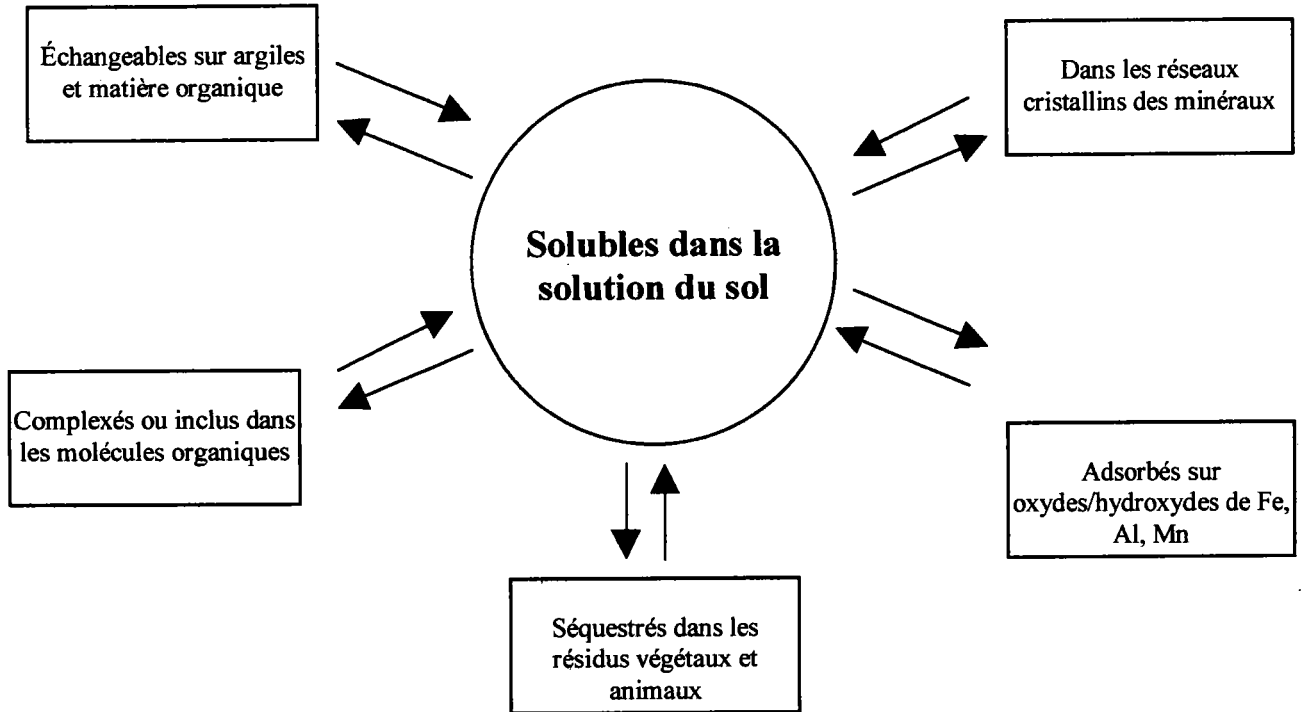


Figure 5 : Différentes formes et localisations des éléments traces dans les sols (d'après Baize, 1997).

	Cadmium	Cuivre	Plomb	Zinc
Seuil d'anomalie	2	100	100	300
Seuil d'investigation	4	200	200	600
Seuil de traitement	10	500	500	1 500
Seuil d'urgence	20	1 000	1 000	3 000

Tableau 5 : Concentrations seuils (en mg.kg⁻¹ de sol) en cadmium, cuivre, plomb et zinc fixées par la norme AFNOR NF U 44-041.

Le tableau 3 rassemble quelques chiffres concernant les sites pollués recensés dans d'autres pays. La majorité de ces sites sont contaminés par des micro-polluants organiques, mais très souvent les pollutions organiques et minérales sont associées.

I.3. ÉLÉMENTS TRACES METALLIQUES ET ENVIRONNEMENT

A partir d'une source ponctuelle, les éléments traces vont, par différents transferts successifs, passer d'un compartiment de l'environnement à un autre (tab. 4), mais il semble que le récepteur final soit le plus souvent le sol. Selon Walker *et al.* (1996), le sol est un milieu de stockage, à plus ou moins long terme, des ETM. Sterckeman *et al.* (1996) ont étudié huit fosses pédologiques à proximité du secteur du PRC et ils concluent que la pollution des sols provient essentiellement des retombées atmosphériques.

De nombreux travaux parlent de la localisation, de la mobilité et de la biodisponibilité des éléments traces dans ce compartiment. Le sol, par sa nature complexe, est un milieu extrêmement hétérogène. On peut le subdiviser en trois grandes phases : une phase solide (organique et minérale), une phase liquide (solution du sol) et une phase gazeuse (atmosphère du sol). Les éléments traces métalliques vont pouvoir se retrouver dans 6 compartiments, associés de façon diverse aux différents constituants du sol (fig. 5).

La répartition d'un élément trace dans les différents compartiments du sol ne demeure pas figée au cours du temps ; en permanence, mais avec des vitesses variables, les éléments passent d'une forme à une autre sous l'influence de facteurs externes (modification de pH, taux d'aérobiose, température, hydratation, environnement chimique, etc.).

La phase solide du sol est composée essentiellement d'argile, d'oxydes métalliques et de matière organique. Ces fractions possèdent des groupements de type : métal-OH, radical carboné-OH et radical carboné-COOH, où peuvent se fixer les éléments traces (Streit & Stumm, 1993).

En fonction de la forme de l'élément, il est possible d'évaluer sa mobilité (aptitude à passer d'un compartiment du sol à un autre) et sa biodisponibilité (aptitude à passer d'un compartiment du sol dans un organisme vivant).

Selon Alloway (1995a et b), la mobilité des éléments traces de la phase solide à la solution du sol est favorisée par cinq événements majeurs :

- l'acidification des sols : à l'exception du molybdène, la plupart des éléments traces deviennent plus mobiles en diminuant le pH ;
- la modification de l'état d'oxydation : la réduction des éléments favorise leur précipitation en mettant en solution les oxydes et les hydroxydes ;
- le changement de la concentration des complexes organiques ligands ;
- le changement de la composition ionique du sol ;
- la méthylation de certains composés : As, Hg, Sb, Se et Ti peuvent se méthyler par l'action des bactéries, des champignons du sol et des sédiments et se retrouver dans l'atmosphère puisqu'ils deviennent plus volatils ; ainsi ils peuvent s'accumuler dans les tissus riches en lipides de certains organismes.

Singh *et al.* (1995) montrent que le cadmium se fixe sur la matière organique, mais que la dégradation progressive de celle-ci conduit à une redistribution de cet élément vers

	Cd	Cr	Co	Cu	Hg	Ni	Pb	Se	Zn
France	2	150	-	100	1	50	100	10	300
Europe	3	200	-	140 *	1,5	75 *	300	-	300 *
Canada	3	750	40	150	0,8	150	375	2	600
U.K.	3	400	-	135	1	75	300	3	300
Pays Bas A	0,8	100	20	36	0,3	35	85	-	140
Pays Bas C	20	800	300	500	10	500	600	-	3000
Pays Bas N	12	380	240	190	10	210	530	-	720
Suède	0,4	30	-	40	0,3	30	40	-	75
Suisse	0,8	75	25	50	0,8	50	50	-	200

Tableau 6 : Normes de concentrations des ETM pour quelques sols européens, en mg.kg⁻¹ de matière sèche (Cd : cadmium, Cr : chrome, Co : cobalt, Cu : cuivre, Hg : mercure, Ni : nickel, Pb : plomb, Se : sélénium, Zn : zinc) (d'après IFEN, 1998).

France : norme AFNOR U 44-041 (1985) – Teneurs limites des sols récepteurs pour l'épandage de boues d'épuration – pH du sol inférieur à 6,0.

Communauté européenne : directive européenne n° 86/278 CEE (1986) – Valeurs maximales pour l'épandage de boues. Les valeurs notées « * » peuvent être augmentées de 50 % si le pH du sol est supérieur à 7.

Canada : Interim remediation criteria for agricultural land (CCME, 1991).

Grande Bretagne (UK) : exemple pour les terres labourables ayant un pH compris entre 6 et 7 (1989).

Pays Bas : valeur de référence A, risque considéré comme négligeable (1987).

Pays Bas : valeur de référence C, décontamination urgente nécessaire (1987).

Pays Bas : valeur N : proposition pour une nouvelle valeur d'intervention C (1993), risque jugé intolérable, décontamination obligatoire.

Suède : teneurs limites des sols récepteurs de boues d'épuration.

Suisse : valeurs indicatives de l'ordonnance OSOL (1987) – Mise en solution par HNO₃ 2N.

d'autres compartiments. Prudent *et al.* (1995) observent sur des colonnes de sols amendés en laboratoire qu'une partie non négligeable du plomb est présente sous forme non solubilisable, liée à la matière organique dans les premières couches de sol, et que sa migration en profondeur est très lente. Ils observent également que les molécules de matière organique ont des poids moléculaires compris entre 3 000 et 7 000 Da. Enfin, selon Sterckeman *et al.* (1996) le cadmium, le plomb et le zinc ont tendance à s'accumuler dans les horizons supérieurs (jusqu'à 0,5-0,9 m). Les galeries formées par les organismes édaphiques faciliteraient le transfert en profondeur.

I.4. LES NORMES RELATIVES A LA QUALITE DES SOLS

La seule norme française relative à la qualité des sols est la norme NF U 44-041 de 1985. Elle a pour but de fixer des règles relatives à l'épandage des boues de stations de traitement des eaux usées urbaines dans les sols à vocation agricole. Elle précise notamment les teneurs totales en éléments traces dans les boues de stations et dans les sols susceptibles de les accueillir.

En ce qui concerne les normes relatives aux sols, les teneurs à respecter, en mg.kg^{-1} de matière sèche sont présentées dans le tableau 5.

Aujourd'hui, dans les différents pays d'Europe et sur le continent nord-américain, il existe des valeurs limites indicatives ou contraignantes relatives aux ETM dans les sols (tab. 6). Elles ont souvent été définies pour limiter les épandages de boues d'épuration. Les pays scandinaves, et notamment la Suède, ont fixé des seuils très bas, c'est en grande partie à cause de l'acidité de leurs sols, issus de roches cristallines pauvres en argile, en fer et donc en ETM. Si ces seuils étaient appliqués en France, cela conduirait à interdire tout épandage de boues d'épuration dans plus de 90 % des sols.

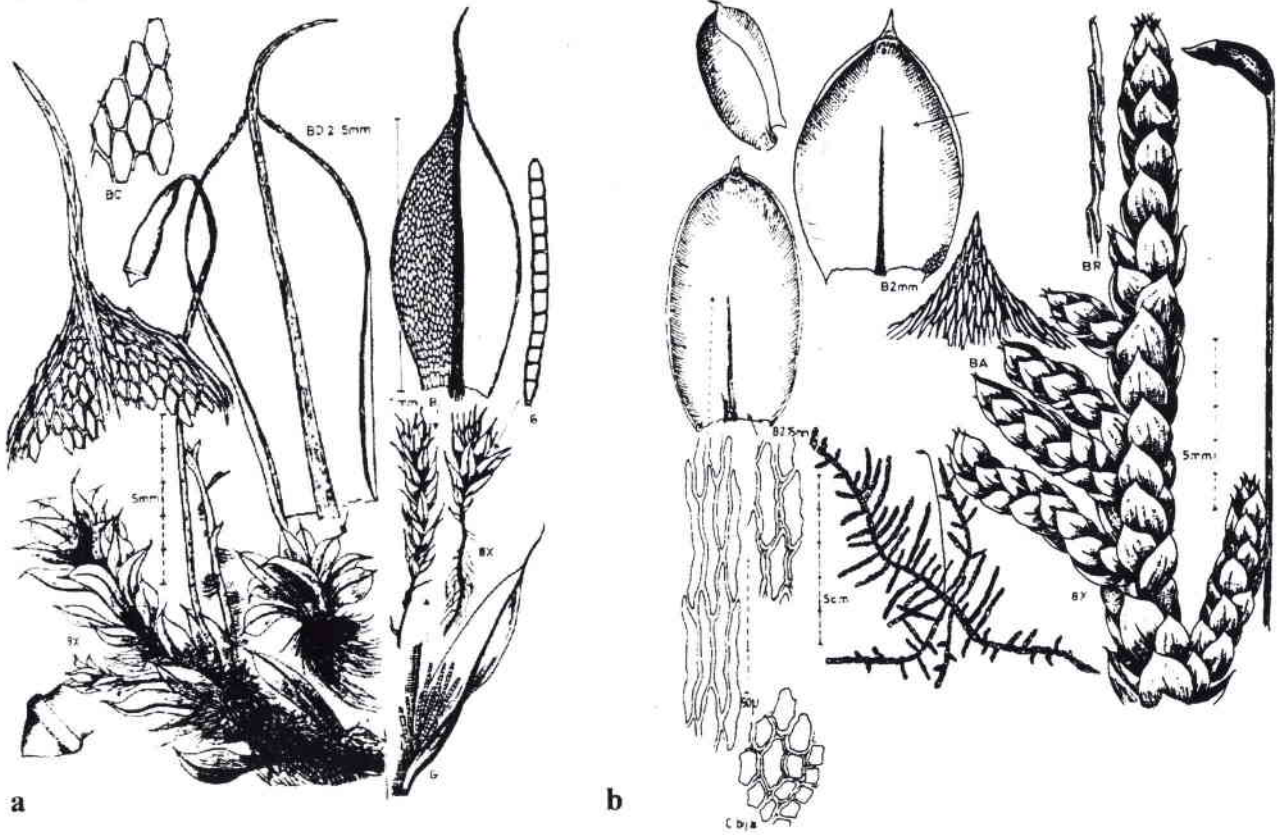


Figure 6 : a - *Bryum capillare* (acrocarpe) et b - *Scleropodium purum* (pleurocarpe), d'après Landwehr, 1984.

II. GENERALITES SUR LES BRYOPHYTES

Les bryophytes (terme créé en 1864 par A. Braun) sont des végétaux autotrophes (à de rares exceptions près) divisés taxonomiquement en trois classes : les *Musci* ou encore *Bryopsida* (les mousses), les *Hepaticae* ou *Hepaticopsida* (les hépatiques) et les *Antherocetae* ou *Anthocerotopsida* (les anthocérotes). Elles ne sont représentées que par des organismes haploïdes (gamétophytes). Le sporophyte, diploïde, réduit à l'organe où s'élaborent les spores haploïdes, vit en héli-parasite sur le gamétophyte. Les mousses peuvent se diviser en deux catégories selon la manière dont se développe le sporophyte : on parle de mousse acrocarpe, lorsqu'il se développe à l'extrémité du gamétophyte et de mousse pleurocarpe, lorsque les sporophytes se développent de manière latérale par rapport au gamétophyte (fig. 6).

II.1. L'APPAREIL VEGETATIF

Les bryophytes sont constituées de tissus différenciés, mais sans appareil vasculaire vrai. Les mousses ont des « tiges » (gamétophores) portant des organes analogues à des feuilles ; les hépatiques se présentent sous forme de thalles ou de tiges feuillées. Les mousses peuvent avoir, sur la face ventrale de leurs feuilles, des lamelles monostomatiques parallèles, très riches en chloroplastes, qui augmentent la surface d'échange avec le milieu (*Polytrichum*, *Atrichum*, *Dawsonia*, ...).

Le gamétophyte est assez variable anatomiquement. Sa structure est différente selon le niveau, les zones basales étant plus simples que les zones distales, et selon les conditions de milieu, les pieds poussant en milieu humide ayant une anatomie moins différenciée que ceux poussant en atmosphère sèche. Chez la grande majorité des mousses, on peut reconnaître en coupe transversale de tige : une couche de cellules chlorophylliennes, faisant penser à une ébauche d'épiderme, un parenchyme général, avec éventuellement des parois peu épaisses, et quelques hydroïdes, éléments conducteurs allongés, dépourvus de contenu cytoplasmique et à parois terminales minces. Ces cellules mortes, dont le contenu disparaît dès le début de leur différenciation, sont disposées en files et ont des cloisons transversales en biseau. Les leptoïdes, analogues des cellules du phloème des plantes vasculaires, qui existent en général dans les bryophytes sont absents des gamétophores des Bryales (Héban, 1977). La tige a un cordon central (conducteur ?) souvent peu différencié, parfois composé de quelques hydroïdes et de traces foliaires. En général, celles-ci se terminent de façon aveugle dans le parenchyme général et sans continuité entre « tige » et « feuilles ».

Certaines mousses, comme les Pottiacées, possèdent une véritable cuticule, souvent garnie de papilles complexes (pour réfléchir la lumière ?), un parenchyme général à paroi riche en plasmodesmes (constituant un parenchyme conducteur dans la tige feuillée des mousses), avec des parois épaisses dans la région sous-épidermique, et de nombreux hydroïdes assurant une certaine conduction de l'eau (Héban, 1977). On parle alors de mousses endohydriques (tab. 7). Dans ce cas, les traces foliaires peuvent rejoindre de façon assez nette le cylindre central et s'y accoler. Néanmoins, ce dispositif de conduction hydrique ne peut se faire que si l'eau est présente dans le milieu, mais sa réelle efficacité reste encore à établir. Par contre, une importante conduction par voie apoplastique (entre le mésophylle et le phloème par transport actif) a été démontrée par marquage au nitrate de lanthane (Gorenflot, 1983). Les espèces endohydriques occupent en général des substrats riches en nutriments et

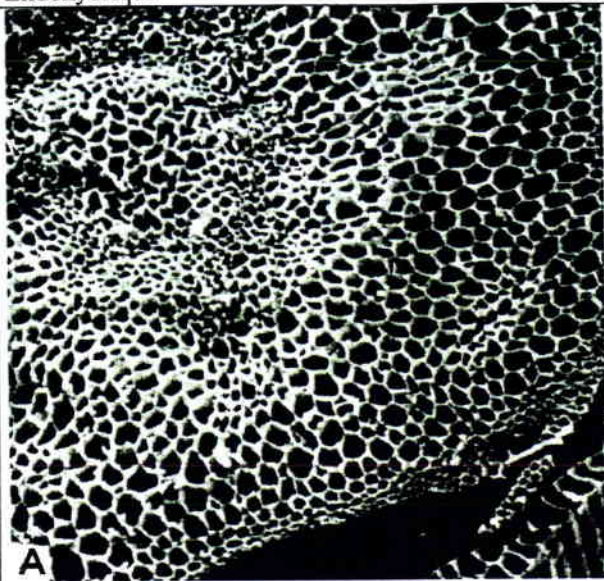
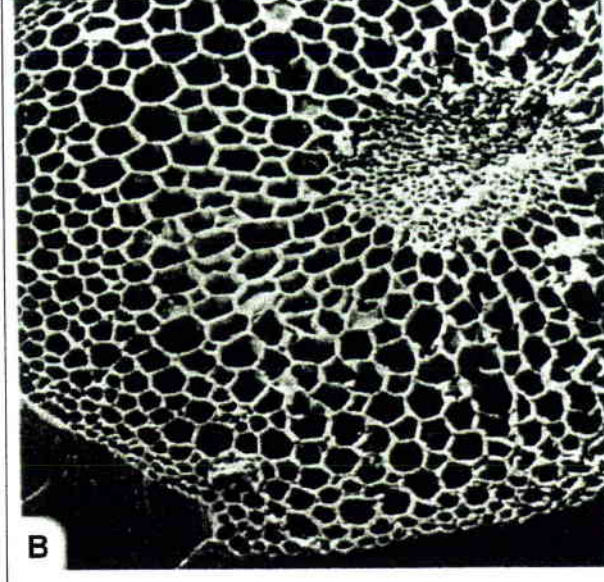
<p>Endohydrique</p>  <p>A</p> <p>Coupe transversale en microscopie électronique à balayage de <i>Polytrichum commune</i> (d'après Proctor, 1984).</p>	<p>Système conducteur efficace pour l'eau</p> <p>Leptoïdes : analogie manifeste avec les cellules criblées de Psilophytes, de Filicinées et celles du protophloème de la plupart des plantes vasculaires. Les leptoïdes sont des cellules allongées, aux extrémités en biseau, leurs parois terminales, obliques, étant percées de très nombreux plasmodesmes dont certains, en s'élargissant, acquièrent une structure voisine de celles des pores. Le cytoplasme dégénère partiellement, mais des mitochondries et des plastes régressés persistent. Le noyau subsiste mais est plus ou moins dégénéré. Enfin la vitesse de conduction dans les leptoïdes de <i>Polytrichum commune</i> a été déterminée expérimentalement : 32 cm/h.</p>
 <p>B</p> <p>Coupe transversale en microscopie électronique à balayage de <i>Plagiomnium</i> sp. (d'après Proctor, 1984).</p>	<p>Hydroïdes bien développés de forme allongée, avec des extrémités affilées. On observe la disposition du noyau et du cytoplasme en fin de différenciation. Hydrolyse partielle des fines parois terminales de contact, qui sont ainsi rendues plus perméables. Pourtant la paroi des hydroïdes ne comporte jamais d'épaississement secondaires lignifiés comparables à ceux du xylème des trachéophytes.</p>
<p>Ectohydrique</p>	<p>Grande utilisation des rhizoïdes pour l'absorption de l'eau du substrat par capillarité.</p> <p>Pas de leptoïdes ;</p> <p>Parfois des hydroïdes mais en faible nombre ;</p> <p>Rare présence de cuticule et de cellules épidermiques.</p>

Tableau 7 : Comparaison entre les bryophytes endohydriques et ectohydriques.

poreux alors que les espèces ectohydriques prédominent sur les substrats imperméables et limités en nutriments.

Les bryophytes ne possèdent pas de racines vraies comme celles des plantes vasculaires, mais possèdent des rhizoïdes qui peuvent être abondants au niveau de la tige ou du thalle. La plupart des rhizoïdes sur le gamétophore sont de type *micronemata*. Le second type *macronemata* est surtout 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 fixateur et de transporteur d'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*, *Dicranum scoparium*, *Pohlia annotina*. En effet, lorsque le rhizoïde apparaîtra à la surface du sol, il deviendra un protonéma chlorophyllien qui produira par la suite de nouveaux gamétophytes feuillés.

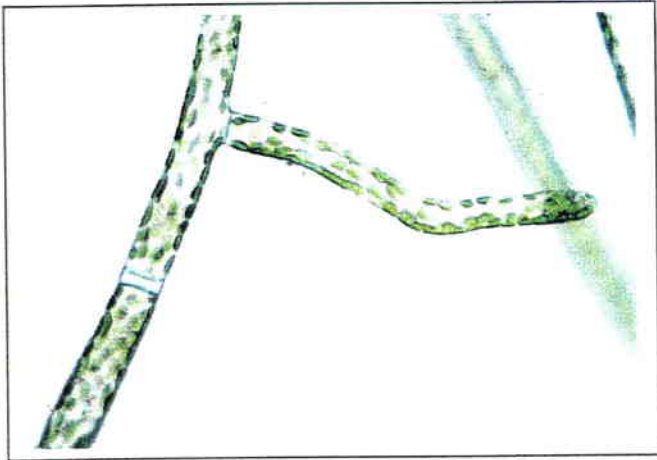
II.2. LA REPRODUCTION

Les mousses sont caractérisées par une alternance de générations hétéromorphe et hétérophasique typique. La reproduction peut être de deux types : végétative et sexuée.

Les bryophytes peuvent se propager très efficacement par voie végétative. Ainsi, elles peuvent se régénérer à partir de fragments de tige isolés ou de propagules uni- ou multicellulaires, produites sur différents organes (feuilles, tiges, rhizoïdes). Certaines hépatiques, par exemple *Marchantia*, forment des cavités cupuliformes appelées corbeilles, qui libèrent des propagules permettant la création de nouveaux thalles.

Chez la plupart des bryophytes, la reproduction sexuée joue un rôle mineur par rapport à la reproduction asexuée à l'aide de morceaux de feuilles, de protonéma, de gémules ou de propagules (During, 1979). Pour les espèces dont on ne connaît pas de sporophytes, la reproduction asexuée est la seule méthode de reproduction.

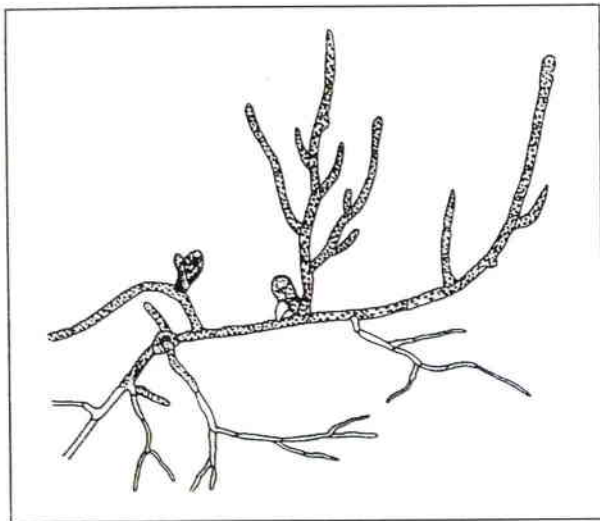
Les bryophytes peuvent se reproduire par voie sexuée sur une courte période. La génération haploïde (gamétophyte) est dominante. Comme les spores sont généralement très petites (15 à 25 μm), elles peuvent être transportées sur de longues distances par le vent, atterrir partout et se développer là où le milieu est suffisamment favorable. Une fois répandues, les spores de la plupart des espèces sont capables de germer immédiatement ; certaines, néanmoins sont dormantes dans des conditions défavorables (*Riccia*, *Sphaerocarpos*, *Anthoceros*, ...). Chez la plupart des espèces, la germination des spores est inhibée aussi longtemps qu'elles sont contenues dans la capsule sporifère, à cause de la présence de substances chimiques émanant de la paroi de la capsule. Ceci étant certainement dû au manque de lumière ou d'eau à l'intérieur de la capsule. Une spore haploïde germe pour donner un prothalle filamenteux et ramifié, le protonéma. La germination du protonéma (fig. 7a) clôt le cycle de l'alternance de générations chez les mousses. Le protonéma est constitué de cellules photosynthétiques possédant des parois transversales obliques. Le protonéma forme des bourgeons (fig. 7b et 7c) à partir desquels se développent, par divisions continues de la cellule apicale tridirectionnelle, des tiges. Bopp (1963) a noté que la forme et la structure du protonéma étaient facilement modifiées par des facteurs externes. Les filaments protonémataux des mousses, par exemple, développent trois sortes de filaments : le chloronéma, le caulonéma et les rhizoïdes. Le chloronéma est un filament simple ayant un



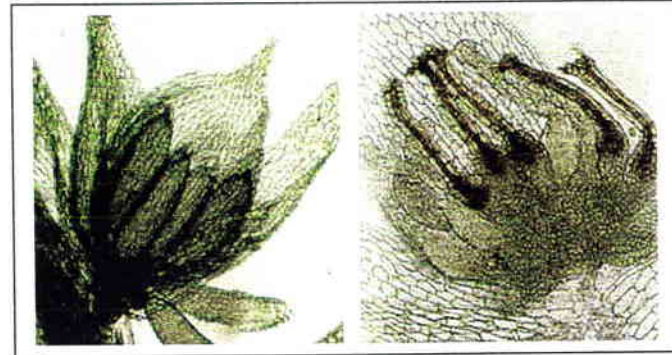
A



B



C



D

Figure 7 : La reproduction chez les bryophytes. A – Protonéma (microscopie photonique X 40) ; B – Bourgeon feuillé se développant sur un caulonéma (microscopie X 10) ; C – Gamétophyte de *Funaria hygrometrica* ; D - Anthéridies et archégonies chez une mousse (microscopie photonique X 10), (A, B, D : photos Franck Denayer ; C : d'après Goebel (1930)).

nombre important de chloroplastes ovoïdes. Le caulonéma est un filament protonématal brun se développant à partir du chloronéma ; il n'existe que chez les mousses. Chez toutes les espèces de bryales, le bourgeon produisant les petites feuilles de la mousse est formé à partir du caulonéma.

Les rhizoïdes sont unicellulaires et simples chez les hépatiques, alors qu'ils sont multicellulaires chez les mousses.

Les gamétophytes feuillés vont produire des anthéridies (organe mâle, libérant des anthérozoïdes flagellés) et des archégonies (organe femelle, contenant l'oosphère) (fig. 7d). Les anthérozoïdes ne se déplacent que dans l'eau, la fécondation de l'oosphère chez les mousses est dépendante de l'eau, ce qui est une réminiscence de la vie aquatique primitive. Les anthérozoïdes une fois libérés des anthéridies nagent jusqu'à l'entrée du canal du col de l'archégonie où ils sont attirés par chimiotactisme. Un des anthérozoïdes féconde l'oosphère de l'archégonie après passage par le canal du col. C'est ainsi que se forme le zygote.

Le zygote se développe immédiatement en un sporogone diploïde qui est fixé par la partie inférieure (haustorium ou suçoir) dans le tissu du gamétophyte à partir duquel il sera nourri. Il s'allonge et déchire finalement la paroi située à la base de l'archégonie. Le reste de l'archégonie se maintient à l'extrémité du sporogone jusqu'à la maturité de ce dernier et forme alors un petit chapeau caractéristique, la coiffe. Le sporogone mûr se structure en un pédicelle (soie) et en une capsule sporifère terminale. Cette dernière comporte des tissus de stockage pour les éléments nutritifs et l'eau (paroi et columelle) ; dans le sac sporifère de nombreuses cellules sporogènes subissent une réduction chromatique et forment des spores haploïdes.

II.3. PARTICULARITE PHYSIOLOGIQUE

Les bryophytes, à l'inverse des plantes vasculaires qui vont le plus souvent puiser leurs ressources en eau dans le sol, vont utiliser l'eau (eau du sol ou eau précipitée) dans le milieu quand elle sera présente et peuvent ainsi résister à la sécheresse pendant de longues périodes. Dans ce cas, on parle de bryophytes ectohydriques (tab. 7), ce qui signifie qu'elles absorbent l'eau sur toute leur surface et la perdent très facilement lorsque l'atmosphère est plus sèche. Ce sont des organismes poïkilohydriques, c'est-à-dire adaptant leur métabolisme en fonction de l'humidité ambiante et pouvant rentrer en état de dormance si l'atmosphère est trop sèche. Barkman (1958) a établi un classement de différentes classes végétales et fongiques en fonction de la relation qu'elles avaient vis-à-vis de l'eau. Il propose de placer les bryophytes dans le groupes des *Ombrophyta*, subdivisé en trois parties selon l'importance du transport hydrique au sein de l'organisme (tab. 8).

Certaines espèces peuvent survivre à de longues périodes de sécheresse sans subir aucun dommage et développer de nouveau un sporophyte. D'autres sont tuées en quelques heures lorsqu'elles subissent de forts déficits hydriques dans leurs tissus. Les espèces ectohydriques ont un rapport surface foliaire/volume important (Larson, 1981) et la conduction externe de l'eau se fait à l'aide du tomentum, des rhizoïdes et/ou des paraphylles et peuvent présenter des feuilles plus concaves. A ce propos, les parois cellulaires des feuilles de sphaignes sont percées de pores permettant l'absorption et la conservation de l'eau du substrat. On retrouve ces mêmes pores chez d'autres genres de bryophytes comme *Leucobryum*, *Encalypta*, *Tortula*... (Castaldo *et al.*, 1979).

	Type H ₂ O	Mécanisme d'absorption	Type de lichen	Type de bryophyte
Atmophyta	Eau vapeur, brouillard	Toute la surface	Lichen lépreux, grande partie des lichens fruticuleux	Bryophytes épiphyllés
Amphiphyta	Eau liquide, eau vapeur	Toute la surface supérieure, face inférieure et organes s'y référant	Lichens crustacés et foliacés	Bryophytes épiphyllés
Ombrophyta	Eau liquide		Lichens à cyanobactéries (10 % des lichens)	La plupart des bryophytes
	Eau liquide	Voie interne, eau du sol importante		Endohydriques (<i>Polytrichum</i> , Marchantiales)
	Eau liquide	Toute la surface		Ectohydriques (pleurocarpes, une partie des acrocarpes)
	Eau liquide	Toute la surface + voie interne		Mixohydriques (acrocarpes)

Tableau 8 : Adaptations des bryophytes et des lichens face à l'eau (facteur limitant), (d'après Barkman, 1958).

II.4. ÉCOLOGIE ET BIOGÉOGRAPHIE DES BRYOPHYTES

Les mousses et les hépatiques sont les bryophytes les plus largement étudiées. Elles présentent plus de 25 000 espèces à travers le monde. La plupart des taxa holarctiques sont ubiquistes bien que la plupart du temps ils aient une discontinuité dans leur large distribution chorologique. Beaucoup de ces disjonctions sont particulièrement nombreuses chez des espèces ayant une faible capacité de compétition ou une demande écologique particulière.

On remarque facilement en travaillant sur le terrain que certaines espèces s'associent régulièrement de manière répétitive, ayant sans doute des exigences assez semblables, ou même que des plantes vasculaires déterminées, ou des lichens accompagnent régulièrement telle ou telle bryophyte, formant des biocénoses végétales.

L'aire de répartition des diverses espèces dans le monde dépend évidemment de l'écologie de chacune et des grands facteurs généraux du climat, latitude et altitude. Les espèces de bryophytes, compte tenu de leurs exigences particulières, ne s'étendent généralement pas sur toute la surface du globe ; peu nombreuses sont les véritables cosmopolites, comme *Bryum argenteum*.

Humidité, nature du substrat, éclaircissement, température, interactions des êtres vivants en présence, tels sont les principaux facteurs qui caractérisent un milieu de vie. Leurs interférences sont multiples.

II.4.1. L'humidité

La dépendance des bryophytes vis-à-vis de la plus ou moins grande abondance de l'eau est des plus frappantes. C'est là seulement où une certaine humidité est constamment entretenue qu'elles peuvent prospérer en abondance : les sous-bois, le bord des eaux, les ravins, les tourbières,... Sur les murs, les rochers, les sables exposés à une sécheresse prolongée, le nombre d'espèces vivaces est réduit à quelques-unes, spécialement résistantes ; il peut s'y joindre quelques éphémérophytes qui passent la longue période sèche à l'état de spores.

Le gamétophyte, non cutinisé et facilement mouillable, peut absorber l'eau liquide par toutes ses parties ; il absorbe même la vapeur d'eau atmosphérique, dès qu'elle est en quantité notable. Mais on sait que la minceur des organes et l'absence de racines, capables de ravitailler la plante aux dépens de la couche humide du sol, entraînent la dessiccation facile de celle-ci dès que l'air et la surface du sol se dessèchent. La teneur de la mousse en eau peut ainsi se réduire à 15-20 %. Les hépatiques sont généralement beaucoup plus délicates et meurent par dessiccation avancée, mais il en existe des xérophytes (*i.e.* supportant la sécheresse) qui peuvent résister à une année de sécheresse notamment chez les Marchantiales. Ces hépatiques (*e.g.* les *Riccia*) vivent sur la terre ensoleillée, dans la région méditerranéenne ; leurs rhizoïdes sont très développés et leur thalle peut s'enrouler sur lui-même, protégeant sa surface stomatifère et n'offrant à l'atmosphère externe que sa face ventrale couverte d'écailles protectrices.

II.4.2. La nature du substrat

La végétation est conditionnée par les caractères physiques et chimiques de son substrat, appelés alors facteurs édaphiques du milieu. La structure physique du substrat permet plus ou moins facilement la circulation de l'air et la rétention d'eau, ainsi que la pénétration des rhizoïdes ; elle dépend principalement de sa nature chimique. Le sol calcaire grumeleux est plus aéré, plus sec, plus chaud que le sol argileux. C'est évidemment l'horizon superficiel du sol qui intéresse directement les bryophytes. Pour certains, le substrat sera la roche nue ou presque nue, les écorces de plantes vivantes, ou encore le bois mort en voie de décomposition. Dans les régions chaudes et humides, il en existe aussi sur les feuilles vivantes d'autres plantes (mousses, ptéridophytes, conifères, angiospermes). Les espèces aquatiques sont influencées par les propriétés de l'eau qui les baigne.

Sous les latitudes moyennes, c'est sur l'humus que les peuplements de bryophytes sont les plus exubérants. En fonction des conditions selon lesquelles l'humus s'élabore (nature de la roche et des débris organiques, quantité d'eau, température...), il peut être très acide (humus brut ou « mor », pH de 3,5 à 5), ou d'une acidité moyenne (humus doux, ou mull, pH de 5 à 6,5), ou même alcalin, sur sols calcaires (mull calcique, pH de 7,5 à 8,5).

Entre ces divers types d'humus, la végétation bryophytique ne se répartit pas indifféremment, et sur les autres substrats la réaction ionique compte aussi beaucoup dans les préférences ou même l'exclusivisme des espèces. Ainsi s'expliquent, pour la plus grande part sans doute, les caractères de calcicoles et de calcifuges, qui distinguent nettement bon nombre de bryophytes, l'ion Ca^{2+} comptant d'abord comme facteur d'alcalinité, néfaste ou favorable, plus que par sa spécificité chimique. Par exemple, des cultures de sphaignes sur des milieux artificiels ont permis de montrer que ces bryophytes ne se développaient que sur des milieux acides, avec des optima de pH entre 3,5 et 5. Les divers cations sont toxiques pour les sphaignes dans la mesure où elles ne peuvent plus en compenser l'action alcalinisante. A côté des calciphiles « exigeantes », il y a des espèces qui seulement préfèrent le calcaire. Enfin, de nombreuses mousses et hépatiques sont plus ou moins indifférentes, et parfois qualifiées d'« euryioniques » comme *Marchantia polymorpha*, *Plagiochila asplenoides*, *Hypnum cupressiforme*...

Les nitrates sont abondants dans certains sols et ils sont bien supportés par certaines espèces de mousses ou d'hépatiques (*Bryum argenteum*, *Lunularia cruciata*...); d'autres genres ont même comme substrats d'élection les boues ou les fumiers (*Splachnum*, *Tayloria*).

Très peu de bryophytes peuvent supporter le chlorure de sodium et vivre sur le bord immédiat de la mer. Encore plus rares sont celles que l'on trouve confinées dans ce milieu, et apparaissent pour cette raison comme des halophytes obligatoires (*Grimmia maritima*, *Pottia crinita*).

Notons enfin que certaines bryophytes sont particulièrement résistantes à certains ions métalliques (voir chapitre III).

Les bryophytes sont des constituants indispensables dans la végétation de nombreux écosystèmes naturels ou anthropisés dans le monde. Plusieurs espèces sont pionnières des sols nus (espèces épigéiques ou terricoles), d'autres ne pourront se développer sans des conditions stables du sol et une dynamique végétale déjà existante. Arnold & Gobat (1998) montrent que les bryophytes accélèrent la pédogenèse, grâce à une rétroaction positive ou négative suivant le type de substrat, aboutissant à la convergence et à un début de maturation des caractères de l'horizon organo-minéral du sol. Les bryophytes peuvent constituer la majeure partie de la biomasse végétale dans certains cas et être responsables de la plupart des productions primaires des marécages (e.g. la dominances des sphaignes dans les tourbières), des landes à

bruyères et de la végétation arctique et subarctique (toundra). Dans les forêts, elles peuvent recouvrir et dominer le sol, particulièrement dans les forêts humides de conifères et les zones subhumides.

Les bryophytes épiphytes sont également très abondantes dans les forêts à feuilles caduques des régions humides et peuvent également apparaître sur des arbres isolés ou sur des plantations en zones urbaines.

II.4.3. L'éclairement

En parcourant les forêts, on est conduit à penser que les bryophytes sont, de façon générale, plus tolérantes que les plantes supérieures à de faibles intensités lumineuses. Certaines peuvent s'accommoder même d'un éclairement extrêmement réduit, dans les grottes ou dans les profondeurs des lacs, où elles accompagnent assez couramment des algues characées jusqu'à 13 à 20 m de profondeur. Dans les forêts des moyennes latitudes, qui perdent leurs feuilles en saison froide et humide, les bryophytes peuvent en général, si la température n'est pas trop basse, assimiler et se reproduire pendant cette période, qui est pour elles la phase lumineuse de l'année.

II.4.4. La température

Il faut naturellement tenir compte ici du microclimat au niveau de la végétation muscinale. Les températures basses, repérées comme d'ordinaire à 1 m du sol ou davantage, sont habituellement bien supportées par les mousses lorsqu'elles sont protégées par une couche isolante de neige.

II.4.5. Les facteurs biotiques

Dans la nature, la rapidité de croissance des bryophytes s'explique en partie par l'action indirecte de nombreux êtres vivants, surtout celle des bactéries et de certaines algues, ainsi que de petits animaux qui élaborent l'humus. La réduction ou l'absence des mousses et hépatiques, au contraire, est due souvent à la concurrence multiforme des plantes supérieures ou des lichens.

D'autre part, un contact direct et plus ou moins intime des bryophytes avec d'autres plantes vivantes a été souvent remarqué et demande que l'on approfondisse, dans certains cas, la nature des rapports, parasitaires, symbiotiques, qui s'y manifestent.

Un certain nombre d'hépatiques à feuilles sont couramment fixées sur des mousses ou sur d'autres hépatiques, par apposition de rhizoïdes digités, étroitement adhérents à l'hôte. On a pu constater que ce dernier apporte à son épibiote de l'eau et des substances dissoutes. Il en est ainsi pour *Lophocolea bidentata* (pauvre en chlorophylle) implanté sur *Anomodon viticulosus* ou sur *Plagiomnium undulatum* ; pour *Odontoschisma sphagni* sur les sphaignes, *Frullania fragilifolia* sur *Hypnum cupressiforme*... (Augier, 1966).

Les bryophytes portent fréquemment des cyanobactéries. Dans quelques genres, le thalle présente de petites ampoules dont la cavité s'ouvre au dehors (*Blasia pusilla*), ou bien des cavités (*Anthoceros*). Un mucilage y est sécrété dans lequel se multiplient régulièrement des *Nostoc*. Les hépatiques, de leur côté, développent des filaments tortueux ou ramifiés entre les cellules de l'algue (Augier, 1966). Des observations précises n'ont pas confirmé, dans ces

cas, l'hypothèse d'une symbiose. Une symbiose assez fragile peut s'établir entre les protonéma de *Tetraphis pellucida* et des algues vertes unicellulaires (*Coccomyxa*), (Augier, 1966).

Beaucoup d'hépatiques renferment, à l'intérieur de certaines cellules, des filaments pelotonnés de champignons. Ceux-ci ont pénétré par les rhizoïdes et se cantonnent ordinairement dans quelques parties du thalle ou de la tige. Plus rarement ils envahissent très largement leur hôte, jusqu'autour des gamétanges, ou même parasitent nettement le tissu sporogène. La présence et la localisation des filaments fongiques sont dans certains groupes bien constantes et caractéristiques, par exemple chez *Lophozia* (Augier, 1966).

II.5. ÉTUDE COMMUNAUTAIRE DES BRYOPHYTES

II.5.1. Milieux naturels et végétation bryophytique, approche bryosociologique

Dans une région déterminée par les grands traits de son climat existent divers types de biotopes. Ce sont surtout la nature du substrat, les facteurs édaphiques qui les caractérisent. On peut en dresser la liste suivante :

1. terre humifère des forêts et, secondairement, des landes, pelouses, prairies ; les bryophytes qu'on y trouve sont souvent appelées bryochaméphytes au sens strict ; les conditions de vie sont souvent favorables à ces végétaux ;
2. terre humifère dans les creux des rochers (fentes, crevasses, cuvettes), où poussent les chasmophytes, où en couche mince à la surface de ceux-ci on trouve les exochomophytes ;
3. rochers à peu près nus, où poussent les épilithes ;
4. substrats végétaux, qui sont les écorces (corticicoles), le bois (épixyles) en état plus ou moins avancé de décomposition et, en pays tropicaux principalement, les feuilles (épiphylls) ;
5. terre plus ou moins humifère où la vie des bryophytes est impossible chaque année, pendant la saison sèche (plantes xérogéophytes) ;
6. terre surtout minérale des sables, dunes (psammophytes) et débris rocheux ;
7. tourbières, où prospèrent les turfiques, dans l'eau ou en dehors de l'eau ;
8. eaux tranquilles ou courantes, mais non tourbeuses (hélophytes au sens large).

A la suite des classiques types biologiques définis par Raunkiaer (1934), de nombreux auteurs ont tenté à leur tour de classer les espèces en fonction de leur adaptation à passer la saison défavorable.

Dans le système défini par Dansereau & Pageau (1966), on peut noter l'apparition d'un nouveau type biologique pour les bryophytes : les bryochaméphytes.

Schmithüsen (1961) a cherché à réunir dans un système unique l'ensemble des adaptations possibles en fonction des différents facteurs écologiques. Il distingue ainsi trente formes de croissance, dont huit pour les mousses, lichens, champignons et algues. Ce sont :

- les bryo-épiphytes (*Thallus-Epiphyten*) : bryophytes capables d'absorber l'humidité atmosphérique par toute leur surface ; muscinées fixées en touffes pendantes, en colonies, en coussinets et en tapis sur les écorces ;

- les bryochaméphytes (*Thallus-Chamaephyten*) : bryophytes des tourbières et des marais qui forment des revêtements lâches et bryophytes terricoles en coussinets. Lecointe & Provost (1970) incluent également dans ce groupe les grandes pleurocarpes, généralement silvatiques, pour lesquelles il n'y a pas de précisions ;
- les bryo-hémicryptophytes (*Thallus-Hemikryptophyten*) : mousses et hépatiques plaquées au sol. Lecointe & Provost (1970) incluent dans ce groupe les bryophytes terricoles, en coussinets ou en tapis bas, ne dépassant pas 5 cm de haut ;
- les bryogéophytes (*Thallus-Geophyten*) : comme les géophytes chez les phanérogames, ce sont des plantes dont l'appareil souterrain seul survit pendant la mauvaise saison. Chez les bryophytes, certaines espèces possèdent un rhizome capable de redonner des gamétophytes au printemps, mais les tiges feuillées supportent généralement la saison défavorable. Suivant la position des bourgeons par rapport au sol, ces bryogéophytes possibles peuvent être classés parmi les bryochaméphytes et les bryo-hémicryptophytes ;
- les bryothérophytes (*Thallus-Therophyten*) : bryophytes éphémères se renouvelant par spores ;
- les bryo-hydrophytes (*Thallus-Hydrophyten*) : bryophytes submergées, flottants ou fixés.

Lecointe & Provost (1970) établissent un spectre du même type que les spectres établis pour les phanérogames, pour les régions qu'ils ont étudiées, dont les proportions sont les suivantes :

Bryo-épiphytes	11 %
Bryo-chaméphytes	20 %
Bryo-hémicryptophytes	45 %
Bryo-géophytes	9 %
Bryo-thérophytes	10 %
Bryo-hydrophytes	5 %

On constate que les bryo-hémicryptophytes sont avec 45 % de l'ensemble les formes les plus abondantes.

II.5.2. Les milieux anthropisés

Très peu d'auteurs ont décrit des communautés bryophytiques présentes dans des milieux anthropisés.

Von Hilde *et al.* (1949) ont décrit les petites associations de mousses présentes en milieu urbain. Ce sont surtout les mousses ubiquistes et cosmopolites qui s'y développent, et surtout des unités sociologiques terricoles, basophiles.

Sur routes pavées ou places sableuses, on observe :

- les communautés à *Bryum argenteum* et *Ceratodon purpureus*. Dans les fissures des pavés : *Bryum argenteum*, *Sagina procumbens*, représentant le *Sagino-Bryetum argentei* (Tüxen 1947) ;
- une association nitrophile de mousses piétinées sur sol sableux (*Ceratodon purpureus* et *Barbula rigidula*). *Barbula unguiculata*, *B. convoluta*, *B. fallax*, se trouvant sur des lieux piétinés, caractérisent une association nitrophile sur sols sableux, en exposition nord ou protégée par des arbres d'alignements.

Von Hübschmann (1975) a pu décrire une association à *Riccia crystallina* et à *Physcomitrella patens* se développant sur des vases asséchées (Schlamm).

Seaward & Bylinska (1980) indiquent que les plantes se développant sur des sols enrichis naturellement ou non (sols miniers, terrils) en éléments traces métalliques (ETM) montrent une grande variété de modifications morphologiques pouvant être utilisées comme outils de diagnostic. Un peu plus tard, Goyal & Seaward (1982) se sont intéressés à la valeur bioindicatrice potentielle que pouvaient présenter certains lichens terricoles (*Peltigera canina* et *P. rufescens*) se développant sur des sols contaminés par les ETM. Ils ont conclu que ces lichens pouvaient présenter une certaine valeur bioindicatrice mais qu'elle était dépendante de la fraction biodisponible des métaux dans le sol et non pas de la teneur totale en ETM du sol. De plus, par rapport aux plantes, les particularités histologiques et morphologiques des lichens se développant sur sites pollués ne peuvent pas être utilisées seules, comme critère d'élaboration d'une échelle de bioestimation.

Marstaller (1987) s'est intéressé aux impacts que pouvaient avoir les retombées atmosphériques de poussières sur les communautés terricoles se développant à proximité d'une usine d'engrais près de Jena en Allemagne. Un travail préalable d'Heinrich (1984) a permis d'établir cinq types de végétation bryophytique pour un milieu anthropisé exposé à des retombées atmosphériques de poussières (de la zone 1, la plus exposée, à la zone 5 la moins exposée) :

- Zone 1 : pelouse rase à *Pucciniella*
- Zone 2 : Formation à *Agropyron repens*
- Zone 3 : apparition des mousses les plus ubiquistes *Ceratodon purpureus*, *Bryum argenteum*, *B. caespiticium*, *Funaria hygrometrica* (si humidité)
- Zone 4 : végétation presque normale mais pas d'épiphytes
- Zone 5 : végétation tout à fait normale

A proximité de Jena, plusieurs communautés de mousses aux abords d'écosystèmes non perturbés ont pu se développer ; il s'agit des *Weissietum crispatae*, *Astometum crispi*, *Aloinetum rigidae*, *Trichostomo-Aloinetum aloidis*, *Tortelletum inclinatae*, *Barbuletum convolutae* et une association appartenant au *Phascion cuspidati*. Sur sols contaminés, l'auteur a pu observer une association à *Bryum caespiticium* et *Bryum argenteum*.

L'*Aloinetum rigidae* (Stodiek 1937) a pour caractéristiques bryophytiques *Aloina rigida* et *Didymodon cordatus*. Elle appartient d'un point de vue synsystématique aux *Grimiadion*, *Barbuletalia unguiculatae*, *Barbuletea unguiculatae*. C'est une association xérophile, sur calcaire dans laquelle *Aloina rigida* fait de nombreux sporogones mais qui meurent pendant leur développement. La pauvreté en lichens est très grande et il y a un fort recouvrement de *Bryum caespiticium* et de *B. argenteum*, et un recouvrement plus faible par *Ceratodon purpureus*. Si cette communauté est soumise à une très forte exposition à la poussière, *Aloina rigida* disparaît. On assiste à un appauvrissement progressif de cette association avec la charge en phosphore et en sodium du sol sous jacent (0-3 cm), ce qui va de pair avec la diminution du nombre d'espèces. Cette communauté constituée de deux *Bryum* se retrouve aussi en bord de route traité aux herbicides, aux endroits enrichis en engrais, sur les places à feu, à proximité des grandes villes.

Le *Barbuletum convolutae* (Hadac & Smarda, 1944) est une association anthropique, calcicole des bords des chemins (fréquente aussi à proximité des cimenteries).

Le *Funarietum hygrometricae* (Engel, 1949) est une association nitrophile et hygrophile qui supporte aussi les herbicides. Elle est fréquente le long des routes et des voies de chemin de fer. L'auteur montre donc que l'impact des dépôts en provenance d'usines d'engrais de Jena entraîne une modification de la structure des communautés bryophytiques. On observe une zonation des communautés en fonction de l'intensité des émissions.

III. LES BRYOPHYTES ET LES METAUX

Depuis le début du siècle, les bryophytes sont utilisées comme bioindicateurs des éléments traces métalliques. Mais, ce n'est que depuis le début des années 1970 que des chercheurs se sont réellement intéressés à la physiologie de ces organismes et à la manière dont ils réagissent face à divers polluants. Les travaux publiés traitent des effets directs des éléments traces métalliques sur les bryophytes, des mécanismes de piégeage et de la tolérance de ces bryophytes aux polluants.

Dans ce chapitre, nous ferons une mise au point bibliographique des différentes études réalisées dans ce domaine. Nous insisterons plus particulièrement sur les recherches menées depuis 1990, date à laquelle Tyler a publié une synthèse de l'état des connaissances sur les relations bryophytes - métaux.

III.1. SOURCES DE NUTRITION MINERALE ET DE CONTAMINATION PAR LES ELEMENTS TRACES METALLIQUES : ROLE DU SUBSTRAT

L'apport de nutriments minéraux et d'éléments traces métalliques chez les bryophytes peut être réalisé de différentes manières. Une dépendance quasiment complète des retombées en nutriments minéraux est observée chez la mousse *Hylocomium splendens* par Tamm (1953). Plusieurs autres espèces pleurocarpes épigéiques semblent avoir une dépendance similaire. Un ratio élevé surface/volume ou surface/masse favorise le piégeage des grosses particules, bien que la vitesse du vent et d'autres caractéristiques liées au site puissent influencer cette efficacité (Clough, 1975).

Cependant, il est évident que les bryophytes, autres que ces pleurocarpes forestières, peuvent dépendre d'une absorption de nutriments à partir du substrat en plus des apports atmosphériques. Puustjärvi (1959) rapporte que les cations basiques sont transférés de la tourbe à une nouvelle biomasse de sphaignes par une différence de potentiel électrique. L'absorption d'ions métalliques est beaucoup plus évidente pour les acrocarpes se développant sur du sol fortement chargé en éléments solubles (Shimwell & Laurie, 1972). Ces ions sont apparemment transportés par capillarité sur ou à travers la biomasse des bryophytes. En présence de sols moyennement contaminés en métaux lourds, cette voie de transfert est beaucoup moins importante voire négligeable. Pour les cations basiques, l'absorption à partir du substrat est mise en évidence chez *Grimmia orbicularis* (Hébrard *et al.*, 1974). Lötschert *et al.* (1975) envisagent même que certains transferts de plomb et de cadmium puissent se faire dans les tissus de la tige de *Bryum argenteum*, espèce acrocarpe aux rhizoïdes bien développés.

Plusieurs études de Bates (1987, 1989, 1990, 1992) ont permis de mieux comprendre les mécanismes d'absorption de nutriments par *Scleropodium purum*. L'auteur indique (Bates, 1990) que le substrat peut apporter une source de minéraux aux bryophytes, même pour les mousses pleurocarpes qui ont un faible contact avec leur substrat. Lorsque celui-ci renferme des concentrations inhabituelles en ETM, ces derniers sont souvent détectables dans les tissus des bryophytes (Bates, 1987).

Huckabee & Janzen (1975) observent que des gamétophytes isolés de *Dicranum scoparium* accumulent le mercure lorsque les rhizoïdes sont immergés dans une solution d'ions Hg^{2+} . Cependant, lors de ces expérimentations, après ajout de sol « rhizosphérique » à la solution de sels mercuriques, aucune augmentation de la concentration en mercure dans les

tissus de la mousse ne peut être mesurée malgré la volatilisation du mercure du sol. A partir d'une étude sur la mousse épiphyte *Hypnum cupressiforme*, Rasmussën & Johnsen (1976), concluent que la plupart des ETM ont pour origine l'atmosphère via les précipitations, les retombées et le lessivage de l'écorce des troncs. Cependant, Rasmussën (1978) n'observe pas de relation directe entre les concentrations en métaux chez *Hypnum* et dans les écorces.

III.2. MECANISMES DE PIEGEAGE ET DE RETENTION DES METAUX

Les dépôts secs et humides assurent la contamination des mousses par les éléments traces métalliques. Les dépôts humides comprennent les dépôts de polluants par les pluies, la neige et par les précipitations occultes (rosée, brouillard). Les dépôts secs concernent l'adsorption et l'absorption directes des polluants sous forme gazeuse et/ou particulaire.

La dynamique chimique d'accumulation dépendra des propriétés physico-chimiques des polluants traces (solubilité, constante de Henry, pK, pH, coefficient octanol/eau Kow...). Selon ces diverses caractéristiques, les éléments traces pourront être adsorbés, absorbés ou éliminés de la mousse. Ces éléments chimiques pourront également subir différentes transformations telles que la photolyse, l'hydrolyse, des réactions d'oxydo-réduction ou acido-basiques, voire même des transformations métaboliques. Si nous nous référons à la littérature, la connaissance de tels processus chimiques chez les bryophytes est encore mal connue excepté en ce qui concerne les processus d'échanges d'ions métalliques.

III.2.1. Propriétés d'échanges ioniques au sein des cellules de bryophytes et mécanismes d'adsorption extracellulaire

Les cations peuvent être classés selon la nature des composés auxquels ils peuvent se lier (Nieboer & Richardson, 1980). Les éléments peuvent être regroupés en 3 classes A, B et C (fig. 4, chapitre I). Les éléments de la classe C sont également appelés éléments de transition. Cette classification est basée sur la propriété des éléments à s'adsorber sur certains ligands. Le tableau 2 résume les principaux ligands retenus par ces auteurs. Les éléments de classe A (K, Na, Mg, Ca, ...) se lient préférentiellement à des ligands donneurs d'oxygène (comme des groupements carboxyliques). Les éléments de classe B (Pb, Hg, Ag, ...) se lient avec des groupements soufrés ou azotés. Les éléments de la classe C (Zn, Cd, Cu, ...) peuvent s'adsorber sur tous les types de ligands.

Des études détaillées sur l'adsorption de cations extracellulaires ont tout d'abord été réalisées chez les lichens (voir la revue de Nieboer & Richardson, 1980 ; Nieboer *et al.*, 1977, 1978). Cette adsorption est dominée par un phénomène rapide et passif d'échange d'ions, seulement affecté par la température et indépendant des changements de métabolisme induits par l'illumination ou l'obscurité, le potentiel d'oxygène réduit ou l'addition d'inhibiteurs métaboliques.

Il est maintenant bien établi depuis des dizaines d'années que les bryophytes se comportent elles aussi comme de véritables résines échangeuses d'ions (Anschütz & Gessner, 1954 ; Puustajärvi, 1955). Bell (1959) met en évidence que la séquence de rétention des cations chez les sphaignes est identique à celle que l'on observe sur des résines échangeuses d'ions : $Fe^{3+} > Mg^{2+}$, $Ca^{2+} > K^+$, Na^+ pour des concentrations naturelles.

Brown & Bates (1972), étudiant l'effet du plomb chez deux populations de *Grimmia doniana*, concluent que la pénétration du plomb à partir d'une solution de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ est un processus physique passif, sans pénétration du métal dans le cytoplasme. Il n'y a pas de différence apparente dans la capacité d'absorption chez les mousses traitées et non traitées. Aucune pénétration du Pb dans la cellule n'est observée dans une mousse tolérante, même avec des concentrations de 10 mg.l^{-1} . Le Pb est fixé sur des sites extracellulaires.

Rühling & Tyler (1970) proposent également une séquence de fixation pour les ions ETM : Cu^{2+} , $\text{Pb}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Co}^{2+} > \text{Zn}^{2+}$, Mn^{2+} . Cet ordre est validé pour une large gamme de concentrations, si les ions sont apportés en solution, seuls ou en mélange. La forte rétention du Cu^{2+} et du Pb^{2+} peut être en partie due à des ligands présentant une très haute affinité pour ces ions.

La forte capacité d'échanges cationiques (CEC) des cellules de bryophytes vivantes est attribuée à la présence des groupements carboxyles des polymères d'acide uronique présents dans la paroi, bien que des groupements oxygène (hydroxyles et carboxyles), amine et sulfhydryle de la paroi et de la membrane plasmique puissent également entrer en jeu (Clymo, 1963 ; Craigie & Mass, 1966 ; Spearing, 1972 ; Schwarzmaier & Brehm, 1975). Chez les sphaignes, cette CEC est très intimement reliée à la concentration dans les tissus de substances pectiques, principalement des acides uroniques (Knight *et al.*, 1961). Chez *Sphagnum acutifolium*, environ 25 % des tissus (poids sec) sont constitués d'acides polyuroniques non estérifiés et une bonne corrélation est observée entre les teneurs en acides polyuroniques et la CEC chez diverses sphaignes (Clymo, 1963 ; Spearing, 1972). Schwarzmaier & Brehm (1975) mettent en évidence l'existence de bandes d'absorption caractéristiques de groupes carboxyles dans un extrait purifié de parois de sphaignes. Par comparaison avec des spectres d'acides carboxyliques, ces auteurs ont pu identifier que ces sites de fixation appartenaient à des acides polygalacturoniques inclus dans une matrice de cellulose, ce qui confirme les travaux de Clymo (1963).

Chez les hépatiques, l'acide mannuronique est présent au niveau de la paroi (Brown, 1984).

Chez les bryophytes épiphytes, Bates (1982) rapporte que les taux de Ca échangeable sont 16 à 17 fois plus élevés chez les espèces basophiles que chez les espèces acidophiles et que la CEC des tissus est trois à quatre fois plus élevée chez les espèces basophiles. Le calcium fixé à ces sites d'échanges peut influencer la perméabilité du plasmalemmes adjacent (Bates, 1982). Koedam & Büscher (1983), Büscher *et al.* (1990) montrent une corrélation entre les CEC tissulaires et la disponibilité du Ca en étudiant les bryophytes d'une forêt belge.

Pickering & Puia (1969), Maurel-Kermarrec *et al.* (1983) étudient les cinétiques d'échanges d'ions entre l'eau et les bryophytes aquatiques *Fontinalis antipyretica* et *Platyhypnidium riparioides*. La fixation de plusieurs éléments traces métalliques chez ces bryophytes s'effectue quelques heures après le contact avec la solution, puis atteint un état d'équilibre 1 à 3 jours plus tard.

La liaison cation-paroi représente un équilibre entre la nature de l'élément et celui du ligand auquel il va se lier. Les séquences d'affinité-liaisons chimiques sont la plupart du temps déterminées avec un ligand accepteur simple, alors que la paroi comporte beaucoup de ligands potentiellement utilisables. La quantité d'un élément lié dépendra de la concentration apportée, de son affinité pour le site d'échange et du nombre total de sites d'échanges libres.

L'implication des protéines dans des mécanismes extracellulaires d'adsorption des métaux n'est pas clairement démontrée. L'expérience de Burton & Peterson (1979) met en évidence que, suite à un traitement à la pronase, la mousse libère du zinc. Cette technique

beaucoup trop invasive pour la mousse, ne permet pas de montrer que le Zn libéré provient exclusivement des protéines pariétales qui pourraient établir des liaisons avec des cations de la classe B (tab. 2).

L'acide uronique, la cellulose et les protéines contenus dans la paroi cellulaire de thalles d'hépatiques (*Conocephalum*) ont une efficacité plus grande que chez des hépatiques à feuilles (*Lophocolea*, *Bazzania* et *Plagiochila*), mais les proportions sont généralement similaires à celles des parois cellulaires d'angiospermes (Inoue *et al.*, 1981 ; Taylor & Kaufman, 1976).

III.2.2. Absorption intracellulaire

On peut donc conclure que les échanges complexes intervenant au niveau de la paroi cellulaire constituent souvent une barrière. En fait, il s'avère que celle-ci n'est pas complètement efficace contre la pénétration des éléments traces métalliques dans le protoplasme.

Déjà en 1969, Pickering & Puia évoquent trois processus successifs d'absorption intracellulaire du zinc chez *Fontinalis antipyretica* :

- une première étape, très courte, correspond à l'absorption dans l'espace libre de la membrane cellulaire ; elle n'est pas influencée par la température et la lumière ;
- une seconde étape de 90 min environ, représente la pénétration au travers de la zone externe du protoplasme ; elle est peu influencée par la lumière et la température ;
- une troisième étape, durant plusieurs jours, correspond à l'accumulation (énergie-dépendante) du zinc dans la vacuole ; elle est influencée par la température et la lumière.

Des particules contenant du plomb sont observées en microscopie électronique dans le noyau de *Rhytidiadelphus squarrosus* récolté à proximité d'une route à grande circulation en Norvège (Skaar *et al.*, 1973 ; Gullvåg *et al.*, 1974). Le transfert d'ions zinc depuis la paroi vers l'intérieur de la cellule a été démontré expérimentalement chez *Rhytidiadelphus squarrosus* par Beckett & Brown (1983). Ces auteurs concluent que la forte fixation des métaux sur la paroi n'assure pas une protection suffisante de la cellule vis-à-vis des éléments traces métalliques. L'exposition de tissus de bryophytes à une solution de CdSO₄ (Wells & Brown, 1987) entraîne un mouvement de Cd extracellulaire vers le milieu intracellulaire avec pour répercussion, une altération de l'activité photosynthétique. Le fait que cette altération survienne immédiatement après l'incubation des tissus de bryophytes dans les solutions métalliques, suppose un transport d'ions vers le cytoplasme (Haseloff & Winkler 1980).

La distribution des ions métalliques à l'intérieur des tissus des mousses est d'une importance fondamentale dans la compréhension de leur activité biologique et de leur possible toxicité. Les principaux cations basiques sont inégalement distribués entre l'intérieur de la cellule et les sites d'échanges de la paroi des sphaignes. Le potassium et le sodium interviennent en premier lieu, le calcium ensuite (Brehm, 1968). Brown & Sidhu (1992) ont travaillé sur la bioaccumulation, la localisation et l'inhibition de croissance des bryophytes à l'aide d'un modèle particulier *Rhytidiadelphus squarrosus*. Il est démontré que ce bryophyte pleurocarpe a la particularité de piéger le cadmium et de l'accumuler au niveau intracellulaire. Dans ce cas, des phénomènes de compétition entre éléments, comme le Ca, le Mg et le Cd rentrent en jeu (Cd inhibé de manière compétitive par le Ca et de manière non compétitive par le Mg). Il est également prouvé que des éléments comme le Cd et le Zn, initialement fixés sur

des sites d'échanges extracellulaires peuvent rapidement et progressivement être transférés dans le milieu intracellulaire.

La détermination de la concentration d'un élément présent à l'intérieur d'une cellule végétale nécessite que les teneurs présentes dans les autres compartiments cellulaires soient connues. Brown & Buck (1979) proposent alors la technique dite d'éluion séquentielle : dans un premier temps, un lavage initial à l'eau libère les éléments solubles intercellulaires, puis une solution d'un cation métallique (le chlorure de nickel à 0,02 M) déplace la fraction extracellulaire échangeable, un traitement à l'eau bouillante libère les fractions solubles intracellulaires par rupture de la membrane, enfin un traitement à l'acide nitrique permet une totale digestion du végétal. En ce qui concerne le lavage à l'eau, il est recommandé de procéder à plusieurs traitements et d'acidifier la solution obtenue pour permettre les dosages en spectrométrie d'absorption atomique.

Bates & Brown (1974), Bates (1982, 1987) utilisent le strontium (Sr^{2+}) comme agent déplaçant des cations de la classe A. Mais le nickel (Ni^{2+}) s'avère plus efficace pour déplacer les cations de la classe B (Brown & Beckett, 1985 ; Wells & Brown, 1987). Il est impératif que cet agent déplaçant n'interfère pas avec les éléments polluants que l'on veut identifier et ne présente pas d'effets toxiques sur l'espèce étudiée.

Ces éluions séquentielles permettent de mettre en évidence qu'en règle générale le potassium est localisé sur des sites intracellulaires alors que le Ca est souvent lié à des sites échangeables extracellulaires (Brown & Buck, 1979, 1985). Le Mg et le Zn montrent une distribution intermédiaire. La proportion des éléments trouvés sur ces deux types de sites varie selon les espèces étudiées et les conditions environnementales (Bates & Brown, 1974 ; Brown & Buck, 1979).

Beaucoup d'auteurs rapportent que la concentration en éléments varie avec l'âge des tissus des bryophytes (Rühling & Tyler, 1970 ; Bates, 1979 ; Brown & Buck, 1979 ; Lötschert & Wandtner, 1982). Cela se manifeste le plus souvent par un accroissement de la concentration en métaux de la partie jeune vers la partie plus vieille de la mousse et la base en décomposition. La technique d'éluion séquentielle a permis de montrer que chez les bryophytes pleurocarpes, le potassium concentré dans les parties apicales est surtout intracellulaire. Des données expérimentales concernant le Cd montrent de fortes teneurs de ce métal dans les segments apicaux métaboliquement actifs. L'adsorption de Cd extracellulaire est quantitativement plus élevée que l'absorption intracellulaire et augmente avec l'âge du segment. Dans certains cas, dans les segments basaux où l'activité photosynthétique est négligeable, on observe une capacité d'absorption intracellulaire élevée du Cd (Brown & Beckett, 1985). Ceci est probablement dû à l'association des microorganismes présents à la surface des parties dégénérantes de la bryophyte plutôt qu'à une activité particulière de la bryophyte (Wells, 1988 ; Brown & Bates, 1990 ; Brown & Wells, 1990). Les distributions normales de cations sont modifiées par la dessiccation. Celle-ci réduit les capacités de perméabilité sélective de la membrane plasmique si bien que lorsque des échantillons secs sont mis au contact d'une solution métallique, la libération d'éléments intracellulaires peut se réaliser. Avec plusieurs bryophytes en état de stress, les pertes potassiques dans la solution de trempage peuvent être appréciables (Brown & Buck, 1979). Cependant, une proportion de potassium se fixe à une fraction extracellulaire échangeable durant le transfert à l'extérieur de la cellule. Ceci est surtout valable pour les cations bivalents comme le Mg pour lequel on observe une forte concentration dans la fraction Ni-déplacable. Brown & Buck (1979) font reposer leur index de sensibilité à la dessiccation sur les changements de concentrations du potassium intracellulaire plutôt que sur la quantité de potassium libérée dans le milieu extracellulaire. En effet, de faibles dommages peuvent n'entraîner qu'une augmentation du K intracellulaire sans qu'il y ait de fuite vers le milieu extérieur.

Bates (1992) montre également les avantages de l'utilisation de l'élution séquentielle pour déterminer dans quels compartiments cellulaires, les cations peuvent se trouver.

D'autres techniques ont été utilisées pour localiser les métaux à l'intérieur de la cellule.

Satake *et al.* (1988) ont recherché chez *Scopelophila cataractae*, mousse considérée comme métalphyte absolu et cuprophile, la ou les localisations possibles du Cu dans les tiges et les cellules des feuilles, au moyen d'un spectromètre à fluorescence X à énergie dispersive (EDXRF). Des mousses provenant de plusieurs temples japonais ont été récoltées et analysées. Le pourcentage de Cu retrouvé dans les cellules, en particulier sur leur paroi, est de 1 à 3 % bien que les concentrations de Cu dans l'eau de ruissellement, provenant des toits des temples soient de l'ordre du ppm. La paroi cellulaire semble être la zone privilégiée de fixation des métaux et en particulier du Cu chez *Scopelophila* en comparaison avec les autres composants cellulaires. Il semblerait que le Cu ne limite pas la croissance de la mousse ni sa reproduction, en dépit des fortes concentrations toxiques de Cu retrouvées. De plus, cette mousse peut également résister à des conditions acides sévères (Noguchi, 1956 ; Nagano *et al.*, 1969). De grosses particules de cuivre n'ont pas été observées dans les cellules de *Scopelophila cataractae*, alors que de grosses particules de Hg se retrouvent au niveau de la paroi chez *Jungermannia vulcanicola* (Satake & Miyasaka 1984) ; des particules de plomb ont également été localisées sur la paroi et dans le noyau de *Rhytidiadelphus squarrosus* (Skaar *et al.*, 1973 ; Gullvåg *et al.* 1974). Autant de différences, entre la forme des composés cupriques accumulés au niveau de la paroi cellulaire de *Scopelophila cataractae* et celle d'autres formes métalliques chez d'autres espèces de bryophytes, permettent de penser qu'il y a beaucoup de mécanismes différents de bioaccumulation.

Watkinson & Watt (1992) étudient plus particulièrement la localisation de certains éléments dans les cellules de feuilles de *Sphagnum squarrosum* à l'aide d'analyses au microscope électronique à balayage par micro-sonde protonique, qui a pour avantage de mettre en évidence la distribution spatiale des éléments à différents niveaux de la cellule. Le fer est localisé dans les feuilles de cette sphaigne et les résultats concordent avec ceux de Malmer (1988) qui rapporte que des éléments comme le phosphore, l'azote, le potassium se trouvent de manière plus abondante dans les feuilles des jeunes tiges, qui ont un métabolisme plus actif dans cette partie de la mousse. Par contre, l'aluminium, le fer, le cadmium et le plomb se trouvent préférentiellement dans les feuilles des parties les plus anciennes de la tige, peut être à cause d'une accumulation passive à la surface des feuilles, alors que le Ca, le Mg et le Na sont plus uniformément distribués dans la mousse et accumulés apparemment par échange d'ions.

Une étude similaire est réalisée par Basile *et al.* (1994), qui étudient la localisation du Pb par microanalyse au microscope électronique à transmission dans les cellules et les tissus de *Funaria hygrometrica*. Le métal est ajouté dans le milieu à des concentrations allant de 1.10^{-2} à 1.10^{-4} M pendant une période d'un à trente jours. Il en résulte que si le Pb est massivement accumulé par la paroi cellulaire, il est également présent dans le cytoplasme, les chloroplastes, les mitochondries, les vacuoles et le réticulum endoplasmique. *Funaria* a donc des capacités particulières à piéger le Pb particulière dans les tissus.

III.2.3. Toxicité et tolérance des bryophytes vis-à-vis des éléments traces métalliques

Plusieurs expérimentations ont été élaborées afin de clarifier le phénomène de sensibilité des bryophytes aux éléments traces métalliques. Ces métaux sont généralement apportés sous forme de sels, seuls ou en mélange avec des nutriments, dans la solution de culture pendant une durée de quelques jours à quelques mois. Dans la plupart des études, les estimations de la diminution de la croissance sont utilisées pour l'évaluation des effets toxiques. Cependant, les changements physiologiques, tels que les teneurs en chlorophylle, la respiration ou l'activité photosynthétique, tout comme les teneurs en carbohydrates ou en lipides sont quelquefois pris en considération.

Les seuils de toxicité obtenus diffèrent considérablement entre les études selon les conditions expérimentales, les espèces utilisées, etc. En règle générale, à concentrations égales, les cations métalliques divalents présentent la séquence de toxicité suivante : $\text{Hg}^{2+} > \text{Cu}^{2+}, \text{Cd}^{2+} > \text{Pb}^{2+} > \text{Zn}^{2+}$ (Simola, 1977a ; Margot, 1980 ; Lepp & Roberts, 1977 ; Haseloff, 1979 ; Combes & Lepp, 1974 ; Klein & Bliss, 1984 ; Haseloff & Winkler, 1980 ; Brown & Whitehead, 1986). Cette séquence révèle une faible toxicité du plomb qui peut s'expliquer par la très haute affinité de cet ion pour les charges négatives de la paroi. La position du zinc dans cette séquence est justifiée par sa faible toxicité plasmatique. Les ions Hg^{2+} entraînent des désordres physiologiques à de très faibles concentrations (0,005 mM) ; à de plus fortes concentrations (0,1 mM), ils inhibent l'activité photosynthétique et la croissance (Simola, 1977b ; Haseloff, 1979 ; Brown & Whitehead, 1986). Le cuivre (Cu^{2+}) s'avère toxique dès les concentrations de 0,015 mM et exerce un effet inhibiteur de croissance aux concentrations de 0,1 mM (Simola, 1977b ; Klein & Bliss, 1984). La toxicité du plomb (Pb^{2+}) ou du (Zn^{2+}) requiert des teneurs plus élevées (entre 0,1 et 1 mM) (Haseloff & Winkler, 1980 ; Klein & Bliss, 1984 ; Haseloff, 1979).

III.2.3.1 ATTEINTES MORPHOLOGIQUES

Chez *Plagiomnium rostratum*, de fortes concentrations en ZnSO_4 (1 mM) entraînent l'apparition de nécroses foliaires, d'abord marginales puis sur l'ensemble du gamétophyte (Biebl, 1947).

Lors d'une étude dans laquelle *Pleurozium schreberi* est soumis à l'action conjuguée du plomb et d'une pluie acide, des effets à pH 3,0 sont observés dès la seconde année, alors que les plus fortes concentrations en plomb (0,005 mM) ne montrent aucun effet (Raeymaekers & Glime, 1986). Mais il faut souligner qu'au sud de la Scandinavie, par exemple, les concentrations en plomb sont cent fois plus basses qu'ailleurs et que l'espèce étudiée dans cette étude est considérée comme étant sensible à la pollution métallique.

III.2.3.2. ACTION SUR LA CROISSANCE

Le plomb tétraéthyle est un inhibiteur de l'élongation du protonéma de *Funaria hygrometrica* à partir de 0,003 mM. A 0,006 mM, on observe une réduction sévère du développement des jeunes thalles de *Marchantia polymorpha*, issus de propagules (Krupinska, 1976) ; on observe également des dégénérescences des chloroplastes.

La fréquence de bifurcation protonématale de *Hylocomium splendens* n'est pas affectée par des concentrations en Cu et en Zn 8 à 10 fois inférieures à celles du bruit de fond régional, dans le cas d'une étude à proximité d'une fonderie en Suède (Bengtsson *et al.*, 1982). Pour une concentration totale en Cu de 100 à 170 mg.kg⁻¹ et en Zn de 600 à 1 500 mg.kg⁻¹, les segments produits par *H. splendens* sont 30 % plus courts et 50 à 65 % plus légers, la biomasse étant réduite de 54 % comparée aux sites témoins. Ces concentrations en métaux sont proches du seuil de survie de la mousse (160 mg.kg⁻¹-Cu).

Basile *et al.* (1995) ont étudié de plus près les effets du plomb et de la colchicine sur la morphogenèse du protonéma de *Funaria hygrometrica*. Une étude par immunofluorescence indirecte a permis de montrer une corrélation entre les concentrations en plomb et l'altération de l'organisation du cytosquelette des cellules protonématales. Roderer & Reiss (1988) montrent que le plomb triéthyle induit le développement aberrant et le gonflement des tubes polliniques chez *Lilium longifolium*, de plus cela détruit les microtubules corticaux de manière sélective et complète. La disparition de microtubules par ce même dérivé du plomb est observée par Kandasamy & Kristen (1989) dans les cellules spermatiques de *Nicotiana sylvestris*. Par contre, le plomb inorganique n'occasionne pas ce genre d'altérations mais agit de manière prépondérante sur l'ultrastructure et la croissance de la paroi cellulaire (Roderer & Reiss, 1988).

III.2.3.3. DESORDRES PHYSIOLOGIQUES

Très peu d'informations sont disponibles sur les effets de la pollution métallique sur la physiologie des bryophytes.

Les premières études expérimentales concernent principalement les effets du Pb(NO₃)₂ sur la photosynthèse, permettant ainsi de classer les espèces selon leur sensibilité aux métaux. Winkler (1976) rapporte la séquence de sensibilité suivante pour 7 espèces forestières et prairiales : *Pleurozium schreberi* > *Scleropodium purum* > *Leucobryum glaucum* > *Rhytidiadelphus squarrosus* > *Plagiomnium undulatum* > *Dicranum scoparium* > *Polytrichum formosum*.

Un travail similaire de Haseloff (1979) donne les résultats suivants : *Rhytidiadelphus loreus* > *Rhytidiadelphus triquetrus* > *Pleurozium schreberi* > *Hylocomium splendens* > *Ptilium crista-castrensis* > *Scleropodium purum* > *Plagiomnium undulatum* > *Thuidium tamariscinum* > *Dicranum scoparium* > *Hypnum cupressiforme*.

L'étude de Haseloff & Winkler (1980) donne l'ordre suivant : *Pleurozium schreberi* > *Scleropodium purum* > *Hypnum cupressiforme*.

De ces différentes études, il ressort que c'est *Pleurozium schreberi* qui présente la plus forte sensibilité au plomb alors qu'*Hypnum cupressiforme* semble beaucoup moins affecté par cet élément trace.

Brown & Whitehead (1986) étudient l'impact du mercure sur *Rhytidiadelphus squarrosus*. Cet élément est extrêmement toxique pour les bryophytes, on le présente généralement comme bryocide. Les résultats de cette étude montrent que la photosynthèse et la respiration sont perturbées même à de basses concentrations en Hg. Quelle que soit la concentration testée, la photosynthèse est inhibée (5 µM pendant 1h). Par contre, la respiration est stimulée à une concentration de mercure supérieure à 10 µM pendant 1h. Cette stimulation n'est que temporaire puisque à l'obscurité, le taux de CO₂ décline dans le temps après une exposition à 25 µM. Si l'on s'intéresse aux teneurs en chlorophylle, celles-ci décroissent de l'apex à la base de la mousse quel que soit le type de chlorophylle a ou b et il semble que la chlorophylle a soit plus sensible au regard du ratio chlorophylle a/b au niveau apical qui passe de 3,6 à 2,5 au-delà de 17h.

Il ressort donc de cette étude que le mercure inhibe la photosynthèse, stimule temporairement la respiration, cause des pertes en chlorophylle et induit des pertes potassiques chez *Rhytidiadelphus squarrosus*. La fuite potassique semblerait être causée par l'endommagement de la membrane plasmique, tout comme le Hg peut induire des pertes en Mg intracellulaire soluble et des photosynthétats (Whitehead, 1983). Kamp-Nielsen (1971) et De Filippis (1979) considèrent également que la perte en potassium est due à une altération de la perméabilité membranaire, probablement causée par l'interaction du Hg avec des groupements sulphydryl des protéines membranaires. D'autres données provenant de Hasselhoff & Winkler (1980) indiquent la nette sensibilité de la photosynthèse au plomb qui varie néanmoins selon l'espèce et selon le métal, chez *Scleropodium purum* (selon la séquence Pb>Cd>Zn). Par contre, Brown & House (1978) mettent en évidence chez *Solenostoma crenulatum*, non seulement son caractère cupricole, mais aussi sa capacité à augmenter sa photosynthèse lorsqu'il y a présence de Cu, cet élément étant strictement nécessaire pour le bon développement de cette hépatique.

Les effets sur la photosynthèse ont été mesurés et corrélés avec la toxicité du métal étudié. Le traitement de *Rhytidiadelphus squarrosus* par une solution métallique pendant une durée de 30 min, met en évidence que l'inhibition de la photosynthèse est plus forte après 24h de stockage en atmosphère humide que celle qui est observée directement après exposition. Il est établi qu'il y a une relation linéaire directe entre la dépression photosynthétique et les concentrations en éléments traces métalliques intracellulaires (Brown & Sidhu, 1992).

Ces résultats viennent conforter les premières mises en évidence de l'action des métaux sur les bryophytes faites par Brown & House (1978) : diminution de la photosynthèse, fuite potassique, localisation des éléments traces au niveau extracellulaire et intracellulaire.

III.2.3.4. ACTION SUR LA BIODIVERSITE

Les effets combinés du SO₂ et des métaux lourds (principalement le plomb et le cuivre) ont été étudiés sur le site d'une fonderie de cuivre au Canada (Le Blanc *et al.*, 1974). La diversité spécifique en bryophytes est fonction de la distance par rapport à la source polluante : *Dicranum viride* et *Brachythecium salebrosum* sont les deux seules espèces observées à proximité immédiate de la source. *Hylocomium splendens*, *Pleurozium schreberi*, *Ptilium crista-castrensis*, *Plagiothecium roeseanum* et des hépatiques comme *Frullania eboracensis* et *Bazzania triloba* s'observent loin de la source bien que *Pleurozium schreberi* et *Hylocomium splendens* accumulent de fortes concentrations en cuivre (700 à 1 300 mg.kg⁻¹ respectivement).

On citera des études analogues faites à proximité d'une fonderie de Cu et de Zn en Suède (Folkesson, 1979b, 1983 ; Folkesson & Andersson-Bringmark, 1988). Dans ce cas précis, les émissions de SO₂ sont plus faibles que celles observées dans l'étude précédente de Le Blanc *et al.* (1974). Les auteurs relèvent une décroissance progressive du recouvrement et du nombre d'espèces de bryophytes terricoles forestières. *Pohlia nutans* est l'espèce la plus tolérante rencontrée (cette espèce est capable de supporter des concentrations extrêmes en Cu et Zn, elle survit à plus de 4 000 mg.kg⁻¹ sans aucun dommage apparent). Les bryophytes citées dans le tableau 9 sont classées selon leur tolérance aux ETM, ce sont des espèces ubiquistes et abondantes. Plusieurs d'entre elles s'avèrent être sensibles dans la zone étudiée car elles ne tolèrent que de très faibles concentrations en cuivre dans leurs tissus. Les valeurs les plus élevées enregistrées chez *Hylocomium splendens*, *Pleurozium schreberi* et *Dicranum polysetum* sont comprises entre 100 et 200 mg.kg⁻¹, et leur recouvrement décroît à partir de 80 mg.kg⁻¹.

Mousse tolérante	Assez tolérante	Assez sensible	Sensible
<i>Pohlia nutans</i>	<i>Andreaea rupestris</i> <i>Racomitrium heterostichum</i> <i>Polytrichum commune</i> <i>Pseudotaxiphyllum elegans</i> <i>Cynodontium strumiferum</i> <i>Plagiothecium curvifolium</i> <i>Plagiothecium laetum</i>	<i>Pleurozium schreberi</i> <i>Hylocomium splendens</i> <i>Dicranum scoparium</i> <i>Hypnum cupressiforme</i> <i>Brachythecium</i> sp.	<i>Ptilium crista-castrensis</i> <i>Dicranum polysetum</i> <i>Rhytidiadelphus triquetrus</i> <i>Aulacomnium palustre</i> <i>Plagiomnium affine</i>

Tableau 9 : Niveau de tolérance au Cu et au Zn de bryophytes récoltés dans une forêt de conifères de Gusum, au sud de la Suède (Folkesson, 1983 ; Folkesson & Andersson-Bringmark, 1988) (In : Tyler, 1990).

III.2.4. Variations génétiques de la tolérance

Très peu d'explications ont été présentées jusqu'à présent pour justifier un possible mécanisme de tolérance adopté par les bryophytes se développant sur des sites fortement contaminés en métaux. Certaines espèces de bryophytes adoptent une stratégie d'évitement et ne peuvent être trouvées que dans des zones faiblement contaminées, telles que *Bryum argenteum*, *Physcomitrium pyriforme* et *Dicranum scoparium* (Baker & Walker, 1990).

A partir de différentes études concernant l'absorption du Cd chez *R. squarrosus* collecté sur divers sites, il a pu être mis en évidence que selon les sites, la mousse répond différemment à l'ajout de la même quantité de Cd (Wells & Brown, 1987 ; Wells, 1988). Dans les sites contaminés en métaux, Brown & House (1978) mettent en évidence l'existence d'écotypes tolérants au cuivre chez l'hépatique *Jungermannia gracillima*. Cependant, il est prouvé que des échantillons pris à quelques mètres les uns des autres dans une zone non contaminée ont également montré des résultats différents à l'ajout de Cd.

Le contrôle génétique de la tolérance aux métaux lourds peut être polygénique (Antonovics *et al.*, 1971), ou parfois ce ne sont qu'un ou deux gènes majeurs qui semblent être impliqués (MacNair, 1977). Il est admis que des espèces ont la capacité d'élaborer des mécanismes de tolérance aux métaux lourds sur une courte période (Wu & Bradshaw, 1972), et qu'une différenciation génétique entre des espèces tolérantes et non tolérantes peut avoir lieu à travers d'extrêmement courtes distances, même s'il y a une quantité significative de flux de gènes (Antonovics, 1968 ; McNeilly, 1968, 1979).

Certaines espèces de bryophytes sont de véritables colonisatrices de milieux contaminés par les métaux. Par exemple, *Weissia controversa*, *Bryum creberrimum* et *Jungermannia gracillima* sont fréquemment retrouvés sur des sites métallifères en Europe (Ernst, 1974) et en Amérique du Nord (Shacklette, 1965a). De la même manière, *Ceratodon purpureus* et *Bryum argenteum* se développent en milieu urbain dans lequel se retrouvent des polluants comme le plomb et d'autres contaminants de l'air.

Shaw (1988) et Shaw *et al.* (1987) observent une variation de la tolérance au zinc et au cuivre chez *Funaria hygrometrica*. Ce niveau de tolérance est corrélé avec les concentrations de ces éléments dans le substrat d'origine. Des écotypes métallotolérants sont également mis en évidence chez deux hépatiques : *Jungermannia gracillima* (Brown & House, 1978) et *Marchantia polymorpha* (Briggs, 1972). Les gamétophytes de *J. gracillima* provenant d'une mine de cuivre en Grande Bretagne sont plus tolérants au cuivre que des gamétophytes provenant d'une mine de plomb. Briggs (1972) trouve que les populations urbaines de *M. polymorpha* sont enrichies en plomb et qu'elles sont plus tolérantes à cet élément que les populations de milieu rural.

Shaw (1990a) a poursuivi d'autres expérimentations sur *Funaria hygrometrica* et sur sa métallotolérance. Il estime la tolérance au Cu, Zn, Ni et Cd dans huit populations de *F. hygrometrica* récoltées sur des crassiers de mines contaminés en métaux lourds, sur des sols situés à proximité des usines de transformation, dans des régions urbaines et dans des sites ruraux non pollués. Les différences entre populations au niveau de la tolérance au Zn, Cd et Ni ne sont pas clairement reliées à la contamination du milieu d'origine. La variation de croissance entre les populations en présence de traitements aux métaux (sauf le cuivre) ne semble pas être reliée à leur tolérance aux métaux mais plutôt aux différences générale de croissance. Les populations diffèrent à plus de 400 % dans leur propension à former des tiges sur le milieu de culture de base et la formation de tiges est négativement corrélée avec la croissance des protonémas. Ceci suggère des interactions possibles entre les deux stades du développement gamétophytique. Les deux populations les plus sensibles aux métaux sont celles qui forment des tiges le plus facilement en absence de contaminants. Comparativement

Espèces	Type de tolérance	Référence
<i>Bryum pseudotriquetrum</i>	Pb, Zn	Shimwell & Laurie, 1972
<i>Calypogeia muelleriana</i>	Cu	Shacklette, 1961
<i>C. sp.</i> (sub. <i>C. trichomanes</i> anciennement)	Cu, Fe	Url, 1956
<i>Cephalozia bicuspidata</i>	Cu, Pb, Zn	Shacklette, 1961, 1965b
	Zn	Nicklasson & Söderberg, 1980
<i>Cephaloziella massalongi</i>	Cu, Fe	Persson, 1948
<i>C. phyllacantha</i>	Cu, Fe	Persson, 1948
<i>Coscinodon cribosus</i>	Acidité, sulphate	Wilkins, 1977
<i>Dicranella varia</i>	Pb, Zn	Shimwell & Laurie, 1972
<i>Grimmia atrata</i>	Cu, Fe	Persson, 1948
<i>Gymnocolea acutiloba</i>	Cu, Fe	Persson, 1948
		Shacklette, 1961, 1965b
<i>Scopelophila cataractae</i>	Cu, Zn, Pb, Fe, Ag	Schumacker & Brugés, 1991
	pH, Cu, Zn	Corley & Perry, 1985
	pH, Cu, Cd, Zn, Pb, S, ...	Sotiaux <i>et al.</i> , 1987
	Cu, Pb, Zn	Lecoite & Schumacker, 1988
	pH; Pb, Cu, Zn	Rumsey & Newton, 1989
	Cd, Pb, Zn, Cu, ...	Shaw & Beer, 1989
<i>Scopelophila ligulata</i>	Cu, Fe	Persson, 1948
	Cu, S, acidité	Noguchi, 1956
<i>S. gedeana</i>	Cu, S, acidité	Noguchi, 1956
<i>Mielichhoferia elongata</i>	Cu, acidité	Mårtensson & Berggren, 1954
	Cu, Fe, Cr	Url, 1956
	Acidité, sulphate	Wilkins, 1977
<i>M. nitida</i>	Cu, acidité	Mårtensson & Berggren, 1954
	Cu, Fe	Persson, 1948 ; Url, 1956
	Cu, Zn, Pb, acidité	Hartman, 1969
<i>Nardia scalaris</i>	Cu, Fe	Url, 1956
	Cu	Shacklette, 1961, 1965b
<i>Oligotrichum hercynicum</i>	Cu, Ni	Shacklette, 1961, 1965b
<i>O. parallelum</i>	Cu, Ni	Shacklette, 1965b
<i>Philonotis fontana</i>	Pb	Shimwell & Laurie, 1972
<i>Pleurocladula albescens</i>	Cu	Shacklette, 1961
<i>Pohlia nutans</i>	Cu	Dykeman & de Sousa, 1966
	Zn	Nicklasson & Söderberg, 1980
	Cu+Zn	Folkesson, 1983
	Metal, acidité	Webster, 1985

Tableau 10 : Espèces de bryophytes observées sur substrat présentant de fortes concentrations en cations métalliques, en sulfates et/ou une forte acidité (d'après Tyler, 1990).

aux plantes à fleurs, une vigueur généralisée et une tolérance croisée entre les métaux pourrait jouer un rôle plus important dans la capacité de *F. hygrometrica* à coloniser les sols contaminés, et les écotypes spécifiquement tolérants à un métal pourraient être moins importants.

Contrairement aux angiospermes, des écotypes métallotolérants semblent n'avoir été décrits chez les bryophytes que pour deux hépatiques : *Marchantia polymorpha* (Briggs, 1972) et *Jungermannia gracillima* (anciennement *Solenostoma crenulatum* ; Brown & House, 1978) et une mousse : *Funaria hygrometrica* (Shaw, 1988). *F. hygrometrica* forme des écotypes tolérants au cuivre, bien que la tolérance à d'autres métaux (comme le Zn et le Cd) apparaisse être principalement due à une tolérance croisée et généralement à une croissance vigoureuse (Shaw, 1990b). Cela diffère de la réponse spécifique aux métaux des plantes à fleurs. Shaw & Albright (1990) observent une absence de différenciation d'écotypes à travers des populations de *Bryum argenteum* se développant sur des sols aux concentrations en métaux très variables. De manière similaire, Longton (1981) trouve que les populations de *B. argenteum* provenant de plusieurs régions, comme Hawaï et l'Antarctique, ne diffèrent pas dans leur réponse à la température. Potentiellement, les bryophytes peuvent différer des angiospermes dans le fait qu'ils possèdent des niveaux élevés de plasticité phénotypique, plutôt que des réponses génétiques à petites échelles. Ces études se limitent plus aux observations morphologiques qu'aux variations génétiques.

III.2.5. Tolérance extrême

L'efficacité de la paroi à immobiliser les ions ETM doit être considérée comme un des mécanismes principaux de la tolérance chez les bryophytes. Cependant, il n'a pas été montré de manière convaincante que des espèces à forte CEC présentent une tolérance supérieure aux métaux.

Beaucoup de mousses et d'hépatiques sont connues pour être résistantes à des fortes concentrations en cuivre et quelquefois à d'autres métaux comme le montre le tableau 10.

Une tolérance extrême au cuivre, au zinc et au manganèse est montrée par Url (1956) chez deux espèces de *Mielichhoferia*. Cela est probablement dû à une immobilisation des métaux au niveau de la paroi cellulaire mais une réelle tolérance plasmatique est également montrée (Persson, 1948 ; Mårtensson & Berggren, 1954). Déjà, ces espèces et d'autres genres ont été décrits comme « mousses du cuivre », caractérisées par leur préférence pour des substrats cupriques et par conséquence, comme des espèces ayant une distribution disjonctive. Hartman (1969) rapporte également que plusieurs de ces espèces sont capables de supporter des conditions de sols extrêmement acides, résultant souvent d'une oxydation des sulfures.

Noguchi (1956) discute de l'écologie de *Scopelophila* (anciennement *Merceya*) au Japon et conclut que *Scopelophila ligulata* se développe même sur des sols riches en soufre près de sources chaudes ou sur des sols métallifères. *Scopelophila gedeanana* est également observée sur des sites soumis à des infiltrations d'eau provenant de toits en cuivre ou de monuments en bronze. Ces deux espèces se propagent exclusivement de manière végétative, les sporophytes étant extrêmement rares.

Shacklette (1961), étudiant l'écologie particulière d'hépatiques de landes océaniques en Alaska, conclut que ces communautés, en raison de leur tolérance au Cu, évitent ainsi le phénomène de compétition avec les plantes vasculaires. Quelques unes de ces espèces sont également trouvées sur des minerais de métaux lourds plus loin à l'intérieur de l'Alaska (Shacklette, 1965a).

Néanmoins, à partir d'une étude sur l'écologie de mousses cupricoles dans les îles Britanniques, Wilkins (1977), suggère que le cuivre (au moins en Grande-Bretagne) n'est pas le seul facteur contrôlant la distribution de ces espèces. La capacité à tolérer de très bas pH du sol et de fortes concentrations en ions sulfates est tout aussi discriminante. Des échantillons anglais de *Mielichhoferia elongata* renferment seulement 7 à 12 mg.kg⁻¹ de cuivre comme *Coscinodon cribrosus*, parfois considérée comme une « mousse du cuivre ».

De très fortes concentrations en cuivre (8 700 à 35 000 mg.kg⁻¹) sont mesurées chez *Pohlia nutans* provenant d'un marais naturellement riche en cuivre au Canada, (Dykeman & de Sousa, 1966). Le développement luxuriant de cette espèce sur des affleurements de charbon bitumé en Pennsylvanie est considéré comme ayant valeur indicatrice à la fois d'une forte concentration en métal et d'un pH très acide (2,65-2,75) dans l'eau de suintement (Webster, 1985). Cependant, près d'une fonderie en Suède, cette même espèce se développe sur sol organique riche en cuivre et en zinc, mais à pH plus élevé (6,0 à 6,5) (Folkesson, 1983).

Shimwell & Laurie (1972) concluent que les gamétophytes de mousses ectohydriques peuvent excréter des sels de métaux lourds, ce qui forme une croûte poudreuse sur les tapis de mousses pendant la période estivale. Cette croûte se dissout rapidement durant la période de pluies et le tapis muscinal reste sain. Des phénomènes similaires sont observés chez les mousses acrocarpes (*Bryum* et *Pohlia* div. sp.) se développant sur des déchets métallifères dans le centre de la Suède. Il n'est cependant pas certain que cette formation de croûtes soit le résultat d'un mécanisme d'excrétion actif. Il pourrait être le résultat de précipitations de cations métalliques transportés de manière passive par évapotranspiration.

Plusieurs mousses aquatiques sont également connues pour accumuler les métaux lourds à des concentrations appréciables sans aucun dommage apparent. Des concentrations en Pb allant de 1000 à 15 000 mg.kg⁻¹ sont mesurées dans plusieurs mousses et hépatiques de rivières polluées dans le Pays de Galles (McLean & Jones, 1975). *Scapania undulata* y est particulièrement fréquente, tandis que *Fontinalis squamosa* est considérée moins tolérante et meurt progressivement si elle est transplantée dans des sites pollués. *Jungermannia vulcanicola* provenant d'un ruisseau japonais faiblement contaminé en mercure (0,6 µg.l⁻¹), accumule HgS dans sa paroi, immobilisant le mercure sous une forme non toxique à de fortes concentrations (1 % du poids sec) (Satake & Miyasaka, 1984). *Fontinalis antipyretica* et *Cinclidotus nigricans* provenant de rivières belges et françaises supportent 1 300 à 1 900 mg.kg⁻¹ de cuivre et 5000 mg.kg⁻¹ de zinc dans leurs tissus (Empain, 1976) et *Fontinalis antipyretica* provenant du Rhin, 2 200 mg.kg⁻¹ de plomb (Dietz, 1973). D'autres exemples pourraient être présentés, mais on connaît très peu de choses sur les processus entrant en jeu dans l'immobilisation des métaux lourds ou sur la nature de l'élément apporté dans les tissus.

En résumé, il semble que plusieurs espèces de bryophytes très tolérantes aux métaux lourds puissent également apparaître sur des sols dont le pH est extrêmement bas, résultant d'une oxydation de sulfures ou d'émanations gazeuses riches en SO₂ ou en H₂S. Une acidité extrême et la présence de minéraux sulfurés sont habituellement apparentés à de fortes solubilités des métaux lourds, ce qui augmente les concentrations dans le sol. Beaucoup d'espèces sont probablement très tolérantes à la fois à une forte acidité et aux métaux lourds, en particulier pour le Cu. Un grand besoin de recherches supplémentaires se fait sentir. L'étude de la résistance plasmatique à d'autres cations métalliques devient une nécessité, principalement lorsque de très fortes concentrations sont observées.

III.2.6. Utilisation des bryophytes en biosurveillance des dépôts d'éléments traces métalliques

Les dépôts d'ETM plus ou moins continus et à grande échelle ont occasionné des dommages chez les organismes vivants. Il s'est donc vite avéré nécessaire de mettre en place des réseaux de surveillance dans le but de caractériser et d'observer les diffusions et les effets de ces polluants. Des investigations conventionnelles d'analyse des dépôts ont été menées mais très vite, ces méthodes se sont avérées très coûteuses et faiblement représentatives de la réalité car la nature hétérogène des dépôts et les difficultés analytiques ne permettent pas une analyse fiable de la situation. De nouvelles méthodes, plus simples, plus représentatives et en même temps peu coûteuses ont été mises au point (Fauth *et al.*, 1985 ; Siewers & Roostai, 1990 ; Kuik *et al.*, 1993 ; Bloemen *et al.*, 1995).

Il a été démontré à maintes reprises que les végétaux, et en particulier les bryophytes, sont de bons indicateurs pour la surveillance de la qualité de l'environnement. Les bryophytes révèlent les effets de la pollution de l'air par des changements dynamiques de populations, la manifestation de certains dommages au niveau morphologique et/ou physiologique, ainsi que par l'accumulation de certaines substances (Arndt *et al.*, 1987 ; Bargagli, 1993 ; Garty, 1993 ; Markert, 1993, 1994 ; Wittig, 1993).

Le premier à mettre en évidence la possibilité d'utiliser des cryptogames comme bioindicateurs est le lichénologue finlandais Nylander (1866). Il remarque ainsi l'effet négatif de la pollution sur certaines espèces. En effet, à la place des lichens, il observe des populations algales de *Protococcus* sp., qui se plaisent « dans un air impur ».

Wilson (1900) fut l'un des premiers à prendre en considération l'état des bryophytes pour estimer l'état de la qualité de l'air. Il déplore qu'on ne constate pas suffisamment « l'effet néfaste des fumées ». Il fait remarquer « le misérable état » de la végétation du nord de la Grande-Bretagne, où beaucoup de fumées sont produites, et « la grande diminution de l'abondance et de la luxuriance des mousses et des hépatiques aux alentours des grandes villes ».

Les principaux avantages des bryophytes comme biomoniteurs des dépôts métalliques peuvent être résumés comme suit :

- il y a généralement absence d'une cuticule et d'une mince paroi épidermique, rendant les tissus très facilement perméables à l'eau et aux minéraux, dont les ions métalliques ;
- les tissus, et en particulier les constituants de la paroi, ont de nombreux groupes chargés négativement et jouent un rôle efficace d'échangeurs de cations ;
- les nutriments minéraux proviennent principalement de la déposition sèche et humide de particules et d'ions solubles ; le substrat n'intervient pas dans la nutrition des espèces pleurocarpes et a peu d'importance pour les mousses épiphytes ; cependant, chez certaines mousses acrocarpes épigées, une absorption de métaux provenant du sol semble être possible, la plus part du temps par capillarité et ces espèces sont moins adéquates en biosurveillance ;
- la formation d'une nouvelle tige feuillée se faisant au sommet de la précédente, empêche tout contact direct ou interaction avec le sol ou le substrat ;
- chez certaines espèces (*e.g. Hylocomium splendens*), il est possible de reconnaître et de séparer les pousses annuelles, ce qui facilite la détermination de la durée d'exposition du matériel vivant utilisé en biosurveillance ;

Pays	Type de source	Références
Australie	Centrale thermique au charbon (ETM)	Godbeer <i>et al.</i> , 1986
Canada	Source ponctuelle, fonderie (ETM)	Temple <i>et al.</i> , 1981
Finlande	Source ponctuelle, fonderies (ETM)	Hynninen, 1986
	(ETM)	Vasander & Millila, 1986
Malaysia	Zone urbaine (ETM)	Low <i>et al.</i> , 1985
Finlande	Route (Pb)	Keller, 1974
	Zone urbaine (hydrocarbures aromatiques polycycliques, HAP) <i>Funaria hygrometrica</i> (dans l'eau)	Roy <i>et al.</i> , 1996
	Région industrielle (ETM)	Hynninen, 1986
Grande-Bretagne	Région industrielle (ETM)	Goodman & Roberts, 1971
	Source ponctuelle, fonderie (ETM)	Little & Martin, 1974
	Source ponctuelle (ETM)	Ratcliffe, 1975
	Une partie du Sud-Ouest du pays (ETM)	Gill <i>et al.</i> , 1975
	Source ponctuelle, fonderie (ETM)	Cameron & Nickless, 1977
	Zone minière, émission de poussières (ETM)	Davies & White, 1981
	Moss bag	Al-Radady <i>et al.</i> , 1993
France	Usine d'incinération (CI)	Gombert & Asta, 1997
Pays-Bas	Usine (HAP)	Wegener <i>et al.</i> , 1992
Portugal	Zone urbaine (ETM)	Vasconcelos & Tavares, 1998
Espagne	Cu, Pb, Zn, Cd, Fe, Mn	Santamaria & Martín, 1997

Tableau 11 : La technique des « moss bags » en biomonitoring des dépôts de xénobiotiques (d'après Tyler, 1990).

- excepté chez certaines acrocarpes, il semble qu'il y ait peu de transfert de métaux lourds entre des segments adjacents ou à partir d'une tige feuillée ancienne sur laquelle se développe une nouvelle ;
- plusieurs espèces sont très abondantes et largement distribuées (ubiquité des bryophytes) ;
- en raison de leur longévité, les bryophytes peuvent être utilisées pour intégrer les dépôts sur une durée importante, habituellement 5 ans, mais cette intégration est dépendante de l'espèce choisie et des méthodes d'échantillonnage ;
- la simplicité et le faible coût de ces méthodes sont des atouts importants en diagnostic environnemental.

Les principaux inconvénients des bryophytes comme biomoniteurs des dépôts métalliques sont les suivants :

- les meilleures espèces utilisées pour les mesures des dépôts (les tapis de mousses pleurocarpes) sont habituellement absentes dans les zones urbaines ou dans d'autres milieux perturbés ; de plus, elles sont souvent assez sensibles aux métaux lourds ainsi qu'aux fortes concentrations en SO₂ dans l'air ; une relation fiable entre les dépôts métalliques de chaque site peut être obtenue en utilisant d'autres mousses plus tolérantes quand cela est nécessaire ;
- les bryophytes indigènes sont moins adaptées pour une surveillance des dépôts sur une période inférieure à 1 an ; des techniques utilisant l'exposition d'échantillons de mousses « moss bags » ont été mises au point à cet effet (tab. 11) ;
- il peut y avoir des fuites ou des sorptions incomplètes de quelques métaux lourds (principalement le zinc et le cadmium) présentant de faibles affinités pour les ligands des tissus, par exemple une période d'exposition de 3 ans, sous conditions acides ;
- le choix des sites d'échantillonnage est très important dans le travail de biosurveillance ; cela est inhérent aux micro-variabilités locales dans les dépôts et non pas à l'utilisation des bryophytes ; dans les forêts, l'exposition des bryophytes par rapport à la canopée est importante en raison des lessivages possibles des dépôts secs ; ce problème n'a pas toujours été pris en compte dans les études de biomonitoring de routine, il est à l'origine de controverses dans l'exploitation des résultats.

III.2.6.1. LES BRYOPHYTES *IN SITU* EN BIOMONITORING PASSIF

Le biomonitoring passif est la surveillance de l'environnement, pendant une période donnée, en utilisant des espèces *in situ*, c'est-à-dire, présentes sur le lieu d'étude.

C'est dans les années 1960, que les scientifiques suédois Rühling et Tyler (1968, 1970) utilisent les bryophytes pour la surveillance des éléments traces métalliques dans l'environnement. Ils constatent que deux espèces pleurocarpes (*Hylocomium splendens* et *Pleurozium schreberi*) sont particulièrement intéressantes et présentent une bonne capacité à piéger des dépôts secs ou humides en métaux lourds.

Plusieurs revues sont disponibles à ce sujet (e.g. Tyler, 1970 ; Manning & Feder, 1980 ; Maschke, 1981 ; Martin & Coughtrey, 1982 ; Brown, 1984). Une sélection des premières études réalisées au niveau mondial est présentée dans l'annexe 1.

La grande majorité des espèces utilisées en biosurveillance ont pour particularités de puiser dans l'atmosphère les nutriments dont elles ont besoin pour vivre. La plupart d'entre

elles sont ectohydriques. Néanmoins, certains auteurs dont Markert *et al.* (1996) se sont intéressés de plus près à des espèces chez lesquelles l'absorption de l'eau et des éléments nutritifs peut se faire par des canaux internes de transpiration (espèces endohydriques), comme par exemple le genre *Polytrichum*. Ganeva (1998) utilise des bryophytes épigéiques acrocarpes comme *Ceratodon purpureus*, *Isothecium alopecuroides*, *Dicranum scoparium* et pleurocarpes comme *Pleurozium schreberi* et *Hylocomium splendens*. L'auteur établit ainsi que pour chaque espèce, les concentrations des éléments analysés suivent l'ordre suivant :

Dicranum scoparium :

Ca>Al>Fe>S>Mg>Mn>Ba>Na>Pb>Zn>Sr>Cu>Ni>Co>Cd

Isothecium alopecuroides :

Ca>Al>Fe>S>Mg>Mn>Na>Ba>Zn>Pb>Sr>Cu>Ni>Cd>Co

Ceratodon purpureus :

Ca>Fe>Al>S>Mg>Mn>Na>Ba>Zn>Pb>Sr>Cu>Ni>Cd>Co

Pleurozium schreberi :

Ca>Al>Fe>S>Mg>Mn>Ba>Na>Zn>Pb>Sr>Cu>Ni>Co>Cd

Hylocomium splendens :

Ca>Al>Fe>S>Mg>Mn>Ba>Na>Zn>Pb>Sr>Cu>Ni>Co>Cd

Un grand nombre d'études ont été publiées sur la calibration entre les mesures directes de dépôts de métaux lourds (par jauges Owen) et les valeurs obtenues à partir des bryophytes. Dans les études menées par Rühling & Tyler (1968, 1969), de fortes corrélations existent entre les taux de métaux lourds dans les mousses et ceux trouvés dans les dépôts atmosphériques. On observe, par exemple, une bonne corrélation entre les dépôts annuels (mm.an^{-1}) et les concentrations de plomb et de cuivre des mousses épigéiques de la province de Skåne au sud de la Suède. Cependant, on peut supposer que l'efficacité de rétention des tissus de mousses puisse différer selon les éléments, par exemple, une perte d'ions zinc peut sembler impossible sous des conditions contrôlées (Rühling & Tyler, 1970).

La production annuelle de biomasse diffère d'une espèce à l'autre, ce qui limite l'utilisation de plusieurs espèces simultanément dans l'estimation des dépôts. Des espèces à faible production annuelle (comme *Hypnum cupressiforme*) ont généralement de plus fortes concentrations en métaux lourds dans leurs tissus que des espèces à forte production annuelle de biomasse (comme *Sphagnum magellanicum*), en raison du changement du rapport biomasse/unité de surface.

Rühling (1985) montre que la production de biomasse annuelle chez *Hylocomium splendens* ne diffère pas significativement entre des sites de climat très différent, *e.g.* entre la Suède (climat ouest européen) et la zone subarctique de Laponie. Une production moyenne annuelle de $116 \pm 14 \text{ g.m}^{-2}$ (poids sec, 80°C) recouvre le sol à 75 %. L'auteur conclut que $150 \text{ g.m}^{-2}.\text{an}^{-1}$ de bryophytes représentent la prise minimale d'échantillonnage d'*Hylocomium splendens* que l'on doit utiliser en Scandinavie, lorsque l'on veut convertir les concentrations dosées dans *Hylocomium splendens* en dépôts. En utilisant cette valeur de $150 \text{ g.m}^{-2}.\text{an}^{-1}$ comme facteur de conversion, on peut alors établir des comparaisons entre les concentrations retrouvées dans les mousses pleurocarpes (*Pleurozium schreberi* et *Hylocomium splendens*) et les teneurs en métaux lourds des dépôts totaux en situation exposée (Tyler *et al.*, 1983 ; Rühling, 1985).

Une comparaison des teneurs en Cd, Cu, Fe, Ni, Pb, et Zn. entre jauges Owen et mousses a été réalisée par Rühling *et al.* (1987) pour le Danemark, la Suède et la Norvège. En prenant en compte tous ces éléments et le nombre élevé d'échantillons ($n=121$), on obtient

une très bonne relation linéaire ($r^2=0,95$). Les auteurs n'observent pas de grandes différences dans l'absorption et la rétention de ces 6 éléments.

Bien que de nombreux auteurs insistent sur la nécessité d'une calibration inter-espèces, on ne trouve que peu de références à ce sujet. Un des premiers essais d'intercalibration a été réalisé par Folkson (1979a). Plus récemment, Kuik & Wolterbeek (1994, 1995), puis Wolterbeek *et al.* (1995) établissent des méthodes de comparaison entre espèces de bryophytes, lorsque plusieurs taxons sont utilisés. Ceci est d'autant plus important que la méthode initiale décrite par Rühling & Tyler (1968, 1970) préconisent l'utilisation de plusieurs espèces. Mais il s'avère difficile, malgré la large répartition des bryophytes utilisées, de trouver simultanément l'ensemble de ces espèces et en quantité suffisante pour mener à bien un tel diagnostic. Ces auteurs mettent en évidence des relations entre l'accumulation par *Pleurozium schreberi* et *Brachythecium rutabulum*. Mais ces calibrations inter-espèces ne peuvent en aucun cas éviter l'utilisation de plusieurs espèces et ne s'appliquent qu'au territoire étudié. Enfin, les résultats montrent également que l'efficacité de ces calibrations n'est valable que pour des travaux menés à grande échelle. En effet, les études menées en Allemagne et en Suisse montrent que les extrapolations peuvent facilement mener à des résultats peu fiables.

Lors d'une étude sur la pollution en Suisse, Rühling & Tyler (1970) montrent qu'il n'y a aucune relation linéaire entre les concentrations retrouvées dans *Hylocomium splendens*, *Hypnum cupressiforme* et dans *Hypogymnia physodes*. Cela se comprend d'autant plus que bryophytes et lichens n'ont pas la même vitesse de croissance, que les mousses employées dans cette étude sont épigéiques alors qu'*Hypogymnia physodes* est épiphyte et qu'on utilise en même temps des organismes végétaux et fongiques. Il en résulte que les mécanismes d'absorption et d'accumulation des ETM sont totalement différents. La calibration inter-espèces introduit une nouvelle incertitude dans les données recueillies et cette variabilité inter-espèces est négligeable pour la plupart des éléments analysés. Cependant, cette variabilité inter-espèces devrait être quantifiée par rapport aux variabilités régionales lorsque des analyses utilisent plus de deux espèces de bryophytes (Halleraker *et al.*, 1998). Il ne faut pas non plus perdre de vue que ces calibrations ne sont que des extrapolations qui ne s'appliquent que dans des conditions précises d'utilisation (Wolterbeek *et al.*, 1995).

Bien qu'il soit nécessaire de multiplier les études d'intercalibration entre espèces, on peut conclure que l'accord entre les mesures des ETM dans les mousses et dans les jauges est bon, voire très bon, au moins dans le cadre d'études régionales. A grande échelle, la variabilité est certainement plus grande, en raison des microvariations des dépôts.

III.2.6.2. TRANSPLANTS DE BRYOPHYTES VIVANTES : BIOMONITORING ACTIF

Le biomonitoring actif est la surveillance de l'environnement, pendant une période donnée, à l'aide d'espèces provenant d'un autre endroit que le site étudié. La technique des transplants est utilisée pour estimer la qualité globale de l'air dans une zone ou une région donnée ou bien pour estimer, comme dans le cas du biomonitoring passif, des dépôts atmosphériques de polluants.

Arnold (1891-1901) a, le premier, l'idée de réaliser des expériences de transplantation. Il constate que des bryophytes et des lichens venant d'une région où l'air est « pur » et qui sont ensuite transportés dans la ville de Munich, meurent peu de temps après.

Pilegaard (1979) rapporte que Brodo en 1961 a mis au point une technique de transplants, à base de lichens et de mousses, placés sur des troncs, pour estimer les effets du dioxyde de soufre. Le Blanc et Rao (1966, 1973) ont repris cette technique en essayant de corrélérer les dommages causés aux mousses et aux lichens avec des valeurs moyennes de concentrations en SO₂. Désormais, il est clair que ce genre d'études ne peut plus être mené à cause du trop grand nombre de polluants et des faibles concentrations dans l'atmosphère. Pilegaard (1979) a mené une étude de ce type au Danemark en transplantant un lichen (*Hypogymnia physodes*) et une mousse (*Dicranoweisia cirrata*) tous deux épiphytes. La plupart du temps, les bryophytes employées dans des études de biomonitoring actif sont des bryophytes épiphytes, laissées en l'état sur leur substrat et placées dans le lieu d'étude.

Goodman & Roberts (1971) introduisent des bûchettes d'*Hypnum cupressiforme* dans une zone industrielle du Pays de Galles. Le transplant meurt après quelques semaines, mais il continue à accumuler les métaux. Pilegaard (1979), au Danemark, utilise *Dicranoweisia cirrata*, une espèce résistant à la fois à la dessiccation et aux polluants. Il trouve que les teneurs en métaux dans la bryophyte sont corrélées linéairement avec ceux des dépôts atmosphériques. La même espèce est transplantée dans différents sites danois et montre une accumulation continue du plomb, tandis que celle du cadmium est plus variable (Johnsen *et al.*, 1983).

Hazell & Gustafsson (1999) évaluent les techniques de conservation des transplants de lichens épiphytes (*Lobaria pulmonaria*) et de bryophytes (*Antitrichia curtipendula*, espèce pleurocarpe). Ils observent que la bryophyte a une vitalité beaucoup plus grande que le lichen surtout en milieu forestier. Cette étude montre bien qu'il faut faire très attention au choix des espèces utilisées, à leur écologie, à leur exposition et à leur durée d'exposition. En effet, certaines espèces sont plus tolérantes que d'autres à la lumière, à la sécheresse. Leur physiologie et leur morphologie peuvent différer en fonction de ces variables abiotiques et une compétition inter-espèces peut être observée si les espèces sont trop différentes les unes des autres (Van der Hoeven, 1999).

III.2.6.3. EXPOSITION D'ECHANTILLONS DE BRYOPHYTES STANDARDS : LA TECHNIQUE DES « MOSS BAGS »

Dans la technique du moss bag, on utilise des mousses séchées à l'air sec, parfois prétraitées et contenues dans un sac de nylon. Ce mode d'utilisation des bryophytes a été introduit par Goodman & Roberts en 1971, en Grande-Bretagne. Plus tard, d'autres auteurs utilisent les sphaignes, souvent prétraitées afin d'éliminer tout dépôt d'éléments traces métalliques à la surface du gamétophyte. On trouvera des revues détaillées de la technique des moss bags dans les publications de Little & Martin (1974), Ratcliffe (1975), Temple *et al.* (1981) et Brown (1984).

Un type particulier de moss bags est mis au point par Al-Radady *et al.* (1993) : un dispositif par capillarité permet l'alimentation de la mousse en éléments essentiels et en eau. Les moss bags sont placés à plat, protégés de la pluie par une feuille de perspex de 500 mm, et exposés aux vents pendant 4 semaines. Les auteurs comparent 5 moss bags irrigués et 5 autres non irrigués. Les plus fortes concentrations sont mesurées dans les moss bags irrigués. Les auteurs concluent que les moss bags habituellement utilisés (non irrigués) sous-estiment les taux en ETM.

Les moss bags peuvent être intéressants pour des niveaux d'expositions connus mais doivent être utilisés avec précaution lorsque l'on veut quantifier cette pollution. L'espèce, la densité, la taille, la vitalité, le traitement subi ou non et la voie d'exposition semblent être des

éléments importants à prendre en compte lors de l'interprétation des résultats. Le temps d'exposition ne devrait pas dépasser un mois dans les zones à fortes contaminations.

Les principaux avantages de la technique des moss bags sont : une exposition uniforme et bien définie, une flexibilité dans le choix du site, une plus grande efficacité dans la récolte des mousses par rapport aux études menées *in situ*.

Néanmoins, cette technique présente quelques inconvénients comme une possible perte d'échantillons, une altération des bryophytes par des moisissures ou des bactéries.

Une standardisation paraît nécessaire si on souhaite obtenir l'estimation des ETM en valeur absolue et que les résultats soient exploitables.

IV. LES CULTURES DE BRYOPHYTES

Les bryophytes constituent un matériel pratique et intéressant pour des études de laboratoire concernant l'écologie, la physiologie, la génétique ou la taxonomie. Afin d'obtenir un matériel standardisé, c'est-à-dire un matériel dont nous connaissons la provenance ainsi que les spécificités génétiques, physiologiques et morphologiques, nous nous sommes intéressés aux différentes méthodes de mise en culture des bryophytes.

Corradini (1996) a réalisé une revue bibliographique critique et complète des différentes méthodes utilisées permettant de choisir la méthodologie la plus adaptée à la problématique posée.

Le gros inconvénient des cultures de bryophytes est que l'ensemble de ces méthodes de cultures *in vitro* ou semi-naturelles sont très peu utilisées. D'après Lal (1984) les premières cultures débutent en 1885 par les travaux de Vochtin, puis ceux de Goebel en 1908 et Lang en 1909, pionniers des cultures axéniques. Dans sa revue, Geldreich (1949) attribue les premiers liquides nutritifs pour bryophytes à Marchal & Marchal en 1906 et Drachnowski en 1907. Mais, malgré des débuts précoces, les bryologues restent réticents à l'emploi des cultures car elles sont coûteuses en temps (Shaw, 1987b); mais le temps consacré dépend de la méthode utilisée et nous verrons un peu plus loin que certaines méthodes semi-naturelles sont plus rapides que les méthodes strictement axéniques *in vitro*. Les techniques sont également difficiles à réaliser d'après McQueen (1991). La méthode de culture classique faisant appel aux techniques microbiologiques de stérilisation, nécessite de produire des milieux de culture et des substrats stériles, de stériliser la surface des propagules et de réaliser un ensemencement dans les mêmes conditions (Shaw, 1987b). Les contaminations fongiques et algales restent un handicap (Shaw, 1987b) qui ruine parfois tous les efforts demandés par les techniques de culture *in vitro*. La morphologie peut être perturbée par les conditions de culture. Sur substrat gélosé, les tiges feuillées se développent parfois anormalement (Ward, 1964). De plus, sur la gélose, le repiquage est nécessaire pour avoir des pieds feuillés (Bell, 1980). Lorsque la culture dure plusieurs mois, sur le substrat d'origine, Richards (1947) observe que le développement de cyanobactéries peut entraîner une surcroissance des gamétophytes. Lal (1984) confirme une action positive de certaines bactéries et moisissures sur la germination des spores. Enfin, il est difficile de trouver des méthodes standardisées.

Corradini (1996) classe les méthodes de culture de bryophytes selon quatre grands types en fonction du substrat.

L'utilisation de substrats souples, comme le papier utilisé par Berrie (1951), et la fibre de verre (Geldreich, 1949) permettent de travailler sur un substrat inerte, stérilisé ou non, qui sert de support d'ancrage pour des espèces aériennes cultivées de façon hydroponique. Berrie (1951) roule une bande de papier qu'il place à l'intérieur d'un tube à essais contenant un peu d'eau. Les échantillons de mousses sont placés à l'intérieur du tube sur le papier. Le tube bouché est exposé à la lumière du jour. L'espèce se développe sans infections algales ou fongiques en atmosphère saturante. Miller & Ambrose (1976) disposent des disques de papier filtre en boîtes de Pétri.

Les substrats gélosés sont réalisés en boîte de Pétri. Tout le matériel est stérilisé, mais cette méthode présente l'inconvénient majeur d'utiliser un substrat, qui est également employé pour la culture d'êtres hétérotrophes, qui peuvent être parasites des cultures de bryophytes. Cette méthode est intéressante si l'on démarre à partir d'une spore que l'on essaie de faire germer. Il faut utiliser des capsules mures stockées au sec présentant le moins de perte de viabilité (Bell, 1980). Leur désinfection par trempages successifs dans des solutions

stérilisantes (habituellement des composés chlorés) puis dans l'eau distillée stérile augmente encore les chances de succès. L'extraction de la capsule se fait à l'aide d'aiguilles stériles et les spores sont récupérées en milieu liquide. Basile (1964) réalise l'ensemencement de son milieu par injection à l'aide d'une seringue.

Les substrats liquides permettent uniquement la culture axénique de bryophytes. Cette culture n'est maintenant réalisée que dans des récipients équipés de filtre à air et contrôlés en lumière, température et pH (Naef & Simon, 1978). Un liquide nutritif est passé en autoclave, puis mis dans le fermenteur qui est hermétiquement clos. L'ensemencement se fait à partir de spores ou de fragments bryophytiques stériles.

Enfin, les substrats particuliers, qu'ils soient naturels (terre d'origine, Richards, 1947), ou artificiels (vermiculite, Proskauer, 1969), sont stérilisés avant d'être utilisés, ce qui réduit de façon importante les contaminations fongiques ou bactériennes, mais aussi l'infestation parasitaire des cultures par d'autres bryophytes (Shaw, 1986).

Cette méthode de culture permet d'utiliser des fragments bryophytiques signalés comme propagules naturelles par Miller & Ambrose (1976). Cet important pouvoir de régénération permet l'obtention de matériel végétal plus rapidement qu'avec les spores. La méthodologie concernant la culture à l'aide de fragments est due à Shaw (1986). Il prélève des gamétophytes entiers dans la nature, les lave à l'eau distillée, les dessèche trois jours à l'étuve pour enlever les particules de terre restante, puis il broie en une fine poudre. La régénération est possible à partir d'un gamétophyte entier, mais elle est fortement dépendante de la taille des fragments (Gay, 1970 ; Brown 1982). Le broyage facilite donc la régénération.

Shaw a plusieurs fois utilisé cette méthode afin de mettre en évidence l'adaptation possible de certaines mousses comme *Ceratodon purpureus* ou *Funaria hygrometrica* à la contamination des sols en métaux. Pour cela il a comparé deux méthodologies de culture, la première en pot avec du sol contaminé en métaux et en surface la poudre de mousse finement broyée. L'ensemble de ces pots a été mis en chambre phytotronique à une température de $27^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ et une photopériode de 13h. Après trois mois de culture, chaque pot a été examiné sous une loupe binoculaire. La seconde expérimentation a été réalisée à l'aide de gélose à base d'agar. Cette fois les gamétophytes ont été stérilisés à l'alcool 30° et rincés à l'eau distillée. Lors de cette étude, des gammes de milieux contaminés ont été mises en place afin d'observer l'inhibition de croissance due aux métaux.

Shaw a également beaucoup travaillé sur la tolérance en métaux de certaines mousses, ainsi que sur la mise en évidence d'écotypes particuliers de bryophytes résistant aux fortes concentrations en éléments traces métalliques (voir chapitre III).

Chaque fois, il a utilisé la méthode se rapprochant le plus des conditions naturelles.

D'autres problématiques apparaissent lorsque nous voulons utiliser une mousse et obtenir un matériel végétal standardisé. En effet, il est important de savoir à quelle période de l'année il faut récolter les échantillons de manière à mettre tous les atouts de son côté. D'après la littérature, les conditions précises de température, d'humidité, les durées d'arrosages et le mode d'arrosage ne sont pas clairement indiqués. Lorsque nous travaillons sur un substrat artificiel, il faut pourvoir le milieu en éléments nutritifs et dans ce cas l'apport en eau est effectué en même temps que les sels minéraux, mais lorsque nous travaillons avec un substrat naturel, il est indispensable de connaître la fréquence des arrosages et leur quantité. Néanmoins, Richards (1947) disait que les besoins exacts de chaque espèce ne peuvent être appris que par l'expérience.

D'après Corradini (1996), les méthodes les plus employées sont celles utilisant un substrat particulaire ou un substrat gélosé.

La méthode reposant sur l'utilisation de gélose est de loin la plus employée mais également la plus critiquée, car, outre les difficultés méthodologiques (Shaw, 1986) dues à leur caractère axénique, les cultures sur milieux liquides posent le problème majeur du maintien des cultures pendant de longues périodes (Basile, 1964). La gélose a une tendance naturelle à se dessécher ; le substrat s'appauvrit, ceci induisant des carences en certains ions ; le gamétophyte s'ancre difficilement sur la gélose, enfin la conservation de la stérilité est extrêmement difficile. Malgré ces difficultés il ne semble pas y avoir de meilleure méthode pour étudier et observer facilement la germination des spores et le protonéma (Kofler, 1959). Mais surtout, c'est une des rares techniques qui permette de contrôler l'origine génétique du matériel étudié en utilisant une spore d'origine connue.

Les méthodes sur substrat naturel ou particuliers sont comparativement plus simples. Elles cherchent toutes à imiter au mieux les conditions naturelles en suivant en ce sens les recommandations de leur initiateur Richards (1947). Elles ne demandent pas une stérilité absolue, ce qui facilite leur mise en place. Elles n'empêchent pas de réaliser une stérilité partielle en passant à l'autoclave le récipient de culture et le substrat, favorisant ainsi le démarrage de la culture au moment où elle est le plus fragile. Leurs principaux avantages résident dans le faible degré d'artificialisation des substrats employés.

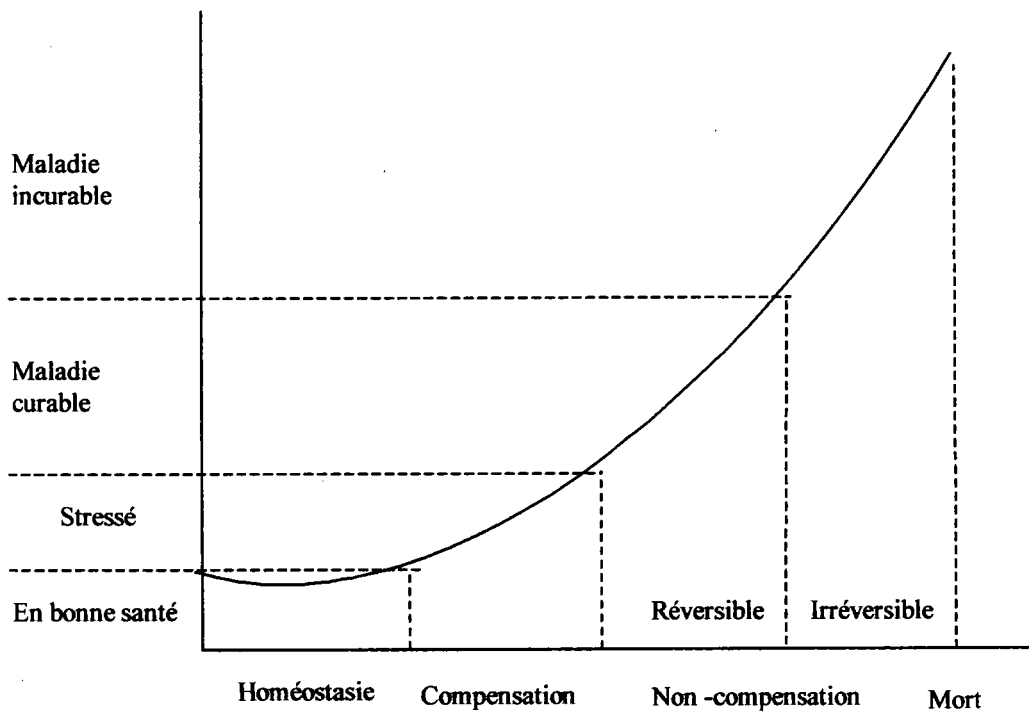


Figure 8 : Échelle des statuts physiologiques d'un organisme permettant de distinguer trois principaux états : l'état sanitaire optimal régi par des mécanismes d'homéostasie, le stress nécessitant la mise en place de mécanismes de compensation pour revenir à l'état précédent et le dernier stade étant la pathologie. Celle-ci est soit curable et nécessite des mécanismes de réparation, soit incurable et aboutit à la mort de l'organisme (d'après Depledge *et al.*, 1993).

V. IMPACTS CELLULAIRES DES ELEMENTS TRACES CHEZ LES BRYOPHYTES

Les polluants et en particulier les éléments traces métalliques (ETM) provoquent certains dommages à différents niveaux d'organisation biologique depuis les populations et/ou les communautés (biocénoses) jusqu'aux différents constituants cellulaires. Tout dommage observé pourrait donc servir pour établir un diagnostic de qualité des milieux naturels. La plupart du temps, ce diagnostic repose sur la recherche et le dosage de substances toxiques dans l'ensemble ou dans une partie d'une ou des espèces sentinelles choisies. Actuellement, les recherches s'orientent de plus en plus vers des paramètres d'exposition précoce qui se modifient en fonction du stress subi par l'organisme. En ce qui concerne les éléments traces métalliques (ETM), on privilégie la mise en évidence d'un stress oxydant induit pour des espèces réactives de l'oxygène (ERO).

Nous allons présenter une mise au point bibliographique sur les notions de biomarqueurs de stress et sur les différents types d'espèces réactives de l'oxygène. Nous présenterons le lien entre le stress oxydant et les éléments traces métalliques et nous verrons qu'il existe certains mécanismes de défense chez les végétaux supérieurs, les algues et les bryophytes.

V.1. DEFINITIONS DES BIOMARQUEURS DE STRESS

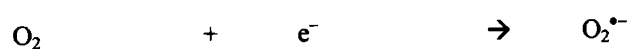
L'utilisation du terme biomarqueur chez les bryophytes est pratiquement inexistant dans la littérature, pourtant le concept est ancien et assez bien établi.

Blandin (1986) est le premier à intégrer la notion de biomarqueur dans sa définition du terme de bioindicateur : « Un indicateur biologique (ou bioindicateur) est un organisme ou un ensemble d'organismes qui par référence à des variables biochimiques, cytologiques, physiologiques, éthologiques ou écologiques, permet de façon pratique et sûre de caractériser l'état d'un écosystème ou d'un écosystème et de mettre en évidence aussi précocement que possible leurs modifications, naturelles ou provoquées ». La notion de biomarqueur rentre parfaitement bien dans cette définition puisqu'elle prend en considération les réponses biologiques, biochimiques ou physiologiques d'organismes vivants soumis à un polluant. Le biomarqueur peut donc aller de la simple liaison ligand-récepteur au niveau cellulaire, jusqu'aux effets sur un individu entier. Le « National Research Council » (1987) présente une première définition : « variation inductible par les polluants de composants ou de processus, structures ou fonctions cellulaires ou biochimiques qui peut être mesurée dans un échantillon ou un système biologique ». Ce sont surtout Koeman *et al.* (1993) qui parlent de biomarqueurs en tant que « modifications d'une réponse biologique pouvant être mise en relation avec une exposition et/ou un effet toxique d'un polluant ». Enfin, selon Lagadic *et al.* (1997), « un biomarqueur est un changement observable et/ou mesurable au niveau moléculaire, biochimique, cellulaire, physiologique ou comportemental, qui révèle l'exposition présente ou passée d'un individu à au moins une substance chimique à caractère polluant ».

De nombreuses classifications de biomarqueurs ont été proposées. La plus largement utilisée est celle qui distingue trois grands types de biomarqueurs :

Réactions d'initiation :

1. Réactions d'oxydo-réduction (enzymatiques ou non)



2. Réaction photodynamique

**Réactions de propagation :**

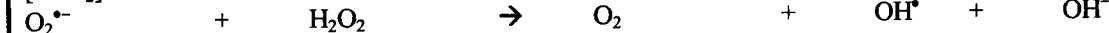
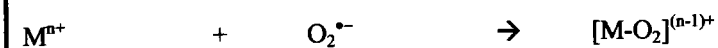
3. réaction d'Haber-Weiss



4. réaction d'Haber-Weiss catalysée par des métaux



5. Réaction d'Haber-Weiss catalysée par des métaux complexés



6. Réaction organique de Fenton

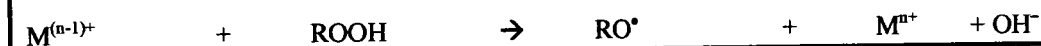


Tableau 12 : Principales voies de formation des espèces réactives de l'oxygène (ERO) *in vivo* (d'après Saran *et al.*, 1988).

- les biomarqueurs d'exposition sont ceux qui indiquent l'exposition d'un organisme à un polluant mais qui ne donnent pas d'information sur les effets toxiques ou non chez ces organismes ; comme exemples, nous pouvons citer l'induction de phytochélatines chez la pomme de terre soumise au cadmium (Stroinski & Zielezińska, 1997), l'induction d'enzymes (peroxydases, enzyme malique, isocitrate deshydrogénase, glucose-6-phosphate deshydrogénase...) lors de fortes concentrations en métaux dans les premières feuilles de haricot (*Phaseolus vulgaris*) (Van Assche *et al.*, 1988)... ;
- les biomarqueurs d'effets, ou plus exactement d'effets toxiques, sont ceux qui indiquent qu'un organisme a subi des dommages pathologiques et a émis des réponses biologiques suite à l'exposition à des toxiques ;
- les biomarqueurs de susceptibilité qui donnent des indications quant aux rôles des variations génétiques dans les réponses toxiques enregistrées (Timbrell *et al.*, 1994 ; Lagadic & Caquet, 1996).

Les expérimentations en conditions contrôlées ont largement démontré que les biomarqueurs peuvent être utilisés pour la surveillance de la qualité des milieux naturels. Les biomarqueurs sont en effet des éléments de l'évaluation biologique dans la mesure où ils peuvent fournir des informations sur l'état de santé des individus. Cependant, les liens entre les phénomènes observés à ces différentes échelles restent encore à établir dans la plupart des cas.

La notion de biomarqueur est directement liée à l'état physiologique de l'organisme étudié. Le changement de l'état de santé d'un individu soumis à une exposition croissante face à un polluant présentera trois états principaux (fig. 8). Un polluant aura des conséquences néfastes pour l'organisme à partir du moment où l'ensemble des mécanismes de réparation, opérant à tous les niveaux biologiques, auront été dépassés. Le stade final de ces dommages sera la perte totale de l'intégrité de l'individu et/ou d'un groupe d'individus ainsi que la perturbation de la structure même de la biocénose et/ou de l'écosystème dont il fait partie intégrante. L'utilisation de biomarqueurs pour le suivi de la qualité des milieux procure, comparativement aux méthodes de biomonitoring, 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, passant du niveau infra-individuel au niveau de l'écosystème (Amiard *et al.*, 1997). Si nous voulons pouvoir établir des diagnostics précoces d'exposition d'organismes à des polluants, l'emploi de biomarqueurs intervenant au niveau infra-individuel sera nécessaire (Van Gestel & Van Brummelen, 1996).

Le stress est donc un état de perturbation de l'homéostasie mettant en jeu des mécanismes de compensation. Il existe de nombreux types de stress qui ont principalement pour conséquences d'occasionner des réactions d'oxydation. Le stress oxydant résulte d'un déséquilibre entre les systèmes pro-oxydants et anti-oxydants en faveur des premiers et est une source d'effets toxiques potentiels (Sies, 1991 ; Bartosz, 1997). Le stress oxydant va donc provoquer la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) qui auront un impact direct au niveau cellulaire et qui sont, selon Halliwell (1987), synonymes de dommages.

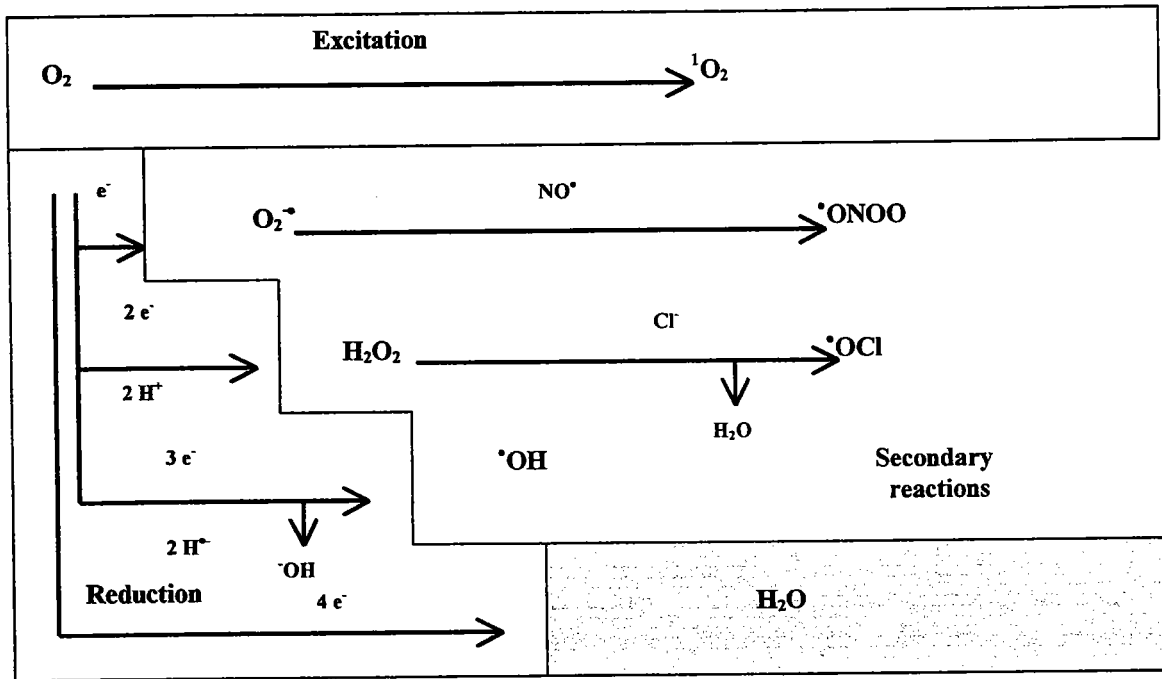


Figure 9 : Principales espèces réactives de l'oxygène (ERO) formées chez les organismes vivants (d'après Bartosz, 1997).

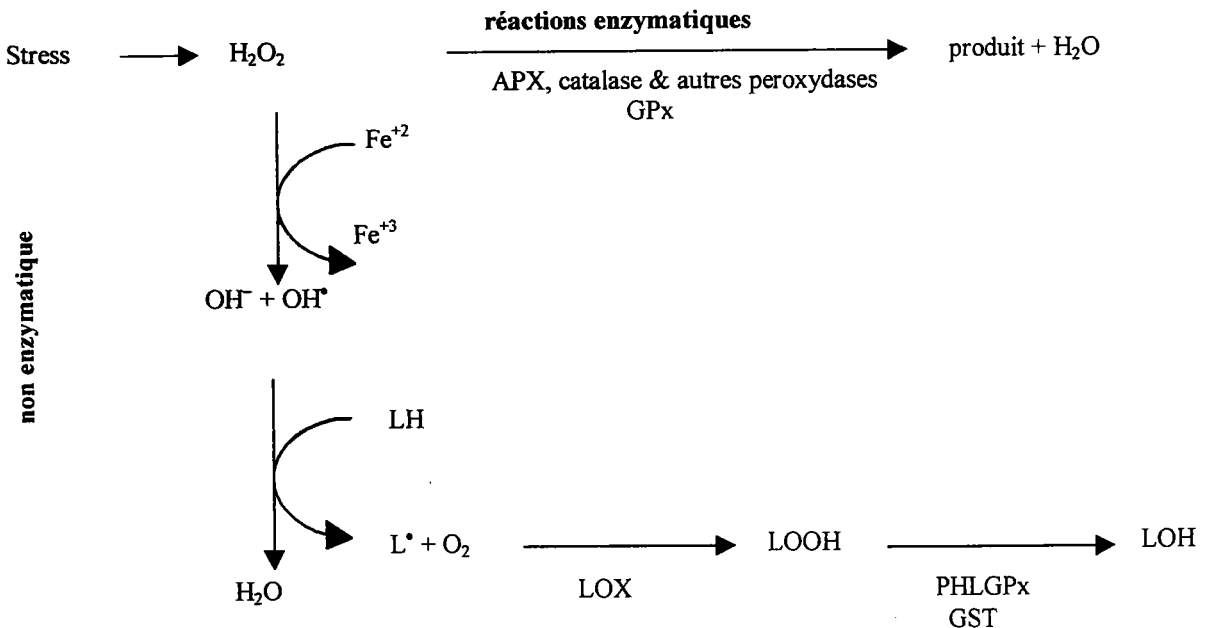


Figure 10 : Voie d'activation des ERO chez les plantes sous l'effet d'un stress induisant un excès d' H_2O_2 (LH, acides gras; L^{\cdot} , radical acide gras; LOOH, lipide hydroperoxyde; LOH, lipide hydroperoxyde réduit; LOX, lipoxygénase; GST, glutathion transférase; PHLGPx, phospholipide hydroperoxyde glutathion peroxydase) (d'après Eshdat *et al.*, 1997).

V.2. GENERALITES SUR LE STRESS OXYDANT ET LES ESPECES REACTIVES DE L'OXYGENE (ERO)

La vie a commencé en absence d'oxygène avec les cellules procaryotes. Pourtant, environ un milliard d'années après l'apparition de ces organismes, l'oxygène est apparu, produit de l'activité photosynthétique des premières algues. L'adaptation de ces organismes vivants dans ces conditions aérobies a été telle que de nombreux systèmes biologiques sont devenus totalement dépendants de l'oxygène. L'oxygène et les espèces réactives qui en dérivent sont paradoxalement toxiques pour les êtres vivants. La toxicité de l'oxygène est liée à sa forte affinité électronique, produisant une variété d'intermédiaires potentiellement endommageants que sont les espèces réactives de l'oxygène (ERO). La théorie selon laquelle la toxicité de l'oxygène passe par la formation de radicaux libres a été proposée par Gerschman *et al.* en 1954. Ce terme de ERO est un terme collectif qui décrit à la fois les radicaux de l'oxygène ($O_2^{\bullet-}$, OH^{\bullet} , ROO^{\bullet} , RO^{\bullet}) et ses dérivés non-radicalaires (H_2O_2 , $HOCl$, O_2 singulet, O_3) (fig. 9). Ces 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 $O_2^{\bullet-}$ (Halliwell & Gutteridge, 1989 ; Pré, 1991 ; Rice-Evans *et al.*, 1991). 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 sont capables de causer des dommages, permanents ou transitoires, aux protéines, lipides et acides nucléiques. Pour répondre à ces dommages, divers composés qualifiés d'anti-oxydants sont synthétisés au niveau cellulaire. Ce sont certaines de ces molécules anti-oxydantes qui seront utilisées comme biomarqueurs de stress oxydant.

V.2.1 Les espèces réactives de l'oxygène (ERO)

Selon Saran *et al.* (1988), les réactions les plus importantes pour expliquer la formation de radicaux libres *in vivo* sont présentées dans le tableau 12 et font intervenir différents types d'espèces réactives de l'oxygène.

L'ANION SUPEROXYDE $O_2^{\bullet-}$, probablement le plus connu des oxy-radicaux, est formé par la réduction univalente de l'oxygène moléculaire ou à partir de l'oxygène singulet. Dans le règne végétal, lorsque l'énergie lumineuse qui arrive sur la molécule de chlorophylle est trop importante, l'énergie d'excitation peut être transférée directement à l'oxygène pour donner l'oxygène singulet qui lui-même peut induire l'anion superoxyde. Les métaux de transition tels que le fer ou le cuivre ont souvent des électrons non appariés et sont d'excellents catalyseurs de la réduction de l'oxygène avec la formation d'anion superoxyde : $Fe^{II} + O_2 \rightarrow Fe^{III} + O_2^{\bullet-}$. L'anion superoxyde peut être produit lorsque des quinones, composés électrophiles, sont réduites en semiquinones par transfert d'électron au niveau des flavoprotéines (Cadenas, 1989). Il est également formé au cours de processus physiologiques par les cellules phagocytaires pour la destruction des particules étrangères et des complexes immuns (Babior, 1978).

Formé essentiellement au niveau des membranes biologiques (Gutteridge & Halliwell, 1993), il n'est pas l'oxy-radical le plus réactif, mais peut endommager les structures cellulaires. Très stable en milieu non-aqueux, il contribue à la destruction des phospholipides membranaires par attaque nucléophile des liaisons esters entre les acides gras et le glycérol.

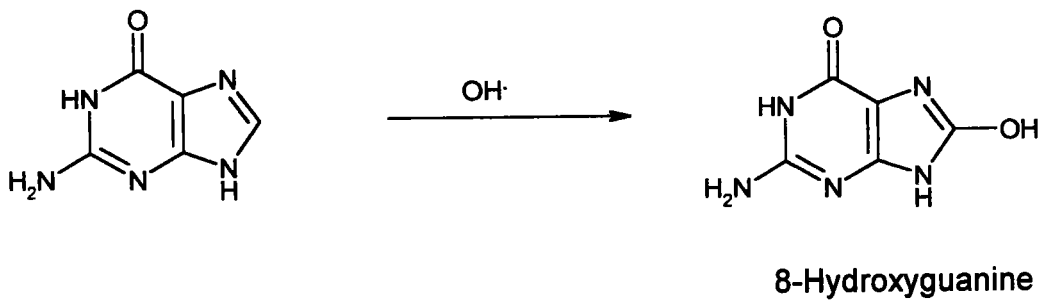
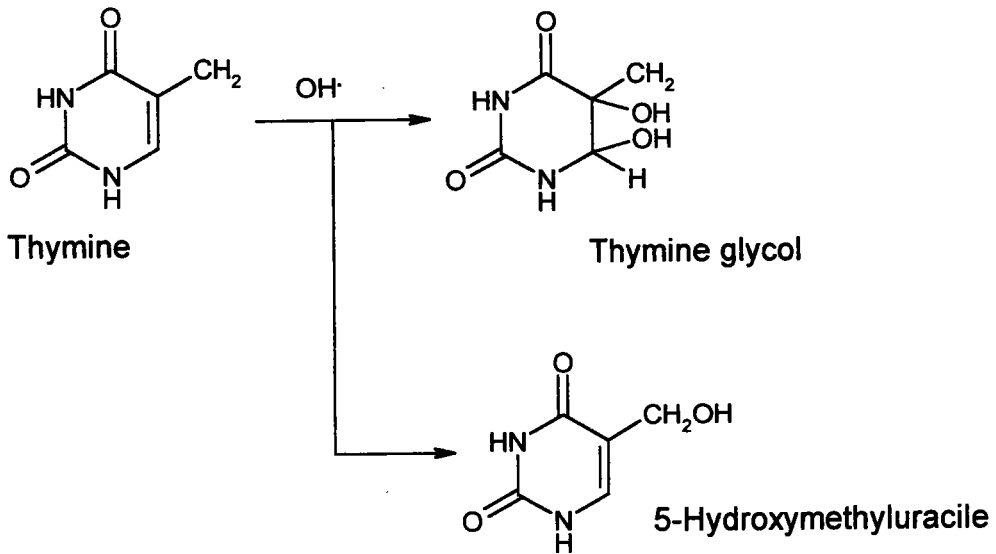


Figure 11 : Exemple de deux produits formés par l'attaque du radical $\text{OH}\cdot$ sur les bases de l'ADN.

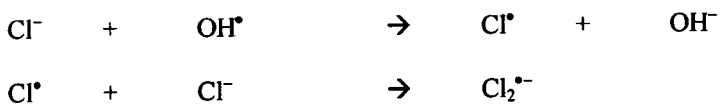


Figure 12 : Exemple de réaction dite de transfert d'électron.

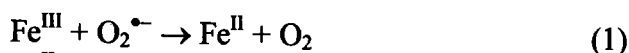
L'anion superoxyde peut se dismuter en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en milieu acide. A pH neutre, sa dismutation est catalysée par la superoxyde dismutase (SOD, E.C. 1.15.1.1) (Fridovich, 1975).

Il peut également servir de précurseur pour la formation d'autres espèces radicalaires beaucoup plus nocives : (1) lors de sa protonation, avec formation du radical hydroperoxyde (HO_2^\bullet) particulièrement toxique, (2) en réagissant avec H_2O_2 pour générer une molécule d'oxygène singulet (1O_2).

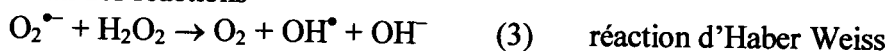
LE PEROXYDE D'HYDROGENE H_2O_2 est formé par dismutation de l'anion superoxyde et par addition d'un second électron et de deux protons, la SOD étant le catalyseur. La catalase (CAT, E.C. 1.11.1.6) intervient pour produire de l'eau et de l'oxygène à partir de H_2O_2 .

Modérément réactif, c'est un important oxydant des thiols et du pyruvate (Halliwell & Gutteridge, 1989). Il diffuse facilement au travers des membranes hydrophobes à cause de son état non ionisé et non chargé. Il participe à la production d'espèces très réactives comme le radical hydroxyle (OH^\bullet) (fig. 10) et son action est plus importante comme initiateur de la formation des radicaux libres plutôt qu'en tant qu'espèce réactive propre (Yu, 1994) et peut former des adduits à l'ADN (i.e. composés s'additionnant à une molécule d'ADN).

LE RADICAL HYDROXYLE OH^\bullet , est produit par choc thermique, par radiations ionisantes ou par réaction de type Fenton (1894) *in vitro* en présence de métaux de transition sous forme réduite et d' H_2O_2 comme précurseur. La première étape consiste en la réduction du métal (fer ou cuivre) par l'anion superoxyde (1), la deuxième étape fait intervenir le peroxyde d'hydrogène par une réaction de Fenton (2), le bilan de la réaction est appelée réaction d'Haber-Weiss (3) :



Bilan des réactions



Cette réaction dépend bien évidemment de la disponibilité des métaux de transition à l'état libre et surtout du fer et du cuivre qui sont les éléments les plus actifs, probablement à cause de leur abondance dans les systèmes biologiques. En présence de composés chélateurs de métaux comme la ferrioxamine dans le cas du fer (Fe^{III}), la réaction d'Haber-Weiss est inhibée et la production d'ions hydroxyles supprimée. Par contre, elle peut avoir lieu en présence de Fe^{III} -EDTA (McCord & Day, 1978) et d'autres chélateurs physiologiques comme l'ATP et l'ADP (Gutteridge & Halliwell, 1993).

Le radical hydroxyle est extrêmement réactif. Il est faiblement diffusible et réagit avec les premières cibles cellulaires rencontrées. Il peut attaquer tout type de constituants :

- par addition sur la molécule cible, comme dans le cas des bases puriques et pyridiques des acides nucléiques (fig. 11) ;
- par élimination d'un atome d'hydrogène, ce qui peut initier la lipoperoxydation des acides gras insaturés et la dégradation des acides aminés ;
- par transfert d'électrons (fig. 12) (Yu, 1994).

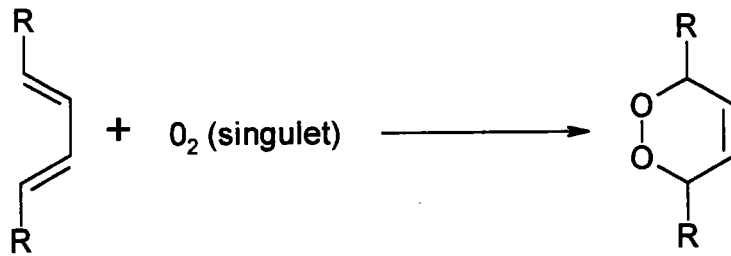


Figure 13 : Composés à doubles liaisons conjuguées comme les carotènes et les chlorophylles réagissant avec l'oxygène singlet pour produire des endopéroxydes.

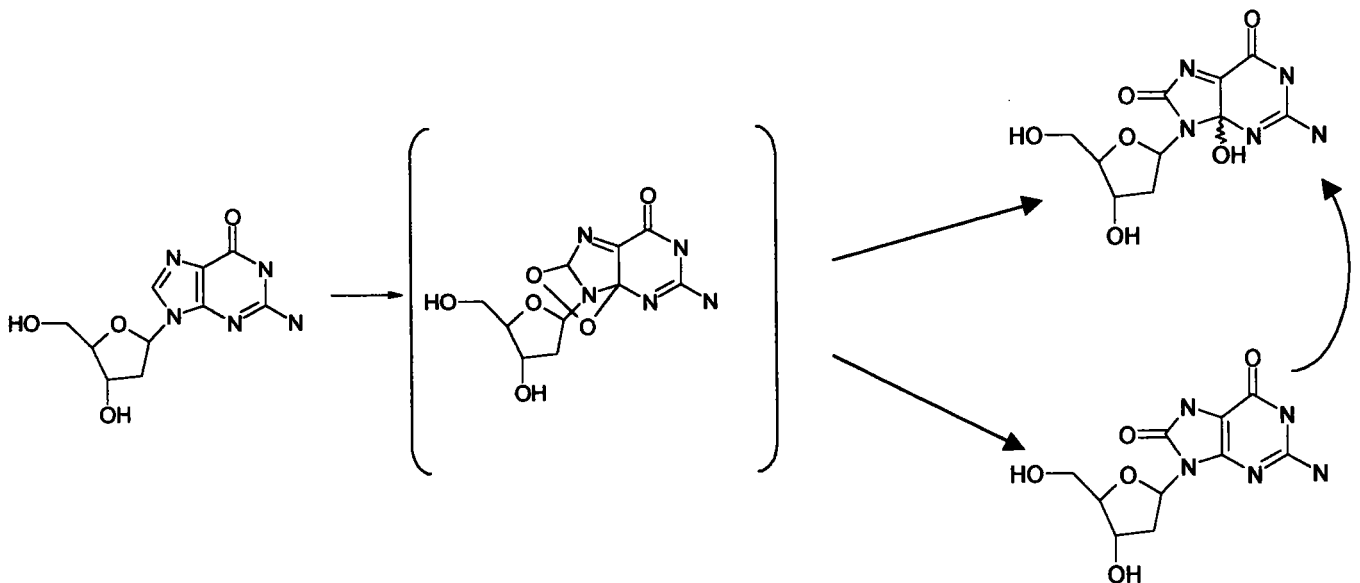


Figure 14 : Principaux produits d'oxydation de la 2'-desoxyguanosine par l'oxygène singlet.

L'OXYGÈNE SINGULET $^1\text{O}_2$ est formé par activation photochimique de l'oxygène et lors de réactions de thermolyse des endoperoxydes.

Il existe sous deux états d'excitation :

- l'état delta ($1\Delta_g \text{O}_2$) qui n'est pas un radical puisqu'il n'a pas d'électron non apparié ;
- l'état sigma ($1\Sigma_g^+ \text{O}_2$), radicalaire et très énergétique qui se dégrade rapidement en l'état delta.

Cette forme active de l'oxygène peut être générée lors de l'illumination de pigments biologiques (chlorophylle, rétinol, flavine, porphyrine) (Dodet, 1991). L'oxygène singulet peut également être produit au sein des organismes vivants en l'absence de lumière suite au processus de lipoperoxydation et à certaines réactions catalysées par voie enzymatique. Les leucocytes humains sont connus pour le produire comme agent antibactérien (Joenje, 1989). Il est moins réactif que le radical hydroxyle mais plus diffusible (Cadenas, 1989).

L'oxygène singulet est considéré comme entité seulement à l'état delta (Halliwell & Gutteridge, 1989). Il peut réagir avec des molécules biologiques de deux façons :

- par réaction d'addition ;
- par « quenching ».

Lors des réactions d'addition, les composés ayant des doubles liaisons conjuguées (e.g. carotènes et chlorophylles) réagissent avec l'oxygène singulet pour produire les endoperoxydes (fig. 13). D'autres composés (cholestérol, tryptophane, histidine, NADPH, cystéine, méthionine et uracile) réagissent également, mais par un mécanisme différent d'addition avec l'oxygène singulet (fig. 14).

Le quenching implique le transfert de l'énergie d'excitation vers une autre molécule qui, à son tour, devient excitée. L'oxygène singulet réagit par « quenching » avec, par exemple l'ion azide, l' α -tocophérol, le β -carotène, les phénols et la bilirubine... Ces molécules excitées peuvent provoquer d'autres réactions radicalaires ou perdre cette énergie par émission de chaleur.

Toutes ces réactions radicalaires jouent un rôle important dans les systèmes biologiques, car elles interviennent dans les réactions métaboliques normales et la production d'énergie. Le principal procédé biologique conduisant à la formation d'espèces réactives telles que l'anion superoxyde est le système de transport des électrons associés aux membranes mitochondriales (McCord & Fridovich, 1969a ; Halliwell, 1987). Chez les végétaux et en particulier chez les cellules chlorophylliennes, au sein des chloroplastes, la chaîne de transport des électrons ou l'activité oxygénase de la Rubisco génère l'anion superoxyde. De manière plus générale, l'activation de l'oxygène peut se produire au niveau des mitochondries, des chloroplastes, des peroxysomes et du réticulum endoplasmique, ainsi qu'au niveau des parois (Cossu *et al.*, 1997 ; Vangronsveld *et al.*, 1997). Les ERO peuvent également intervenir cette fois en tant que système protecteur de l'organisme dans lequel elles se trouvent, par exemple, en tant que second messenger dans l'infection d'une plante par un parasite (Métraux, 1998). Qu'ils soient utiles sur le plan physiologique ou fortuits, ces processus doivent être étroitement contrôlés. La production d'intermédiaires physiologiques est réglée en fonction des besoins et canalisée pour éviter tout dommage cellulaire. Ainsi, la formation d'anions superoxyde lors du transfert d'électrons dans la chaîne respiratoire mitochondriale ne dépasserait pas 2 % du processus global de réduction (McCord, 1983).

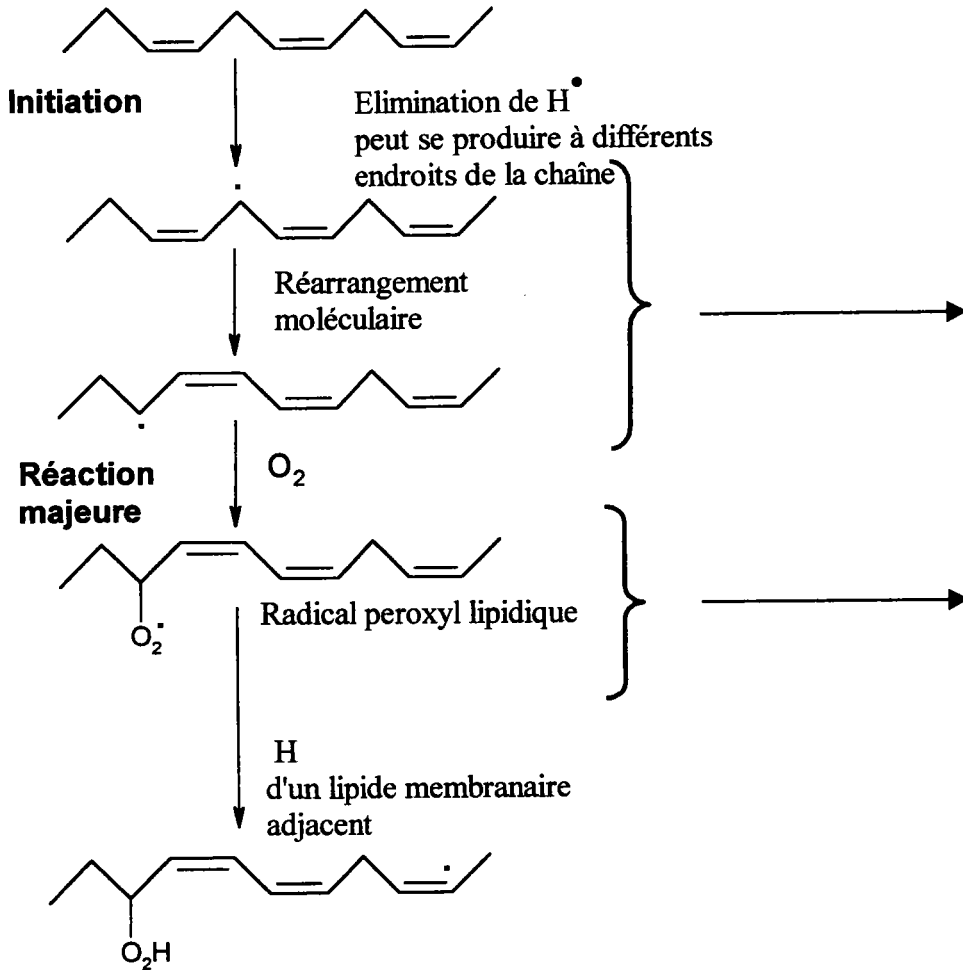


Figure 15 : Mécanismes de la lipoperoxydation (d'après Halliwell & Gutteridge, 1989).

Toutefois, les dommages oxydatifs sont inévitables en milieu aérobie où la vie n'est possible qu'avec la protection d'anti-oxydants et de systèmes de réparation des cibles endommagées.

A côté de ces sources endogènes, des facteurs abiotiques et biotiques peuvent générer des ERO chez les organismes vivants tels que :

- la dessiccation (Kranner & Grill, 1994, 1995 ; Dhindsa, 1987, 1991 ; Werner *et al.*, 1991 ; Schipperges & Rydin, 1998 ; Oliver *et al.*, 1997 ; Tuba *et al.*, 1996), les variations de température, les changements d'altitude (Schlee *et al.*, 1995) ;
- différents polluants comme le paraquat (Modenesi, 1993), l'ozone (Vangronsveld *et al.*, 1997), les polluants atmosphériques en général (Silberstein *et al.*, 1996 ; Egger *et al.*, 1994 ; Gonzales *et al.*, 1996 ; Niewiadowska & Miszalski, 1997), les éléments traces métalliques (Howlett & Avery, 1997 ; Brennan & Schienstl, 1996) ; ...
- l'infection parasitaire, le vieillissement tissulaire (Balachandran *et al.*, 1997).

V.2.2. Les principaux dommages cellulaires causés par les ERO

Dans le règne animal ou végétal, une cellule soumise à un stress oxydant va subir des dommages assez importants. Les principales cibles seront les lipides, les protéines et les acides nucléiques.

LES LIPIDES assurent beaucoup de fonctions au sein de la cellule mais on les retrouve en majorité comme composant principal des membranes plasmiques. Ils assurent une certaine fluidité membranaire. Ils sont responsables de manière plus générale de l'état physique des membranes, influant sur les échanges cellulaires avec le milieu extérieur et peuvent ainsi perturber la conformation des protéines membranaires et modifier leur activité. Les ERO vont directement attaquer les acides gras (poly)insaturés des phospholipides membranaires en provoquant une peroxydation. Ce processus permanent et ubiquitaire se développe simultanément par voie enzymatique (dioxygénases, lipoxygénases) ainsi que spontanément (auto-lipoperoxydation) par un enchaînement de réactions radicalaires. Le développement de la lipoperoxydation radicalaire se subdivise en 3 phases (A, B, C) : initiation, propagation, terminaison (fig. 15). En fonction du degré d'insaturation de la structure acylée lipidique, la peroxydation conduit à la formation de différents hydroperoxydes qui, du fait de leur instabilité en présence de métaux de transition ionisés, sont notamment à l'origine de composés de lyse constitués d'aldéhydes, d'acides et de traces d'hydrocarbures (Wade & Van Rij, 1985).

Parmi les aldéhydes, une très large place a été faite à un dialdéhyde tricarboné, le malondialdéhyde (MDA) issu de l'oxydation disruptive des insaturations maloniques présentes dans les acides gras polyinsaturés (Frankel & Neff, 1983). En fait, cet aldéhyde est produit en beaucoup moins grande quantité que les hydroxyalkénals (Esterbauer *et al.*, 1988), notamment le 4-hydroxynonéal (Benedetti *et al.*, 1980). Plusieurs auteurs ont utilisé le MDA comme biomarqueur d'effets : Gallego *et al.*, 1996, Chaoui *et al.*, 1997, Howlett & Avery, 1997, ...

Lors d'une modification des propriétés des lipides membranaires, une fuite d'électrolytes intracellulaires comme le potassium peut être observée, mais Dietz *et al.* (1999) montrent que ce n'est pas toujours le cas. Ce processus a été également utilisé comme biomarqueur d'atteinte à l'intégrité de la membrane plasmique.

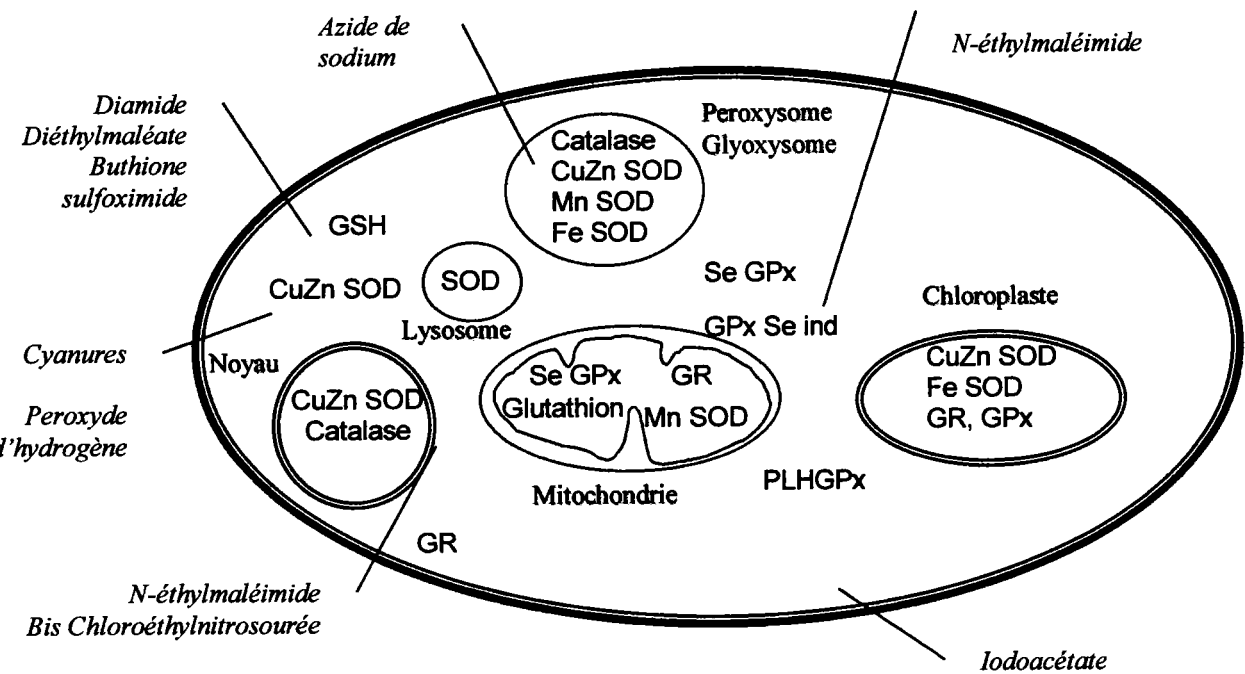


Figure 16 : Répartition du glutathion (GSH) et de certaines enzymes antioxydantes avec leurs inhibiteurs (en italique), au sein d'une cellule végétale. (SOD, superoxyde dismutase ; Se GPx, glutathionperoxydase sélénium dépendante ; GPx Se ind, glutathion peroxydase sélénium indépendante ; GR, glutathion réductase ; PLHGPx, phospholipide hydroperoxyde glutathion peroxydase, (d'après Cossu *et al.*, 1997, modifié).

LES PROTEINES ont une multitude de rôles différents au sein de la cellule. En effet, lors d'une attaque radicalaire sur les protéines cellulaires, le catabolisme de ces dernières augmente et cela se traduit par une perturbation grave des fonctions normales de la cellule. Des groupes carbonyles résultant de l'oxydation de certaines protéines, des acides aminés modifiés, ainsi que des ponts disulfures peuvent être observés. Certaines de ces modifications peuvent servir de biomarqueur d'effet (Acworth & Bailey, 1995).

D'autres organites cellulaires peuvent également être atteints, comme les noyaux et par conséquent **L'ADN**. Lors d'une attaque par des ERO, des oxydations ainsi que la modification des bases nucléiques peuvent être occasionnées. On parle alors d'adduits qui sont responsables de mutations ponctuelles et sont considérés comme les prémices du processus de carcinogenèse. Si ces modifications sont peu ou mal réparées, la phase d'initiation de la cancérogenèse s'amorce provoquant des modifications structurales des substances élaborées. Le principal adduit à l'ADN lors d'attaques des ERO est la 8-hydroxy-2'-desoxyguanosine. Mais fort heureusement, les êtres vivants, des plus primitifs aux plus évolués, possèdent toute une batterie de moyens de défense permettant dans le meilleur des cas de retrouver une intégrité fonctionnelle des cellules atteintes ou alors d'éliminer les cellules endommagées en provoquant l'apoptose cellulaire.

V.3. LES SYSTEMES DE DEFENSE ANTI-OXYDANTS.

Les organismes vivants ont un système anti-oxydant très efficace et très diversifié pour faire face à la toxicité de l'oxygène et des espèces réactives qui en dérivent. Les moyens mis en œuvre pour l'élimination des ERO sont les suivants :

- élimination des métaux catalyseurs de la production d' OH^\bullet en les séquestrant par des métalloprotéines (la transferrine au niveau extracellulaire et la ferritine intracellulaire jouent ce rôle pour le fer, la céruléoplasmine et les cupréines pour le cuivre, les métallothionéines et les phytochélatines, chez les végétaux, pour d'autres types de métaux ;
- inactivation d' $\text{O}_2^{\bullet -}$ et d' H_2O_2 à l'aide d'enzymes spécifiques ;
- capture des radicaux libres responsables de dommages cellulaires à l'aide de pièges moléculaires ;
- arrêt de la propagation des réactions en chaîne.

Ce système agit à l'intérieur et à l'extérieur des cellules (Yu, 1994). Davies (1988) propose que ce système soit divisé en deux parties : primaire et secondaire. Le système primaire se compose de 2 parties : une enzymatique et une non enzymatique. Le système secondaire concerne les enzymes lypolytiques et les enzymes protéolytiques.

Les composés enzymatiques du système anti-oxydant primaire chez les végétaux comprennent principalement les superoxydes dismutases, la catalase, les peroxydases et la glutathion réductase, à l'instar de ce qui est observé chez les animaux.

Les composés non-enzymatiques du système anti-oxydant primaire comprennent des molécules de faible poids moléculaire, telles que l'acide ascorbique (vitamine C), l'alpha-tocophérol (vitamine E), les pigments caroténoïdes et le glutathion. L'acide ascorbique et l'alpha-tocophérol piègent les radicaux hydroxyles, l'oxygène singulet et l'anion radical

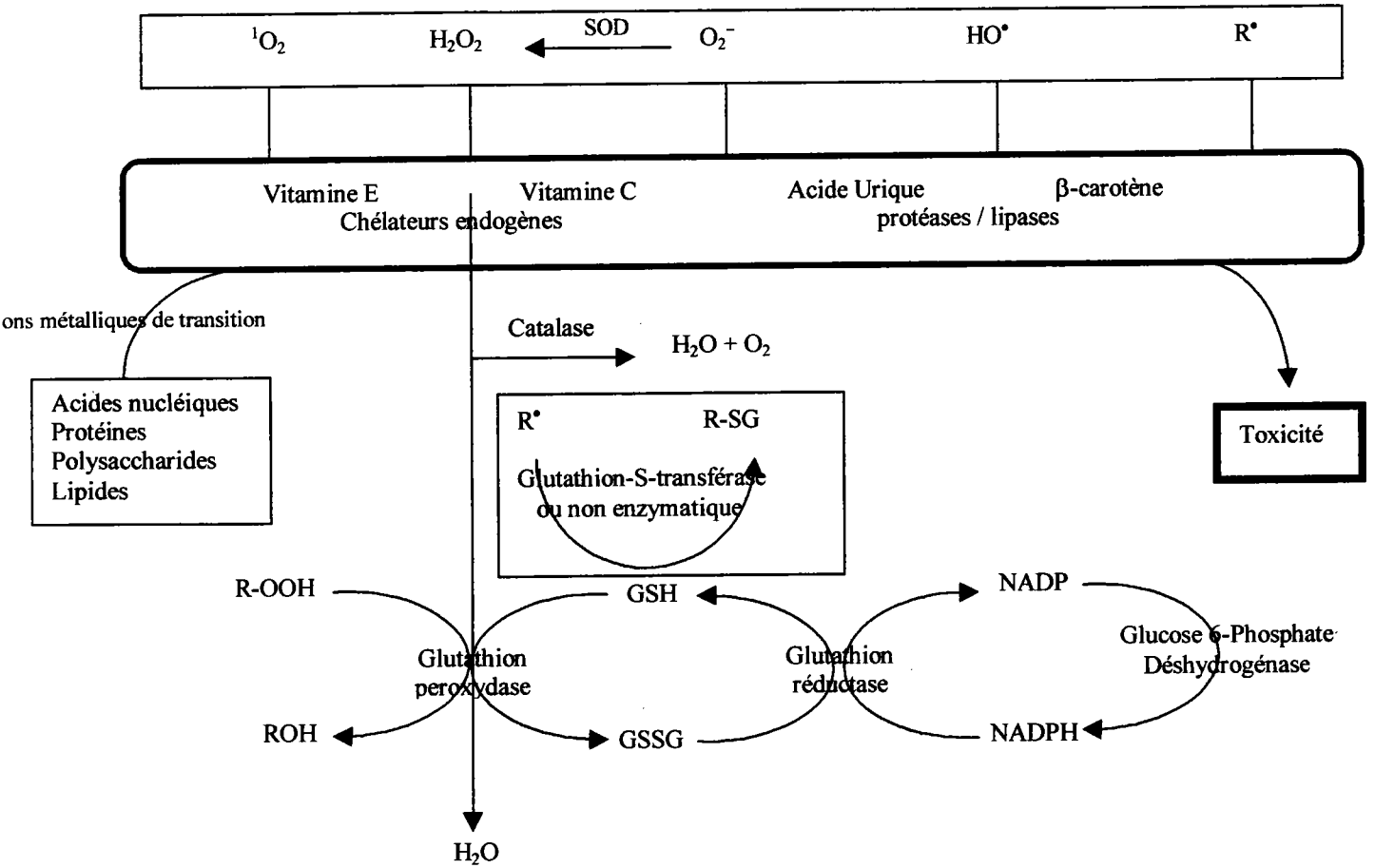


Figure 17 : Systèmes de défense antioxydants enzymatiques et non enzymatiques (d'après Kehrer, 1993).

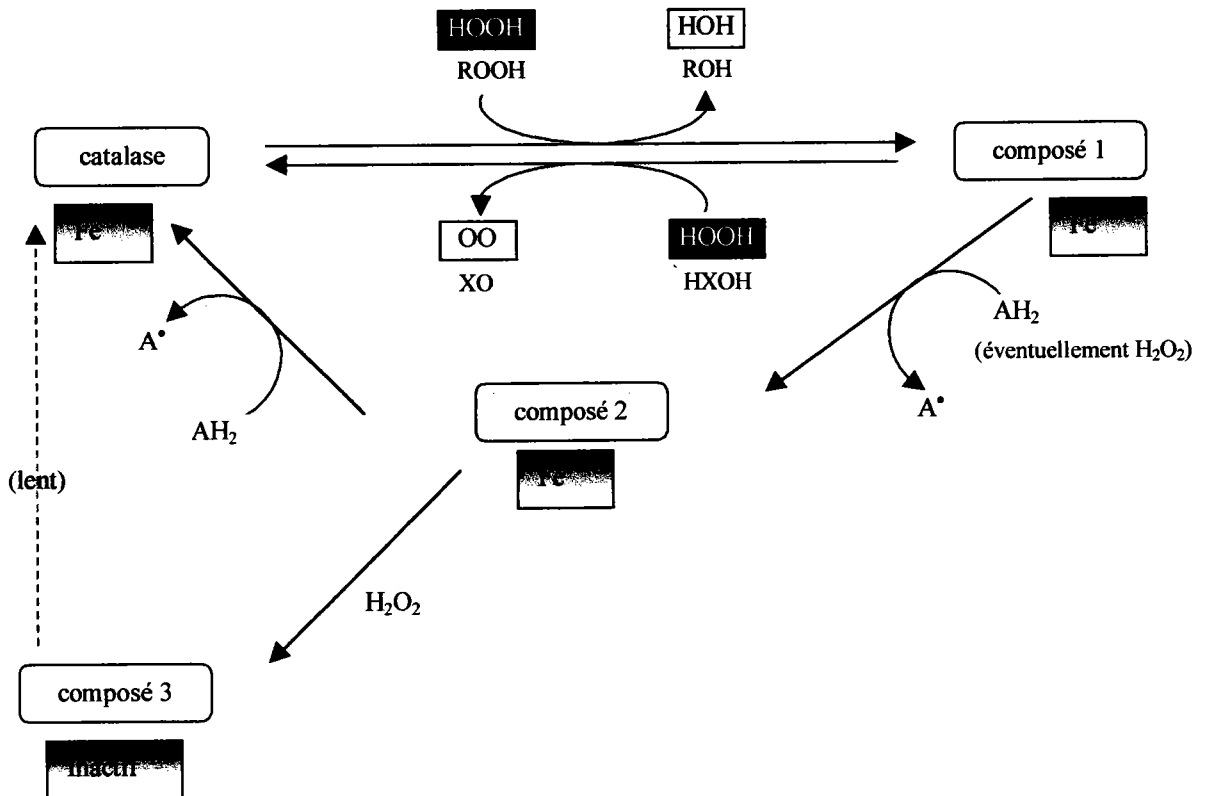


Figure 18 : Mécanisme de la réaction de décomposition du peroxyde d'hydrogène catalysée par la catalase (d'après Pelmont, 1989).

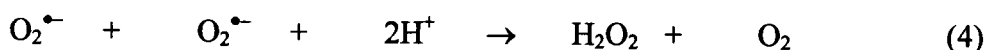
superoxyde (Yu, 1994). Les pigments chloroplastiques, comme les caroténoïdes, peuvent empêcher la formation de l'oxygène singulet en absorbant ou en piégeant l'énergie excédentaire de la chlorophylle. Le glutathion réagit avec l'oxygène singulet et avec le radical hydroxyle. Il peut aussi agir comme un réducteur pour protéger les groupements thiols des enzymes ou comme régénérateur de l'ascorbate.

V.3.1. Les systèmes anti-oxydants enzymatiques

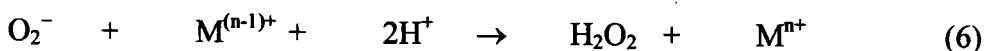
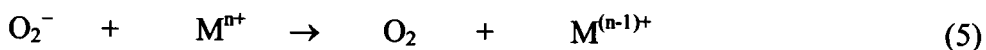
Il existe trois enzymes anti-oxydantes majeures mises en œuvre pour l'élimination d'espèces réactives de l'oxygène : les superoxydes dismutases (SOD), les glutathion peroxydases (GPx) et la catalase. Ces enzymes sont toutes des métalloprotéines et agissent de façon coordonnée (fig. 16). La figure 17 montre le système anti-oxydant enzymatique et non enzymatique de défense des végétaux contre les formes toxiques de l'oxygène. La première enzyme qui agit est la SOD, enzyme présente dans les chloroplastes, le cytoplasme et les mitochondries.

LES SUPEROXYDES DISMUTASES (SOD, E.C. 1.15.1.1.) sont considérées comme les premières lignes de défense cellulaire contre les radicaux oxygénés (Alscher *et al.*, 1997). Découvertes par McCord & Fridovich (1969a) dans des cellules sanguines de mammifères, elles sont mises en évidence par Asada & Kiso (1973) dans les chloroplastes d'épinard. Les SOD sont des enzymes facilement inductibles, ce qui a suggéré leur utilisation en tant que marqueur biologique (Stegeman *et al.*, 1992).

Les SOD possèdent un métal de transition (cuivre, manganèse, fer ou zinc) au niveau de leur site actif. Les SOD sont donc un groupe de métalloenzymes qui catalysent la réaction de dismutation du radical superoxyde (4).



Selon Salin (1987), cette réaction d'oxydo-réduction exige la participation d'un cofacteur métallique (5 et 6).



Ce cofacteur métallique est en réalité apporté par les différentes SOD :

- la CuZn SOD, enzyme dimérique, contient un atome de cuivre et un atome de zinc par sous-unité ; elle est présente dans le compartiment cytosolique mais également dans les peroxysomes, les lysosomes et les noyaux des cellules eucaryotes (Beyer *et al.*, 1991) ; on la trouve chez les organismes vivants aquatiques et terrestres vertébrés et invertébrés ainsi que chez les végétaux ; elle est sensible aux ions CN^- ; chez les végétaux supérieurs, elle se rencontre principalement dans les chloroplastes ;
- la Mn SOD est présente chez les eucaryotes et les bactéries au niveau de la matrice mitochondriale et dans les peroxysomes ;
- la Fe SOD s'observe chez les végétaux, en particulier dans les chloroplastes des végétaux supérieurs et les peroxysomes de quelques espèces et chez les bactéries ;
- la SOD extracellulaire, tétramérique, contient du cuivre et du zinc.

Les SOD occupent une place très importante dans le système anti-oxydant parce que leurs activités déterminent les concentrations de radicaux superoxydes et de peroxyde d'hydrogène qui sont les deux substrats qui participent à la réaction d'Haber-Weiss.

Les localisations de ces SOD correspondent à des sites cellulaires où il y a formation d'oxy-radicaux : au fur et à mesure que la photosynthèse augmente, la quantité de SOD chloroplastique augmente (Bowler *et al.*, 1992). Les SOD semblent être codées par l'ADN nucléaire, synthétisées puis transportées pour les localisations respectives dans les organites (White & Scandalios, 1989 ; Bowler *et al.*, 1992).

L'augmentation de l'activité SOD ne signifie pas une protection en soi-même, car certains produits ultérieurs sont beaucoup plus réactifs (et dangereux) que le radical qui a été dismuté (Kaiser, 1979).

Très peu de travaux ont été réalisés chez les bryophytes dans ce domaine. A notre connaissance ces enzymes ont été mises en évidence et utilisées comme biomarqueurs, mais les études portaient principalement sur le stress hydrique. A ce propos, les variations de l'activité des SOD chez *Dicranella palustris* et *Tortula ruraliformis* ont été plus spécifiquement étudiées (Seel *et al.*, 1991).

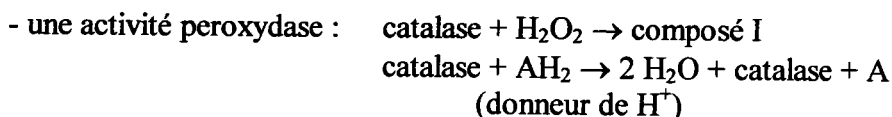
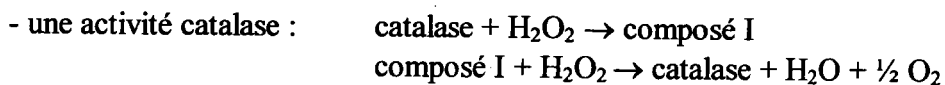
LA GLUTATHION PEROXYDASE SELENIUM DEPENDANTE (SeGPx, E.C. 1.11.1.9) catalyse la réduction glutathion-dépendante de nombreux peroxydes allant du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) aux peroxydes organiques (ROOH). Cette enzyme est une métalloenzyme tétramérique (80 000 daltons) dont chaque sous unité contient au niveau de son site actif un atome de sélénium sous forme d'un résidu sélélocystéine. Le sélénium d'origine exogène serait incorporé dans le site actif de l'enzyme par un ARN de transfert sélélocystéine-spécifique (Spallholz & Boylan, 1991). L'enzyme est localisée dans le cytosol et la matrice mitochondriale. Elle apparaît comme un système protecteur contre le processus de lipoperoxydation endogène et exogène (Wendel, 1981).

Les inhibiteurs les plus connus de l'activité enzymatique de la glutathion peroxydase sélénium-dépendante sont les thioloprives tels que le cadmium ou le plomb, par exemple. Il existe une autre séléloglutathion peroxydase utilisée par Thomas *et al.* (1990) chez les végétaux : la phospholipide hydroperoxyde glutathion peroxydase (PLHGPx, E.C. 1.11.1.12). Cette enzyme monomérique (22 000 daltons) est localisée dans le cytosol et son rôle consiste à protéger les liposomes et les biomembranes contre les dommages peroxydatifs. Elle diffère de SeGPx par son exigence moins stricte en sélénium et son inhibition spécifique par l'iodoacétate (Spallholz & Boylan, 1991). Sa compétence comprend la réduction des hydroperoxydes phospholipidiques, des hydroperoxydes solubles du cholestérol et des esters de cholestérol hydroperoxydes, dans les liposomes et les membranes. Ceci explique qu'elle peut réduire tous les groupes hydroperoxydes générés dans les membranes microsomaux au cours de la lipoperoxydation, alors que la glutathion peroxydase classique est inefficace face à ces espèces réactives. Il a été montré que la lipoperoxydation microsomale est inhibée par la PLHGPx seulement quand les membranes contiennent des concentrations physiologiques en vitamine E, ce qui suggère un mécanisme d'action conjoint de ces deux anti-oxydants (Roveri *et al.*, 1994).

Le maintien d'une activité glutathion-peroxydase implique le recyclage NADPH-dépendant du glutathion réduit, par la glutathion réductase (GR, E.C. 1.6.4.2), le NADPH étant lui-même produit par la voie des pentoses phosphates. Cette enzyme est une

flavoprotéine dimérique (100 000 daltons) localisée dans le cytosol et les mitochondries (Meister & Anderson, 1983).

LA CATALASE (E.C. 1.11.1.6) est une hémoprotéine tétramérique (240 000 daltons) qui possède un atome de fer par sous unité, chacune des sous unités contient une molécule de NADPH qui stabilise l'enzyme. Elle catalyse la réduction du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire (fig. 18), elle possède une double activité :



Le composé I est un produit d'oxydation de la réaction entre le fer du site actif de l'enzyme et le peroxyde d'hydrogène (Chance *et al.*, 1979).

La catalase est localisée majoritairement dans les glyoxysomes et les peroxysomes, organites contenant des enzymes génératrices de peroxyde d'hydrogène telles que la glycolate oxydase, l'urate oxydase et les déshydrogénases impliquées dans la β -oxydation des acides gras (Aebi, 1984). Malgré sa stricte localisation, la catalase joue un rôle important dans le système anti-oxydant puisque le peroxyde d'hydrogène diffuse facilement au travers des membranes (Bowler *et al.*, 1992). Kendall *et al.* (1983) ont montré qu'une souche mutante d'*Hordeum vulgare* déficiente en catalase a été incapable de croître normalement parce qu'elle ne pouvait décomposer le peroxyde d'hydrogène qui se formait dans les glyoxysomes pendant la photorespiration. Elle a un rôle complémentaire de celui de la peroxydase sélénium-dépendante contre la lipoperoxydation induite par H_2O_2 . Les principaux inhibiteurs de l'activité catalase sont l'azide de sodium, les cyanures et les 3-amino-1,2,4-triazole (Simmons & Jamal, 1988).

LES PEROXYDASES (E.C. 1.11.1.7) constituent une grande famille d'enzymes qui, avec l'aide d'un substrat (H_2R), catalysent la réduction chimique d'une grande variété de peroxydes (7).



Le mécanisme de cette réaction est presque identique à celui décrit pour la catalase, mais avec la présence d'un substrat (Halliwell, 1985).

Les fonctions des peroxydases chez les végétaux sont multiples. Les composés phénoliques sont transformés en radicaux phénoxyles par les peroxydases. Ensuite, ces radicaux sont polymérisés, ce qui produit par exemple la lignine (Polle *et al.*, 1994). Une autre fonction des peroxydases concerne la dégradation de l'hormone acide indoleacétique qui joue un rôle important dans la régulation de la croissance des plantes (Halliwell, 1985).

Les peroxydases sont des enzymes extrêmement sensibles aux conditions physiologiques des végétaux et répondent à une grande variété de facteurs externes ou toxiques (Gaspar *et al.*, 1982).

Une peroxydase propre aux végétaux a été isolée par Nakano & Asada (1981), il s'agit de L'ASCORBATE PEROXYDASE qui joue un rôle important au niveau des chloroplastes pour la

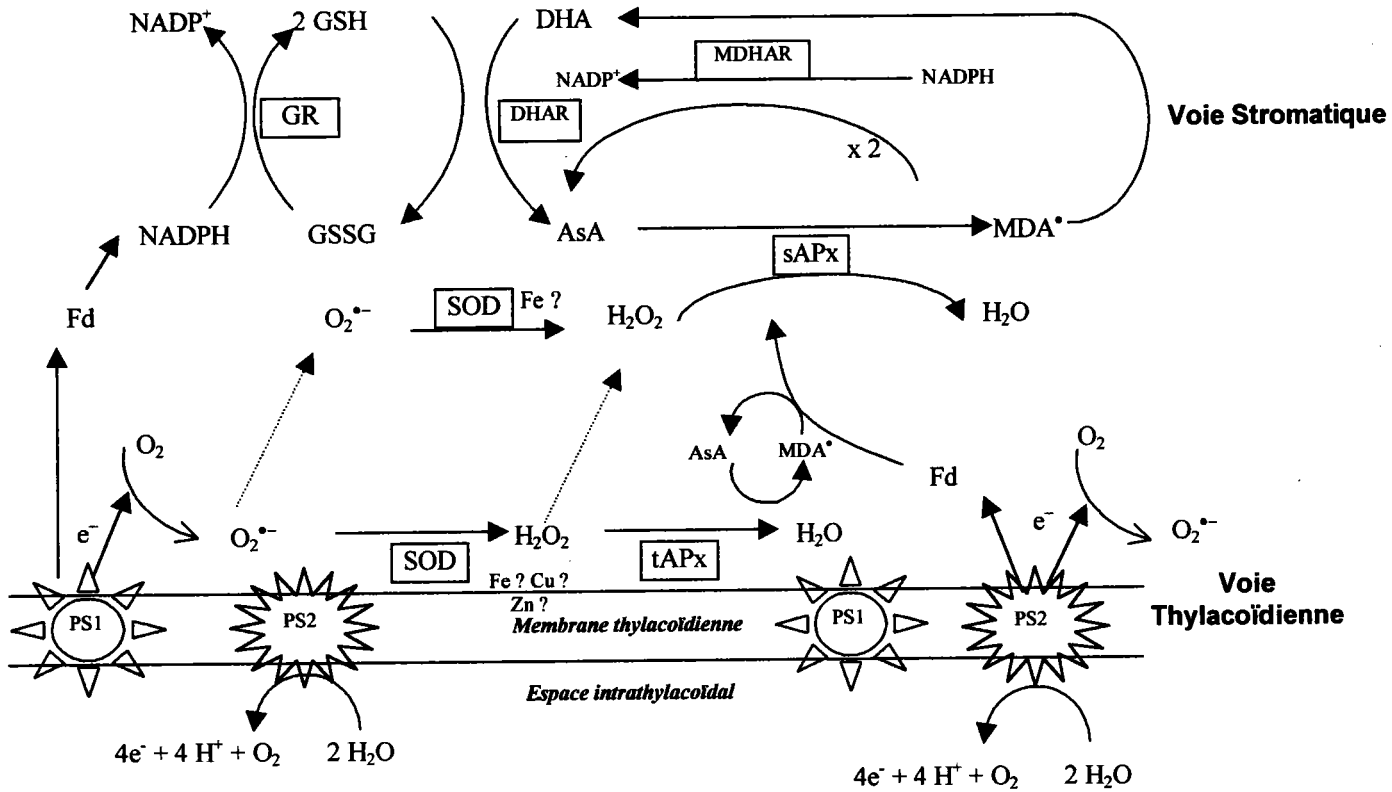


Figure 19 : Piégeage des ERO dans le chloroplaste impliquant la SOD : voies stromatique et thylacoïdienne. Dans les piègeages associés aux thylacoïdes, les radicaux superoxydes sont dismutés par la superoxyde dismutase (SOD) (forme Fe ou Cu/Zn) et le peroxyde d'hydrogène résultant est récupéré par l'ascorbate peroxydase intra-thylacoïdienne (tAPx). Dans les piègeages associés au stroma, les ERO qui échappent à la voie thylacoïdienne sont dismutés par la Fe (ou Cu/Zn) SOD et l'APx stromatique (sAPx). Les radicaux monodeshydroascorbates (MDA[•]) produits par l'APx sont convertis en ascorbate (AsA) à travers une réaction avec la ferredoxine (Fd) thylacoïdienne ou la monodeshydroascorbate réductase (MDHAR) stromatique. La réduction du deshydroascorbate (DHA) en AsA est catalysée par la deshydroascorbate réductase (DHAR), (d'après Alscher *et al.*, 1997).

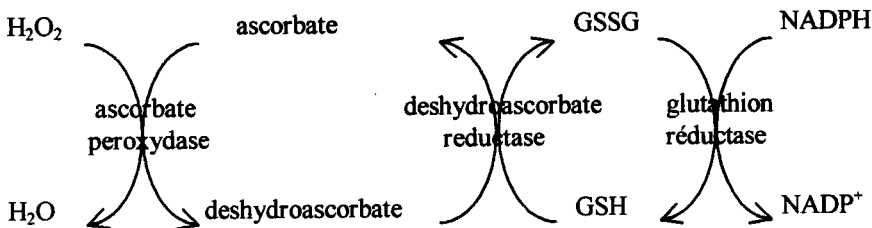


Figure 20 : Cycle Halliwell-Asada.

décomposition du peroxyde d'hydrogène. L'ascorbate qui s'oxyde lors de la réaction catalytique de l'eau oxygénée en eau est réduit par le glutathion, la glutathion réductase permet la réduction du glutathion.

LES GLUTATHION REDUCTASES (GR, E.C. 1.6.4.2) sont responsables du maintien du rapport glutathion réduit/oxydé (GSH/GSSG) (fig. 19), mais interviennent également après la glutathion peroxydase sélénium dépendante. La connaissance de l'activité de ces enzymes aide à mieux comprendre le rapport GSH/GSSG, lequel peut servir comme biomarqueur (Stegeman *et al.*, 1992).

L'activité de la glutathion réductase joue sur la disponibilité du NADPH dans les chloroplastes (Foyer & Halliwell, 1976). Mais l'enzyme a aussi été localisée dans les mitochondries et dans le cytoplasme (Drumm-Herrel *et al.*, 1989 ; Edwards *et al.*, 1990). Dans le cycle Halliwell-Asada, la glutathion réductase participe à la réduction du GSSG et intervient après l'ascorbate peroxydase et la dehydroascorbate réductase, ce qui assure le recyclage de l'ascorbate et du glutathion (fig. 20).

Ce cycle assure l'élimination de l'eau oxygénée dans tous les tissus, qu'ils soient photosynthétiques ou non.

V.3.2. Les systèmes anti-oxydants non enzymatiques

Ils agissent comme des réducteurs ou des piègeurs de radicaux et viennent renforcer l'action des enzymes anti-oxydantes. Au sein des membranes biologiques, ils peuvent également piéger les oxy-radicaux dès leur formation, interrompre les réactions en chaîne et empêcher la lipoperoxydation.

L'ACIDE LIPOÏQUE, impliqué dans la formation de l'acétyl coenzyme A à partir du pyruvate, est sous sa forme réduite un réducteur puissant capable de réduire le glutathion et les radicaux peroxydes et de désactiver l'oxygène singulet.

LE GLUTATHION (L- γ -glutamyl-L-cystéinyglycine) est le thiol non protéique le plus abondant chez les organismes vivants et en particulier chez les végétaux (Kranter & Grill, 1995). Il est présent majoritairement à l'état réduit (GSH) dans les cellules. Son groupement thiol et sa liaison γ -glutamyl lui permettent d'être résistant à l'attaque des peptidases. Une fois oxydé sous la forme de GSSG, il est réduit grâce à la glutathion réductase (E.C. 1.6.4.2). L'activité de cette enzyme est régulée selon un mécanisme de feed back par la concentration en GSH et NADPH. Toutefois, une augmentation de la forme oxydée (GSSG) est indicatrice d'un stress oxydant (Arkeboom & Sies, 1990).

Il agit à la fois comme nucléophile (donneur d'électrons) pouvant ainsi neutraliser des espèces réactives telles que les radicaux hydroxyles ou phénoxy, et comme puissant réducteur du peroxyde d'hydrogène et des lipoperoxydes (Deneke & Fanburg, 1989 ; Munday & Winterbourn, 1989 ; Deleve & Kaplowitz, 1991). A pH 7, le GSH, sous sa forme anionique (GS⁻), inactive l'oxygène singulet (Cadenas, 1989). Il intervient également comme substrat des glutathion peroxydases ainsi que dans la conjugaison des substances électrophiles catalysées par les glutathion transférases.

Le GSH protège directement les membranes en neutralisant les hydroperoxydes lipidiques (Bartosz, 1997).

Le glutathion joue aussi un rôle important dans de nombreuses fonctions cellulaires, telles que la synthèse des protéines, le transport des acides aminés, la réserve et le transport de la cystéine, le métabolisme des prostaglandines et des leucotriènes, la réduction de

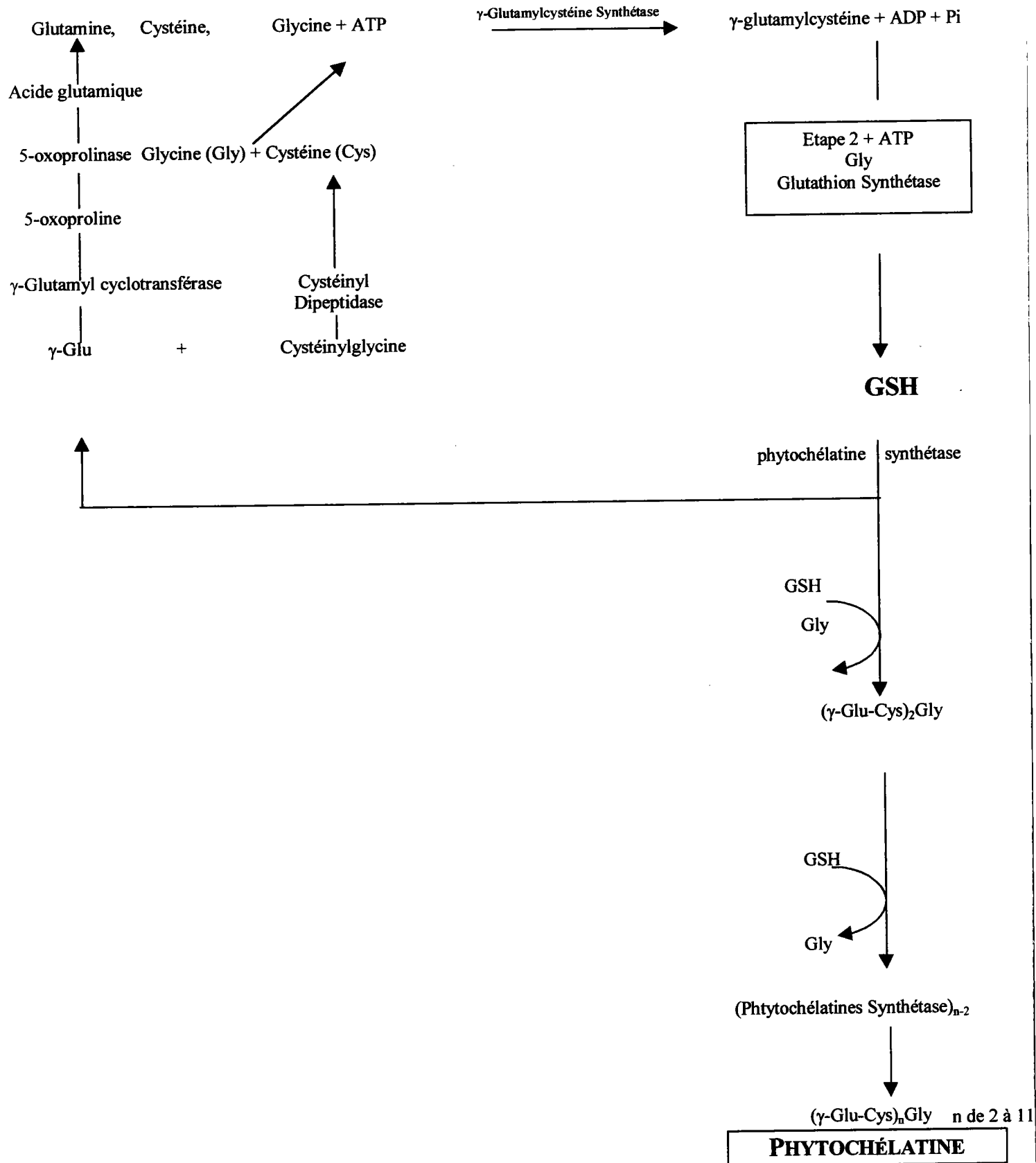
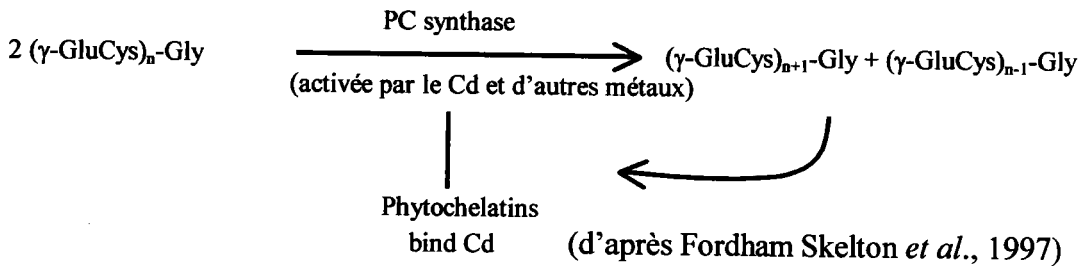


Figure 21 : Les différentes voies de synthèse et d'utilisation du glutathion au sein des cellules (d'après Grant & Dawes, 1996 ; Kneer & Zenk, 1992 ; Vangronsveld *et al.*, 1997, 1998).

ribonucléotides en déoxyribonucléotides (Meister & Anderson, 1983 ; Cotgreave *et al.*, 1990 ; Estrela & Pallardó, 1990 ; Bray & Taylor, 1993). Chez certaines plantes de la famille des *Fabacées* et des *Poacées*, il est possible de rencontrer des analogues du GSH, respectivement le γ -glutamyl-cystéinyl- β -alanine et le γ -glutamyl-cystéinyl-sérine.

Chez les végétaux supérieurs, le glutathion est utilisé dans la synthèse des phytochélatines (PC). Ces PC interviennent dans la séquestration des éléments toxiques (*i.e.* non essentiels) et dans l'homéostasie des éléments essentiels.



Ce sont des polymères de L- γ -glutamyl-L-cystéine : $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$ ($n=2-11$) (Kneer & Zenk, 1992). Il existe de nombreux liens entre la synthèse du glutathion et la synthèse des PC (Vangronsveld *et al.*, 1997), comme le montre la figure 21.

La phytochélatine synthétase catalyse le transfert de la $\gamma\text{-GluCys}$ (provenant du GSH ou d'une PC) à d'autres GSH, pour produire $(\gamma\text{-GluCys})_2\text{-Gly}$, ou une PC, pour produire de plus grandes PC. Les enzymes ont besoin d'ions Cd^{2+} ou d'un nombre d'autres ions métalliques pour l'activation. *In vitro* les ions métalliques disponibles ont été chélatés par les PC ou l'EDTA et la synthèse de PC cesse.

LA VITAMINE E est l'anti-oxydant le plus largement distribué dans la nature, aussi bien chez les animaux que chez les végétaux. Parmi ses isomères structuraux, l' α -tocophérol est le plus connu et possède le potentiel anti-oxydant le plus important. Ses propriétés lipophiles font qu'il se retrouve associé aux membranes intracellulaires, en particulier celles des chloroplastes, des mitochondries et du réticulum endoplasmique. Il protège les membranes contre la lipoperoxydation en cédant un atome d'hydrogène aux espèces radicalaires (fig. 22) (Byczkowski & Gessner, 1988 ; Cadenas, 1989).

LA VITAMINE C est, au contraire de la vitamine E, hydrosoluble. Elle agit en tant que réducteur en réagissant directement avec l'anion superoxyde, le radical hydroxyle et de nombreux hydroperoxydes lipidiques. De plus, elle permet la régénération de la vitamine E oxydée et se comporte donc comme le relais de l' α -tocophérol au niveau cytosolique (Halliwell & Gutteridge, 1989).

LE β -CAROTENE (vitamine A) et les caroténoïdes protègent les lipides de la peroxydation par quenching des oxy-radicaux et plus particulièrement de l'oxygène singulet (Yu, 1994).

D'autres dérivés tels que l'ubiquinol, les flavonoïdes, l'urée ou le mannitol sont également des piègeurs de radicaux, mais ils sont le plus souvent utilisés *in vitro*.

Plus particulièrement chez les végétaux, Bartosz (1997) dans sa revue, met en évidence toutes les sources des espèces réactives de l'oxygène (tab. 13), les agents pouvant

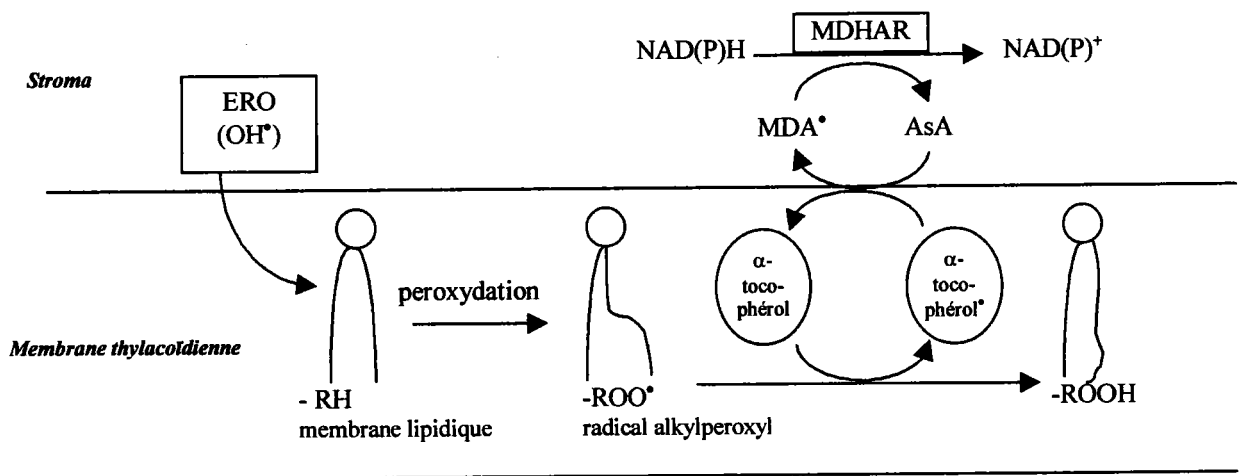


Figure 22 : Régénération de l' α -tocophérol et piégeage de radicaux alkylperoxy (MDHAR, monodeshydroascorbate réductase ; MDA, monodeshydroascorbate ; AsA, ascorbate ; ERO, espèces réactives de l'oxygène (d'après Alscher *et al.*, 1997).

Endogènes	
Chaîne respiratoire mitochondriale	Boveris, 1984
Photosystèmes I et II dans les chloroplastes	Asada & Takahashi, 1987
Chaînes de transports d'électrons dans les microsomes, peroxyosomes et enveloppe nucléaire	Gille & Sigler, 1995
Enzymes générant ions superoxydes (<i>e.g.</i> xanthine oxydase, aldéhyde oxydase, galactose oxydase, cellobiose oxydase, NADPH oxydase)	McCord, 1985
Oxydases générant des peroxydes d'hydrogène (<i>e.g.</i> aldéhyde oxydase, D-amino oxydase, xanthine oxydase)	Halliwell & Gutteridge, 1989
Réactions de photosensibilisation (<i>e.g.</i> flavines, cercosporine)	Daub & Hangarter, 1983 ; Halliwell & Gutteridge, 1989
Autooxydation de flavines réduites, thiols, catécholamines, sucres réduits (principalement le glucose)	Sun & Leopold, 1995
Hémoprotéines	Halliwell & Gutteridge, 1989
Exogènes	
Radiations ionisantes	Halliwell & Gutteridge, 1989
Radiations UV	Halliwell & Gutteridge, 1989
Ozone	Farage <i>et al.</i> , 1991
Composés chimiques autooxydants (<i>e.g.</i> SO ₂)	Asada & Takahashi, 1987
Xénobiotiques dans le cycle redox intracellulaire (<i>e.g.</i> paraquat)	Farrington <i>et al.</i> , 1973

Tableau 13 : Sources des espèces réactives de l'oxygène (d'après Bartosz, 1997).

Polluants de l'air (SO ₂ , NO _x , O ₃)	Asada & Takahashi, 1987 ; Dominy & Heath, 1985 ; Hippeli & Elstner, 1996
Xénobiotiques intervenant dans le cycle redox intracellulaire (e.g. paraquat, diquat)	Farrington <i>et al.</i> , 1973
Toxines	Asada & Takahashi, 1987 ; Daub & Hangarter, 1983
Hyperoxie	Foster & Hess, 1980 ; Scandalios, 1992 ; Simontacchi <i>et al.</i> , 1995
Hautes températures	Elstner, 1991
Basses températures	Jahnke <i>et al.</i> , 1991 ; Okuda <i>et al.</i> , 1992
Sécheresse	Navari-Izzo <i>et al.</i> , 1996 ; Pastori & Trippi, 1992 ; Price <i>et al.</i> , 1989, Zhang & Kirkham, 1994
Hypertonie	Corpas <i>et al.</i> , 1993 ; del Rio <i>et al.</i> , 1996 ; Hernández <i>et al.</i> , 1993
Haute intensité lumineuse et radiations UV	Scandalios, 1993
Inondation	Elstner, 1991
Carence minérale	Elstner, 1991
Excès en ions métalliques	Caro & Puntarulo, 1996
Sénescence	Droillard <i>et al.</i> , 1987 ; Rabinovitch & Sklan, 1981 ; Thompson <i>et al.</i> , 1987
Infections pathogènes	Doke <i>et al.</i> , 1996 ; Levine <i>et al.</i> , 1994 ; Low & Merida, 1996
Réoxygénation après anoxie	Monk <i>et al.</i> , 1989
Manipulation cellulaire de plantes	Legendre <i>et al.</i> , 1993 ; Low & Merida, 1996 ; Sabri <i>et al.</i> , 1996

Tableau 14 : Agents induisant un stress oxydatif chez les végétaux (d'après Bartosz, 1997).

Hydrophile (présentes dans la phase aqueuse)	
Glutathion	Gérard-Monnier & Chaudière, 1996 ; Meister, 1983
Ascorbate	Bielski & Richter, 1975 ; Stadtman, 1991
Cystéine	Motoyama <i>et al.</i> , 1989
Acide urique	Becker, 1993
Acide phytique	Graf & Eaton, 1990
Phytochélatines	Zenk, 1996
Flavonoïdes (<i>e.g.</i> quercetine, myricetine, rutine)	Foti <i>et al.</i> , 1996 ; Graf, 1992
Coumarines	Foti <i>et al.</i> , 1996
Acide cinammique	Foti <i>et al.</i> , 1996 ; Graf, 1992
Polyphénols (<i>e.g.</i> lignine, tannins)	Sakagami <i>et al.</i> , 1995
Hydrophobes (présentes dans les membranes cellulaires)	
Tocophérols	Ingold <i>et al.</i> , 1987 ; Kamal-Eldin & Apelqvist, 1996
Tocotriénols	Kamal-Eldin & Apelqvist, 1996 ; Serbinova <i>et al.</i> , 1991
Caroténoïdes	Palozza & Krinsky, 1992
Xanthophylles	Lim <i>et al.</i> , 1992
Ubiquinol	Beyer, 1992 ; Frei <i>et al.</i> , 1990
Bilirubine	Neuzil & Stocker, 1993 ; Stocker <i>et al.</i> , 1987
Flavonoïdes	Kozubek & Nienartowicz, 1995
Alkylresorcinols	Wiseman, 1993
Vitamine D	

Tableau 15 : Composés de faible poids moléculaire agissant comme antioxydants (d'après Bartosz, 1997).

Enzymes et réactions catalysées	
Superoxyde dismutase	McCord & Fridovich, 1969 ; Rabinovitch & Fridovich, 1983
Catalase	Deisseroth & Dounce, 1970 ; Redinbaugh <i>et al.</i> , 1990 Flohé & Schlegel, 1971
Glutathion peroxydase	Thomas <i>et al.</i> , 1990
Phospholipide hydroperoxyde glutathion peroxydase	
Glutathion réductase	Schaedle & Bassham, 1977
Ascorbate peroxydase	Elia <i>et al.</i> , 1992
Deshydroascorbate réductase	Dipiero & Borraccino, 1991
Ascorbate radicaux libres réductase	Borraccino <i>et al.</i> , 1986
Méthionine sulfoxide réductase	Brot & Weissbach, 1983
DT-diaphorase	Lind <i>et al.</i> , 1982
Thioredoxine	Holmgren, 1989
Thioredoxine réductase	Holmgren, 1989
Thioredoxine peroxydase	Rhee & Chae, 1994
Métallothionéines	Cai <i>et al.</i> , 1995 ; Ebadi <i>et al.</i> , 1996
Ferritine	Lobreaux & Briat, 1991
Enzymes de réparation de l'ADN	Doetsch <i>et al.</i> , 1986
Protéases	Davies, 1986 ; Davies & Goldberg, 1987 ; Fagan & Waxman, 1992

Tableau 16 : Protéines protégeant des ERO (d'après Bartosz, 1997).

induire ce stress oxydant aux plantes (tab. 14), les composés de faibles poids moléculaire agissant comme anti-oxydants (tab. 15), ainsi que les protéines protégeant des ERO (tab. 16).

V.4. IMPACTS DU STRESS ENVIRONNEMENTAL CHEZ LES BRYOPHYTES

Les bryophytes sont des organismes très anciens, les premiers apparaissant il y a plus de 350 millions d'années avant notre ère (Miller, 1984 ; Frahm, 1981). Ils ont réussi, au fil du temps, à mettre en place des dispositifs particuliers de défense contre le stress environnemental. En effet, ces organismes sont beaucoup moins évolués que les plantes supérieures, puisqu'ils sont poïkilohydriques (capacité qu'a l'organisme à s'adapter à l'humidité ambiante). Ils ont donc une capacité particulière à subir les différents stress environnementaux non anthropiques et anthropiques.

V.4.1. Stress environnemental non anthropique

Le phénomène de tolérance à la dessiccation et aux stress environnementaux en général peut être observé chez de nombreuses bryophytes, ce qui leur confère une remarquable capacité à survivre à la sécheresse et aux différentes agressions occasionnées lors de phénomènes environnementaux non anthropiques sans perdre aucunement leur capacité à se régénérer et à continuer leur croissance et leur développement.

Lors de la dessiccation et de la réhydratation des végétaux poïkilohydriques, des enzymes et des molécules non enzymatiques vont intervenir de manière à limiter les dommages occasionnés par un tel stress.

Le glutathion est connu pour avoir une action directe ou indirecte dans de nombreux phénomènes biologiques. Il peut protéger les cellules contre les agressions oxydatives, mais également il peut influencer l'activité de certaines enzymes, la synthèse des protéines et de l'ADN. Chez les végétaux supérieurs, le glutathion est la forme de transport des sulfures réduits. Un rôle important de ce tripeptide dans la détoxification des éléments traces métalliques et des polluants a été décrit par Rennenberg & Lamoureux (1990) et Smith *et al.* (1990).

Lorsqu'il y a de l'énergie lumineuse, le NADPH nécessaire à l'action de la GR peut être obtenu à partir de la chaîne de transporteur d'électrons de la photosynthèse. Dans l'obscurité, le NADPH semble provenir de l'action de la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PD).

La forme redox et la concentration cellulaire du glutathion sont déterminées par de nombreux facteurs liés à l'environnement et à l'évolution. Les glutathions actuels retrouvés chez les végétaux varient selon les espèces, selon les organes au sein d'une même espèce et selon les organites cellulaires.

Levitt (1980) émet l'hypothèse que les plantes sont protégées contre des stress (incluant le stress lié à la sécheresse) à l'aide de conversion de thiol-disulfures. Une des idées de cette hypothèse est que la déshydratation durant les périodes de sécheresse, notamment le stress lié aux basses températures peut causer des dénaturations de protéines en stimulant la

formation intramoléculaire de ponts disulfures. La tolérance protoplasmique à la sécheresse nécessiterait la réduction de ces ponts disulfures à l'aide de composés thiols de faibles poids moléculaires comme le glutathion. Mais bien évidemment, ce système de protection n'est pas le seul, d'autres anti-oxydants comme le tocophérol ou l'acide ascorbique et/ou d'autres enzymes peuvent intervenir lors des processus d'induction du stress.

Le stress oxydant peut opérer pendant les périodes de sécheresse, mais également lors de longues périodes d'ensoleillement, après une contamination de l'air ou des sols ou lors de carences en minéraux. Et il est donc évident que les végétaux ont dû élaborer une stratégie antioxydative. Bien que le GSH joue un rôle d'anti-oxydant, la SOD peut prédominer dans certaines parties des végétaux. A ce moment là, la GSH joue le rôle de piègeur de radicaux libres.

Chez les plantes poïkilohydriques le phénomène de reviviscence après une dessiccation sans qu'il n'y ait aucune perte de leur capacité à se régénérer et à croître ne se trouve que chez les bryophytes.

Un des aspects de la tolérance à la sécheresse peut être corrélé avec la capacité de se débarrasser des espèces cytotoxiques de l'oxygène. La formation de radicaux libres lors de sécheresses chez les bryophytes a été rapportée par Seel *et al.* (1991). Des espèces fortement résistantes à la dessiccation comme *Tortula ruraliformis* et des espèces comme *Dicranella palustris* faiblement tolérantes à la sécheresse accumulent toutes les deux des radicaux libres relativement stables. Ces espèces radicalaires semblent être initiées par un stress environnemental, la dessiccation ou une exposition à des radiations. Chez les mousses sensibles à la sécheresse, des dommages moléculaires sont observés et donc selon l'adaptation de l'espèce, certaines mousses présenteront des destructions de chlorophylles, des pertes de caroténoïdes et une augmentation des peroxydations lipidiques. Par contre, les bryophytes tolérantes à la dessiccation ne montrent aucun dommage lié à l'oxydation.

Dans l'expérience menée par Kranner & Grill (1995), les deux bryophytes précédemment citées ont été utilisées : *Tortula ruraliformis* (tolérante à la dessiccation) et *Dicranella palustris* (sensible à la dessiccation). Le but de cette étude a été d'observer les mécanismes de défense contre les dommages liés à l'oxydation. Il en résulte que dans l'état hydraté, *T. ruraliformis* présente une plus forte activité SOD que *D. palustris*, par contre pour les deux mousses les activités de la glutathion peroxydase (GPx) et de l'ascorbate peroxydase (APx) sont très faibles. Chez *T. ruraliformis*, la dessiccation aboutit à une augmentation de l'activité de la SOD mais n'induit pas l'activité de la GPx et de la APx. Chez *D. palustris* la dessiccation en combinaison avec l'irradiation aboutit à une diminution de l'activité des peroxydases, mais a un faible effet sur l'activité d'autres enzymes intervenant sur l'oxygène. Les catalases extrachloroplastiques sont 7 fois plus actives chez *T. ruraliformis* hydraté que chez *D. palustris*, mais le phénomène de dessiccation induit une baisse commune des activités catalases chez les deux bryophytes. Durant la dessiccation, une diminution du taux d'acide ascorbique a été notée chez les deux espèces. Lorsque *T. ruraliformis* se dessèche à la lumière, il y a synthèse d' γ -tocophérol, maintien des α -tocophérol et du glutathion.

Les auteurs ont également montré que l'oxydation et la réduction du glutathion durant la réhydratation dépendait de la vitesse de dessiccation. Pendant les dessiccations lentes, il observe une augmentation de la GSSG passant de 2 % à 22 % (% des glutathions totaux). Lors de la réhydratation des mousses desséchées lentement, le GSSG diminue jusqu'à 2 % (GSSG initial) en deux heures. Pendant les dessiccations rapides, il y a une très faible augmentation des GSSG et lors de la réhydratation on peut observer une augmentation forte des GSSG allant jusqu'à 45 %. Ce taux commence à diminuer après deux heures et retrouve le

niveau initial de 2 % après six heures. Dans cette étude, les fortes concentrations en GSSG pendant la réhydratation ont été corrélées avec l'inhibition de la synthèse protéique.

Comme le GSSG ne croît pas lors de dessiccations rapides des mousses, il se pourrait que la formation de GSSG durant le phénomène de sécheresse ne soit pas la conséquence exclusive en réponse au phénomène de sécheresse mais plutôt à une oxydation passive de la GSH par l'oxygène. Dans ce cas, l'oxydation de la GSH serait faite de manière enzymatique. Nous ne connaissons pas quelles enzymes interviennent dans ce processus, mais il semblerait probable que des peroxydases catalysent ce genre de réaction.

Dans cette étude sur *T. ruralis*, l'activité des GR, GPx et glutathion-s-transférase (GST) a augmenté lors d'une dessiccation lente ou durant une réhydratation suivant une déshydratation rapide de la mousse. Une augmentation du pourcentage de GSSG d'après la quantité totale de glutathion a été positivement corrélée avec les taux de peroxydation lipidique et négativement avec le taux de synthèse protéique. Il a d'ailleurs été décrit pour les tissus animaux que le GSSG inhibait l'initiation de la synthèse protéique par activation d'une protéine kinase (rôle de phosphorylation) et cela inactiverait les sous unités α du facteur d'initiation 2. De cette façon, les défenses contre les dommages liés à l'oxydation durant les sécheresses peuvent être corrélées avec la formation de glutathion oxydé. Pour les plantes réhydratées, tolérant la sécheresse, il y a une forte demande pour conserver les glutathions dans l'état réduit afin de prévenir l'inhibition de la synthèse des protéines par le GSSG. Enfin, dans certains cas, ce sont les ions superoxydes (O_2^-) qui peuvent causer un vieillissement précoce des tissus et des dommages au niveau cellulaire.

A noter également que certaines espèces de bryophytes ont développé des métabolites secondaires particuliers afin de piéger ces ions très réactifs. Ce sont des flavonoïdes, des tanins, des polyphénols et le carotène qui agissent un peu comme une dismutase (Asakawa, 1990).

V.4.2. Stress environnemental anthropique dû aux polluants

La large distribution des bryophytes et leur grande capacité pour l'accumulation des métaux en font des organismes de choix pour l'analyse d'échantillons de sites pollués à divers degrés. Depuis Rühling & Tyler (1968), les mousses ont été utilisées dans de nombreux pays de l'hémisphère nord pour donner une estimation de la déposition atmosphérique des éléments traces métalliques dans une région donnée, à la fois en tant que biomoniteurs passifs (utilisation des mousses *in situ*) et actifs (introduction de mousses dans le site à étudier).

Durant les dix dernières années, l'étude de l'écophysiologie a été un champ prédominant en bryologie. Mais en étudiant l'ensemble de la bibliographie concernant les bryophytes et la bioindication au sens large, il paraît extrêmement difficile de trouver des informations concernant ce que nous appelons biomarqueurs au sens de Lagadic *et al.* (1997). En effet, il semble que dans de nombreuses études, l'objectif est de savoir uniquement si la bryophyte ou les bryophytes accumulent ou bioaccumulent les polluants. Seuls Brown & Buck (1978), Brown & Withehead (1986), Brown & Sidhu (1992) et Brown & Brumelis (1996) ont lors de plusieurs études concernant *Rhytidiadelphus squarrosus*, entre autres, prolongé leurs recherches bibliographiques et fondamentales afin de connaître non seulement la spéciation de ces métaux mais également les conséquences physiologiques de cette bioaccumulation métallique au sein de la cellule bryophytique. Mais les premières recherches concernant des peptides de faibles poids moléculaires, pouvant intervenir auprès des ETM, ont été réalisées par Jackson *et al.* (1991) lors d'une étude de biomonitoring chez

Rhynchosygium riparioides (mousse aquatique). Un peu plus tard, une autre mousse aquatique, *Fontinalis antipyretica*, a été utilisée en tant que biomoniteur passif, lors de l'étude des ETM de la rivière Elbe (rivière d'Allemagne) (Bruns *et al.*, 1995). Les auteurs ne parlent pas de biomarqueurs mais cherchent une explication aux grandes quantités d'ETM (Cd et Zn) trouvées chez ces bryophytes aquatiques. Ils se sont donc intéressés à la mise en évidence d'un système d'induction de peptides de faible poids moléculaire en présence d'ETM dans les eaux. Afin de compléter ces premières mises en évidence, Bruns *et al.* (1997) ont poursuivi leurs investigations en mettant en évidence l'action des phytochélatines comme chélateur possible du Cd et du glutathion comme monomère des phytochélatines (fig. 21). En parallèle, ils ont pris en considération d'autres paramètres physiologiques comme la concentration en chlorophylles a et b fournissant ainsi des indications sur la vitalité de la mousse.

Les ETM tels que le Cd, le Cu, le Pb et le Zn sont reconnus comme pouvant générer, plus ou moins directement, un stress oxydant au sein des organismes vivants. Les ETM non essentiels perturbent de nombreux processus chez les végétaux comme le fonctionnement des chloroplastes et de la photosynthèse, la fixation biologique de l'azote, l'assimilation du soufre. Ils augmentent l'activité de certaines enzymes, comme le Cd qui augmente l'activité de l'enzyme malique, de la glutamate-oxaloacétate-aminotransférase (Chugh *et al.*, 1992). De nombreux travaux établissent un lien direct entre les éléments traces et le stress oxydant chez les végétaux supérieurs. Costa & Spitz (1997) ont étudié les effets du Cd chez *Lupinus albus*. Ils ont pu montrer qu'il y avait un effet délétère sur les pigments chlorophylliens, mais aussi sur les membranes par l'augmentation de la concentration en MDA.

Chaoui *et al.* (1997) ont exposé des plants de *Phaseolus vulgaris* à des solutions de Cd et de Zn. Ils ont observé une augmentation de la concentration en MDA dans tous les organes, ainsi qu'une augmentation de l'activité de la glutathion réductase. L'activité de l'ascorbate peroxydase augmente uniquement au sein des feuilles, confirmant que les centres d'activités principaux de cette enzyme sont les chloroplastes.

Les effets du plomb ont été beaucoup moins étudiés. Cet élément est moins mobile au sein des végétaux supérieurs. Il est fréquemment immobilisé au niveau du système racinaire. Vangronsveld *et al.* (1997) ont montré lors de travaux *in vitro* que chez diverses espèces exposées à des solutions de plomb, on pouvait noter une induction de l'activité des peroxydases. Récemment, Rucinska *et al.* (1999) ont montré que l'action du $Pb(NO_3)_2$ sur *Lupinus luteus* provoquait une inhibition de la croissance racinaire et une modification de sa morphologie. La formation de radicaux libres et l'activité des enzymes anti-oxydantes ont été étudiées (SOD, catalase, peroxydase, ascorbate peroxydase). Une augmentation dépendante du plomb a été observée pour l'activité de la SOD et de la peroxydase au bout des racines alors que les activités catalase et ascorbate peroxydase diminuent lorsque les plus hautes concentrations en Pb sont atteintes. Ils mettent en évidence que lorsque les concentrations en plomb sont trop fortes, le système anti-oxydant des cellules racinaires est débordé et que la croissance de ces dernières diminue sensiblement. Il semblerait que pour les végétaux l'emploi de la catalase et de l'ascorbate peroxydase soit plus judicieux que les autres activités enzymatiques étudiées, puisque ces dernières sont directement en relation avec le peroxyde d'hydrogène qui est synthétisé lorsqu'il y a présence d'ions métalliques dans la cellule végétale.

La première cible du Cu semble être la membrane cellulaire. De Vos *et al.* (1989) ont observé que le cuivre induit une peroxydation lipidique corrélée avec une fuite de potassium, et une baisse du GSH chez *Silene cucubalus*. Ils ont montré que cette baisse de GSH est due à la synthèse de PC (De Vos *et al.*, 1992). Schat *et al.* (1997) ont observé chez *Silene vulgaris* que le cadmium engendre une baisse du potentiel hydrique. Cette baisse provoque un stress qui induit la production de proline. Cet acide aminé chélaterait le Cd au sein du cytoplasme, essentiellement au niveau des feuilles.

Malgré ces travaux, des études complémentaires sur les impacts du stress oxydant occasionnés par les ETM chez les bryophytes doivent être plus développées si l'on veut pouvoir utiliser de manière fiable ces organismes comme bioindicateurs et biomoniteurs de polluants. En effet, malgré le fait que les ETM provoquent un stress oxydant qui sera, si les conditions sont favorables, contrôlé par des enzymes ou des molécules anti-oxydantes, ces ETM peuvent également inhiber ces mêmes enzymes ou molécules. C'est pourquoi, il est indispensable d'utiliser un ensemble de marqueurs biologiques et de croiser les résultats pour réaliser des diagnostics précoces fiables et également mieux appréhender les phénomènes de tolérance ou de non-tolérance des bryophytes faces aux polluants.

V.5. UTILISATION DE BIOMARQUEURS PHYSIOLOGIQUES ET BIOCHIMIQUES EN ECOTOXICOLOGIE

Les activités enzymatiques anti-oxydantes peuvent être modulées par des facteurs environnementaux et par la présence de substances polluantes. Ainsi, ces activités pourraient être utilisées en écotoxicologie comme biomarqueurs chez les bryophytes permettant de caractériser la qualité des milieux naturels. Chez les végétaux, la plupart des travaux sont limités au domaine expérimental à l'instar des animaux, mais chez les bryophytes, les travaux sont quasi inexistant mis à part dans les études physiologiques chez certaines mousses vis-à-vis du stress hydrique. C'est pourquoi d'après notre étude bibliographique, nous pouvons proposer deux types de biomarqueurs potentiellement utilisables chez les bryophytes : les biomarqueurs physiologiques et biochimiques.

V.5.1. Les biomarqueurs physiologiques

Beaucoup de mousses pleurocarpes ont été utilisées dans les études de relation entre les métaux et certains facteurs physiologiques comme la photosynthèse, la croissance, les concentrations en sels minéraux (Ca, Mg...) chez *Rhytidiadelphus squarrosus* (Brown & Sidhu, 1992). Brown & Whitehead (1986) ont étudié l'impact du mercure toujours chez cette même espèce. Le mercure étant un élément métallique extrêmement toxique et de nombreuses études préliminaires ayant présenté le Hg comme bryocide, une étude physiologique a été nécessaire. Les résultats de ce travail ont montré que la photosynthèse et la respiration étaient perturbées même à de basses concentrations en Hg.

Haselhoff & Winkler (1980) indiquent la nette sensibilité de l'activité photosynthétique, vis-à-vis du plomb, qui varie néanmoins selon l'espèce et selon le métal, chez *Scleropodium purum* (Pb>Cd>Zn). Par contre, Brown & House (1978) ont pu mettre en évidence chez *Jungermannia gracillima*, non seulement son caractère cupricole, mais aussi sa capacité à augmenter sa photosynthèse en présence de Cu, ce dernier étant strictement nécessaire pour le bon développement de cette hépatique. Ces résultats viennent conforter la nécessité de mettre en évidence des modifications physiologiques intéressantes et de les utiliser en tant que biomarqueurs d'exposition ou d'effets.

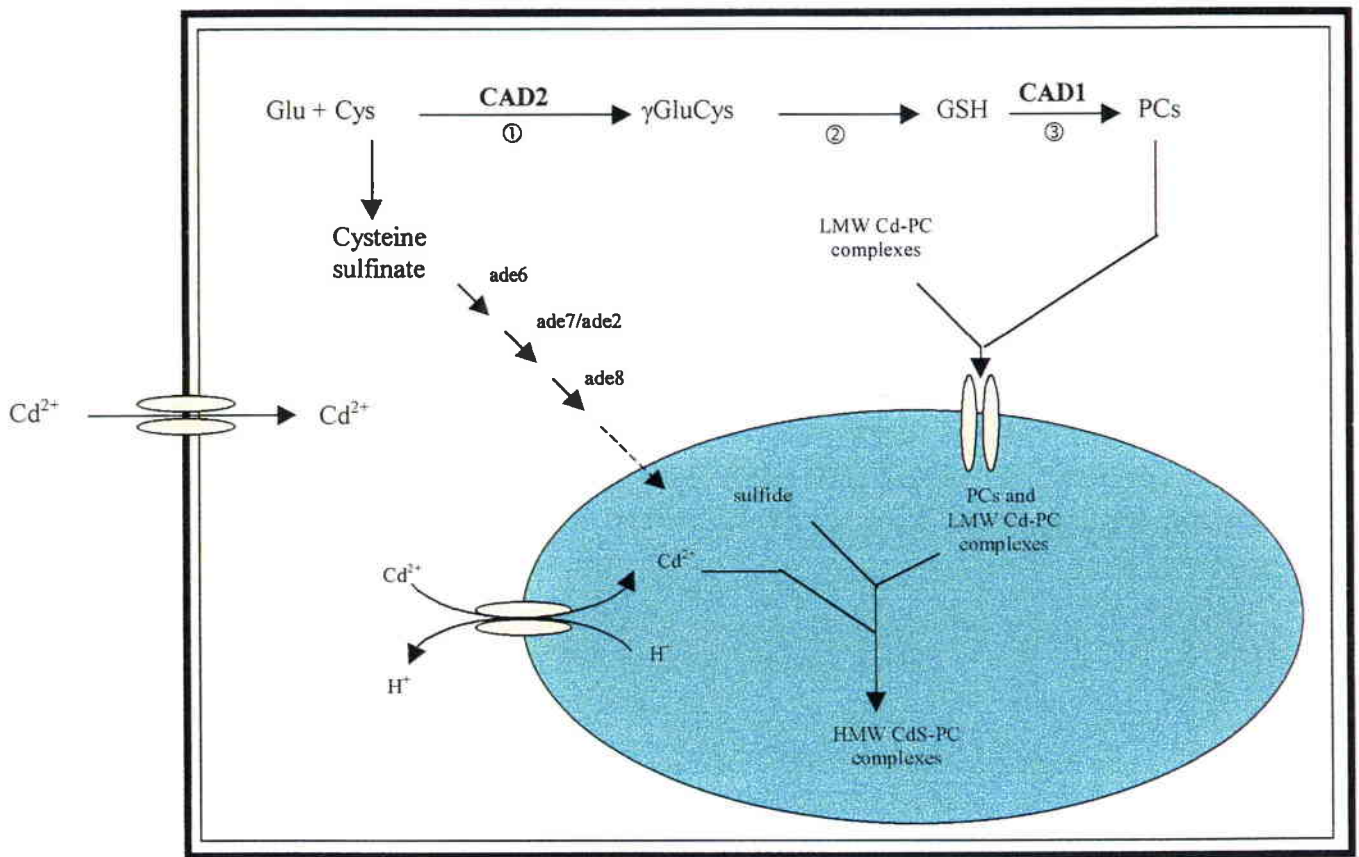


Figure 23 : Résumé de la formation de complexes Cd-PC chez les plantes et chez *Schizosaccharomyces pombe* (LMW Cd-PC, complexes Cd-PC de faible poids moléculaire ; hmt1, transporteur tolérant aux éléments traces métalliques ; HMW Cd-PC, complexes Cd-PC de haut poids moléculaire ; CAD 1, produit du gène cad1 chez *Arabidopsis halleri* modulant sa tolérance au Cd²⁺ ; CAD2, produit du gène cad2 chez *Arabidopsis halleri* modulant sa tolérance au Cd²⁺ ; ade 2, ade 6, ade 7, ade 8, produits des gènes respectifs pour *Schizosaccharomyces pombe* (d'après Fordham Skelton *et al.*, 1997).

V.5.2. Les biomarqueurs biochimiques

Nous savons désormais que chez les bryophytes, comme chez les végétaux supérieurs, de nombreux mécanismes enzymatiques et non enzymatiques interviennent dans divers compartiments cellulaires (intrachloroplastique ou extrachloroplastique). Il est généralement admis que les bryophytes présentent un cycle de réduction du carbone photosynthétique en C₃, intégré avec un cycle d'oxydation en C₂. Des catalases (E.C. 3.2.1.6) avec des oxydases sont les marqueurs enzymatiques pour les systèmes oxydants. Imoto & Ohta (1985) ont isolé des peroxyosomes d'une suspension de culture de *Marchantia polymorpha* et ont montré que 72 % des activités des catalases étaient localisées dans ces organites cellulaires (cité par Rudolph, 1990). Frederick *et al.* (1973) ont mesuré l'activité catalase chez *Polytrichum sp.*, *Leptodictyum riparium*, *Pellia sp.*, *Porella sp.* et chez *Marchantia sp.* (cité par Rudolph, 1990). Ils concluent que chez les bryophytes comme chez les plantes supérieures, cette enzyme utilise le H₂O₂ produit par l'oxydation du glycolate. En comparaison avec les plantes supérieures, les peroxydases ont très peu été étudiées chez les bryophytes. Mais quelques études ont permis de savoir que ces enzymes se trouvaient au niveau de la paroi cellulaire et au niveau du cytoplasme. Ishida *et al.* (1987) présentent des résultats indiquant que H₂O₂ est formée par l'oxydation soit du NADH soit du NADPH, en présence de MnCl₂, à l'aide des peroxydases associées à la paroi cellulaire, la réaction étant stimulée par des phénols, comme le 2, 4-dichlorophénol ou l'acide p-coumarique (cité par Rudolph, 1990).

De nombreux travaux, depuis une vingtaine d'années chez les végétaux supérieurs, ont permis de mettre en évidence les différentes interactions entre les polluants et les molécules biologiques. Deux types d'enzymes sont classiquement utilisés en tant que biomarqueurs d'exposition : les enzymes de biotransformation, en particulier les monooxygénases à cytochrome P450, et les acétylcholinestérases. Les enzymes de la peroxydation lipidique et du stress oxydant (peroxydases, super oxyde dismutases, catalases) constituent une autre classe d'enzymes intervenant dans les mécanismes de détoxication dont les possibilités d'utilisation comme biomarqueurs d'exposition ou d'effets font actuellement l'objet d'études chez les bryophytes.

Chez d'autres espèces de bryophytes et en particulier les sphaignes, des acides particuliers sont synthétisés au niveau intracellulaire et présentent des propriétés chélatantes vis à vis des métaux (Ramos *et al.*, 1993). En effet la capacité pour les sphaignes d'accumuler les cations et donc les métaux a été pour la première fois observée par Williams & Thompson en 1936 (Ramos *et al.*, 1993). Des acides polyuroniques ont été découverts à des taux compris entre 10 et 30 % de la masse totale de la mousse à l'état sec. Enfin, divers acides organiques sont naturellement synthétisés par les bryophytes. Il semblerait probable que d'autres acides organiques et en particulier des substances polyphénoliques peuvent intervenir dans la chélation de cations métalliques. Enfin, l'utilisation de composés polymères riches en groupements thiols, comme les phytochélatines, semble très intéressante. Chez les végétaux supérieurs, ces polymères du glutathion chélatent les ions Cd²⁺ présents au niveau cellulaire (fig. 23). Néanmoins, la présence de ces phytochélatines chez les bryophytes n'a pas encore été démontrée.

Nous pouvons donc résumer dans le tableau suivant (tab. 17) les pistes intéressantes à suivre en ce qui concerne l'utilisation potentielle de biomarqueurs de stress chez les bryophytes.

Biomarqueurs biochimiques	Biomarqueurs physiologiques
SOD Cytochrome P450 Malondialdéhyde Glutathion (GSH) Peroxydases Catalases Ascorbate peroxydase Nitrate réductase Protéines de stress HSP Métallothionéines	La photosynthèse Taux de chlorophylles a et b ATP Potassium Calcium Magnésium Fer Cuivre
Biomarqueurs de génotoxicité	Biomarqueurs de mutagénéicité
Adduits (8OHdG...) Dimères de thymine Pontage intra/inter-brins Coupe de l'ADN	Micronoyaux Cassure de chromatides

Tableau 17 : Biomarqueurs à prendre en considération lors d'utilisation de bryophytes pour le diagnostic précoce de pollutions dues à des xénobiotiques.

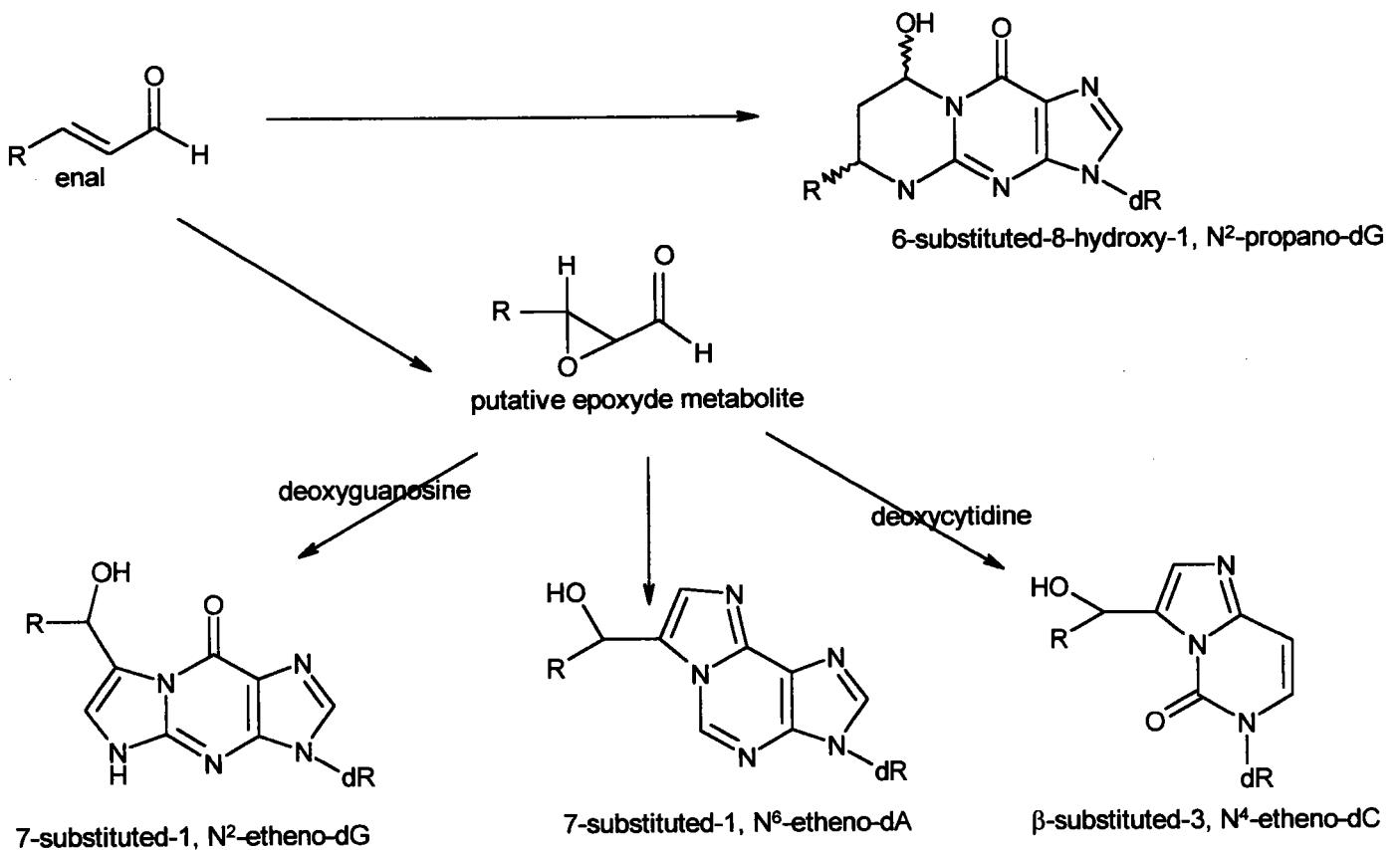


Figure 24 : Principaux adduits formés durant les réactions des composés énal, ainsi que de leurs produits d'époxydation avec l'ADN (d'après Burcham, 1998).

Plusieurs types de mesures physiologiques, réalisées au laboratoire ou en milieu naturel, peuvent être utilisées. La mise en relation de paramètres individuels (croissance, reproduction, etc.) avec l'estimation de la consommation d'énergie et des réserves énergétiques disponibles pour le métabolisme constitue une approche intéressante. Elle permet, en effet, d'évaluer l'évolution de l'état de santé de l'individu et les conséquences potentielles sur les populations à partir de paramètres biochimiques facilement mesurables. Les bryophytes mises en contacts directs ou indirects avec les éléments traces métalliques permettent dans certains cas de mettre en évidence de tels biomarqueurs (biochimique et/ou écophysio-logique). L'émission de fluorescence au niveau de la chlorophylle par des bryophytes et donc des modifications sensibles de l'activité photosynthétique, apportent des éléments supplémentaires quant à la pertinence de l'utilisation des biomarqueurs chez ces organismes végétaux. Néanmoins, des stress autres que ceux liés aux métaux sont révélés dans différentes études. Des mécanismes d'adaptation particuliers combattant les effets liés au stress de la perte en eau en sont un exemple. Enfin, il semble intéressant de pouvoir comparer les activités physiologiques et biochimiques des bryophytes avec celles des plantes supérieures afin de mettre en évidence des pistes plus précises quant à l'étude de ces biomarqueurs d'exposition précoce. L'utilisation de biomarqueurs de génotoxicité permettra d'affirmer ou de confirmer certains diagnostics lors de contamination par certains polluants particuliers. La fixation des contaminants sur des macromolécules, conduisant à la formation d'adduits sera un de ces exemples. Le dosage des nucléotides de l'ADN modifié par des agents génotoxiques constitue des mesures plus exactes de la dose interne individuelle que la mesure des concentrations dans l'air environnant. Néanmoins, dans l'état actuel des recherches, ces méthodes ne permettent d'apprécier que le niveau d'exposition. En effet du point de vue écoépidémiologique, aucune relation n'a encore pu être établie, par exemple entre la fréquence de formations des adduits aux macromolécules et la proportion de cancers chez les individus régulièrement exposés à des substances génotoxiques. Les adduits à l'ADN (fig. 24) chez certains végétaux ont été utilisés comme biomarqueurs d'exposition à des substances génotoxiques présentes dans le sol, l'eau et dans l'air (par exemple le benzo(a)pyrène). D'autres adduits, comme la 8OHdG peuvent également être mis en évidence chez les végétaux supérieurs et chez les bryophytes. A ce jour, nous n'avons vu aucune référence bibliographique montrant que ce type d'adduit était utilisé chez les bryophytes.

Une utilisation synergique de ces biomarqueurs permettraient de mettre en évidence de manière plus rapide des problèmes environnementaux chez des organismes sentinelles appropriés. Ainsi, nous pourrions réaliser de manière encore plus précoce des diagnostics concernant la qualité de nos écosystèmes et intégrer de manière globale, grâce à la démarche écotoxicologique, l'ensemble des impacts des polluants sur l'environnement.

MATERIEL ET METHODES

I. ÉTUDE BRYOSOCIOLOGIQUE

Les effets néfastes sur la flore bryologique dus à la mauvaise qualité de l'air sont connus depuis bien longtemps, mais ce fut Wilson (1900) qui le premier observa la grande diminution de l'abondance de certaines mousses et hépatiques aux alentours des grandes villes du nord de la Grande-Bretagne. Il évoquait l'extinction pour les genres *Ulota* et *Orthotrichum*. Barkman (1958) fut un pionnier en ce qui concerne l'utilisation des bryophytes pour évaluer la qualité de l'environnement.

De façon générale et sans distinction de type de polluant, nous pouvons affirmer que les principaux effets de la pollution sur les bryophytes sont une diminution de la diversité des espèces, de leur vitalité et de leur fertilité (De Sloover & Le Blanc, 1970 ; Gilbert, 1970).

Depuis le premier article de Rühling & Tyler (1968), les mousses ont été utilisées dans de nombreux pays de l'hémisphère Nord pour donner une estimation de la déposition atmosphérique des métaux dans une région donnée, à la fois en tant que bioindicateur actif ou passif. La large distribution des bryophytes et leur grande capacité d'accumulation des métaux en font des organismes de choix pour l'analyse de sites pollués à divers degrés.

Des mousses cupricoles appartenant aux genres *Grimmia*, *Gymnocolea*, *Scopelophila*, *Mielichhoferia* ont été décrites par Persson en 1956. Brown & House (1978) ont découvert un écotype cuivre-tolérant de l'hépatique *Jungermannia gracillima*, chez qui la photosynthèse est stimulée par une concentration donnée en cuivre, démontrant ainsi que l'hépatique aurait un besoin spécifique en cet élément. Plus récemment, des études ont été menées par Shaw et ses collaborateurs (Shaw, 1987a, 1987b ; Shaw *et al.*, 1987, 1989 ; Shaw & Anderson, 1988). Nous citerons les études de Shaw (1987a) concernant *Scopelophila cataractae* dans six localités aux Etats-Unis d'Amérique. L'analyse chimique de différents substrats a mis en évidence qu'une seule population supportait un fort enrichissement en cuivre. Divers échantillons de cette population ont été cultivés expérimentalement sur quatre sols différemment contaminés en cuivre, plomb et zinc, il s'est avéré que *Scopelophila cataractae* supportait le mieux la pollution par le cuivre. D'après Sotiaux & De Zuttere (1987), toutes les localités actuellement connues de cette bryophyte en Europe se situent sur des déchets souvent très riches en divers éléments traces métalliques (boues de lavage, scories et culots de fonderie) à proximité d'anciennes usines de traitement de minerais de métaux non-ferreux (sites artificiels).

Persson (1948), Noguchi (1956), Shacklette (1965a, 1965b, 1967), entre autres, ont discuté de leurs propres observations ou expériences sur les bryophytes apparemment cuprophiles. Même si de nombreux bryophytes semblent montrer un haut degré de tolérance vis-à-vis de sols riches en métaux, il ne semble y avoir qu'un nombre très limité d'espèces strictement inféodées aux milieux naturels ou artificiels riches en éléments traces métalliques.

Sotiaux & De Zuttere (1987) ont montré que des communautés bryophytiques retrouvées sur des sols fortement contaminés en métaux étaient composées parfois d'espèces inféodées à ce type de sol, mais également d'espèces plus ubiquistes présentant une tolérance importante en présence de fortes concentrations en éléments traces métalliques dans le sol.

La région Nord-Pas-de-Calais renferme un certain nombre de sites pollués situés à proximité d'usines de traitements de minerais de métaux non-ferreux (Pb, Zn, Cd) encore en activités (Noyelles Godault, Auby) ou en arrêt depuis 1963 (Mortagne-du-Nord). Sur deux de ces sites, Sotiaux & De Zuttere (1987) avaient noté la présence de *Scopelophila cataractae* ainsi que de *Cephaloziella divaricata* (Boullet, 1989). Les auteurs ont essentiellement envisagé l'écologie et la chorologie de *Scopelophila cataractae* en Europe. Aucune



Figure 25 : Localisation des sites d'étude des communautés bryophytiques.



Photographie 1 : Exemple de communauté de bryophytes (photo Franck Denayer)

corrélation n'a été établie entre le degré de contamination des sols et la composition des groupements bryologiques observés dans la région Nord-Pas-de-Calais.

Le but de cette étude est de décrire les groupements bryologiques terricoles caractéristiques des sites calaminaires de la région Nord-Pas-de-Calais. Nous nous proposons d'étudier les corrélations entre les teneurs en Cd, Pb et Zn et la composition floristique de ces sols, afin d'établir un outil de diagnostic pertinent des sites pollués en éléments.

Les relations entre la végétation bryophytique terricole et les paramètres édaphiques (pH, C/N (carbone / azote), N (azote organique), CEC (capacité d'échanges cationiques), MO (matière organique) et concentrations en Cd, Pb et Zn) des sites calaminaires du Nord-Pas-de-Calais ont été étudiées par différentes analyses statistiques (ACP, AFD et AFCM). La corrélation significative entre les classements bryofloristiques et édaphiques implique une forte valeur bioindicatrice de sols pollués aux douze groupements bryophytiques mis en évidence. Cette valeur bioindicatrice a été affinée en prenant en compte les stades physiologiques de chaque espèce (stérilité, fertilité, maturité, vitalité) ce qui a permis de différencier trois classes de bryophytes caractérisées chacune par une gamme de concentrations des sols en Cd, Pb et Zn.

I.1. SITES D'ETUDE

Cinq sites ont été retenus dans la Région Nord-Pas-de-Calais : trois terrains calaminaires (deux à Aubry et un à Mortagne-du-Nord, Nord), un terroir minier (Harnes, Pas-de-Calais) et un site témoin (Flines-les-Mortagne, Nord) (fig. 25).

Les terrains calaminaires du Nord-Pas-de-Calais correspondent à d'anciens crassiers où ont été amassés les résidus provenant de la métallurgie des minerais de plomb et de zinc. Les sites d'Aubry (AH, ABA) sont localisés à proximité immédiate de l'usine Union Minière qui traite les minerais de zinc depuis la fin du XIX^{ème} siècle. A la pollution des sols engendrée par le dépôt des scories résiduelles de l'exploitation des minerais, s'ajoute une pollution atmosphérique. Pour l'année 1995, on estimait les rejets annuels atmosphériques de Cd, Pb et Zn respectivement à 0,09, 3 et 1240 kg pour Union Minière (Aubry) et à 780, 26 790 et 34 570 kg pour Metaleurop (Evin-Malmaison), la production annuelle étant de plus de 283 000 tonnes de zinc et de 152 000 tonnes de Pb pour ces deux usines (DRIRE, 1996). Sur le site de Mortagne-du-Nord (MN), l'industrie métallurgique a cessé ses activités depuis 1963. De tels sites sont colonisés par une végétation particulière appelée pelouse calaminaire. On y observe des métalrophytes absolus, i.e. des végétaux liés exclusivement aux sols métallifères : *Armeria maritima* Willd. subsp. *halleri* (Wallr.) Rothm., *Cardaminopsis halleri* (L.) Hayek, *Silene vulgaris* (Moench) Garcke subsp. *vulgaris* var. *humilis* Schubert. D'autres végétaux non nécessairement liés à la présence de métaux dans les sols, tels que *Arrhenatherum elatius* (L.) Beauv. ex J. et C. Presl, *Agrostis capillaris* L., *Calamagrostis epigeios* (L.) Roth. ainsi que des bryophytes et des lichens sont également présents sur ces sites ; on les qualifie de pseudo-métalrophytes (Lambinon & Auquier, 1963). D'un point de vue synsystématique, les végétations calaminaires des sites étudiés constituent une forme appauvrie de l'*Armerietum halleri cardaminopsidetosum halleri* Ernst 1965 (Van Haluwyn *et al.*, 1987). L'originalité de ces végétations a permis le classement du site de Mortagne-du-Nord en Zone Nationale d'Intérêt Ecologique Faunistique et Floristique (ZNIEFF).

Le terril minier de Harnes (H) est essentiellement colonisé par une pelouse rase à bryophytes et à lichens. Une strate herbacée ainsi qu'une strate arbustive sont faiblement représentées.

Le site témoin (TFM) correspond à une ancienne carrière de sable acide, non loin d'une forêt domaniale sur sable tertiaire présentant des assises dites e³ et e², colonisée en partie par une pelouse rase à bryophytes et lichens.

I.2. PRELEVEMENTS ET ANALYSES DES SOLS

Un échantillon de sol (moins de 10 cm de profondeur) a été prélevé systématiquement dans chaque relevé de bryophytes ; l'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA, Arras) en a déterminé les caractéristiques physico-chimiques : pH, azote organique, rapport C/N, capacité d'échanges cationiques (CEC), matière organique. Les protocoles utilisés correspondent aux normes françaises en vigueur (normes AFNOR).

Les dosages des éléments traces métalliques ont été réalisés au Centre Universitaire de Mesures et d'Analyses de l'Université de Lille 2 (CUMA).

Après séchage et tamisage (2mm) des sols prélevés, un échantillon de 250 mg est soumis à une minéralisation acide (technique dite à l'eau régale Norme AFNOR NF X31-151) : 2 ml HNO₃ (65 %), 3,5 ml HCl (30 %), 1 ml d'eau ultra-pure. Chaque échantillon est mis à l'étuve à 60° pendant 36 heures. Les dosages sont réalisés par spectrométrie d'absorption atomique de flamme air/acétylène (Perkin Elmer 2100 à correction par lampe au deutérium). L'estimation de l'erreur ($\pm 10\%$) comprend tout le processus de la réception des échantillons aux dosages.

I.2.1. Protocole de dosage des éléments traces, norme AFNOR X 31-151 (1996)

I.2.1.1. PRINCIPE

Le dosage consiste, dans un premier temps, à mettre en solution les éléments par un mélange d'acides (*i.e.* la phase de minéralisation). On dose ensuite les éléments par spectrométrie d'absorption atomique.

I.2.1.2. MODE OPERATOIRE

Les échantillons sont séchés à température constante (29° C) pendant plusieurs jours. Ils sont ensuite tamisés à l'aide d'un tamis de 2 mm de maille. La masse standard de l'échantillon est de 250 mg.

La mise en solution des éléments se fait par une attaque acide associant 3,5 ml d'acide chlorhydrique à 30 % (Acros), 2 ml d'acide nitrique à 65 % (Acros) et 1 ml d'eau bidistillée (technique dite à l'eau régale). Cette mise en solution s'effectue dans des piluliers en polyuréthane résistant aux acides. Les piluliers sont placés à l'étuve à 60°C pendant deux jours. Les échantillons sont ensuite filtrés à l'aide d'un papier filtre sans cendre. Les solutions obtenues sont placées dans des fioles jaugées en verre et le volume est ajusté à 50 ml par de

l'eau bidistillée. Cette solution est prête pour effectuer les dosages des éléments traces métalliques.

Les dosages de cadmium, plomb et zinc ont été effectués par spectrométrie d'absorption atomique de flamme air/acétylène. Nous avons utilisé un appareil Perkin-Elmer 2100 à correction par lampe au deutérium. La longueur d'onde employée pour le Zn est de 213,9 nm (seuil de détection : 1 mg.l⁻¹), celle pour le Pb de 283,3 nm (seuil de détection : 20 mg.l⁻¹) et celle pour le Cd de 228,8 nm (seuil de détection : 2 mg.l⁻¹). Nous avons dû, pour les échantillons des sites contaminés, fréquemment pratiquer des dilutions (1/10, 1/100 et 1/1 000) avec de l'eau bidistillée. Chaque mesure est réalisée deux fois. Les résultats sont exprimés en mg.kg⁻¹ de sol.

Le dosage du calcium total a été réalisé selon le même principe, mais la mise en solution s'opère par un mélange de 5 ml d'acide perchlorique (HClO₄) et de 5 ml d'acide fluorhydrique (HF). Les résultats sont exprimés en g.kg⁻¹ de sol.

I.2.2. Protocole de dosage de la matière organique (MO), norme AFNOR NF X 31-109 (1992)

I.2.2.1. PRINCIPE

Il est basé sur la réduction du chrome VI en chrome III par le carbone organique du sol. Le taux de matière organique est calculé par un coefficient multiplicateur à partir du taux de carbone.

I.2.2.2. MODE OPERATOIRE

Un échantillon de 25 mg de terre est broyé dans un broyeur à garniture d'agate. L'échantillon broyé est introduit dans un tube jaugé dans lequel on ajoute 5 ml de solution de bichromate (K₂Cr₂O₇ solution à 8 % m/V) puis 7,5 ml d'acide sulfurique. Au fur et à mesure de l'addition de l'acide sulfurique, les tubes sont placés dans un bloc chauffant et laissés 30 minutes. On ajoute ensuite 50 ml d'eau bidistillée puis les tubes sont refroidis dans un bain d'eau. Les solutions à température ambiante sont complétées avec de l'eau bidistillée et le volume ajusté à 75 ml. Après homogénéisation, les tubes sont laissés à décanter pendant une heure. Une aliquote de chaque solution est transférée dans des tubes pour une centrifugation à 2 000 G pendant 10 minutes.

Les solutions sont transférées dans des cuves de spectrophotomètre ($\lambda = 585$ nm). La gamme d'étalonnage est réalisée avec des solutions de glucose (solution de 0 à 10 g de glucose par litre). Les résultats sont exprimés en g.kg⁻¹ de sol.

I.2.3. Détermination de la capacité d'échanges cationiques (CEC), norme AFNOR NF X 31-130 (1993)

Il existe trois méthodes normalisées : la méthode à l'acétate d'ammonium, la méthode au chlorure de cobaltihexamine et la méthode à l'oxalate d'ammonium. Dans ce paragraphe, nous décrivons la méthode à l'acétate d'ammonium qui a été utilisée.



I.2.3.1. PRINCIPE

La capacité d'échange cationique d'un échantillon de sol est la quantité totale de cations que l'échantillon peut retenir sur son complexe adsorbant à un pH donné. Dans un premier temps, on effectue un échange entre les cations de l'échantillon et les ions ammonium en solution. La deuxième phase est un rinçage des ions ammonium en excès. La troisième étape est l'extraction des ions ammonium fixés dans l'échantillon. Enfin, la dernière étape est la détermination de la CEC par le dosage des ions ammonium fixés.

I.2.3.2. MODE OPERATOIRE

Un échantillon de 2,5 g de sol est placé dans une allonge de percolation. Cette allonge est remplie avec une solution d'acétate d'ammonium ($C_2H_7NO_2$, pH : 7 ; 1 mol.l^{-1}) que l'on laisse percoler. Au total, il faut réaliser cinq percolations. L'échantillon est ensuite rincé à l'alcool éthylique. Il est généralement nécessaire d'effectuer six rinçages pour obtenir une élimination complète des ions ammonium en excès. A la suite du rinçage, l'échantillon est mis à sécher environ douze heures à température ambiante.

L'échantillon est placé dans un récipient à agitation. L'extraction des ions ammonium est réalisée grâce à 50 ml de NaCl (1 mol.l^{-1}). L'agitation dure 1 heure.

La solution est ensuite filtrée (sur filtre sans cendres). Vingt-cinq millilitres du filtrat sont versés dans le ballon d'un appareil à distiller, ainsi que 10 ml de soude (solution aqueuse à 33%). Le volume est complété à 200 ml avec de l'eau distillée. Quarante millilitres de solution d'acide borique et quelques gouttes d'indicateur de Tashiro sont placées dans le flacon de récupération du distillat. Le dosage est réalisé par spectrocrométrie à une longueur d'onde de 660 nm. La concentration est déterminée par rapport à une gamme d'étalonnage. Les résultats sont exprimés en cmol^+/kg .

I.2.4 Détermination de la teneur en azote total, méthode de Kjeldahl modifiée, norme AFNOR X31-111 (1995)

I.2.4.1 PRINCIPE

Ce dosage repose sur une minéralisation de l'azote total. Initialement, la méthode de Kjeldahl utilise le sélénium comme catalyseur. Dans cette version modifiée, le sélénium est remplacé par du dioxyde de titane.

I.2.4.2. MODE OPERATOIRE

On place un échantillon de 1 g de sol dans un matras de minéralisation en verre ou en Téflon. La minéralisation débute par l'ajout de 4 ml de mélange d'acide salicylique et d'acide sulfurique (25 g d'acide salicylique $C_7H_6O_3$ dans 1 l d'acide sulfurique H_2SO_4). On agite le matras jusqu'à obtention d'une phase homogène de sol et d'acides. Ce mélange doit reposer plusieurs heures (une nuit).

On ajoute 500 mg de thiosulfate de sodium ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$), puis on chauffe progressivement le matras jusqu'à la disparition de la mousse formée. Après refroidissement, on ajoute 1,1 g du mélange catalytique. Ce mélange se compose de 200 g de sulfate de potassium (K_2SO_4), 6 g de sulfate de cuivre ($\text{CuSO}_4, 5\text{H}_2\text{O}$) et 6 g de dioxyde de titane (TiO_2), broyés et homogénéisés. On chauffe à nouveau le matras ($t^\circ < 400^\circ\text{C}$), jusqu'à ce que le mélange réactionnel devienne clair (durée 2 à 5 h). La minéralisation est alors terminée. Après refroidissement à température ambiante, on ajoute 20 ml d'eau distillée sans agitation. Le contenu du matras est additionné de 20 ml d'hydroxyde de sodium (10 mol.l^{-1}) et ensuite transféré dans un appareil à distiller. On verse 5 ml d'une solution aqueuse d'acide borique ($\text{H}_3\text{BO}_3, 20 \text{ g.l}^{-1}$) dans une fiole conique de 100 ml placée en sortie du condenseur, son extrémité plongeant dans la solution. Après distillation, on ajoute quelques gouttes d'indicateur coloré (vert de bromocrésol), puis on titre avec de l'acide sulfurique jusqu'à virage violet. Les résultats sont exprimés en g.kg^{-1} de sol.

1.2.5. Détermination du pH, norme NF X 31-103 (1992)

Vingt grammes de sol sec tamisé sont placés dans un becher de 150 ml. On ajoute 50 ml d'eau distillée et un barreau aimanté. L'eau et l'échantillon sont mélangés pendant au moins cinq minutes. La mesure s'effectue au pH-mètre (Hanna HI 8520, Linosheim).

1.3. RELEVES DES BRYOPHYTES

Trente neuf relevés ont été réalisés sur les cinq sites d'étude selon la méthode phytosociologique sigmatiste (de la SIGMA, Station Internationale de Géobotanique Méditerranéenne et Alpine, fondée par J. Braun-Blanquet à Montpellier), née des échanges entre le Zurichois J. Braun-Blanquet (1884-1980) et le Montpelliérain J. Pavillard (1868-1961). Nous avons effectué la technique du prélèvement intégral : un échantillon représentatif de chaque relevé est emmené au laboratoire pour une détermination la plus exhaustive possible (photo 1).

La méthode phytosociologique requiert tout d'abord d'avoir une perception globale du terrain sur lequel nous travaillons, puis essayer de distinguer des formes élémentaires qui peuvent correspondre aux individus d'association. L'objet élémentaire de la phytosociologie sigmatiste est l'individu d'association homogène, il faut donc réaliser le relevé sur une aire minimale homogène, c'est-à-dire une aire sur laquelle le nombre d'espèces rencontrées n'augmente pratiquement plus.

Nous allons donc décrire l'individu d'association délimité par son homogénéité interne en effectuant la liste des espèces présentes sur cet individu d'association ; on y ajoute des coefficients semi-quantitatifs d'abondance-dominance traduisant l'importance de chaque espèce dans l'individu d'association étudié. Depuis Braun-Blanquet, on s'accorde sur l'échelle suivante :

- 5 : recouvrement de l'espèce supérieur à 75 % de la surface ;
- 4 : recouvrement de l'espèce compris entre 50 % et 75 % ;
- 3 : recouvrement de l'espèce compris entre 25 % et 50 % ;
- 2 : recouvrement de l'espèce compris entre 5 % et 25 % ;

- 1 : recouvrement de l'espèce inférieur à 5 %, espèce peu abondante ;
 + : recouvrement de l'espèce très faible, espèce très peu abondante.

Il arrive de trouver dans des travaux les lettres r (espèce très rare) et i (espèce représentée par un individu unique).

Le relevé type comprend :

- le numéro du relevé (utilisant en général le format aa/mm/jj) et la localité précise ;
- la surface totale du relevé ;
- le pourcentage de recouvrement de la flore phanérogamique ;
- le pourcentage de recouvrement de la flore cryptogamique.

Les associations végétales décrites occupent soit les terrains calaminaires du PRC, de Mortagne-du-Nord, du terril de Harnes, soit le site situé à Flines-les-Mortagne dans le nord de la France. Un transect a été effectué sur chaque station mettant en relation des variations de composition floristique et les caractères physico-chimiques des sols correspondant aux cinq stations (fig. 25).

L'aire minimale pour la végétation cryptogamique est en général de 50 à 500 cm². C'est pourquoi, il est conseillé de prélever sur le terrain des plaques de 10 cm x 10 cm (prélèvement intégral) ; sur le terrain, les mousses sont sélectionnées à l'œil nu, puis à la loupe afin de réaliser les relevés pour ensuite les regarder à la loupe binoculaire au laboratoire. Ainsi, le nombre d'espèces présentes et non observées décroît sensiblement.

Une fois les espèces décrites et les coefficients d'abondance-dominance donnés, s'il n'y a pas eu de prélèvement intégral, il faut alors mettre la bryophyte dans une enveloppe et inscrire son nom présumé (ou lui assigner une lettre) avec le numéro du relevé. Dans tous les cas, une confirmation est nécessaire soit à la loupe binoculaire, soit le plus souvent en complément au microscope.

Lorsque l'espèce est inconnue, il faut distinguer les mousses pleurocarpes et acrocarpes, des hépatiques à thalles ou à feuilles et des sphaignes. Ensuite arrive le travail de détermination taxonomique sans laquelle toute approche toxicologique du problème est inutile.

La détermination a été réalisée à partir des ouvrages de Smith (1978a et b), Landwehr (1980 et 1984) et grâce aux herbiers de la Station Scientifique des Hautes-Fagnes (Pr. Schumacker).

Il nous a aussi semblé utile de prendre en compte les variations non génétiquement fixées que sont les stades physiologiques observés car ils pourraient être associés aux conditions du milieu étudié. Ces unités systématiques ressortissent à la notion d'*écodème* (reprise sous le nom d'*écophène* par Julve 1993) définie par Gillet *et al.* (1991) : *ensemble des organismes d'une même espèce, parvenus à un même stade ontogénique, et partageant à un moment donné un même milieu isotrope*. Elles se rapprochent aussi des *unités biologiques fonctionnelles* de Sastre (1994), nom que l'on retiendra ici sous l'abréviation UBF.

Les principales unités que nous avons mises en évidence sont indiquées par les signes s (présence d'un sporophyte), j (état juvénile) et * (vitalité réduite).

I.4. TRAITEMENT DES DONNEES

L'ensemble des données a été traité à l'aide du logiciel STAT-ITCF 4.0 .

Une analyse factorielle des correspondances (AFC) a permis de traiter les données floristiques. Les paramètres physico-chimiques ont été exploités par analyse en composantes principales centrée réduite (ACP). Une analyse factorielle en composantes multiples (AFCM) a permis de mettre en évidence les relations possibles entre les unités biologiques fonctionnelles (UBF) et les valeurs des variables physio-chimiques.

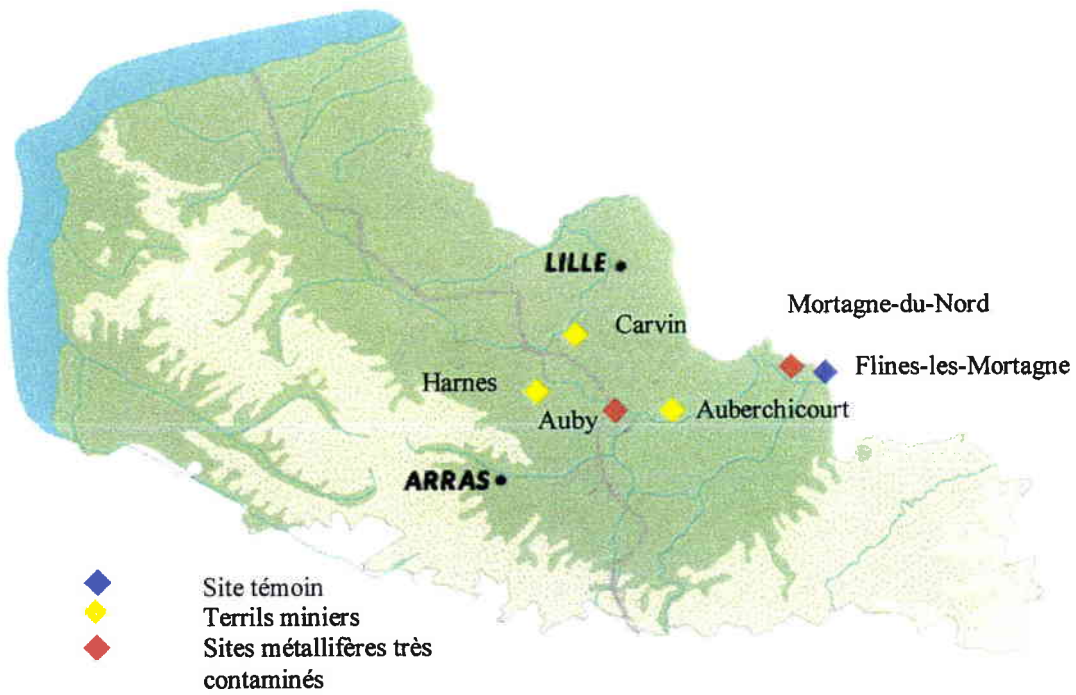


Figure 26 : Localisation des sites d'étude des communautés bryolichéniques.

II. ÉTUDE BRYOLICHENOSOCIOLOGIQUE

II.1. DESCRIPTION DES SITES ETUDIÉS

Nous avons étudié les communautés bryolichéniques terricoles sur des sites présentant des degrés de contamination en éléments traces métalliques divers. Nous avons retenus 6 sites dans la région Nord-Pas-de-Calais (fig. 26) : deux terrains métallifères fortement contaminés, Auby et Mortagne-du-Nord ; trois terrils miniers, Harnes, Carvin et Auberchicourt présentant une contamination intermédiaire et un site témoin à Flines-les-Mortagne.

II.1.1. Les sources d'éléments traces métalliques du secteur d'étude du Programme de Recherches Concertées (PRC)

Le programme de recherches concertées, présenté en introduction de ce travail, est centré sur la région de Douai polluée par les éléments traces métalliques. Les principales sources industrielles sont clairement identifiées. Il s'agit de deux entreprises de traitement des métaux non ferreux : Metaleurop et Union Minière. L'entreprise Metaleurop a produit en 1995, 152 303 tonnes de plomb et 99 463 tonnes de zinc (DRIRE, 1996). Elle exploite du minerai contenant essentiellement du sulfure de plomb (la galène), du sulfate de zinc (la blende) et du sulfate de cuivre. Un cortège de différents éléments comme le bismuth, le cadmium, l'antimoine, l'arsenic et l'étain accompagne les premiers éléments cités.

L'entreprise Union Minière produit essentiellement du zinc. En 1995, la production a atteint 229 783 tonnes (DRIRE, 1996). L'exploitation du zinc réalisée à partir de minerais tels que la calamine (silicate de zinc). De nos jours, il s'agit plus fréquemment de la blende.

Les deux entreprises présentes sur les secteurs du PRC émettent également du dioxyde de soufre, des oxydes d'azote et des poussières. Enfin, de nombreuses sources de pollutions diffuses viennent s'ajouter à ces installations industrielles : centres urbains, réseaux routiers denses, parcelles agricoles...

II.1.2. Description des sites métallifères

Les sites métallifères sont d'anciens crassiers de l'entreprise Union Minière. Des résidus provenant du traitement des minerais de zinc ont été amassés sur ces terrains.

Le site d'Auby est situé à proximité de l'usine Union Minière. Ce site a une surface d'environ 15 000 m². Il est délimité par une voie de chemin de fer à l'ouest, la départementale D420 à l'est et deux propriétés au nord et au sud. Ce terrain se situe en zone urbanisée, à proximité de la cité Asturienne. A l'heure actuelle, le site d'Auby appartient à la Compagnie des Charbonnages de France.

La végétation phanérogame observée est particulière (Van Haluwyn *et al.*, 1995). On retrouve des métallophytes absolus (*i.e.* végétaux liés exclusivement aux sols métallifères) : *Armeria maritima* Willd. subsp. *halleri* (Wallr.) Rothm., *Cardaminopsis halleri* (L.) Hayek, *Silene vulgaris* (Moench) Garcke subsp. *vulgaris* var. *humilis* Schubert.

D'autres végétaux qui ne sont pas nécessairement liés à la présence de métaux dans les sols (*i.e.* pseudo-métallophytes) tels que *Arrhenatherum elatius* (L.) Beauv. ex J. et C. Presl,

Agrostis capillaris L. et *Calamagrostis epigeios* (L.) Rothy (Van Haluwyn *et al.*, 1995) ont également été observés.

Du point de vue synsystématique, la végétation calaminaire de ce site constitue une forme appauvrie de la sous-association *Cardaminopsidetosum halleri* de l'*Armerietum halleri* Ernst 1965 (Van Haluwyn *et al.*, 1987). Quelques arbres sont présents tels que des *Populus* sp. ou *Acer campestre* L.

L'activité industrielle du **site de Mortagne-du-Nord** a cessé en 1963 et de nos jours, les installations ont été reconverties. Le site est abandonné à l'heure actuelle.

Le terrain se situe à l'entrée de la ville de Mortagne-du-Nord, sa surface est plus importante que la précédente (plusieurs hectares). Il est limité à l'ouest par la D268, à l'est par la Scarpe canalisée, au nord par le reste des installations industrielles et au sud par un terrain privé. Il a fait l'objet de travaux, notamment l'apport de terres et le passage d'engins de chantier, afin d'éviter la circulation des voitures.

La couverture végétale, lichénique et bryophytique est hétérogène. Des pelouses rases à lichens et bryophytes se développent par plaques. La végétation phanérogame n'est pas très développée ; la strate arborescente est essentiellement représentée par le bouleau ; la strate herbacée est dominée par diverses graminées et *Cardaminopsis halleri*.

II.1.3. Description des terrils miniers

Les terrils de Carvin et de Harnes sont des terrils miniers. Les terrils sont composés de stériles, qui constituent la gangue minérale du charbon non exploitée. En fonction de la période, et de la méthode d'exploitation, cette gangue a été plus ou moins purifiée et des quantités non négligeables de charbon peuvent persister sur les terrils. Elles sont néanmoins trop faibles pour être utilisées d'une manière rentable.

Le terril de Carvin se situe sur la commune d'Estevelles, en zone rurale, entouré de surfaces agricoles. C'est un terril conique avec à sa base plusieurs plates-formes successives où nous avons réalisé nos relevés. Nous y avons observé 36 espèces de végétaux supérieurs. La couverture végétale des plates-formes est assez homogène avec la présence de *Sedum acre* L. en abondance, de grandes graminées (telles qu'*Arrhenatherum elatius*) et d'espèces arbustives à la base de la pente.

Le terril de Harnes occupe une place tout à fait différente par rapport au précédent. Il se situe en effet dans une zone fortement urbanisée : Fouquières-les-Lens au sud, Harnes au nord et à proximité d'une zone industrielle. L'autoroute A21 passe à environ 1 kilomètre au sud. Le site a récemment fait l'objet d'un aménagement paysager. C'est un terril plat qui possède une terrasse supérieure importante. Celle-ci se caractérise par la présence de buttes allongées dans le sens de la longueur du terril. Ces buttes sont dans la majorité des cas dépourvues ou pauvres en végétaux supérieurs (dominance du *Sedum acre* et de diverses graminées), laissant apparaître la végétation bryolichénique.

Le terril d'Auberchicourt (Lécuru & Courtecuisse, 1998), encore appelé, terril de Sainte-Marie se situe à cheval sur quatre communes (Auberchicourt, Écaillon, Bruille-les-Marchiennes, Aniche), au milieu d'un triangle délimité par Douai, Valenciennes et Cambrai. Il se trouve donc dans le département du Nord, arrondissement de Douai, canton de Douai-Sud. Les distances du site par rapport aux trois grandes villes citées sont : 12 km de Douai, 24 km de Valenciennes, 17 km de Cambrai et 45 km de Lille.

Le terril Sainte-Marie est édifié sur un socle ancien de roches schisteuses et de grès

carbonifères (ardoises carbonifères, argiles schisteuses, anthracites, calcaires carbonifères, alternance de grès, de schiste, de houille et de fer carbonaté...).

II.1.4. Description du site témoin

Le site de **Flines-les-Mortagne** est situé en bordure de la forêt de Flines et non loin de l'aérodrome. Il a l'aspect d'une ancienne carrière de sable. C'est un milieu ouvert, présentant une pente prononcée vers le sud. La végétation bryophytique est plus développée que la végétation lichénique.

II.2. METHODOLOGIE DES RELEVES BRYOLICHENOSOCIOLOGIQUES

Nous avons effectué nos 36 relevés selon la méthode sigmatiste (de la SIGMA, Station Internationale de Géobotanique Méditerranéenne et Alpine, fondée par J. Braun-Blanquet à Montpellier), née des échanges entre le zurichois J. Braun-Blanquet (1884-1980) et le montpelliérain J. Pavillard (1868-1961). Nous avons relevé aussi bien les végétaux supérieurs que les bryophytes et les lichens. Cependant, pour respecter les objectifs de ce travail, nous avons effectué le traitement des données uniquement sur la strate bryolichénique. De plus, selon Gillet *et al.* (1991), celle-ci peut-être considérée comme indépendante de la strate phanérogamique.

Nous avons prospecté l'ensemble des différents sites. Après cette première étape, nous avons distingué des aires où la végétation bryolichénique était la plus homogène, permettant de définir l'individu d'association. Il faut respecter une aire minimale qui fait en général de 50 à 500 cm² pour la végétation lichénique et bryophytique.

Une fois l'individu d'association défini, nous avons récolté l'ensemble des espèces dans des boîtes (boîtes de culture Sigma). Les premiers centimètres du sol ont été recueillis pour le dosage des éléments traces métalliques, du calcium, de l'azote total, de la matière organique ainsi que pour la détermination du pH et de la capacité d'échange cationique.

A chaque espèce, nous associons des coefficients semi-quantitatifs d'abondance-dominance. Ils permettent d'apprécier l'importance relative de chaque espèce au sein du relevé.

L'échelle de ces coefficients établie par Wirth (1988) est la suivante :

- 5 : recouvrement de l'espèce supérieure à 75 % de la surface ;
- 4 : recouvrement de l'espèce compris entre 50 % et 75 % ;
- 3 : recouvrement de l'espèce compris entre 25 % et 50 % ;
- 2b : recouvrement de l'espèce compris entre 12,5 % et 25 % ;
- 2a : recouvrement de l'espèce compris entre 5 % et 12,5 % ;
- 2m : recouvrement de l'espèce compris entre 2 % et 5% avec un nombre d'individus supérieur à 20 ;
- 1 : recouvrement de l'espèce compris entre 2 % et 5 % avec un nombre d'individus inférieur à 20 ;
- +
- 2 : recouvrement de l'espèce inférieur à 2 % avec un nombre d'individus supérieur à 2 ;
- r : recouvrement de l'espèce inférieur à 2 % avec un nombre d'individus inférieur à 2.



Photographie 2 : Exemple de communauté bryolichénique à *Diploschistes muscorum* (photo Franck Denayer).

Les espèces récoltées ont été amenées au laboratoire pour détermination (photo 2). Les lichens ont été identifiés par D. Cuny et C. Van Haluwyn, grâce à diverses flores dont les ouvrages de Clauzade & Roux (1985), Purvis *et al.* (1992). Les déterminations des *Cladonia* ont fait appel à la technique de chromatographie couche mince sur gel de silice, qui reste l'outil de base incontournable en lichénologie. Cuny (1999) a adopté le protocole standard exposé par Boissière (1991).

Les bryophytes ont été identifiées grâce aux ouvrages de Smith (1978a et b) et Landwehr (1980, 1984).

II.3. DETERMINATION DES CARACTERISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES DES SOLS

Sur le terrain et au laboratoire, nous avons décrit macroscopiquement le sol de chaque relevé. Les échantillons de sol ont été recueillis dans un sachet plastique de l'INRA et stockés en chambre à température constante. Les dosages de carbone et d'azote organiques, de la teneur en matière organique, ainsi que la détermination de la capacité d'échanges cationiques ont été réalisés par le laboratoire d'analyses des sols de l'INRA d'Arras. Nous avons réalisé les dosages en éléments traces métalliques au service commun de spectrométrie d'absorption atomique du C.U.M.A. (Centre Universitaire de Mesures et d'Analyses) de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Lille. Enfin, la détermination du pH des sols a été effectuée au sein de notre laboratoire. Le protocole concernant les dosages en ETM (Pb, Zn, Cd) et les différentes variables édaphiques (MO, C/N, CEC, N, pH) est le même que celui employé pour les communautés de bryophytes (voir chapitre I.2.).

II.4. TRAITEMENTS STATISTIQUES DES RESULTATS

II.4.1. Caractéristiques physico-chimiques des sols

Nous avons réalisé, dans un premier temps, une série de comparaisons des moyennes des différentes variables grâce à des tests de Student, à un risque consenti α de 5%. Ces comparaisons sont complétées par le calcul des coefficients de variation. Nous avons enfin calculé les coefficients de corrélation entre chaque variable.

Pour compléter et illustrer les résultats des tests de Student, nous avons effectué une Analyse Factorielle Discriminante (AFD). L'AFD permet d'effectuer la discrimination de groupes définis *a priori* (par exemple par rapport aux différents sites) en fonction de plusieurs variables. Elle est basée sur le principe de l'analyse de variance : en fonction de la variance inter et intra-groupe, l'analyse dispose chaque observation et peut reconstituer de nouveaux ensembles. L'AFD permet également de mettre en évidence la (ou les) variable(s) qui sépare(nt) deux groupes. Enfin, elle fournit une représentation graphique des dispositions relatives de chaque groupe en fonction des variables.

Variables	Classe 1	Classe 2	Classe 3	Classe 4
MO (en g.kg ⁻¹)	18,39-163,83	163,84-309,28	309,29-454,73	454,74-597,20
N (en g.kg ⁻¹)	0,85-6,38	6,39-11,91	11,92-17,44	17,45-20
C/N	11,81-25,01	25,02-38,21	38,22-51,40	51,41-61,65
CEC (cmol.+kg ⁻¹)	3,40-16,52	16,53-29,63	29,64-42,75	42,76-52,90
pH	3,00-4,00	4,01-4,50	4,51-5,00	5,01-6,32
Cadmium (mg.kg ⁻¹)	0	0-2	2,01-200	200-325,3
Plomb (mg.kg ⁻¹)	4,00-100	101-1000	1001-15000	15001-30000
Zinc (mg.kg ⁻¹)	20,77-300	301-10000	10001-30000	30001-500000

Tableau 18 : Classes de concentrations des ETM et des variables édaphiques, pour l'AFCM, dans les sols des sites pollués et du site témoin.

II.4.2. Traitement des données floristiques

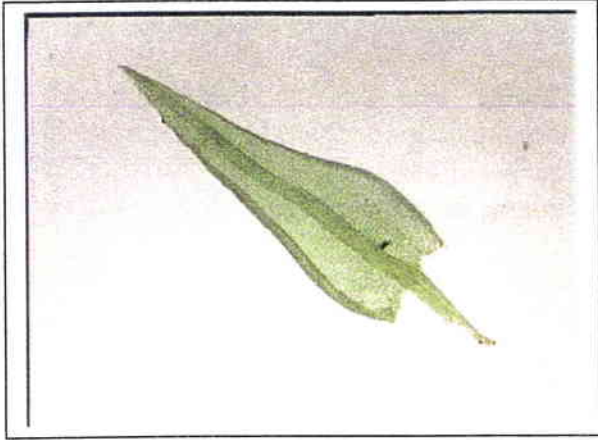
Nous avons, dans un premier temps, effectué une Analyse Factorielle des Correspondances Multiples (AFCM) dont le but est d'associer les données floristiques et les caractéristiques physico-chimiques de sols. Le principe d'une AFCM est d'étudier la dépendance entre deux ensembles de caractères, comme la présence ou l'absence d'une espèce et les variables édaphiques du sol.

L'AFCM nécessite, pour être appliquée, de disposer les relevés en lignes, les espèces (présence 1, absence 0) et les variables édaphiques en colonnes. Les variables édaphiques sont regroupées en quatre classes (tab. 18).

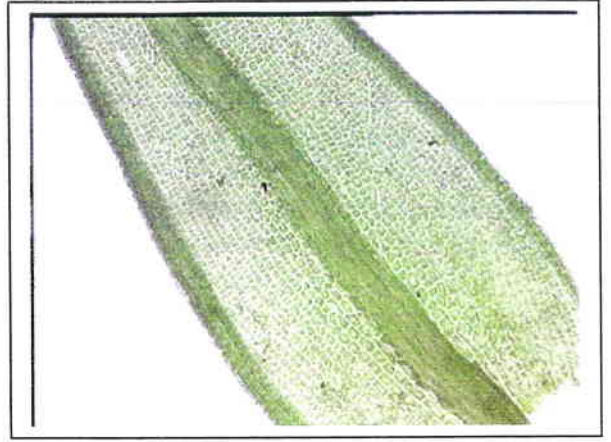
Les classes des concentrations en cadmium, plomb et zinc sont celles utilisées par Denayer *et al.* (1999), nous les avons choisies pour pouvoir comparer nos résultats. Les autres classes ont été définies automatiquement par le logiciel.

Nous avons effectué dans une deuxième étape une Analyse en Composantes Principales (ACP). Cette analyse structure un groupe de variables et un groupe d'individus. Ainsi, elle permet de savoir si des variables sont associées ou opposées, de même si des individus sont associés. Les principes fondamentaux sont les mêmes que ceux de l'AFCM.

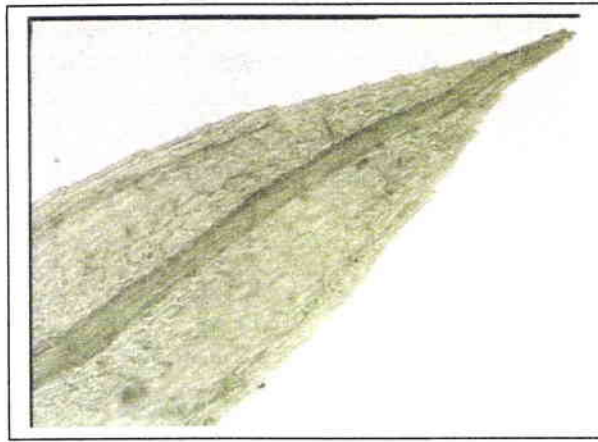
Toutes ses analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel STAT BOX + version 2.5 (Grimmer Logiciels, Paris).



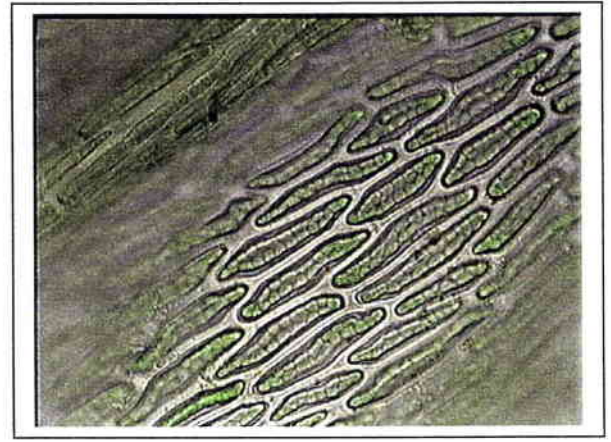
X 100



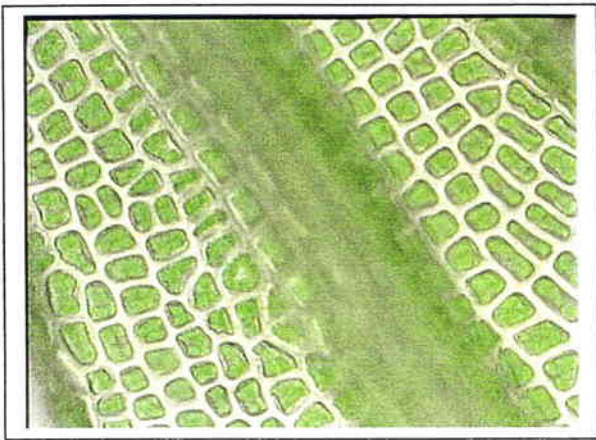
X 100



X 100



X 1000



X 400



X 1000

Photographie 3: Feuilles de *Ceratodon purpureus* (Hedw.) Brid. en microscopie photonique (photos Franck Denayer).

III. ÉLABORATION D'UN BRYOCAPTEUR DE RETOMBÉES ATMOSPHÉRIQUES MÉTALLIQUES A L'AIDE DE *CERATODON PURPUREUS* (HEDW.) BRID.

Lors de notre travail de recherche (Denayer *et al.*, 1999), nous avons pu mettre en évidence, qu'un traitement phytosociologique classique et statistique des communautés bryologiques terricoles permettait de les corrélérer avec la charge en éléments traces métalliques du sol. Des groupements caractéristiques et originaux ont pu être ainsi définis, pouvant servir à une première caractérisation de sites pollués. Nous pouvons désormais passer à l'étape ultérieure et confirmer ces résultats à l'aide d'outils encore plus fins, mettant en relation le biomonitoring passif et le biomonitoring actif.

La technique du biomonitoring actif, c'est-à-dire la transplantation des mousses issues d'une région non polluée dans le site pollué dont on désire évaluer le degré de contamination, est très souvent utilisée dans les études environnementales. Il est intéressant de prendre en compte la mousse, *Ceratodon purpureus*, en raison de sa large amplitude écologique et chorologique, et de son importante tolérance à la pollution atmosphérique tant acide, oxydante que métallique (photo 3). Mais de très nombreuses questions restent à élucider si l'on désire standardiser la technique et disposer d'un « bryocapteur » fiable quelle que soit la région à étudier et la période d'expérimentation. En effet, il paraît indispensable d'approfondir la connaissance des mécanismes de bioaccumulation de divers polluants en relation avec le métabolisme de la mousse, sa physiologie, son stade de croissance, sa période biologique...

Pour répondre à ces différentes questions, nous avons établi une collaboration avec la Société Bryotec, qui cultive de manière standardisée cette mousse. Cette standardisation a fait l'objet d'un dépôt de brevet européen, américain et japonais. Nous disposons donc d'échantillons bien calibrés que nous avons soumis à une pollution métallique en l'exposant aux alentours de l'usine Metaleurop. Le terme de cette recherche est d'évaluer les capacités accumulatrices et bioaccumulatrices de cette bryophyte aux ETM. Afin de mieux appréhender l'impact des ETM sur *Ceratodon purpureus*, une étude de six biomarqueurs de stress oxydant a été menée. Cette recherche a pour finalité la proposition d'un « bryocapteur » standard permettant d'évaluer les retombées atmosphériques en terme d'éléments traces métalliques.

III.1. DESCRIPTION DES SITES D'ETUDE

Cinq stations ont été retenues pour cette étude dans la région Nord-Pas-de-Calais :

- une station témoin dans la ville de Jenlain ;
- quatre stations soumises aux retombées métalliques de l'usine Metaleurop.

Les quatre stations se situent à proximité de Metaleurop sur un cercle d'environ deux kilomètres de rayon. Elles ont été retenues en fonction de leur proximité de l'usine, de leur exposition aux vents dominants, de leur équipement en capteur physico-chimique du SO₂ et capteur de poussières atmosphériques PPA 60. Sur ce type de capteur, les poussières sont récoltées sur un disque, remplacé automatiquement chaque jour pendant sept jours. Ces disques sont ensuite analysés par Metaleurop et les concentrations en Cd, Pb et Zn sont données en µg de métal par mètre cube d'air.



Photographie 4 : Site témoin de Jenlain (photo Chantal Van Haluwyn).



Photographie 5 : Station de Noyelles-Godault (photo Franck Denayer).

La station de Jenlain (TJ) (photo 4).

Nous avons choisi la ville de Jenlain comme site témoin à cause de sa très faible exposition aux polluants d'origine anthropique. La biostation a été installée au sein même d'un verger, en pleine campagne.

La station de Noyelles-Godault (N) (photo 5).

Elle se situe à environ 1 800 m de l'usine Metaleurop à vol d'oiseau. Elle a une exposition Sud, Sud-Ouest par rapport à l'usine et est équipée d'un capteur de poussières atmosphériques PPA 60 protégé par un enclos grillagé. La station est à l'extrémité de la cité Crombez, à proximité de champs cultivés.

La station de Courcelles-les-Lens (C) (photo 6).

Elle se situe à environ 1 300 m de l'usine Metaleurop, à proximité du cimetière de la ville et d'un parking de supermarché, non loin du centre ville et est exposée au Sud. La station est équipée d'un capteur de poussières atmosphériques PPA 60 et d'un capteur SO₂, tous deux protégés par un enclos grillagé.

La station d'Evin-Malmaison, ferme Dugardin (EF1) (photo 7).

Elle se situe à 1 850 m environ de l'usine, chez un particulier, exploitant agricole. Nous avons placé notre biostation sur une pelouse à proximité d'un champ en face de l'usine Metaleurop. Son exposition est Est, Nord-Est. Elle n'est pas équipée de capteurs physico-chimiques, mais est bien protégée du vandalisme.

A quelques centaines de mètres plus loin se trouve une station équipée d'un capteur PPA 60. Nous avons décidé de ne pas nous y installer car elle est entourée d'une haie de Thuyas, qui joue le rôle « d'effet coupe vent », mais nous prendrons en compte les données de ce capteur pour notre discussion.

La station d'Evin-Malmaison, ferme Delobel (EF2) (photo 8).

Elle se situe à environ 1 800 m de l'usine Metaleurop (photo 9), chez un particulier, exploitant agricole et est équipée d'un capteur PPA 60 protégé par un enclos grillagé. Elle est exposée Nord, Nord-Est. La biostation se trouve à proximité d'un champ cultivé face à l'usine Metaleurop.

III.2. LE MATERIEL BIOLOGIQUE

La société Bryotec nous a fourni 32 barquettes, colonisées par *Ceratodon purpureus*. Les cultures étant standardisées selon leur protocole (Brevet Bryotec, voir annexe 5).

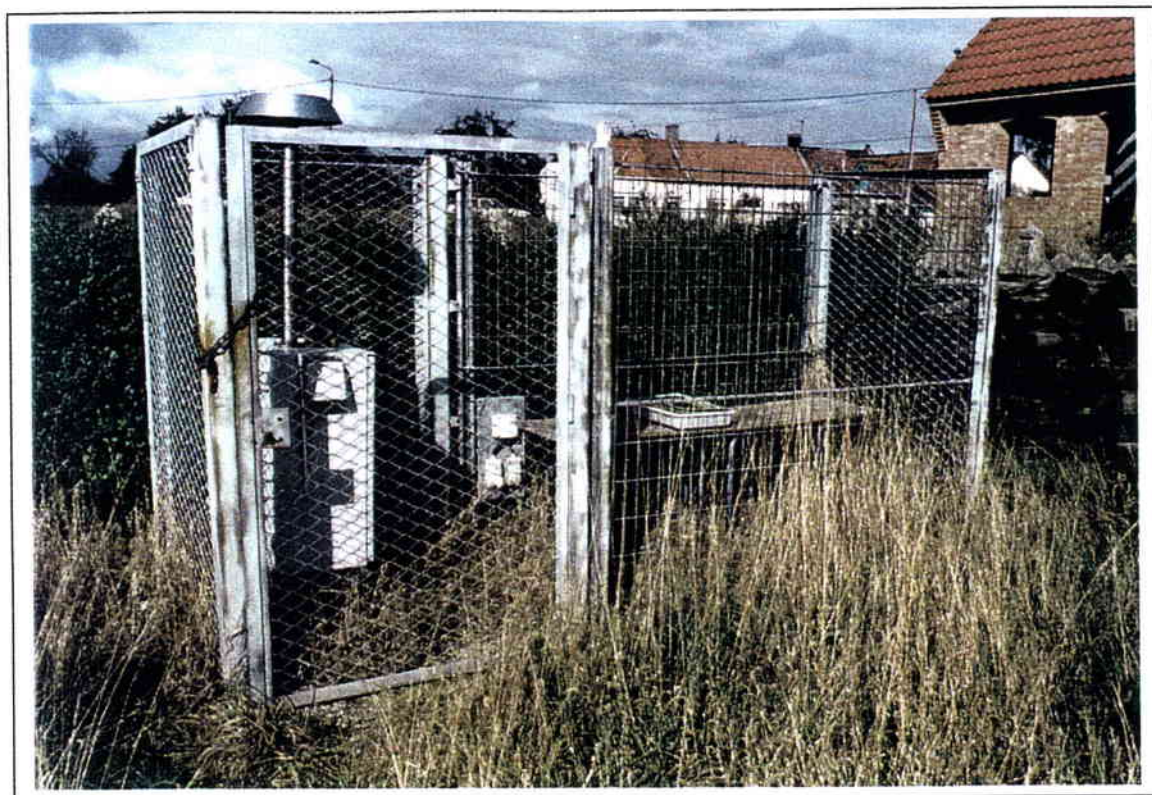
Ces barquettes sont de deux formats différents : 15 barquettes de 46,5 cm x 33,5 cm et 17 barquettes de 21 cm x 15,5 cm (photo 10).



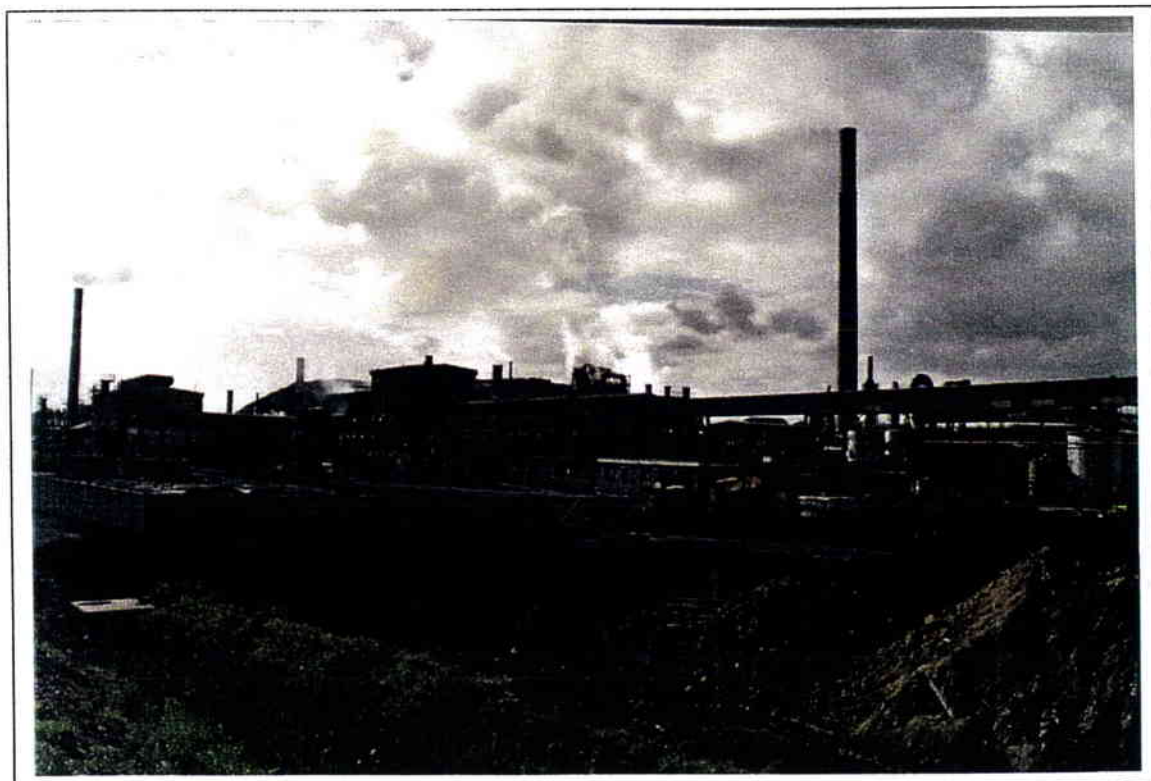
Photographie 6 : Station de Courcelles-les-Lens (photo Franck Denayer).



Photographie 7 : Station d'Evin-Malmaison 1, ferme Dugardin (photo Franck Denayer).



Photographie 8 : Station d'Evin-Malmaison 2, ferme Delobel (photo Franck Denayer).



Photographie 9 : Usine Metaleurop (photo Franck Denayer).



Photographie 10 : Barquettes de bryophytes avant la mise en place dans les stations (photo Chantal Van Haluwyn).



Photographie 11 : Exemple d'une biostation équipée de trois grandes et trois petites barquettes (photo Chantal Van Haluwyn).

III.3. PLAN EXPERIMENTAL

Nous avons choisi une période d'exposition permettant de prendre en compte les effets climatiques de trois saisons différentes (deux mois de printemps, deux mois d'été, deux mois d'automne). La durée d'exposition était initialement de six mois, rapportée à cinq mois à cause du vandalisme quasi-mensuel sur les sites de Noyelles-Godault et de Courcelles-les-Lens. Les biostations de bryophytes ont toutes été mises en place le 15 avril 1999.

Chacune a été équipée de trois petites et trois grandes barquettes tirées au hasard à l'aide d'une table de randomisation, car la densité de population en mousses s'est avérée beaucoup plus faible sur les grandes barquettes (photo 11). Les deux barquettes restantes ont été utilisées comme point de référence (T0) (photo 12). Toutes les analyses y ont été réalisées.

Chaque barquette a été numérotée et placée dans un bac contenant de l'eau et de l'argile expansée, afin qu'elle soit régulièrement soumise à une humidité ambiante.

Chaque mois, une barquette sur chacun des cinq sites a été prélevée au hasard. Sur chacune de ces barquettes, chaque mois, nous avons analysé chez *Ceratodon*, le cadmium, le plomb et le zinc (teneurs totales), ainsi que six biomarqueurs de stress oxydant (le glutathion réduit (GSH), le glutathion oxydé (GSSG), le malondialdéhyde (MDA), l'activité des Superoxyde Dismutases (SOD), l'activité de la glutathion peroxydase (GPx) et l'activité de la glutathion réductase (GR).

Une élution séquentielle (cf. chapitre III.3.1.5.) a été réalisée pour les mois 3 et 5 sur les mêmes prélèvements que précédemment. Les mousses ont également été analysées en Cd, Pb et Zn. Cette expérimentation nous permettra de mieux appréhender si telle ou telle fraction cellulaire modifie les paramètres témoignant d'un stress oxydatif. Les récoltes ont été réalisées d'après le tableau 19.

Au sein de chacune des stations, une expérimentation parallèle a été menée en plaçant, dans deux sachets de polypropylène de 5 cm de côté, du *Ceratodon purpureus* mort, traité préalablement à l'acide nitrique (cf. chapitre III.3.1.6.). Lors des troisième et cinquième mois d'exposition, un moss bag a été prélevé. Nous y avons analysé les teneurs totales en Pb, Zn et Cd, afin de voir si les mousses mortes accumulaient plus les métaux que les mousses vivantes.

Pour chaque analyse de biomarqueur de stress oxydant, des répétitions ont été réalisées sur chacune des barquettes prélevées chaque mois. Le nombre de répétitions a été fixé de manière différente pour le témoin et les quatre sites exposés, de manière à obtenir une certaine représentativité statistique des résultats.

Nous avons utilisé la formule suivante (Lellouch & Lazar, 1974) :

$$a = \frac{N}{b} + \sqrt{b}$$

- a étant le nombre de répétitions pour les sites exposés pour chaque biomarqueur analysé ;
- b étant le nombre de types d'échantillons utilisés (4 exposés, 1 témoin, un point zéro) ;
- N le nombre de répétitions à faire pour le témoin.

Nous avons donc pour notre expérimentation $a = 5$, $b = 6$, ce qui nous donne un $N = 15$.

	15 Avril 1999	15 Mai 1999	15 Juin 1999	15 Juillet 1999	15 Août 1999	26 Septembre 1999
Barquette : biomarqueurs /métaux	T0	T1	T2	T3	T4	T5
Elution séquentielle : biomarqueurs /métaux				T3		T5
Moss bags				T3		T5

Tableau 19 : Dates des récoltes de *Ceratodon purpureus* pour les barquettes et les moss bags sur le terrain.

$$5 = \frac{N}{6} + \sqrt{6} \Rightarrow N = 15$$

Mais en raison de la taille des barquettes, nous avons décidé de ne faire que 12 réplifications sur le témoin de manière à disposer de suffisamment de matériel pour réaliser les analyses.

Chaque barquette a donc été divisée, en 12 parties égales pour le site témoin (fig. 27a) et en 5 pour les quatre sites exposés (fig. 27b).

Le nombre de répétitions, particulièrement important pour les analyses du témoin, n'a pas pu être réalisé certains mois, à cause du vandalisme omniprésent, et cela, malgré les enclos grillagés (photo 13).

Les mousses sont récoltées tous les 15 du mois et sont immédiatement traitées (photo 14). Lors du choix de prélèvement de la barquette sur chaque station, un tirage au sort est effectué. Les barquettes de chaque point d'analyse sont rapportées au laboratoire. Nous avons distingué 5 ou 12 zones égales pour chaque barquette, une zone représentant un essai. Afin de ne pas avoir de biais lors de nos analyses statistiques, nous échantillons au hasard chacune de ces zones, à l'aide d'un numéro préalablement attribué. Sur chacune, l'ensemble des analyses de biomarqueurs et de métaux sont réalisées. Les mousses sont prélevées très précautionneusement à la pince à épiler sur l'ensemble de la zone. Le problème majeur de cette phase d'échantillonnage est la séparation des mousses de leur substrat (photo 15). En effet, même en prenant le maximum de précautions, du sable et de l'argile adhèrent à la mousse. Il faut donc en retirer le maximum si nous voulons que notre pesée soit la plus juste possible. Cette erreur de pesée inévitable se répercutera également, sur toutes les prises d'essai réalisées pour chacun des dosages, puisque l'ensemble des analyses sont réalisées sur une même zone. C'est pourquoi, nous avons décidé de doser les protéines sur cette même zone, afin de limiter le plus possible ces erreurs. L'ensemble des résultats sera exprimé en mg.g^{-1} de protéines.

III.3.1. Extractions et dosages des biomarqueurs de stress oxydant et des éléments traces métalliques

III.3.1.1. LES PROTEINES TOTALES ET LES ACTIVITES ENZYMATIQUES²

Nous avons utilisé des protocoles dérivés de ceux employés au laboratoire de biochimie¹. Suite à de nombreux essais préliminaires (voir annexe 4), il s'est avéré impossible de détecter une activité enzymatique pour la glutathion peroxydase et la glutathion réductase.

Une seule extraction a été réalisée sur laquelle l'ensemble des dosages enzymatiques et protéiques ont été faits.

² Les dosages ont été effectués par l'équipe de Fahrid Zerimech au sein du laboratoire de biochimie de l'Hôpital Huriez de Lille.



Photographie 12 : *Ceratodon purpureus* au temps t0 (X 15) (photo Franck Denayer).

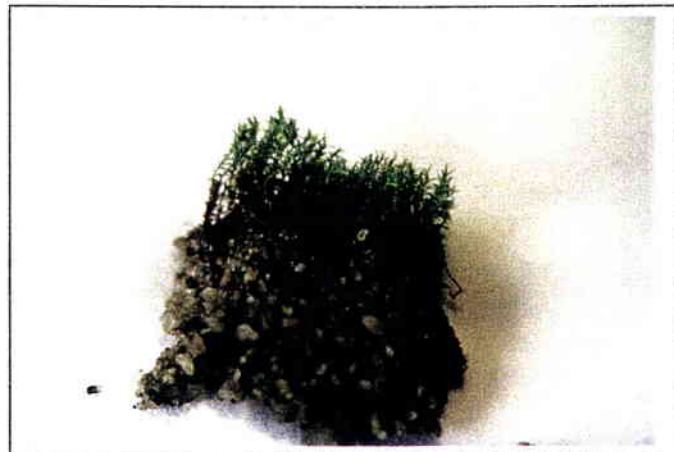
Photographie 13 : Vandalisme sur la station de Courcelles-les-Lens (photo Franck Denayer).



Photographie 14 : Etat des barquettes au troisième mois d'exposition (photo Franck Denayer).



Photographie 15 : *Ceratodon purpureus* et son substrat (photo Franck Denayer).



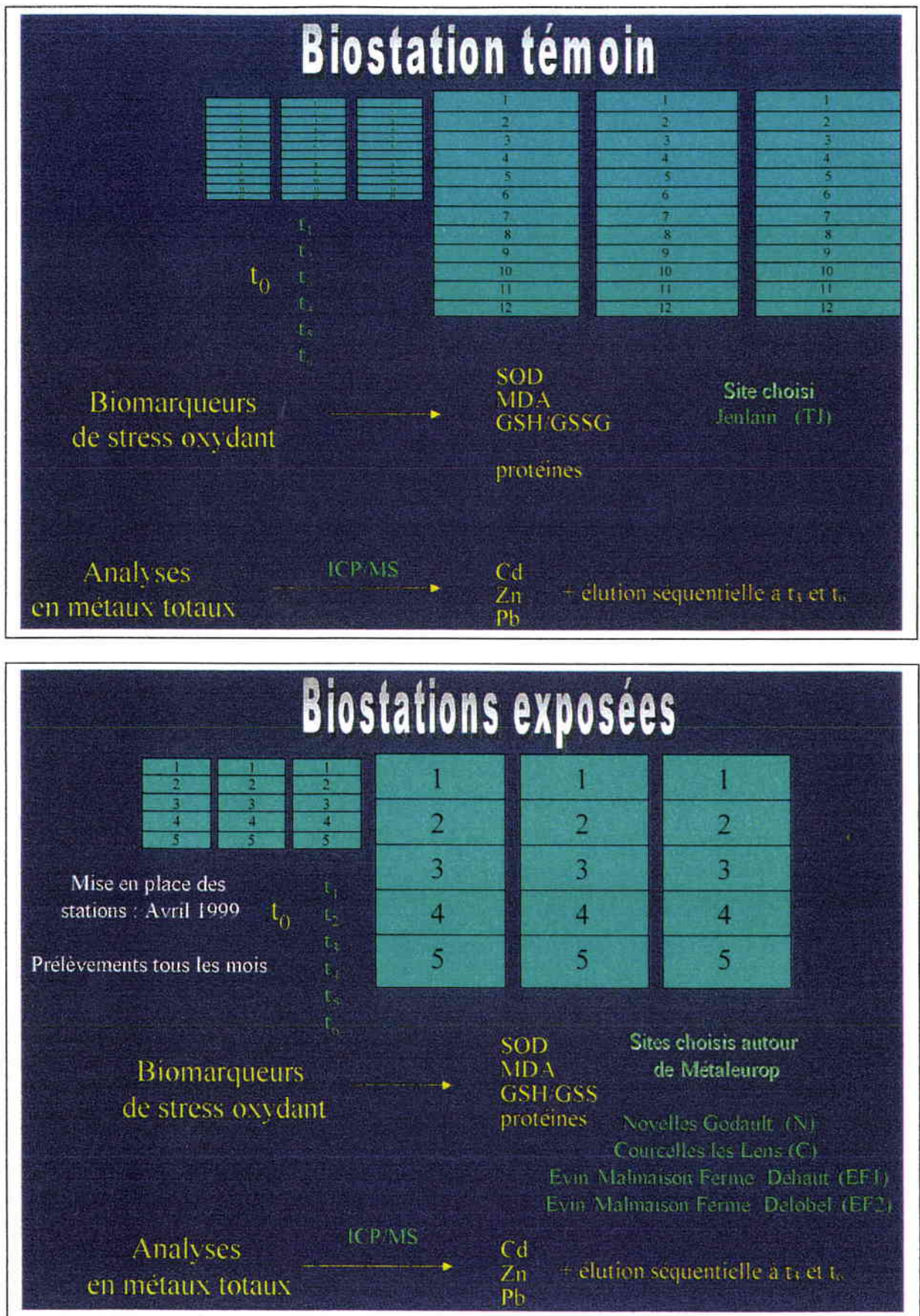


Figure 27 : Plan expérimental pour la mise au point d'un bryocapteur des retombées atmosphériques à l'aide de *Ceratodon purpureus* (Hedw.) Brid. (a – site témoin, b – sites exposés).

Préparation des échantillons																													
SOD et protéines	100 mg de mousse + 2 ml de tampon phosphate, pH 7,0 Broyage au mortier et pilon Centrifugation 10' - 3000 g à + 4°C Lysat cellulaire pur et dilué au ½ dans tampon phosphate 0,01 M pH 7,0																												
SOD	<p>Réactifs (concentration finale)</p> <p>1. substrat: xanthine 0,034 mmol/l I.N.T. 0,017 mmol/l</p> <p>2. tampon: CAPS pH 10.2 34 mmol/l EDTA 0,64 mmol/l</p> <p>3. xanthine oxydase: 54 U/l</p> <p>4. étalon: concentration variable selon le lot</p> <p>Mode opératoire</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>blanc réactif</th> <th>étalon</th> <th>échantillon</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>échantillon</td> <td></td> <td></td> <td>5 µl</td> </tr> <tr> <td>étalon</td> <td></td> <td>5 µl</td> <td></td> </tr> <tr> <td>tampon phosphate</td> <td>5 µl</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>substrat</td> <td>170 µl</td> <td>170 µl</td> <td>170 µl</td> </tr> <tr> <td>xanthine oxydase</td> <td>25 µl</td> <td>25 µl</td> <td>25 µl</td> </tr> <tr> <td>λ = 505 nm</td> <td>température = 37 °C</td> <td colspan="2">blanc contre l'air</td> </tr> </tbody> </table>		blanc réactif	étalon	échantillon	échantillon			5 µl	étalon		5 µl		tampon phosphate	5 µl			substrat	170 µl	170 µl	170 µl	xanthine oxydase	25 µl	25 µl	25 µl	λ = 505 nm	température = 37 °C	blanc contre l'air	
	blanc réactif	étalon	échantillon																										
échantillon			5 µl																										
étalon		5 µl																											
tampon phosphate	5 µl																												
substrat	170 µl	170 µl	170 µl																										
xanthine oxydase	25 µl	25 µl	25 µl																										
λ = 505 nm	température = 37 °C	blanc contre l'air																											

CAPS = acide (3-cyclohexylamino-1-propanesulfonique)

NADPH = β-nicotinamide adénine dinucleotide phosphate

EDTA = acide éthylène diamine tetraacétique

INT=(2-(4-iodophényl)-3-(4-nitrophénol)-5-phenyltétrazolium)

FAD = flavine adénine dinucléotide

Tableau 20 : Protocoles d'extraction, de dosage des protéines et de l'activité des SOD.

Etape	Principe	Protocole
1.	Acidification du milieu	A 30 mg de mousses, ajout de 1 ml de HCl 0,1 N
2.	1^{ère} extraction	Ajout de 3 ml d'acétate d'éthyle, vortex 3 min, centrifugation 10 min à 3 000 trs/min.
3.	1^{ère} récupération	Récupération de la phase organique, évaporation sous azote
4.	2^{ème} extraction	Ajouter 3 ml d'acétate d'éthyle à la phase aqueuse, vortex 3 min, centrifugation 10 min à 3 000 trs/min.
5.	2^{ème} récupération	Récupération de la phase organique dans le même tube que la première récupération, évaporation de l'ensemble sous azote puis reprise dans 200 µl de méthanol
6.	Coloration des échantillons	50 µl d'échantillon après extraction, 700 µl d'H ₃ PO ₄ 1/100, 250 µl TBA 0,6 % 95°C 1 heure puis refroidir ¼ d'heure à 4°C
7.	Passage des échantillons	50 µl de la solution refroidie

Tableau 21 : Protocole d'extraction et de dosage du malondialdéhyde (MDA).

III.3.1.1.1. Réactifs utilisés

Solution aqueuse de tampon phosphate 50 mM à pH 7

Na₂HPO₄, 2 H₂O Normapur pour analyses (Prolabo)

H₂KO₄P monobasique P.A.

III.3.1.1.2. Protocole expérimental d'extraction

Dhindsa (1991) a mis au point un protocole d'extraction simple pour le dosage des protéines et des activités enzymatiques chez les bryophytes.

La prise d'essai est de 100 mg de mousses auxquelles nous ajoutons 2 ml de tampon phosphate 50 mM à pH 7. L'ensemble est broyé au mortier et au pilon, puis centrifugé à 15 000 tours.min⁻¹ pendant 10 min. Le surnageant est filtré puis mis dans des tubes Eppendorf. Tous les tubes sont ensuite congelés à - 80°C (tab. 20).

III.3.1.1.3. Dosage des protéines

Les protéines sont dosées par la méthode à l'acide bicinchoninique (Smith *et al.*, 1985) sur appareil Cobas Fara II au moyen du coffret réactif BCA Protein Reagent (Pierce). L'échantillon est mélangé à une solution d'acide bicinchoninique (BCA) et de CuSO₄ de coloration verte. Les ions Cu²⁺ sont réduits par les protéines en ions Cu⁺ qui forment avec le BCA des complexes pourpres qui absorbent à 562 nm. L'intensité de la réaction est directement proportionnelle à la concentration en protéines présente dans l'échantillon. Le standard utilisé est de l'albumine bovine (Pierce) à 1 g.l⁻¹ dans 0,9 % de NaCl contenant de l'azide de sodium. Les résultats sont exprimés en mg.ml⁻¹.

III.3.1.1.4. Dosage de l'activité totale des SOD

L'activité de cette enzyme est dosée par méthode colorimétrique à partir de l'extraction précédente des mousses (tab. 20).

La méthode de dosage de l'activité des superoxydes dismutases (SOD) utilise le système de la xanthine/xanthine oxydase générant des anions superoxydes qui réagissent avec un chromogène formant un composé formazan rouge. Les SOD inhibent cette réaction. La technique proche de celle décrite par McCord et Fridovich utilise le coffret réactif RANSOD (Laboratoires Randox, Crumlin, Co Antrim, Royaume Uni). La lecture est faite à 505 nm sur automate HITACHI 911 (Boeringher Mannheim, Meylan; France). Les résultats sont donnés en unités enzymatiques U.g de protéines⁻¹.

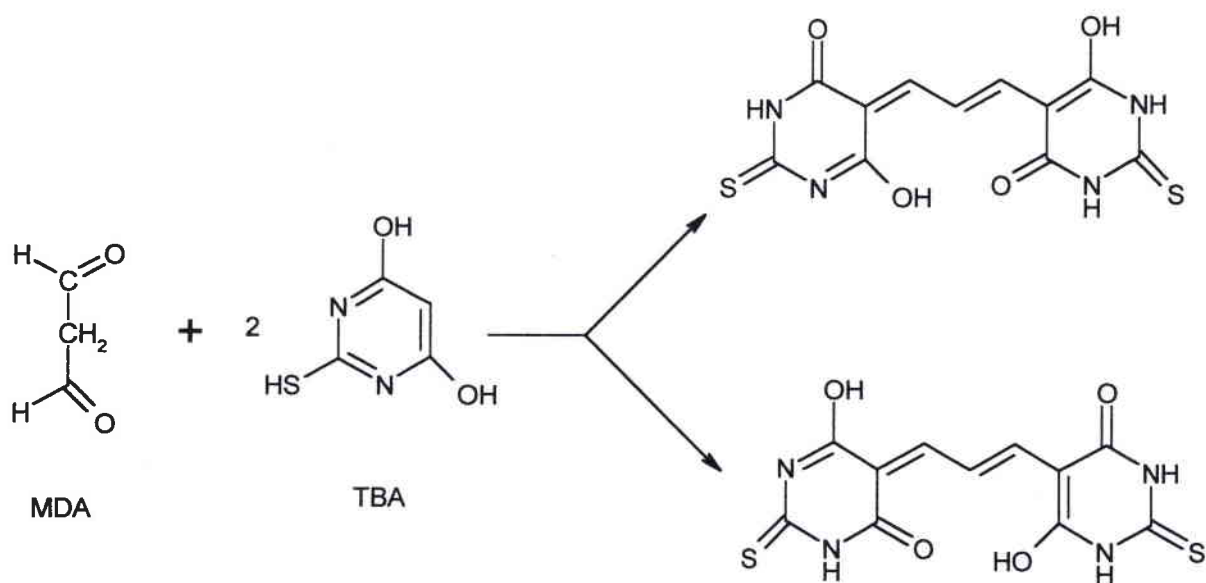


Figure 28 : Réaction de l'acide thiobarbiturique (TBA) avec le malondialdéhyde (MDA) et les structures tautomériques des adduits (d'après Valenzuela, 1991).

III.3.1.2. EXTRACTION ET DOSAGE DU MALONDIALDEHYDE (MDA), (SHIRALI *et al.*, 1994 ; BOUTIN *et al.*, 1998)³

Le dosage est réalisé par HPLC sur colonne Nucleosil C18 (5 μ m, 150 x 2,1 mm) avec une phase mobile composée de 60% de KH₂PO₄ 50 mM à pH 6,8 et 40% de méthanol.

III.3.1.2.1. Réactifs utilisés

Solution aqueuse d'HCl 0,1 N
 Solution aqueuse d'acétate d'éthyle (Chromanorm, Prolabo)
 Solution aqueuse de méthanol (Gradient, Merck)
 Solution aqueuse d'acide phosphorique 1/100 (Prolabo)
 Solution aqueuse d'acide thiobarbiturique (Sigma)

Phase mobile :	60 % KH ₂ PO ₄ 50 mM	}	v/v	pH 6,8
	40 % Méthanol			

Gamme étalon : TEP (1,1,3,3, tétrahydroxypropane) (Sigma)

III.3.1.2.2. Extraction du MDA chez les bryophytes

La prise d'essai pour les dosages de MDA est de 30 mg. Nous y ajoutons 3 ml d'acétate d'éthyle et 1 ml d'HCl. Après homogénéisation au vortex pendant 3 minutes et une centrifugation de 10 minutes à 3 000 trs/min., la phase organique est récupérée. Une nouvelle extraction est effectuée en ajoutant 3 ml d'acétate d'éthyle. Les phases organiques obtenues sont évaporées sous rampe d'azote à 50 °C et reprises dans 200 μ l de méthanol. A 50 μ l d'échantillon sont ajoutés 700 μ l d'acide phosphorique et 250 μ l d'acide thiobarbiturique (fig. 28). Le mélange est incubé à 80 °C pendant 30 minutes puis 50 μ l de cette solution sont injectés. La détection est effectuée à 532 nm (détecteur UV Jasco 975) et la lecture est réalisée par rapport à une gamme étalon avec une courbe d'étalonnage variant de 0,4 à 400 μ mol/l (tab. 21). Les résultats sont exprimés en mg.g⁻¹ de protéines.

III.3.1.3. LE GSH ET LE GSSG²

Le dosage des deux formes de glutathion (réduit et oxydé) est réalisé simultanément par chromatographie liquide haute performance (HPLC) avec détecteur électrochimique (Coularray, ESA, Chemsford, USA). Le tableau 22 reprend le protocole d'extraction et d'analyse en HPLC. Les concentrations sont calculées à partir de standards de concentration connue (glutathion réduit et oxydé, Sigma).

³ Travail réalisé en collaboration avec l'équipe de M. Pirouz Shirali au sein de l'Insitut de Médecine du Travail, Pôle Recherche, Faculté de Médecine, Université de Lille 2

Etape	Principe	Protocole
1.	Extraction	1. 100 mg de mousses + 1,6 ml d'EDTA + 0,4 ml HClO ₄ 2. Vortex 6 min, centrifugation 10 min à 15000 tours/min 3. filtration du surnageant avec un filtre Dynagard
2.	Injection dans la colonne	Injection de 50 µl d'échantillon
3.	Séparation dans la colonne	Débit : 1 ml/min Phase A : 10 mM NaH ₂ PO ₄ , 2 mM octane 1-sulfonic acid sodium (OSA, Merck, France) Phase B : 50% acétonitrile + 50% [25 mM NaH ₂ PO ₄ , + 2 mM octane 1-sulfonic acid sodium (OSA)] Gradient : t ₀ à t ₁₀ min : 100% phase A t ₂₄ : 65% phase A, 35% phase B t ₂₅ : 100 % phase A Colonne : Supelcosil C18 (150X4,6 mm) (Supelco, USA)
4.	Détection	Détecteur coulométrique à deux électrodes (potentiels respectifs : 650-800 mV) piloté par un logiciel d'analyse (ESA)

Tableau 22 : Protocole de dosage du glutathion réduit et oxydé (GSH et GSSG).

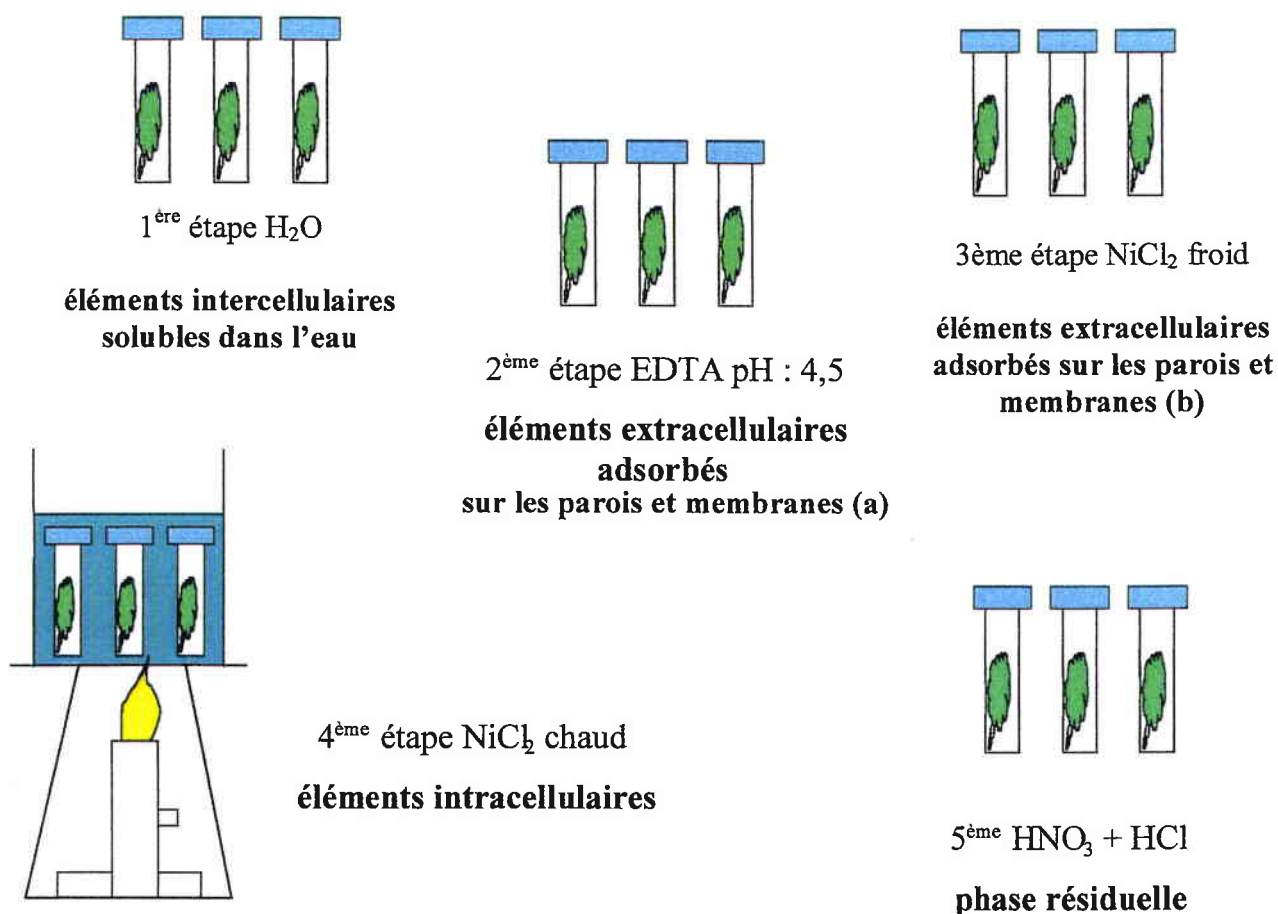


Figure 29 : Représentation schématique du protocole d'éluion séquentielle (d'après Branquinho & Brown, 1994 ; Branquinho *et al.*, 1997a, 1997b ; *In* : Cuny, 1999).

III.3.1.3.1. Réactifs utilisés

Solution aqueuse d'EDTA (ethylene diamine tetraacetic acid) (Touzart et Matignon)
 Solution aqueuse d' HClO_4 0,2 M (Prolabo)
 Solution aqueuse de GSH (Sigma)
 Solution aqueuse de GSSG (Sigma)

Solution A :

Solution aqueuse de NaH_2PO_4 10 mM (Prolabo)
 Solution aqueuse d'OSA 2 mM (Merck) à pH 7,2

Solution B :

Solution aqueuse NaH_2PO_4 25 mM	}	50 %
Solution aqueuse OSA 2mM (Merck)		
Solution aqueuse d'acétonitrile (Prolabo)	}	50 %

III.3.1.3.2. Extraction du GSH et du GSSG

La prise d'essai, de 100 mg de mousses, est placée dans un tube en polypropylène. Nous y ajoutons 1,6 ml d'EDTA et 0,4 ml d' HClO_4 . L'ensemble est passé au Vortex pendant 6 min. Les échantillons sont mis dans des tubes Eppendorf puis centrifugés pendant 10 minutes à 15 000 tours.min⁻¹. Le surnageant est filtré, à l'aide d'un filtre Dynagard, puis conditionné dans un tube Eppendorf. L'ensemble des tubes sont immédiatement placés au réfrigérateur à 4°C.

La détermination des concentrations se fait par chromatographie liquide haute performance (HPLC) (colonne Supelcosil LC-18-DB, 15x4,6 Supelco) couplée à un détecteur électro-chimique (CoulArrey, ESA, Inc.). L'injection d'échantillon est de 50 μl (tab. 22). Le débit de la pompe (Jasco PU-980) est de 0,3 ml.min⁻¹. L'élution se fait grâce à un gradient de deux phases mobiles (passeur de gradient : Jasco LG-980.02) A et B filtrées grâce à un système millipore et utilisées à un débit de 1 ml.min⁻¹ selon le programme suivant :

10 min 100 % solution A et 0 % solution B
 24 min 65 % solution A et 35 % solution B
 24 min 100 % solution A et 0 % solution B

Les concentrations sont exprimées en mg.ml⁻¹, extrapolées à partir de l'injection d'un échantillon standard de GSH et de GSSG à 1 mg.l⁻¹ avant chaque nouvelle série. L'appareil utilisé possède 2 électrodes dont les potentiels sont de 600 mV et de 850 mV. Le glutathion est détecté en majorité au niveau de l'électrode 2.

Avant chaque série de mesures, il convient d'effectuer un blanc (mélange EDTA- HClO_4), un standard, un passage d'échantillon et un passage du même échantillon avec un ajout d'1 mg.l⁻¹. Les concentrations sont calculées à partir du standard. L'ajout sur un échantillon permet de localiser les pics recherchés. La sensibilité de la détection est d'au moins 1 $\mu\text{g.l}^{-1}$ (données du constructeur). Les résultats sont exprimés en mg de GSH/GSSG.g⁻¹ de protéines.

III.3.1.4. DOSAGES DES ETM, NORME AFNOR X 31-151 (1996)

L'ensemble des dosages du Cd, Pb, Zn et du K a été réalisé par la société AGREN en ICP/MS. Cette entreprise spécialisée dans le domaine analytique suit les normes AFNOR pour toutes les étapes de préparation, de minéralisation et d'analyse des échantillons. De plus, elle réalise régulièrement des calibrations intra et inter-laboratoires. De manière générale, la prise d'essai a été de 0,5 g de mousses et nous avons réalisé trois répétitions pour chaque échantillon. Les seuils de détection, et le contrôle qualité des analyses se trouve en annexe 6. Les résultats sont exprimés en mg d'ETM par gramme de protéines.

III.3.1.5. PROTOCOLE D'ELUTION SEQUENTIELLE (FIG. 29)

Comme nous l'avons présenté lors de l'analyse bibliographique sur les relations mousses-métaux, c'est Brown, qui dans de nombreux travaux, a mis au point cette technique chez les bryophytes. Cet auteur distingue quatre grands compartiments au sein des tissus des bryophytes : une fraction soluble intercellulaire (étape 1), puis les cations échangeables adsorbés sur des sites d'échanges d'ions des parois et à l'extérieur des membranes plasmiques (étapes 2 et 3) ; une fraction intracellulaire (étape 4) et enfin une fraction résiduelle (étape 5).

La première étape fait appel à une double extraction dans de l'eau distillée. L'échantillon est immergé dans 10 ml d'eau distillée et agité, une première fois pendant 40 minutes. Au terme de cette étape, la solution d'extraction est récupérée. L'échantillon est de nouveau mis en contact avec 10 ml d'eau distillée et agité pendant 30 minutes. La solution est récupérée et mélangée à la précédente, puis analysée en ICP/MS.

La seconde étape est une extraction à l'aide d'une solution de 10 ml d'EDTA- Na_2 à 20 mM, pH 4,5. Cet agent chélatant a pour but d'extraire les éléments de la classe B (Nieboer & Richardson, 1980) tels que le plomb, le cuivre..., qui se fixent sur les groupements carboxyliques mais surtout sur les groupements thiols et azotés. Nous utilisons ici les résultats de Branquinho & Brown (1994) et Branquinho *et al.* (1997a et b) qui ont testé les différents chélatants. L'EDTA- Na_2 , même utilisé à ce pH ne provoque pas de dégâts membranaires lors de l'expérience. L'extraction se réalise en deux étapes : 40 et 30 minutes avec agitation. Les deux solutions d'extraction sont mélangées pour le dosage en ETM.

La troisième étape de l'éluion fait appel à une solution de chlorure de nickel 20 mM. Cette étape, complémentaire de la précédente, se base sur le mécanisme de compétition ionique entre le nickel et les ETM, adsorbés sur des sites pariétaux et à l'extérieur des membranes plasmiques. On reprend ici le principe d'une chromatographie échangeuse d'ions. Par compétition, le nickel se fixe sur ces sites et permet une mise en solution des ETM. L'échantillon de mousse est mis en contact avec 10 ml de solution de NiCl_2 puis agité pendant 40 minutes. La solution est récupérée et l'échantillon est à nouveau mis en contact avec 10 ml de NiCl_2 puis agité pendant 30 minutes. A la fin de cette seconde phase, les deux solutions sont récupérées pour le dosage des ETM.

La quatrième étape utilise une solution de NiCl_2 (20 mM) bouillante. Le tube à essai est placé dans un bain-marie bouillant. Cet étape a pour but de briser les membranes pour mettre en évidence la fraction intracellulaire contenant des éléments solubles et adsorbés. Le mécanisme de compétition évoqué lors de l'étape précédente reste valable. De la même

manière, l'échantillon est exposé pendant 40 minutes, puis 30 minutes à la solution de chlorure de nickel bouillante.

La cinquième et dernière étape consiste en une digestion totale avec un mélange de 1 ml d'eau distillée, de 2 ml d'acide nitrique (65 %) et de 3,5 ml d'acide chlorhydrique (30 %) (Cuny, 1999). De la même manière que pour les échantillons de sols ou les échantillons de bryophytes précédents, les échantillons sont placés pendant 48 heures dans une étuve à 60 °C. Les solutions sont ensuite filtrées et le volume est ramené à 25 ml avec de l'eau distillée.

Dans cette expérience, chaque analyse est répétée trois fois et la prise d'essai est de 0,222 g de mousse. Nous dosons deux fois le plomb, le zinc et le cadmium dans chacune des solutions d'extraction. Afin de suivre les éventuels dégâts membranaires, nous dosons le potassium. Cet élément, en principe essentiellement intracellulaire, présent dans la solution d'extraction souligne une rupture membranaire. Pour l'interprétation des résultats, exprimés en mg d'ETM par gramme de protéines, nous avons réuni certaines de ces phases, *i.e.* $K_{\text{extracellulaire}} = K_{\text{EDTA}} + K_{\text{NiCl}_2}$ à froid ; $K_{\text{total soluble}} = K_{\text{total}} - K_{\text{HNO}_3}$.

III.3.1.6. PREPARATION DES « MOSS BAGS »

Deux « moss bags » contenant chacun 1 200 mg de *Ceratodon purpureus* ont été accrochés dans chacun des sites étudiés. Le *Ceratodon* est préalablement traité à l'acide nitrique (HNO_3 , 0,2 M) pendant deux heures, puis laissé sécher à l'air libre pendant 24 h. Le plomb, le zinc et le cadmium seront dosés en ICP/MS (trois répétitions) aux temps T3 et T5.

III.3.1.7. ANALYSE STATISTIQUE DES RESULTATS

Nous avons effectué l'analyse des données avec le logiciel Statistica™ version 5 (Statsoft). Des analyses des tests de comparaison des moyennes de Mann-Whitney (test U de rang) ont été réalisées. Dans une seconde étape, nous avons utilisé des analyses en composantes principales (ACP) centrées réduites, afin d'étudier les relations entre les métaux et les biomarqueurs de stress oxydant sur les mousses de chaque station chaque mois. Dans une dernière étape, nous avons associé les résultats des biomarqueurs avec ceux des dosages des éléments traces réalisés par les éluions séquentielles. Nous avons procédé à plusieurs analyses de régression linéaire multiple. Celles-ci permettent d'étudier la relation existante entre plusieurs variables. On distingue une variable expliquée (les différents biomarqueurs pris chacun séparément) et des variables explicatives (les teneurs en ETM dans les différents compartiments).

Nous rappelons la désignation des différentes fractions :

- MH_2O : concentration en métal (M) intercellulaire soluble dans l'eau ;
- M extracellulaire : concentration en métal adsorbé sur les sites pariétaux et membranaires ;
- M intracellulaire : concentration intracellulaire ;
- MHNO_3 : concentration résiduelle suite à la minéralisation avec HNO_3 et HCl ;
- M total soluble : concentration totale extractible à l'eau, l'EDTA- Na_2 et au NiCl_2 à froid et à chaud ;
- M totale : concentration totale en métal.

RESULTATS
ET
DISCUSSIONS

I. IMPACTS DES ELEMENTS TRACES METALLIQUES SUR LES COMMUNAUTES BRYOPHYTIQUES

I.1. CLASSEMENT DES SITES PAR LA BRYOFLORE

Dans un premier temps, nous avons tenté de caractériser les sites par la bryoflore au moyen d'une analyse factorielle des correspondances (AFC), la carte factorielle est donnée par la figure 30.

Elle fait apparaître douze groupes (A à L).

L'analyse montre également une distribution des bryophytes en fonction d'un gradient de pollution selon l'axe 1. Les résultats sont synthétisés dans le tableau 23.

Des groupements bryophytiques montrent les différents stades d'évolution des bryophytes d'après la teneur en éléments traces métalliques du sol. En effet, lorsque le sol est fortement contaminé en éléments traces métalliques, nous constatons presque uniquement la présence de bryophytes acrocarpes. En revanche, lorsque les sols sont intermédiaires, nous obtenons également un stade intermédiaire avec la présence d'acrocarpes, mais également avec l'apparition de quelques pleurocarpes (e.g. *Hypnum cupressiforme*, *Rhytidiadelphus squarrosus*...). Enfin, lorsque le sol est dépourvu de toute pollution en éléments traces métalliques, les acrocarpes ont tendance à être absents et ce sont les bryophytes pleurocarpes qui sont majoritairement présentes.

I.2. CLASSEMENT DES SITES PAR LES VARIABLES EDAPHIQUES

La figure 31 présente les résultats de l'ACP réalisée sur les sites ; elle fait apparaître onze groupes (I à XI). Le tableau 24 donne pour chacun de ces groupes les moyennes des valeurs prises par les différentes variables. Sur le cercle de corrélation (fig. 32), on constate une corrélation positive entre l'axe 1 (contribution à la variance totale 52,5 %) et les valeurs du Cadmium (Cd, $r=0,91$), Zinc (Zn, $r=0,9$) et de la matière organique (MO, $r=0,91$) ; l'axe 2 (26 %) est corrélé négativement avec le pH ($r=-0,67$) et C/N ($r=-0,77$) et à un degré moindre avec le plomb (Pb, $r=-0,6$). Les variables CEC et N sont corrélées aussi bien avec l'axe 1 qu'avec l'axe 2. D'un autre côté, les variables édaphiques se répartissent en trois groupes : Cd, MO, Zn pour le groupe 1, Pb, pH, C/N pour le groupe 2 et CEC, N pour le groupe 3. Les deux derniers présentent des corrélations négatives entre eux. Ces corrélations entre variables peuvent être appréciées par le tableau des corrélations (tab. 25).

I.3. COMPARAISON ENTRE LES CLASSEMENTS BRYOFLORESTIQUE ET EDAPHIQUE DES SITES

Il nous semble intéressant de chercher à comparer les deux classements que nous venons d'établir, l'un sur une base floristique, l'autre sur la base des variables édaphiques. A cet effet, nous avons dressé le tableau 26 reprenant les groupes A à L d'un côté, I à XI d'un autre ; à l'intersection d'une ligne et d'une colonne est porté le nombre de sites appartenant simultanément à ces groupes. Ce tableau fait apparaître une certaine diagonalisation de ces

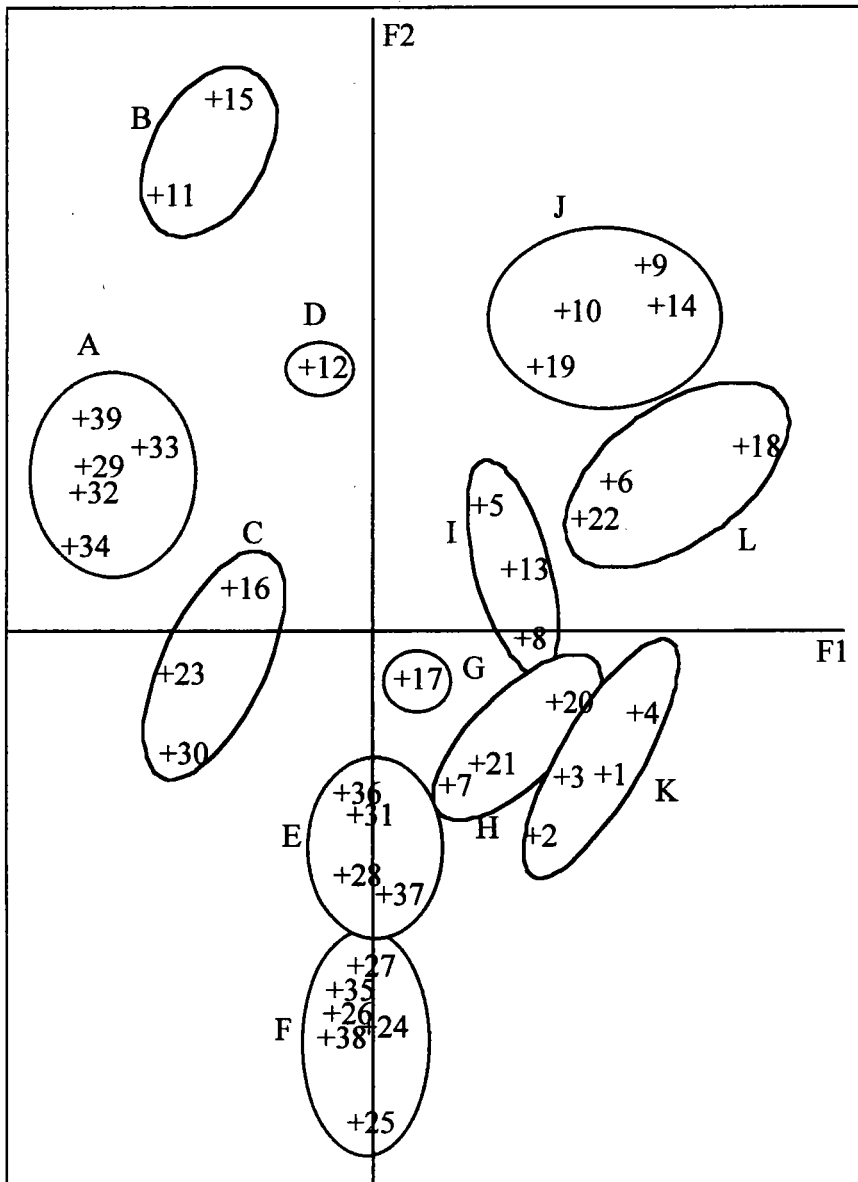


Figure 30 : Carte factorielle représentant les axes 1 et 2 de l'AFC.

n° du relevé		29	32	33	34	39	30	23	16	35	24	25	26	38	27	28	37	31	36	7	21	20	8	13	5	9	10	14	19	2	1	3	4	18	6	22	11	15	17	12									
classe de l'AFC		A	A	A	A	A	C	C	C	F	F	F	F	F	F	E	E	E	E	H	H	H	I	I	I	J	J	J	J	K	K	K	K	L	L	L	B	B	G	D									
<i>Ceratodon purpureus s</i>	Cpus	1	1	1	1	1		1	1																														1	1		1							
<i>Brachythecium albicans</i>	Ba	1	1	1	1	1	1																																	1	1								
<i>Scleropodium purum</i>	Ppu				1					1					1		1																																
<i>Ceratodon purpureus</i>	Cpu						1								1	1																																	
<i>Campylopus paradoxus</i>	Cps						1	1					1						1	1																													
<i>Polytrichum juniperinum s</i>	Pjs							1																																									
<i>Rhytidiadelphus squarrosus</i>	Rs							1																																									
<i>Aulacomnium androgynum</i>	Aa									1																																							
<i>Polytrichum juniperinum</i>	Pj										1	1	1			1																																	
<i>Campylopus paradoxus</i>	Cp									1	1	1			1				1																														
<i>Dicranum scoparium</i>	Ds											1	1																																				
<i>Polytrichum piliferum s</i>	Pps											1																																					
<i>Hypnum cupressiforme</i>	Hc															1																																	
<i>Hépatique à thalle</i>	Ht																1																																
<i>Brachythecium sp.</i>	Bs																1																																
<i>Callergion cuspidatum</i>	Cc																1																																
<i>Bryum argenteum j</i>	Barj																				1																												
<i>Pottia starkeana</i>	Ps																			1																													
<i>Bryum capillare</i>	Bc																			1			1							1	1		1																
<i>Pottia starkeana*</i>	Ps*																		1																									1					
<i>Pohlia nutans</i>	Pn																					1	1							1	1		1																
<i>Brachythecium albicans j</i>	Baj																					1						1																					
<i>Ditrichum cylindricum</i>	Dc																						1																										
<i>Weissia controversa s</i>	Wcs																						1	1		1	1	1	1	1														1					
<i>Eurhynchium sp</i>	Es																							1				1															1						
<i>Aulacomnium androgynum j</i>	Aaj																							1																									
<i>Bryum capillare s</i>	Bcs																										1	1	1	1	1	1													1				
<i>Ditrichum cylindricum*</i>	Dc*																										1	1																					
<i>Weissia controversa*</i>	Wc*																																													1			
<i>Weissia controversa</i>	Wc																																																
<i>Brachythecium albicans*</i>	Ba*																																																
<i>Pohlia nutans j</i>	Pnj																																																
<i>Pohlia nutans*</i>	Pn*																																																
<i>Pohlia nutans s</i>	Pns																																																

s : fertile

* : mauvais état

j : jeune

Auby handicapé (AH) : données de 1 à 11

Auby bois des Asturies (ABA) : données de 18 à 23

Terril de Harnes (H) : données de 30 à 40

Mortagne-du-Nord (MN) : données de 12 à 17

Témoin Flines-les-Mortagne (TFM) : données de 24 à 29

Tableau 23 : Tableau phytosociologique élaboré des espèces observées sur les différents sites pollués et le site témoin.

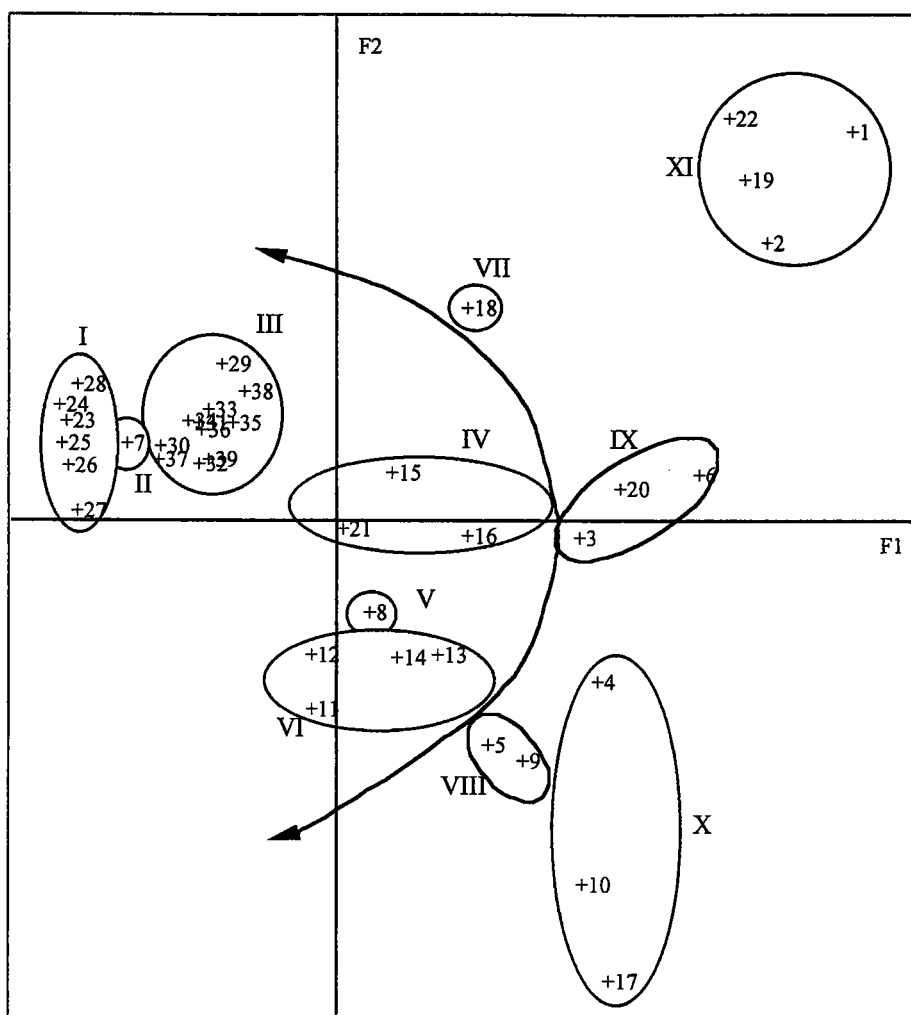


Figure 31 : Carte factorielle représentant les axes 1 et 2 de l'ACP.

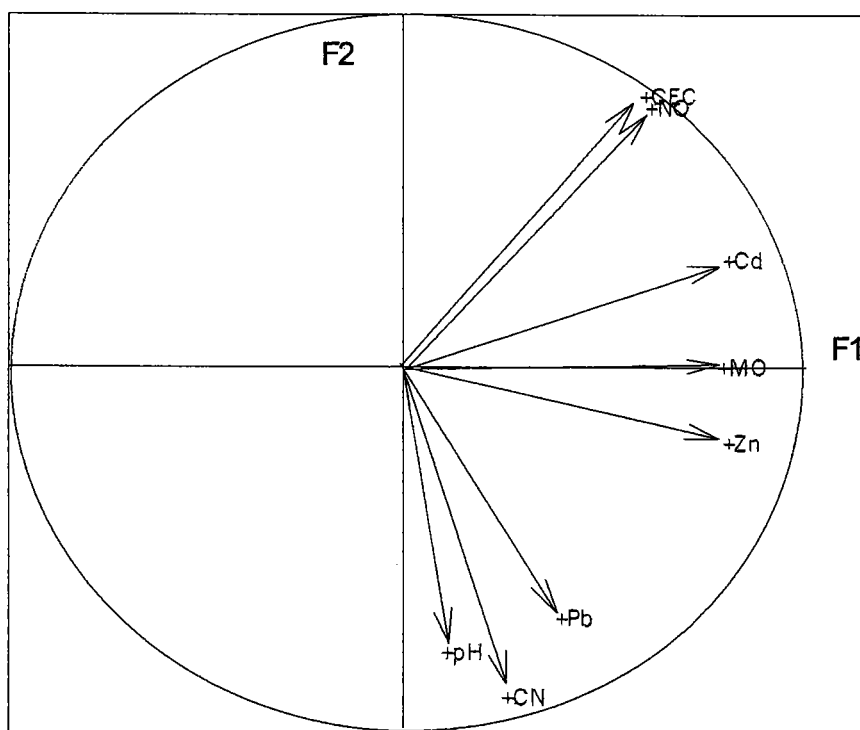


Figure 32 : Cercle des corrélations de l'ACP (axes 1 & 2).

	I		II		III		IV		V		VI	
	m	sd	m	sd	m	sd	m	sd	m	sd	m	sd
Zn ppm	30,90	8,00	984,25	0,00	413,10	208,59	21 408,7	6 846,42	39,96	0,00	21 348,55	14 200,80
Pb ppm	16,18	9,96	218,50	0,00	272,99	75,22	5 123,5	4 127,10	10,04	0,00	5 754,98	873,48
Cd ppm	0,03	0,08	2,76	0,00	6,85	4,26	92,82	27,67	0,20	0,00	114,00	44,89
MO g.kg ⁻¹	7,35	3,04	20,70	0,00	190,75	41,43	194,5	59,23	4,80	0,00	145,73	45,79
N g.kg ⁻¹	0,37	0,11	0,74	0,00	5,61	1,38	5,53	1,83	0,32	0,00	2,63	0,71
C/N	11,38	2,20	16,30	0,00	20,03	2,94	20,6	0,70	8,80	0,00	32,50	9,12
CEC cmol.kg ⁻¹	3,38	3,55	1,50	0,00	14,55	3,36	26,53	2,72	12,40	0,00	9,75	1,32
pH (H ₂ O)	5,22	0,60	5,70	0,00	5,78	0,41	6,87	0,31	6,40	0,00	7,33	0,05

	VII		VIII		IX		X		XI	
	m	sd	m	sd	m	sd	m	sd	m	sd
Zn ppm	26 245,06	0,00	22 088,35	2 101,44	38 682,34	13 933,51	26 924,96	2 835,71	32 402,66	2 664,45
Pb ppm	3 778,66	0,00	3 630,52	4 092,13	5 034,71	562,24	18 403,05	10 428,08	4 758,72	542,79
Cd ppm	163,24	0,00	82,33	63,33	219,97	99,34	113,77	34,41	271,35	53,23
MO g.kg ⁻¹	269,50	0,00	481,40	37,34	531,07	130,38	486,53	108,33	603,60	103,98
N g.kg ⁻¹	7,99	0,00	4,59	0,16	8,78	0,11	4,25	1,09	19,62	6,25
C/N	19,60	0,00	60,95	2,62	35,17	8,66	67,10	7,20	18,65	4,14
CEC cmol.kg ⁻¹	36,50	0,00	17,15	3,04	24,17	8,81	13,50	3,65	56,65	10,37
pH (H ₂ O)	5,10	0,00	7,75	0,21	6,47	0,57	6,63	0,81	5,63	0,61

Tableau 24 : Valeurs moyennes (m) et écarts-types (sd) des différents paramètres physico-chimiques (MO : matière organique ; N : azote total ; C/N : rapport carbone sur azote ; pH ; Zn : zinc ; Pb : plomb ; Cd : cadmium) des onze groupes de sites définis par l'ACP.

	Zn ppm	Pb ppm	Cd ppm	MO g.kg ⁻¹	CEC cmol.kg ⁻¹	N g.kg ⁻¹	C/N	pH (H ₂ O)
Zn ppm	1							
Pb ppm	0,53	1						
Cd ppm	0,90	0,38	1					
MO g.kg ⁻¹	0,73	0,42	0,72	1				
CEC cmol.kg ⁻¹	0,53	0,12	0,73	0,65	1			
N g.kg ⁻¹	0,52	0,1	0,69	0,75	0,83	1		
C/N	0,43	0,65	0,21	0,52	-0,08	-0,08	1	
pH (H ₂ O)	0,4	0,41	0,16	0,22	-0,07	-0,04	0,54	1

Tableau 25 : Corrélation entre les variables édaphiques des sites étudiés.

	III	I	II	IV	VI	V	VIII	IX	XI	X	VII	
A	5											5
E	3	1										4
F	2	4										6
C	1	1		1								3
H			1	1				1				3
B				1	1							2
D					1							1
I					1	1	1					3
J					1		1	1	1			4
K								1	2	1		4
L								1	1		1	3
G										1		1
	11	6	1	3	4	1	2	3	4	3	1	

Tableau 26 : Corrélation entre les groupes de l'AFC et ceux de l'ACP.

	Unité 1		Unité 2		Unité 3	
	m	sd	m	sd	m	sd
Zn ppm	278,21	250,31	21 374,33	10791,52	30 527,26	8383,33
Pb ppm	182,35	139,90	5 484,35	2484,57	7 722,14	7548,87
Cd ppm	4,44	4,76	104,92	37,29	185,73	93,49
MO g.kg ⁻¹	126,02	96,11	166,63	53,83	515,35	125,31
N g.kg ⁻¹	3,76	2,80	3,87	1,94	10,37	7,38
C/N	16,98	5,00	27,40	9,07	40,22	21,80
CEC cmol.kg ⁻¹	10,61	6,42	15,77	9,43	31,57	19,61
pH (H ₂ O)	5,58	0,54	7,13	0,30	6,34	0,96

Tableau 27 : Valeurs moyennes (m) et écarts-types (sd) des paramètres physico-chimiques des sols (MO : matière organique ; N : azote total ; C/N : rapport carbone sur azote ; pH ; Zn : zinc ; Pb : plomb ; Cd : cadmium) dans les différentes Unités Biologiques Fonctionnelles (UBF).

données, ce qui montre une bonne corrélation entre les deux démarches. Un classement un peu plus grossier permet en fait de séparer 3 unités de niveau supérieur :

- l'une formée par les groupes de sites A, C, E, F, liés aux groupes I, III ($30 < [Zn] < 413$ ppm) ;
- une seconde formée par les groupes de sites B et D, liés aux groupes IV et VI ;
- une troisième formée par les groupes de sites G, J, K, L, liés à VII à XI.

Entre ces unités subsistent des groupes isolés intermédiaires H, I et II, V. Le tableau 27 précise les valeurs moyennes (m) et les écarts-types (sd) des paramètres physico-chimiques des sols des différentes unités biologiques fonctionnelles (UBF).

1.3.1. La valeur bioindicatrice des groupements bryologiques

La corrélation significative entre les classements bryofloristique et édaphique implique une forte valeur bioindicatrice de sols pollués aux groupements bryologiques tels qu'ils ont été définis par l'AFC.

Mais nous pouvons essayer d'affiner cette valeur bioindicatrice au niveau des Unités Biologiques Fonctionnelles à l'aide d'une Analyse Factorielle des Correspondances Multiples (AFCM) (fig. 33).

En décomposant chaque variable édaphique selon 4 classes (tab. 28), nous avons pu déduire le comportement des unités biologiques fonctionnelles en fonction de ces classes.

L'axe 1 (inertie de 33,63 %) représente le gradient chimique concernant les éléments traces métalliques.

Cinq grands groupes ont été trouvés (tab. 29).

Le groupe 1 est composé de bryophytes se trouvant sur des sols très pauvres en Cd (sols considérés comme normaux, concentrations inférieures à la norme AFNOR NFU 44-041), le groupe 2 a plutôt tendance à être constitué de bryophytes se développant sur des sols très pauvres en Zn, qui est un oligo-élément du sol. A droite de l'axe 1, nous sommes en présence de groupements bryologiques se développant sur des sols dont les concentrations en éléments traces métalliques sont égales ou supérieures à la norme AFNOR (groupes 3, 4, 5).

Il convient également de noter que les autres variables (CEC, C/N, MO, N, pH) ont des valeurs croissantes du groupe 1 au groupe 5.

Trois classes de bryophytes peuvent être distinguées ici :

- la classe α rassemblant les groupes 1 et 2 contenant des bryophytes se développant sur des sols très pauvres en métaux ;
- la classe β , classe intermédiaire reprenant le groupe 3 dans son intégralité, considérée comme classe intermédiaire des deux autres ;
- la classe γ , rassemblant les groupes 4 et 5 pour lesquels les bryophytes se développent sur des sols extrêmement riches en métaux.

En outre, les espèces juvéniles et à vitalité réduite ne se rencontrent que dans les classes β et γ .

Shaw (1987b) a montré qu'une bryophyte comme *Funaria hygrometrica* pouvait présenter des variations de croissance du gamétophyte, de germination, de morphologie lorsque l'on soumettait cette bryophyte à de fortes concentrations en cuivre au niveau du sol.

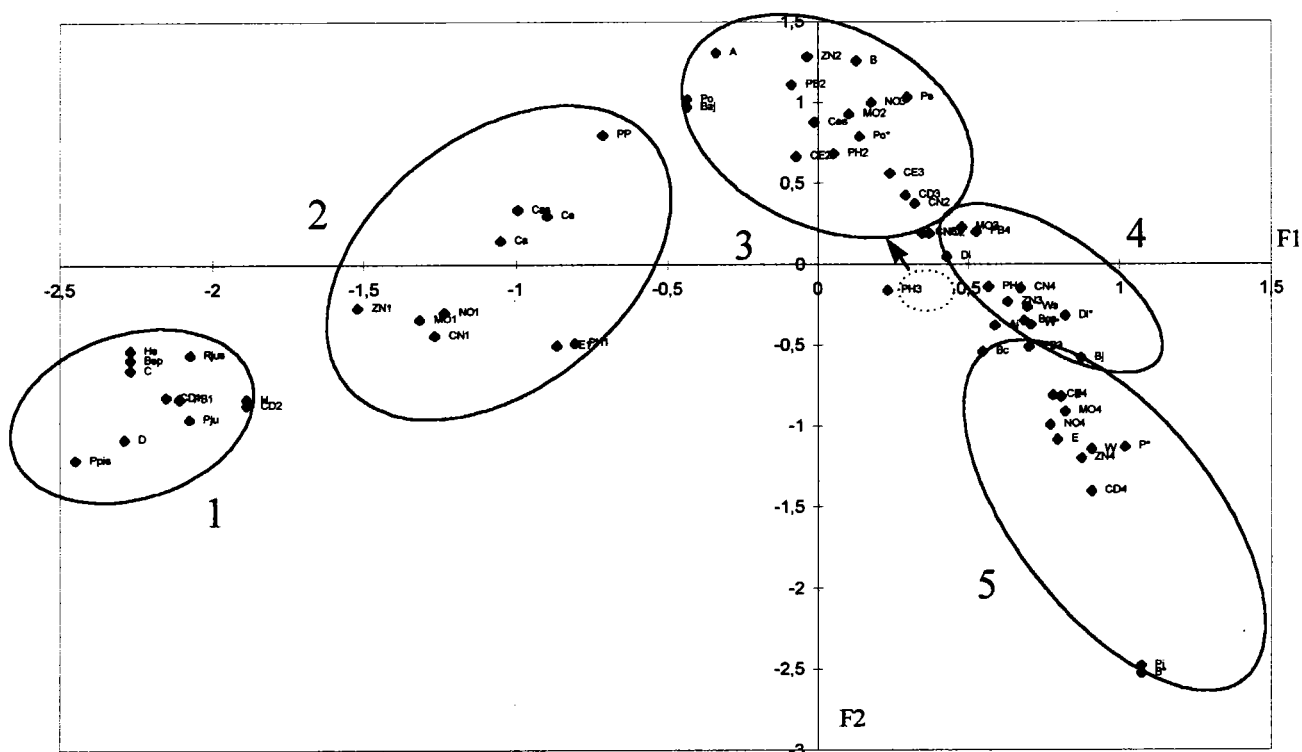


Figure 33 : Carte factorielle représentant les axes 1 et 2 de l'AFCM.

Zn ppm		Pb ppm		Cd ppm		MO g.kg ⁻¹	
Zn1	de 20,766 à 300	Pb1	de 3,953 à 100	Cd1	0	MO1	de 4,3 à 128,8
Zn2	>300 à 10000	Pb2	>100 à 1000	Cd2	de 0,201 à 2	MO2	>128,8 à 205,3
Zn3	>10000 à 30000	Pb3	>1000 à 15000	Cd3	>2 à 200	MO3	>205,3 à 455
Zn4	>30000 à 53436,3	Pb4	>15000 à 30376,98	Cd4	>200 à 325,3	MO4	>455 à 689,4

CEC cmol.kg ⁻¹		N g.kg ⁻¹		C/N		pH (H ₂ O)	
CEC1	de 1,5 à 10,1	N1	de 0,26 à 2,99	C/N1	de 8,8 à 17,1	pH1	de 4,8 à 5,2
CEC2	>10,1 à 15	N2	>2,99 à 4,8	C/N2	>17,1 à 20,9	pH2	>5,2 à 6
CEC3	>15 à 21,1	N3	>4,8 à 7,05	C/N3	>20,9 à 29	pH3	>6 à 6,8
CEC4	>21,1 à 67	N4	>7,05 à 27,7	C/N4	>29 à 75,3	pH4	>6,8 à 7,9

Tableau 28 : Classes des paramètres physico-chimiques des sols (MO : matière organique ; CEC : capacité d'échanges cationiques ; N : azote total ; C/N : rapport carbone sur azote ; pH ; Zn : zinc ; Pb : plomb ; Cd : cadmium) utilisés pour l'AFCM.

Groupe 1	Abréviation	Concentrations en Cd très faibles ou nulles, concentrations en Pb très faibles	Classes des variables de l'AFCM	Classe
<i>Hépatique à thalle</i>	He		Cd1 Cd2 Pb1	α
<i>Brachythecium</i> sp.	Bsp			
<i>Callergionella cuspidata</i>	C			
<i>Dicranum scoparium</i>	D			
<i>Polytrichum piliferum</i> s	Ppis			
<i>Rhytidiadelphus squarrosus</i>	R			
<i>Polytrichum juniperinum</i> s	Pjus			
<i>Hypnum cupressiforme</i>	H			
<i>Polytrichum juniperinum</i>	Pju			
Groupe 2		Concentrations en Zn très faibles, sols pauvres en matière organique, pH acide (4,8 à 5,2)		
<i>Campylopus paradoxus</i>	Ca		Zn1 CE1 pH1 MO1 N1 C/N1	
<i>Campylopus paradoxus</i> s	Cas			
<i>Ceratodon purpureus</i>	Ce			
<i>Scleropodium purum</i>	Pp			
Groupe 3		Concentrations en Zn, Pb et Cd au-dessus de la norme AFNOR, sol à pH plus acido-neutre, présence de matière organique		
<i>Aulacomnium androgynum</i>	A		Pb2 Zn2 N3 MO2 CE2 Cd3 pH2 C/N2 pH3 CE3	β
<i>Pottia starkeana</i>	Po			
<i>Bryum argenteum</i> j	Baj			
<i>Brachythecium albicans</i>	B			
<i>Pohlia nutans</i> s	Ps			
<i>Ceratodon purpureus</i> s	Ces			
<i>Pottia starkeana</i> *	Po*			
Groupe 4		Concentrations en Pb, Zn et Cd nettement supérieures à la limite de la norme AFNOR, sols à tendance plutôt neutre voire basique, matière organique importante		
<i>Ditrichum cylindricum</i>	Di		N2 Pb4 C/N3 MO3 pH4 Zn3 C/N4 Pb3	γ
<i>Ditrichum cylindricum</i> *	Di*			
<i>Aulacomnium androgynum</i> j	Aj			
<i>Weissia controversa</i> var. <i>crispata</i> s	Ws			
<i>Weissia controversa</i> var. <i>crispata</i> *	W*			
<i>Bryum capillare</i> s	Bcs			
<i>Brachythecium albicans</i> j	Bj			
Groupe 5		Concentrations en Pb, Zn et Cd extrêmement importantes, sols très riches en matière organique et à pH neutre voire basique		
<i>Eurhynchium</i> sp.	E		CE4 Zn4 MO4 Cd4 N4	
<i>Pohlia nutans</i>	P			
<i>Pohlia nutans</i> j	Pj			
<i>Weissia controversa</i> var. <i>crispata</i>	W			
<i>Bryum capillare</i>	Bc			
<i>Brachythecium albicans</i> *	B*			

Tableau 29 : Classement des Unités Biologiques Fonctionnelles selon les variables physico-chimiques des sols par AFCM (cf. tableau 28 pour les valeurs des différentes classes), (norme AFNOR NFU 44-041, Cd 2ppm, Pb 100 ppm, Zn 300 ppm).

Shaw *et al.* (1991) ont également montré que les métaux avaient une influence non négligeable sur la croissance, sur la reproduction et sur la morphologie de *Ceratodon purpureus*.

Le tableau 29 montre que certaines bryophytes, comme *Weissia controversa* var. *crispata*, *Pohlia nutans*, *Pottia starkeana*..., ne se retrouvent que sur des sols dont les concentrations sont très importantes en matière organique et en éléments traces métalliques (Pb, Zn et Cd).

Shacklette (1965a, b, 1967) a montré que certaines bryophytes se développaient sur des substrats très riches en cuivre et en éléments traces métalliques en général. Ces bryophytes des genres *Mielichhoferia*, *Scopelophila*, *Gymnocolea* et *Cephaloziella* sont en général accompagnées d'autres bryophytes également tolérantes à ces fortes concentrations en métaux mais pouvant se développer également sur des sites « normaux » (bryophytes pseudométallophytes). Brown & Buck en 1978 ont également montré que des bryophytes pleurocarpes du genre *Grimmia* avaient la capacité de se développer sur des sols riches en Sr qu'ils pouvaient accumuler.

Concernant les relations entre les bryophytes et leur substrat, Richards (1947) notait que la réponse des bryophytes aux facteurs édaphiques est certainement plus pointue et plus claire que pour les phanérogames. Des travaux ont également été réalisés sur des bryophytes « cupricoles » que nous n'avons pas retrouvés sur nos sites, mais qui étaient signalés encore en 1986 par Sotiaux *et al.* Il y a également d'autres facteurs qui pourraient entrer en jeu comme la compétition existant entre les bryophytes et les plantes supérieures, mais dans notre cas, les sols sont tellement contaminés en éléments traces métalliques que nous avons une végétation phanérogamique calaminaire particulière. Lors de nos échantillonnages successifs, les plantes supérieures n'étaient pas très développées voire absentes des relevés.

Nous ne pouvons pas conclure sur le fait que ces bryophytes sont réellement des bryophytes métallophytes absolues ou pseudométallophytes, au sens de Lambinon & Auquier (1963), car cela implique des études beaucoup plus approfondies des mécanismes de bioaccumulation de ces différentes espèces. Mais il semblerait plausible, comme l'a démontré Shaw en 1987b et 1990, ainsi que Briggs (1972) et Brown & House (1978) qui ont pu mettre en évidence des écotypes métallo-tolérants chez *Marchantia polymorpha* et *Jungermannia gracillima*, que certains bryophytes se soient adaptées à leur milieu en développant au fil des générations des écotypes différents permettant d'avoir une certaine tolérance vis-à-vis de ces concentrations létales en Cd, Pb et Zn observées sur les sites calaminaires étudiés.

1.3.2. Conclusion

Les résultats de ce travail ne permettent pas de répondre de façon définitive à la question de savoir s'il existe chez certaines bryophytes des écotypes leur permettant de tolérer les fortes concentrations en éléments traces métalliques au niveau des sols, ni pourquoi nous ne trouvons pas sur nos sites pourtant très chargés en Cd, Pb et Zn les bryophytes considérées comme métallophytes absolues, mais ils permettent déjà d'apporter un début de réponse quant à la possibilité d'établir des diagnostics fiables concernant la contamination de certains sites en éléments traces métalliques.

Ce résultat nous amène à nous poser d'autres questions : les bryophytes que nous rencontrons sur nos sites et qui se regroupent en communautés bryophytiques originales sont-

elles pseudométallophytes et, si oui, quels sont les mécanismes intervenant dans la métallogtolérance ou la métallog-résistance de ces organismes ?

Nous allons donc poursuivre notre travail afin de comprendre, d'une part, pourquoi des bryophytes comme *Cephaloziella divaricata* ou *Scopelophila cataractae* disparaissent progressivement des sites belges et français et, d'autre part, savoir s'il existe véritablement des écotypes métallog-tolérants concernant certaines bryophytes ubiquistes. Des mises en culture de ces bryophytes, ainsi que des tests croisés devraient nous apporter des éléments de réponse.

II. IMPACTS DES ELEMENTS TRACES METALLIQUES SUR LES COMMUNAUTES BRYOLICHENIQUES

Les travaux présentés dans ce chapitre ont été réalisés en collaboration avec M. Damien Cuny et présentés dans sa thèse (Cuny, 1999).

II.1. LES CARACTERISTIQUES PHYSICO-CIMIQUES DES SOLS

Les résultats bruts des caractéristiques physico-chimiques des sols sont présentés dans le tableau 30. Nous proposons à la fin de ce paragraphe un résumé et une discussion sur les résultats obtenus pour les sols.

Pour plus de clarté, nous avons séparé les résultats obtenus pour les éléments traces métalliques de ceux des autres caractéristiques édaphiques.

II.1.1. Les caractéristiques édaphiques

Les variables édaphiques des sols ont été traitées par analyse factorielle discriminante (AFD). Les résultats sont présentés tableau 31 et figure 34.

L'horizon superficiel du sol d'Auby est composé de différentes fractions. On distingue tout d'abord une litière importante de végétaux, dominée par des rosettes de feuilles d'*Armeria maritima* subsp. *halleri*. La fraction minérale est composée d'éléments grossiers hétérogènes. Nous avons observé des débris exogènes comme des morceaux de briques, de tuiles et de bois. Une fraction grossière schisteuse est également présente. Les produits exogènes pourraient mettre en évidence des dépôts de matériaux sur ce site, autres que les dépôts d'origine métallurgique. La fraction fine (*i.e.* après tamisage à 2 mm) est plus homogène. Une observation à la loupe binoculaire y révèle la présence de nombreux débris végétaux.

Ces observations sont confirmées par les résultats des dosages qui révèlent un taux important de matière organique. Il n'est cependant pas significativement différent des taux de Harnes et de Carvin. Le taux de matière organique est fortement corrélé avec la capacité d'échange cationique (tab. 32). Cela semble indiquer que les éléments traces pourraient se fixer préférentiellement sur cette fraction de sol. L'azote dosé est principalement de l'azote organique. Le pH varie de 5,77 à 6,32, nous sommes donc dans une gamme de pH acide, confirmée par les dosages de calcium. Ces derniers (sauf pour l'individu AH6) caractérisent un horizon pas ou peu calcaire.

Le sol de Mortagne se caractérise également par la présence d'éléments grossiers exogènes qui sont de nature similaire à ceux rencontrés à Auby. Nous avons aussi observé des éléments schisteux, qui mettent en évidence des dépôts d'origine métallurgique. La fraction fine, ocre à brune, contient des débris végétaux, mais en plus faible quantité que précédemment.

La concentration en matière organique est significativement inférieure à celle des autres sites contaminés. La capacité d'échange cationique est plus faible. Il est intéressant de

Sites	groupe	n° relevé	MO (g/kg)	N (g/kg)	C/N	CEC (cmol+/kg)	pH	Cadmium (mg/kg)	Plomb (mg/kg)	Zinc (mg/kg)
Auby	1	AH1	564,70	16,41	20,01	46,10	5,88	376,00	5209,00	29650,00
	1	AH2	462,30	9,36	28,72	37,90	5,90	124,40	5077,00	21660,00
	1	AH3	313,40	3,02	60,65	11,65	6,32	98,20	14855,00	18195,00
	1	AH4	320,40	5,12	36,39	21,90	6,12	97,80	5597,00	30050,00
	1	AH5	596,20	19,00	18,24	51,90	5,77	523,00	7500,00	33650,00
	1	AH6	159,10	3,20	28,91	10,60	5,95	39,80	3081,00	7680,00
Mortagne	2	M14	106,98	4,32	14,43	12,33	5,77	39,65	8004,00	14681,25
	2	M15	140,40	4,46	18,30	11,50	5,46	19,40	3666,00	5860,00
	2	M16	127,60	4,21	17,62	11,80	5,69	25,10	6940,00	7830,00
	2	M17	156,20	3,22	28,20	8,60	6,12	92,40	11030,00	3430,00
	2	M11	121,60	4,59	16,61	14,45	6,03	49,65	6809,50	11770,00
	2	M13	190,70	4,81	23,06	15,60	6,00	66,90	3730,80	6338,80
Harnes	2	M12	137,30	3,13	25,50	10,00	5,95	86,10	5957,00	13490,00
	3	TH1	210,00	6,19	19,73	18,10	4,76	2,00	165,00	321,00
	3	TH2	226,90	7,48	17,63	19,80	4,67	2,00	182,00	327,00
	3	TH3	358,25	11,68	17,94	26,60	4,68	25,30	2992,00	2264,50
	3	TH4	169,80	4,41	22,38	14,00	5,22	2,00	234,00	211,80
	3	TH5	186,80	5,54	19,60	12,30	4,90	2,00	185,00	180,10
Carvin	4	TC1	247,90	4,07	35,41	11,50	6,28	2,00	187,00	122,90
	4	TC2	351,60	5,99	34,12	15,90	6,01	2,00	321,00	151,20
	4	TC3	379,80	4,38	50,41	11,60	5,56	2,00	222,00	109,70
	4	TC4	234,60	3,83	35,61	9,70	5,97	2,00	150,00	135,30
	4	TC5	338,30	6,13	32,09	15,40	5,79	2,00	116,00	151,40
Témoïn	5	M21	18,40	0,90	12,04	4,10	5,22	2,00	100,00	58,20
	5	M22	19,30	0,85	13,80	3,40	4,82	2,00	100,00	100,70
	5	M21B	86,25	3,69	13,96	10,20	3,38	2,00	100,00	85,90
	5	M31	54,20	1,39	22,66	6,90	3,48	2,00	100,00	21,50
	5	M32	33,90	0,88	22,39	4,20	3,19	2,00	100,00	27,50
	5	M33	35,80	1,76	11,82	8,20	5,72	2,00	100,00	35,60
Auberchicourt	6	TA1	53,56	2,10	14,70	11,19	6,45	2,00	100,00	137,60
	6	TA2	58,40	2,51	13,40	12,89	6,80	2,00	100,00	139,27
	6	TA3	48,63	2,05	13,70	9,95	6,40	2,00	100,00	144,89

Tableau 30 : Résultats bruts des différents paramètres physico-chimiques des sols pollués et du sol témoin.

Groupes : groupes utilisés dans l'AFD ; Relevés : abréviations des sites ; MO : matière organique ; N : azote total ; C/N : rapport carbone sur azote ; CEC : capacité d'échanges cationiques. Les valeurs en italique indiquent les échantillons dans lesquels les concentrations sont inférieures aux limites de détection de l'appareil. Nous avons choisi les valeurs de la norme AFNOR NF U 44-041 comme valeurs seuil.

Individu	Groupe initial	Axe 1	Axe 2	Groupe estimé
AH1	1	-3,97	1,27	1
AH2	1	-3,66	2,24	1
AH3	1	-5,18	1,51	1
AH4	1	-3,04	1,45	1
AH5	1	-3,89	2,84	1
AH6	1	-0,44	0,75	2
M14	2	1,59	0,90	2
M15	2	1,19	-0,46	2
M16	2	1,15	0,30	2
M17	2	-0,61	-0,14	2
M11	2	1,00	2,12	6
M13	2	-0,34	1,00	2
M12	2	0,08	0,68	2
TH1	3	1,18	-0,22	3
TH2	3	1,29	-0,40	3
TH3	3	-0,25	-1,96	3
TH4	3	0,85	0,15	3
TH5	3	1,15	-2,19	3
TC1	4	-2,47	-0,91	4
TC2	4	-3,36	-3,50	4
TC3	4	-4,53	-4,20	4
TC4	4	-2,00	-1,54	4
TC5	4	-2,78	-3,78	4
M21	5	3,26	-1,02	5
M22	5	3,58	-1,43	5
M21B	5	4,61	-1,74	5
M31	5	4,17	-0,44	5
M32	5	4,72	-1,35	5
M33	5	2,61	0,90	2
TA1	6	1,41	3,02	6
TA2	6	1,09	3,81	6
TA3	6	1,57	2,33	6

Tableau 31 : Résultats de l'analyse factorielle discriminante des sites selon les variables édaphiques. Les groupes estimés sont ceux établis par l'AFD. Les colonnes "Axe" reprennent les coordonnées des individus sur la représentation graphique. Les sites mal classés sont en gras.

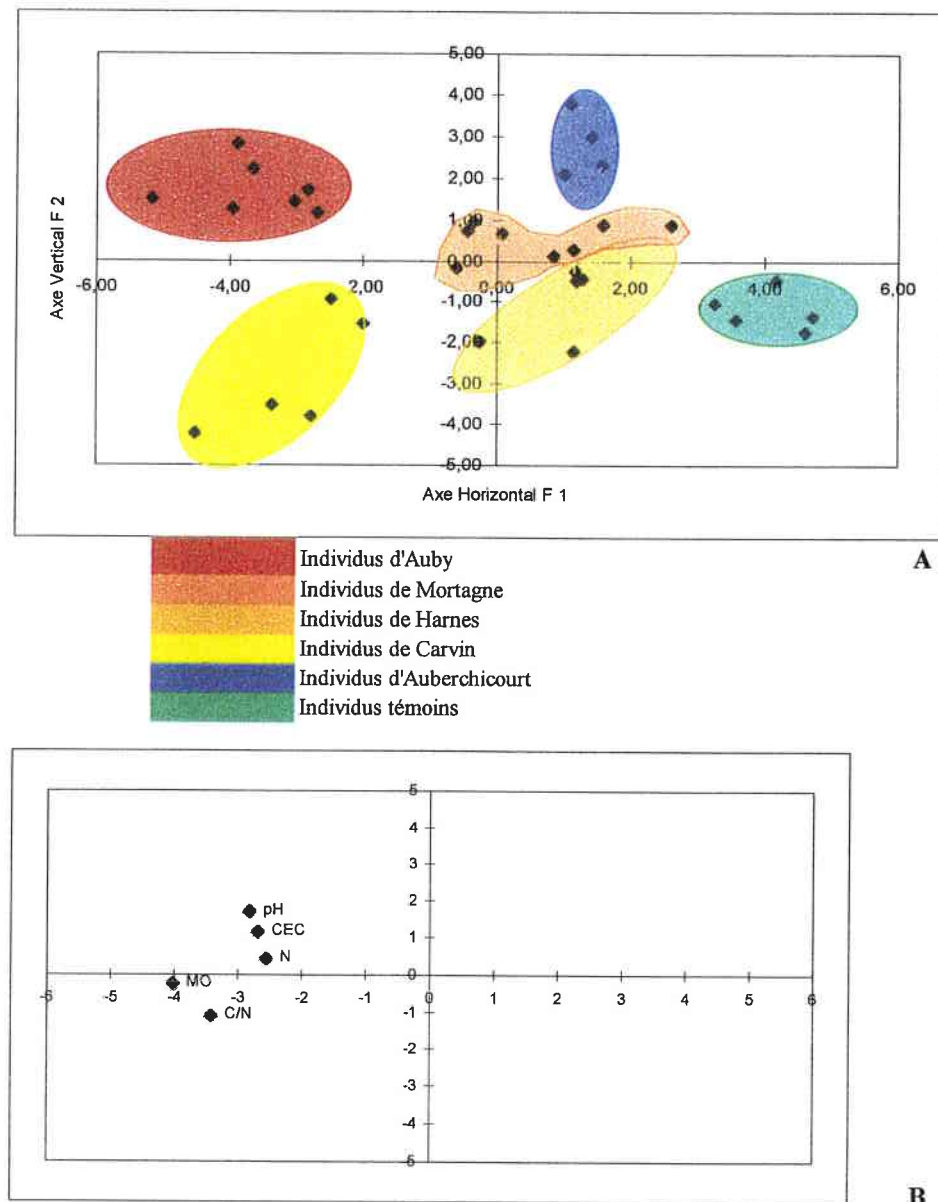


Figure 34 : Représentation graphique des individus selon les axes 1 et 2 de l'AFD (A) et représentation des variables canoniques (B).

Auby	MO	N	C/N	CEC	pH
MO	1,00				
N	0,93	1,00			
C/N	-0,54	-0,75	1,00		
CEC	0,96	0,97	-0,74	1,00	
pH	-0,58	-0,77	0,97	-0,77	1,00

Mortagne	MO	N	C/N	CEC	pH
MO	1,00				
N	0,07	1,00			
C/N	0,66	-0,70	1,00		
CEC	0,20	0,89	-0,50	1,00	
pH	0,35	-0,34	0,58	0,02	1,00

Harnes	MO	N	C/N	CEC	pH
MO	1,00				
N	0,99	1,00			
C/N	-0,67	-0,75	1,00		
CEC	0,94	0,95	-0,68	1,00	
pH	-0,64	-0,72	0,96	-0,69	1,00

Carvin	MO	N	C/N	CEC	pH
MO	1,00				
N	0,62	1,00			
C/N	0,46	-0,41	1,00		
CEC	0,62	0,98	-0,40	1,00	
pH	-0,73	-0,19	-0,65	-0,09	1,00

Témoin	MO	N	C/N	CEC	pH
MO	1,00				
N	0,91	1,00			
C/N	0,17	-0,23	1,00		
CEC	0,87	0,91	-0,15	1,00	
pH	-0,61	-0,30	-0,78	-0,18	1,00

Auberchicourt	MO	N	C/N	CEC	pH
MO	1,00				
N	0,91	1,00			
C/N	-0,22	-0,60	1,00		
CEC	1,00	0,94	-0,31	1,00	
pH	0,92	1,00	-0,59	0,95	1,00

Tableau 32 : Coefficients de corrélation entre les variables édaphiques. (MO : matière organique ; N : azote organique ; CEC : capacité d'échanges cationiques ; pH).

Auby	Cadmium	Plomb	Zinc
Cadmium	1,00		
Plomb	-0,01	1,00	
Zinc	0,74	0,04	1,00

Mortagne	Cadmium	Plomb	Zinc
Cadmium	1,00		
Plomb	0,42	1,00	
Zinc	-0,08	-0,04	1,00

Harnes	Cadmium	Plomb	Zinc
Cadmium	1,00		
Plomb	1,00	1,00	
Zinc	1,00	1,00	1,00

Carvin	Cadmium	Plomb	Zinc
Cadmium	1,00		
Plomb	NS	1,00	
Zinc	NS	0,03	1,00

Témoin	Cadmium	Plomb	Zinc
Cadmium	1,00		
Plomb	NS	1,00	
Zinc	NS	-0,69	1,00

Auberchicourt	Cadmium	Plomb	Zinc
Cadmium	1,00		
Plomb	0,99	1,00	
Zinc	0,58	0,48	1,00

Tableau 33 : Coefficients de corrélation entre les éléments traces métalliques. (NS = Non Significatif).

remarquer que la CEC et la MO ne sont pas corrélées. Par contre la CEC est corrélée avec l'azote. Cela peut mettre en évidence qu'une autre fraction que la MO du sol participe ici au stockage des éléments traces.

Le pH varie de 5,46 à 6,12, ce qui caractérise des horizons superficiels acides. Ces horizons sont peu calcaires.

Le sol du terril de **Harnes** a une structure différente des sites précédents. Les pentes du terril, notamment au niveau de la rampe d'accès, permettent d'observer une stratification régulière des différentes couches.

La topographie plane de la terrasse étudiée a permis la formation d'un sol mais les éléments schisteux dominant dans l'horizon superficiel.

Des éléments grossiers exogènes peuvent être également observés, mais en quantité plus faible que sur les deux sites précédents. L'observation de la fraction fine met en évidence la présence de débris végétaux.

Le taux de MO est comparable à celui observé à Auby. De même, la CEC est corrélée à la MO Cette fraction pourrait être un site préférentiel de stockage des éléments traces métalliques. L'azote dosé est principalement de l'azote organique. Les valeurs de pH varient entre de 4,67 à 5,22 et caractérisent des horizons très acides à acides. Ces horizons sont peu calcaires.

Les résultats obtenus pour les échantillons de **Carvin** sont très proches des précédents. Les aspects macroscopiques sont identiques avec une prédominance d'éléments schisteux noirs ou rougeâtres. Les éléments exogènes sont plus rares, plus fins et plus rarement organiques.

La concentration moyenne en MO est importante (par rapport aux autres sites). Les coefficients de corrélation avec la CEC et l'azote sont plus faibles que précédemment. Il est possible qu'une autre phase du sol participe au stockage des éléments. Les valeurs du pH et de la concentration en Ca caractérisent un substrat acide et non calcaire.

Le sol du terril d'**Auberchicourt** présente une concentration en MO faible, mais nous obtenons une meilleure corrélation entre la MO et la CEC Le terril est édifié sur un socle ancien de roches schisteuses et de grès carbonifères et la gamme de pH caractérise un substrat acido-neutre.

Le sol **témoin** se caractérise par une texture sableuse. La concentration en MO est faible, mais semble être importante dans le stockage des cations. La gamme de pH et des concentrations en calcium caractérisent un substrat très acide à acide et peu calcaire.

Les résultats de l'AFD montrent que les différents groupes sont bien individualisés. Trois observations ont été reclassées par l'analyse. Les écarts entre les points au sein d'un même groupe soulignent les coefficients de variation importants. Il s'agit de l'observation AH6 (Auby) qui est associée au groupe de Mortagne, M11 (Mortagne) qui est associé au groupe du terril d'Auberchicourt et M33 (Flines-les-Mortagne) qui est associé au groupe de Mortagne. Selon les axes 1 et 2 (fig. 34), le groupe d'Auby peut être discriminé par les valeurs de la CEC De même, la MO et C/N permettent de différencier le groupe de Carvin. Le groupe témoin se distingue par les faibles valeurs des concentrations en MO et de la CEC Nous n'avons repris que les axes 1 et 2. Les autres représentations n'apportent pas de changements significatifs. Elles permettent seulement de mieux discriminer les sites de Mortagne, Auberchicourt et de Harnes.

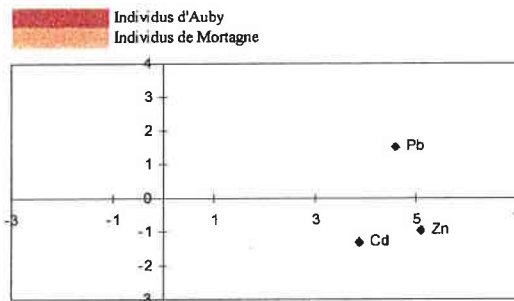
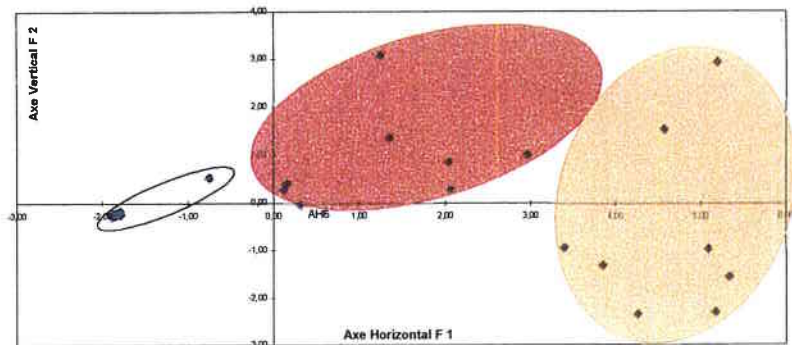


Figure 35 : Représentation graphique des individus selon les axes 1 et 2 (A) et représentation des variables canoniques (B).

Auby	MO	N	C/N	CEC	pH
Cd (mg/kg)	0,88	0,96	-0,62	0,88	-0,65
Pb (mg/kg)	0,02	-0,19	0,79	-0,24	0,69
Zn (mg/kg)	0,82	0,73	-0,38	0,77	-0,32

Mortagne	MO	N	C/N	CEC	pH
Cd (mg/kg)	0,45	-0,67	0,86	-0,34	0,85
Pb (mg/kg)	-0,31	-0,58	0,25	-0,59	0,48
Zn (mg/kg)	-0,67	0,00	-0,48	0,17	-0,01

Harnes	MO	N	C/N	CEC	pH
Cd (mg/kg)	0,96	0,92	-0,45	0,84	-0,41
Pb (mg/kg)	0,95	0,91	-0,43	0,84	-0,39
Zn (mg/kg)	0,97	0,94	-0,49	0,88	-0,45

Carvin	MO	N	C/N	CEC	pH
Cd (mg/kg)	NS	NS	NS	NS	NS
Pb (mg/kg)	NS	NS	NS	NS	NS
Zn (mg/kg)	NS	NS	NS	NS	NS

Témoin	MO	N	C/N	CEC	pH
Cd (mg/kg)	NS	NS	NS	NS	NS
Pb (mg/kg)	NS	NS	NS	NS	NS
Zn (mg/kg)	NS	NS	NS	NS	NS

Auberchicourt	MO	N	C/N	CEC	pH
Cd (mg/kg)	-0,98	-0,98	0,42	-0,99	-0,98
Pb (mg/kg)	-0,95	-0,99	0,52	-0,97	-1,00
Zn (mg/kg)	-0,74	-0,39	-0,50	-0,67	-0,41

Tableau 35 : Coefficients de corrélation entre les différentes variables édaphiques et les éléments traces métalliques. (NS = Non Significatif).

Individus	Groupe initial	Axe 1	Axe 2	Groupe estimé
AH1	1	4,27	-2,32	1
AH2	1	3,41	-0,94	1
AH3	1	5,20	2,95	1
AH4	1	5,34	-1,53	1
AH5	1	5,18	-2,28	1
AH6	1	0,32	-0,02	2
M14	2	2,97	1,02	2
M15	2	0,16	0,42	2
M16	2	1,35	1,37	2
M17	2	1,25	3,10	2
M11	2	2,05	0,87	2
M13	2	0,12	0,28	2
M12	2	2,07	0,30	2
TH1	3	-1,79	-0,22	4
TH2	3	-1,78	-0,21	4
TH3	3	-0,75	0,54	3
TH4	3	-1,79	-0,18	4
TH5	3	-1,81	-0,20	4
TC1	4	-1,82	-0,19	4
TC2	4	-1,78	-0,14	4
TC3	4	-1,82	-0,18	4
TC4	4	-1,83	-0,20	4
TC5	4	-1,83	-0,22	5
M21	5	-1,86	-0,21	5
M22	5	-1,87	-0,25	6
M21B	5	-1,85	-0,22	5
M31	5	-1,86	-0,21	5
M32	5	-1,86	-0,21	5
M33	5	-1,86	-0,21	5
TA1	6	-1,85	-0,23	6
TA2	6	-1,85	-0,24	6
TA3	6	-1,85	-0,24	6

Tableau 34 : Résultats de l'analyse factorielle discriminante des sites selon les concentrations en éléments traces. Les groupes estimés sont ceux établis par l'AFD. Les colonnes "Axe" reprennent les coordonnées des individus sur la représentation graphique. Les sites mal classés sont en gras.

II.1.2. Les concentrations en éléments traces métalliques

Les résultats des traitements statistiques sont présentés dans les tableaux 33 et 34 ainsi que par la figure 35. Le tableau 35 présente les corrélations entre les teneurs en métaux et les autres variables édaphiques. Comme pour les variables physico-chimiques, les coefficients de variation sont très importants, ce qui souligne l'hétérogénéité des contaminations.

Les concentrations en éléments traces des sols d'Auby et de Mortagne sont proches, hormis pour le zinc. Si l'on se base sur les valeurs moyennes, pour ces deux sites, les concentrations en cadmium, en plomb et en zinc dépassent le seuil d'urgence fixé par la norme AFNOR NF U 44-041.

Les concentrations du sol de Carvin en plomb sont supérieures au seuil d'investigation de la norme AFNOR NF U 44-041 (voir tableau 5).

Les valeurs obtenues pour le sol d'Harnes sont très hétérogènes. Un relevé (97052003) présente des concentrations beaucoup plus importantes que les autres. Celles-ci ont été vérifiées et confirmées. Hormis pour ce relevé, les concentrations en plomb sont proches du seuil d'investigation et les concentrations en zinc sont proches du seuil d'anomalie. Les concentrations en cadmium sont inférieures au seuil de détection. Nous pensons en fait que le relevé très contaminé a été effectué sur une zone où il y a eu un dépôt de matériaux métallurgiques.

Les concentrations du sol d'Auberchicourt sont très faibles et inférieures au seuil d'urgence fixé par la norme AFNOR NF U 44-041.

Les coefficients de corrélation entre les éléments traces apportent une information quant à leur origine (tab. 33). Plus le coefficient est élevé, plus la probabilité que les éléments aient la même origine est importante. Ainsi, dans l'horizon superficiel du sol d'Auby, le cadmium et le zinc sont fortement corrélés. Ces deux éléments sont présents dans les minerais utilisés par l'entreprise métallurgique du secteur. Par contre, le plomb n'est pas corrélé avec les trois autres éléments. Cela signifierait que le plomb est issu d'une autre source et/ou qu'il est stocké dans une autre fraction du sol. Les concentrations en zinc et en cadmium sont corrélées avec les concentrations en MO (tab. 35), à l'inverse des concentrations en plomb. L'origine principale des éléments traces sur le site d'Auby semble être l'entreprise Union Minière. Nous ne pouvons cependant pas exclure totalement la contribution de sources diffuses.

Les concentrations en éléments traces sur le site de Mortagne ne sont pas corrélées entre elles. Il n'existe pas de source importante de pollution à proximité. Nous pensons être en présence d'une pollution en grande partie relictuelle. Aucun des éléments n'est corrélé avec la MO Il est vraisemblable qu'ils se répartissent au sein de différentes fractions du sol et plus en profondeur.

Les résultats obtenus pour le site de Harnes sont biaisés par les différences existant entre les valeurs. Nous avons réalisé les calculs sans prendre en compte le relevé 97052003. Dans ce cas, les éléments traces ne sont pas corrélés entre eux. Nous pensons que les concentrations en éléments traces sont dues à des sources diffuses : centres industriels et urbains. Dans le cas du dépôt direct, il semble que les éléments se situent au niveau de l'horizon superficiel, fortement liés à la MO.

Les concentrations en plomb et en zinc des échantillons de Carvin ne sont pas corrélées. Nous pensons que, sur ce site, les éléments traces sont originaires de sources diffuses telles que les transports et l'activité agricole.

Les concentrations en plomb et cadmium des échantillons d'Auberchicourt sont corrélées. Mais les concentrations sont extrêmement faibles et correspondent au fond géochimique.

Les résultats de l'AFD confirment les observations précédentes. L'analyse sépare les sites de Mortagne et d'Auby des autres. L'hétérogénéité du site de Harnes est également soulignée. Une observation de ce groupe est déplacée dans le groupe témoin (TC5), tandis qu'une observation d'Auby (AH6) est ajoutée à celles de Mortagne. Enfin, quatre observations du groupe de Harnes sont déplacées dans le groupe de Carvin. On peut noter qu'une observation du témoin s'est placée dans le groupe d'Auberchicourt, mettant ainsi en évidence, des similarités avec le site témoin. La discrimination des groupes souligne les écarts existant entre les valeurs des contaminations. L'axe 1 suit un gradient de pollution en plomb et en zinc. Les autres éléments sont discriminants sur les autres axes et fournissent les mêmes représentations graphiques.

L'ensemble de ces résultats montre que les sols étudiés sont très hétérogènes. Cette variabilité intra-site pourrait s'expliquer par leur utilisation. Ce sont des dépôts de matériaux industriels qui sont par nature hétérogènes. Nous ne pouvons exclure la présence de dépôts incontrôlés, plus ponctuels, qui ne feraient qu'amplifier ce phénomène.

Nous avons observé que la MO des sols est une fraction fondamentale. Celle-ci semble jouer deux rôles principaux. Le premier est la fixation des éléments traces, qui est mise en évidence par les coefficients de corrélation élevés entre les deux variables. Ce rôle est confirmé par les coefficients de corrélation obtenus avec la CEC. La deuxième fonction de la MO est la régulation du pH, par conséquent de la biodisponibilité des éléments traces.

Dans les sols de Mortagne et de Carvin, la fraction minérale, argileuse ou plus grossière, semble jouer un rôle plus important dans le stockage des éléments traces.

L'ensemble de ces sites nous permet de travailler avec un panel de sources. Ainsi, les éléments traces du site d'Auby sont principalement issus de l'activité d'Union Minière. Ceux du site de Mortagne seraient plus relictuels du passé industriel. Pour les sites de Harnes et de Carvin, les éléments traces semblent issus de sources diffuses ou parfois de dépôts directs de matériaux contaminés.

En résumé :

Les résultats mettent en évidence :

- une hétérogénéité caractéristique des sols ;
- l'importance de la matière organique dans le stockage des éléments traces métalliques des sols, notamment pour les sites d'Auby et de Harnes ;
- sur les sites de Mortagne, de Carvin et du témoin, le rôle de la fraction minérale dans la fixation des cations semble plus importante ;
- les sols étudiés sont acides, peu ou pas calcaires ;
- en tenant compte de l'ensemble des variables, les sites diffèrent significativement les uns des autres. Les variables édaphiques sont donc impérativement à intégrer dans l'élaboration de l'échelle de diagnostic de la contamination des sols à l'aide des communautés bryolichéniques.

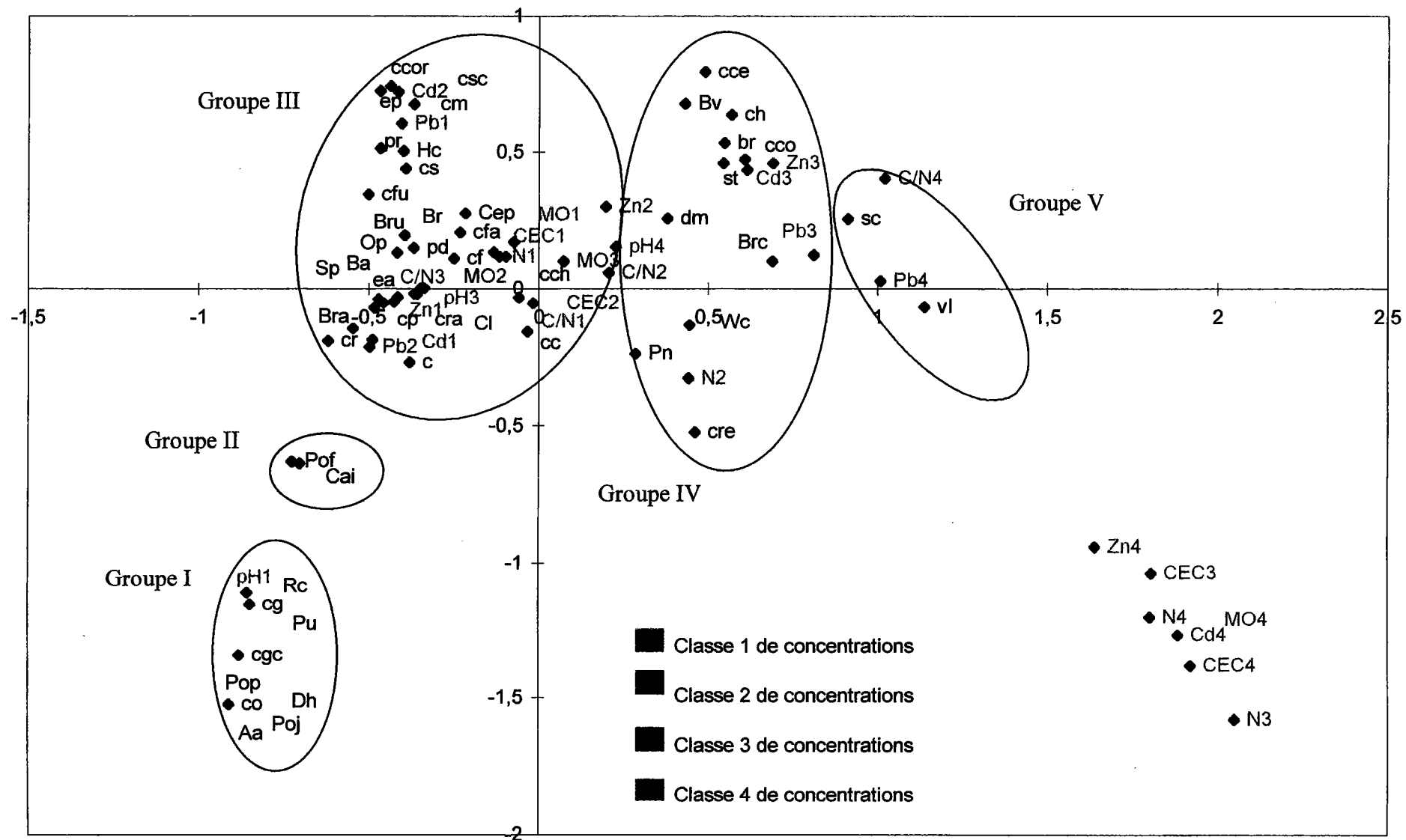


Figure 36 : Représentation graphique des résultats de l'AFM selon les axes 1 et 2. Pour la signification des abréviations voir tableau 36.

II.2. RESULTATS DES ANALYSES STATISTIQUES SUR LES RELEVES FLORISTIQUES

Nous rappelons ici succinctement que cette analyse a pour buts (1) d'associer les espèces entre elles et (2) d'associer les espèces avec les caractéristiques des sols.

La représentation graphique des résultats de l'AFCM est présentée par la figure 36. Nous avons mis en couleur les variables selon la classe à laquelle elles appartiennent. Nous devons nécessairement faire appel à un système de trois axes pour décrire l'ensemble des groupes définis par l'analyse.

Selon les axes 1 et 2 (fig. 36), l'AFCM définit cinq groupes d'espèces bien individualisés : I, II, III, IV et V. Au centre de la fig., se situe un groupe plus important (groupe III).

Ces ensembles sont significativement associés à des variables physico-chimiques. Cela signifie que la plupart des espèces observées s'associent en fonction des caractéristiques du sol, mais aussi que les variables retenues permettent d'expliquer la majeure partie des groupes d'espèces. Les concentrations des sols en ETM, la matière organique (MO), le pH et la capacité d'échanges cationiques (CEC) contribuent essentiellement à l'axe 1. La CEC contribue également à l'axe 2 comme l'azote organique (N).

Ainsi, les espèces du groupe I et II se développent sur des sols très acides à acides, non pollués et pauvres en matière organique. Pour le groupe II, le pH et la concentration en MO sont un peu plus élevés que pour le groupe I. Les groupes III, IV, V rassemblent des espèces présentant la capacité de se développer sur des sites pollués. Nous pouvons établir un classement de ces sites selon une concentration croissante en ETM : $III \leq IV \ll V$.

Les groupes III et IV sont séparés grâce à la contribution plus importante des ETM sur l'axe 1. Les espèces de ces groupes se développent sur des sols moins acides, un peu plus riches en MO que les groupes I et II.

Les teneurs en ETM du sol permettent de séparer les groupes IV et V. En effet, à partir des relevés floristiques globaux (tab. 36), nous observons que les espèces des groupes IV et V sont plus liées aux sols pollués que celles du groupe III.

Les groupes III et IV rassemblent des espèces ubiquistes pouvant s'observer sur des sites témoins comme sur des sites pollués. Cependant, celles appartenant au groupe V semblent plus fréquentes sur les sites très pollués contrairement à celles du groupe III qui semblent plus fréquentes sur les sites témoins. Cette répartition pourrait mettre en évidence des phénomènes de tolérance aux éléments traces métalliques plus ou moins importants selon les espèces. En effet, le groupe III est composé de *Cladonia* qui ont fréquemment posé des problèmes d'identification, principalement causés par des atteintes macroscopiques modifiant les caractéristiques morphologiques des thalles. Certaines bryophytes posent également de nombreux problèmes lors des déterminations car elles ont également des atteintes morphologiques rendant extrêmement difficile l'utilisation des clés de détermination. Il est vraisemblable que ces dommages soient imputables aux ETM. Nous ne pouvons pas totalement exclure l'existence de mécanismes de compétition entre les espèces des groupes III et V. Ces mécanismes pourraient expliquer en partie l'exclusion qui semble exister entre ces deux groupes.

La composition floristique des cinq sous-ensembles est reportée dans le tableau 37. Nous pouvons tout de suite observer que la diversité floristique diminue au fur et à mesure que les concentrations en ETM augmentent. Ces résultats nous permettent d'établir l'existence de groupes associant des bryophytes et des lichens, dont la composition spécifique varie significativement en fonction des caractéristiques édaphiques des sols.

Groupe I : espèces métallobes

<i>Cladonia glauca</i> fo. <i>glauca</i>	cg	
<i>Collema</i> sp.	co	pH1
<i>Pogonatum urnigerum</i>	Pu	
<i>Racomitrium canescens</i>	Rc	
<i>Dicranella heteromalla</i>	Dh	
<i>Cladonia gpe conoidea</i>	cgc	
<i>Polytrichum juniperinum</i>	Poj	
<i>Polytrichum piliferum</i>	Pop	
<i>Aulacomnium androgynum</i>	Aa	

Groupe II : espèces métallobes

<i>Campylopus introflexus</i>	Cai	
<i>Polytrichum formosum</i>	Pof	

Groupe III : groupe d'espèces ubiquistes, principalement présentes sur sites peu ou faiblement pollués

<i>Cladonia ramulosa</i>	cr		
<i>Cladonia</i> sp.	c		
<i>Cladonia furcata</i>	cfu		
<i>Bryum argenteum</i>	Bra		Pb1, Cd1, Zn1 MO2
<i>Cladonia pocillum</i>	cp	pH3	MO1, CEC1 Zn2
<i>Cladonia rangiformis</i>	cra		N1 Cd2
<i>Endocarpon adscendens</i>	ea		C/N1 Pb2
<i>Homalothecium lutescens</i>	Cl		C/N3
<i>Hypnum cupressiforme</i> var. <i>elatum</i>	Hc		
<i>Cladonia subulata</i>	cs		
<i>Peltigera didactyla</i>	pd		
<i>Bryum</i> sp.	Br		
<i>Eurhynchium praelongum</i>	Op		
<i>Brachythecium rutabulum</i>	Bru		
<i>Brachythecium velutinum</i>	Bv		
<i>Cladonia coniocraea</i>	cc		
<i>Brachythecium albicans</i>	Ba		
<i>Ceratodon purpureus</i>	Cep		
<i>Cladonia chlorophaea</i>	cch		
<i>Cladonia fimbriata</i>	cf		
<i>Cladonia fimbriata</i> var. <i>apolepta</i> fo. <i>coniocraea</i>	cfa		
<i>Peltigera rufescens</i>	pr		
<i>Scleropodium purum</i>	Sp		
<i>Lepraria</i>	l		
<i>Evernia prunastri</i>	ep		
<i>Cladonia cornuta</i>	ccor		
<i>Cladonia merochlorophea</i>	cm		
<i>Cladonia scabriuscula</i>	csc		

Groupe IV : groupe d'espèces ubiquistes pouvant s'observer sur des sites pollués

<i>Cladonia humilis</i>	ch		
<i>Cladonia cenotea</i>	cce		N2
<i>Cladonia conoidea</i>	cco		C/N2
<i>Baeomyces rufus</i>	br		Pb3
<i>Stereocaulon</i> sp.	st		Cd3
<i>Pohlia nutans</i>	Pn		Zn3
<i>Weissia controversa</i> var. <i>crispata</i>	Wc		MO3
<i>Bryum capillare</i>	Brc		pH4
<i>Diploschistes muscorum</i>	dm		
<i>Cladonia rei</i>	cre		

Groupe V : espèces métallobes

<i>Veizdaea leprosa</i>	vl		C/N4
<i>Sarcosagium campestre</i> var. <i>macrosporium</i>	sc		Pb4

Tableau 37 : Composition spécifique des groupes écologiques déterminés par l'AFCM. Les abréviations sont celles utilisées pour l'AFCM. Nous avons replacé les classes de variables physico-chimiques qui caractérisent les groupes.

Les espèces des groupes I et II sont métallophobes. Les groupes III, IV sont des groupes de transition. En effet, le groupe IV est composé d'espèces ubiquistes, rencontrées sur des sites contaminés en ETM mais parfois également sur des sites sains. On pourrait penser que ces espèces sont des pseudo-métallophytes. Les espèces du groupe V semblent être des métallophytes. Il est intéressant de souligner que le groupe V n'est composé que de lichens. Ces espèces semblent particulièrement inféodées au plomb. Il est donc nécessaire de travailler avec des groupes d'espèces. Une communauté bryolichénique apporte une indication plus précise sur les conditions écologiques que les espèces considérées isolément. L'utilisation d'une espèce seule peut conduire à des faux positifs ou à des faux négatifs. Ainsi, c'est une association d'espèces telles que *Vezdaea leprosa*, *Sarcosagium campestre* var. *macrosporum* et *Bryum capillare* (intermédiaire entre les groupes IV et V) qui peuvent indiquer la contamination d'un site.

Dans l'optique de disposer d'un outil diagnostic, nous avons associé ces résultats à ceux d'une étude précédente (Denayer *et al.*, 1999) ne comportant que des groupements exclusivement bryophytiques se développant sur des sites similaires.

Il est intéressant de comparer nos résultats avec les travaux réalisés antérieurement. Il s'avère que la seule association qui se rapproche le plus de notre composition floristique globale est le *Cladonietum rei* décrit par Paus en 1997. Il s'agit d'une association bryolichénique terricole composée de *Cladonia* div. sp. à large amplitude écologique, préférant les milieux perturbés, indifférente au pH et tolérante aux éléments traces métalliques.

Nous pouvons proposer une partition du cortège floristique du *Cladonietum rei* selon nos groupes écologiques. Celle-ci fait apparaître la participation des groupes III à V. Les caractéristiques d'association (*Cladonia rei*, *C. chlorophaea*, *C. humilis* et *Peltigera didactyla*) se répartissent dans les groupes III à V, soit sur des sols peu à très pollués. Les caractéristiques de l'alliance (*Cladonion rei* Paus 1997) telles que *Cladonia fimbriata* et *Ceratodon purpureus* appartiennent au groupe III (sites peu ou faiblement pollués).

II.3. RESULTATS DE L'ACP

Lors de travaux précédents (Denayer *et al.*, 1999), nous avons défini cinq groupes de bryophytes en fonction des concentrations en éléments traces des sols sur lesquels elles se développent. Pour y associer les travaux sur les communautés bryolichéniques, nous avons affecté, à chaque espèce, les caractéristiques du sol sur lequel elles ont été prélevées. Ensuite, nous avons effectué la moyenne des valeurs afin de caractériser chaque groupe et d'obtenir une matrice de valeurs (tab. 38).

Grâce à cette matrice, nous avons pu réaliser une ACP. Les résultats sont présentés figure 37 (a et b). La contribution des variables selon l'axe 1 est de 69,42 % et de 17,7 % selon l'axe 2, ce qui nous permet de n'utiliser que ce système d'axes. Les concentrations en Cd, M.O et Zn sont négativement liées à l'axe 1, tandis que les autres variables font appel, à des degrés différents, à l'axe 2. La CEC et l'azote organique sont anti-corrélés avec le plomb, le pH et C/N.

Nous remarquons que les groupes sont partiellement associés. Ainsi, les groupes 1-I, 2-II, 3-III, qui caractérisent des sols peu ou pas pollués, se sont regroupés. La distance entre ces différents groupes est expliquée par des variables édaphiques comme le pH et la CEC.

Le groupe III occupe une place intermédiaire proche des groupes précédents, ce qui confirme les résultats de l'AFCM. Enfin, les groupes IV, V, 4 et 5 sont rassemblés dans la

	C/N	Cadmium en mg/kg	CEC en cmol+/kg	MO en g/kg	N en g/kg	pH	Plomb en mg/kg	Zinc en mg/kg
I	17,24	2,00	7,87	65,89	2,59	3,30	100,00	63,19
II	20,11	2,00	11,11	119,00	3,72	3,92	133,00	142,92
III	23,17	10,78	11,45	172,08	4,38	5,53	618,47	1164,86
IV	21,77	83,76	15,57	192,15	5,30	5,71	5539,28	10560,24
V	40,32	84,33	17,61	289,05	4,48	6,10	7498,42	19018,96
1	11,80	0,04	4,98	7,78	0,38	5,22	18,12	33,10
2	15,68	4,01	10,49	125,42	4,16	5,72	174,09	248,81
3	23,05	22,34	11,92	131,95	3,42	6,20	1657,43	3895,22
4	43,13	139,54	5,42	353,30	5,86	6,70	8381,16	26941,59
5	23,12	216,29	23,15	504,50	16,24	5,88	4823,81	29742,64

Tableau 38 : Matrice des données de l'ACP.

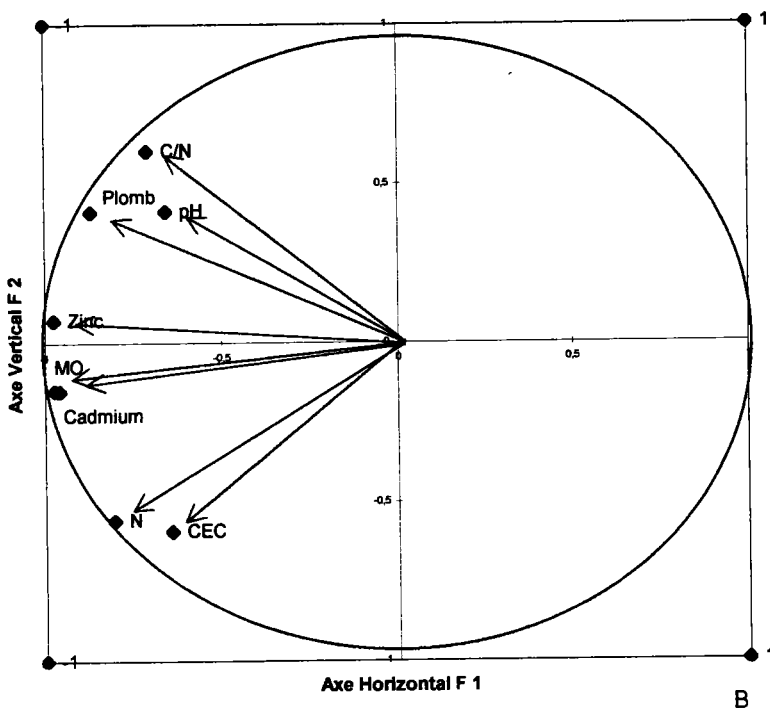
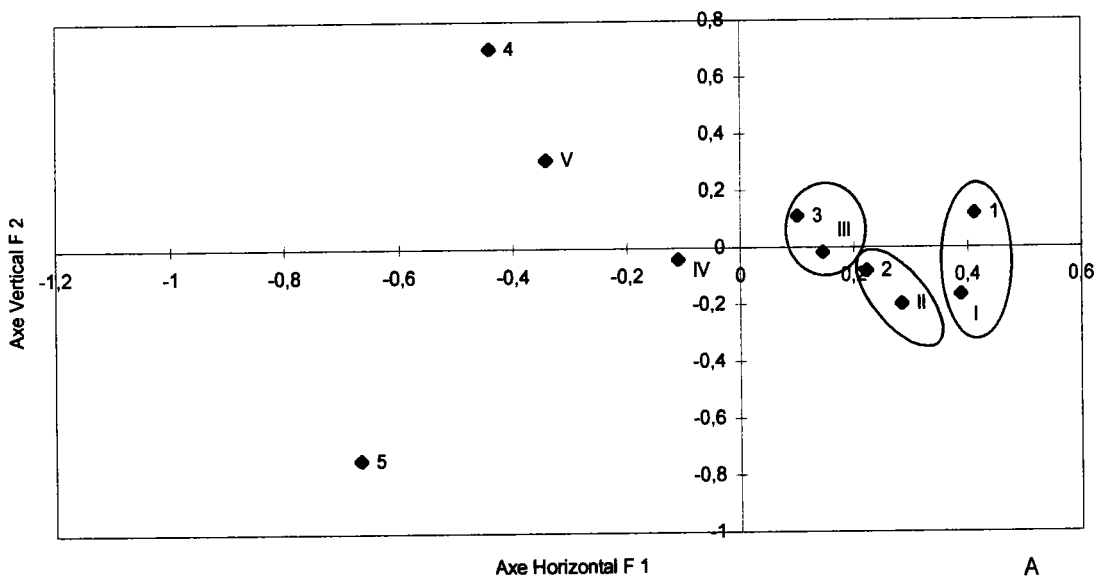


Figure 37 : Représentation graphique des résultats de l'ACP (A) et cercle des corrélations selon les axes 1 et 2 (B).

direction d'une contamination plus importante en ETM. Néanmoins, nous pouvons constater que les groupes V et 4 semblent plus être liés au Pb, C/N et pH élevés que le groupe 5, plus riche en Cd et lié à la CEC et à l'azote organique. Le groupe IV de nos communautés bryolichéniques semble composé d'espèces moins métallophytes que celles des groupes V, 4 et 5.

Si l'on se réfère aux valeurs absolues des contaminations, on retrouve les dispositions relatives des groupes. Ainsi, les groupes 4 et 5 se développent sur des milieux plus contaminés que les groupes IV et V. Nous avons réalisé l'AFCM précédente avec des classes de contamination en Cd, Pb et Zn définies lors de notre précédente étude (Denayer *et al.*, 1999). Nous avons travaillé sur des zones plus polluées que celles qui nous intéressent actuellement. Cela explique pourquoi, sur la figure 36, il y a un groupe de variables sans espèces.

Les mises en évidence de groupes d'espèces bryophytiques métallophobes (1-2) et métallophytes (4-5) dans notre étude précédente, nous permettent d'émettre l'hypothèse que les groupes d'espèces de bryophytes, dépourvus de lichens, sont plus tolérants à de très fortes concentrations en métaux que les groupes d'espèces de bryophytes et de lichens, définis dans cette étude. Si nous comparons les compositions spécifiques des groupes, nous retrouvons plusieurs espèces communes, ce qui souligne la complémentarité de ces deux approches. Ainsi, *Bryum capillare* et *Weissia controversa*, espèces métallophytes, se retrouvent dans le groupe V ; à l'inverse, *Polytrichum juniperinum* et *Polytrichum piliferum*, espèces métallophobes du groupe 1, sont également présentes dans le groupe I. Il faut également noter que dans le groupe V, il y avait des bryophytes et en particulier du *Bryum capillare* mort ou en très mauvais état, complètement colonisé par *Veizdaea leprosa*. Cela nous amène à penser qu'en plus de la tolérance des espèces aux métaux, il y a des compétitions entre les bryophytes et les lichens qui font que certaines espèces sont présentes ou pas.

Dans les divers objectifs du PRC, l'évaluation des impacts des éléments traces sur les communautés d'organismes vivants tient une place importante. Ainsi, de nombreux maillons des réseaux trophiques terrestres font l'objet de travaux au sein des différentes équipes.

Le but de cette étude était d'apprécier, dans un premier temps, les impacts des ETM des sols sur les communautés bryolichéniques terricoles. Ces organismes sont pionniers (mais parfois aussi permanents), précédant le développement des communautés végétales et donc à la base des réseaux trophiques. Nous avons ainsi étudié la flore de six sites présentant des contaminations croissantes.

L'étude de différentes concentrations en éléments traces des sols a montré qu'elles sont très hétérogènes. En effet, sur un même site, nous avons obtenu des coefficients de variation pouvant atteindre 100 %. De même, les autres variables édaphiques sont également très hétérogènes.

Cependant, nous avons mis en évidence que les ETM modifient significativement la composition spécifique des communautés. Nous avons également mis en évidence que les facteurs édaphiques ne sont pas à négliger et que, parmi ces facteurs, le pH et la teneur en MO sont les plus importants.

Dans un deuxième temps, il nous a semblé très intéressant de développer la mise au point d'une échelle de bioindication de la contamination des sols, basée sur les structures des communautés bryolichéniques. En effet, l'hétérogénéité des sols rend difficile leur caractérisation en se basant uniquement sur les données physico-chimiques. Nous avons mis en évidence cinq groupes écologiques d'espèces qui, en intégrant l'ensemble des caractéristiques des sols permettent une première approche globale de leur caractérisation. Il nous paraît fondamental de considérer des groupes plutôt que des espèces prises

individuellement car la plupart d'entre-elles ne sont pas rares mais ce sont leurs associations qui sont originales.

Le recouplement de ces nouvelles observations avec les précédentes (Denayer *et al.*, 1999) nous a permis de valider nos résultats et d'obtenir une première échelle de diagnostic à l'aide des bryophytes et des lichens. Nous obtenons ainsi deux groupes d'espèces métallophobes, un groupe de transition, d'un groupe réparti en fonction de la tolérance de ses espèces aux ETM et un groupe d'espèces métallophytes (tab. 37). Nous disposons ainsi d'un outil de diagnostic de la contamination des sols en éléments traces pour le nord de la France.

Au sein du groupe IV, composé d'espèces ubiquistes pouvant se rencontrer sur des sites très contaminés, un lichen, rare dans la région, est très abondant. Il s'agit de *Diploschistes muscorum*, qui a fait l'objet de nombreux travaux, montrant que cette espèce avait la capacité d'accumuler de fortes concentrations en ETM sans présenter de dommage visible (Cuny, 1999). Deux mousses *Pohlia nutans* et *Weissia controversa*, tolérant particulièrement bien les ETM, sont également présentes de manière abondante. Mais nous avons voulu nous intéresser aux mousses du groupe III (sites peu à faiblement pollués, mais présentant une certaine capacité à tolérer des concentration supérieures au seuil d'urgence donné par la norme NF U-44 041) et particulièrement à *Ceratodon purpureus*. Cette espèce est souvent retrouvée sur des sites très contaminés, mais également peu ou faiblement contaminés. Cette bryophyte ubiquiste, semble être un organisme de choix pour la mise en place d'un bryocapteur des retombées atmosphériques en ETM.

III. MECANISMES D'ACCUMULATION ET IMPACTS CELLULAIRES DES ELEMENTS TRACES METALLIQUES CHEZ *CERATODON PURPUREUS* HEDW. (BRID.), IMPLICATIONS DANS LE STRESS OXYDANT⁴

III.1. L'EXPOSITION AUX ELEMENTS TRACES METALLIQUES (Pb, Zn ET Cd) (TAB. 39 ET FIG. 38)

Sur le site de Jenlain (TJ), nous observons que les concentrations en Pb, Zn et Cd sont faibles et stables durant l'ensemble des mois d'exposition. Le zinc y est le métal dominant. Ce site semble donc être un bon témoin en ce qui concerne une non-exposition aux éléments traces métalliques.

Sur les sites d'Evin-Malmaison (EF1 et EF2), ce sont les concentrations en Cd qui dominent par rapport aux autres sites. Elles augmentent dès le deuxième mois d'exposition puis chaque mois sans discontinuité. Le Pb suit la même évolution que le Cd pour chacun des deux sites. Le Zn et le Pb semblent évoluer parfaitement ensemble. Nous pouvons noter que les concentrations en métaux, entre les mois 3 et 4, décroissent légèrement. Cela pourrait être dû à un lessivage lors de précipitations. Il convient de préciser que les deux stations d'Evin-Malmaison sont situées au sein d'exploitations agricoles.

Courcelles-les-Lens est un site urbain et nous observons que les trois métaux évoluent, de manière similaire, à partir du deuxième mois jusqu'au dernier mois d'exposition. Le zinc domine nettement sur le site de Courcelles. Cela semble difficilement interprétable sans variables supplémentaires.

A Noyelles-Godault et Courcelles (deux sites urbains), le Zn domine et augmente jusqu'au quatrième mois d'exposition puis diminue. Cette diminution du zinc du site de Noyelles n'est pas significative. L'augmentation des trois métaux se fait dès le premier mois d'exposition et sans interruption jusqu'au quatrième mois. Les concentrations en plomb varient très peu au début de l'exposition pour l'ensemble des sites et augmentent de manière sensible le dernier mois.

En résumé, le site de Jenlain semble être un bon témoin, nous pourrions donc grâce à lui mieux évaluer l'exposition des sites aux ETM et les éventuelles fluctuations des différents biomarqueurs de stress oxydant. Nous voyons que parmi nos quatre sites soumis aux retombées de Metaleurop, les deux sites urbains (Noyelles et Courcelles) sont plus exposés au zinc et que les deux sites agricoles (Evin Ferme 1 et Evin Ferme 2) sont plus soumis au cadmium. Enfin, les diverses fluctuations des concentrations en ETM, sur les divers sites, pourraient être dues à un lessivage du *Ceratodon* pendant les périodes de fortes pluies et pour une plus faible partie, au vandalisme sur les sites autour de Metaleurop.

⁴ Dans cette étude, l'ensemble des résultats sont significatifs. Si ce n'est pas le cas, cela sera précisé dans le texte, les tableaux ou les figures.

Plomb	avril/mai		mai/juin		juin/juillet		juillet/août		août/septembre-octobre	
	M	ET	M	ET	M	ET	M	ET	M	ET
TJ	5,93	0,21	11,98	1,94	8,18	0,24	10,85	0,55	11,98	1,03
C	7,08	0,67	4,21	0,26	12,27	0,61	35,16	4,25	27,04	1,57
N	2,75	0,18	15,57	1,06	20,92	0,00	17,21	1,62	* 13,12	0,41
EF1	5,14	0,15	13,17	0,88	7,72	0,79	19,17	3,01	33,40	1,26
EF2	15,94	1,67	* 15,66	1,98	20,49	2,41	16,24	1,53	43,00	1,14

Zinc	avril/mai		mai/juin		juin/juillet		juillet/août		août/septembre-octobre	
	M	ET	M	ET	M	ET	M	ET	M	ET
TJ	29,76	2,36	57,21	5,03	36,62	2,55	44,14	1,05	* 44,53	2,38
C	88,16	10,96	36,14	1,15	93,81	4,33	177,86	26,34	108,64	3,65
N	33,67	4,42	87,52	5,85	149,21	0,00	* 151,92	2,97	* 106,46	2,40
EF1	10,23	0,37	21,47	1,01	11,90	0,71	26,07	2,04	37,29	0,78
EF2	34,62	3,07	38,96	1,43	* 40,97	3,29	30,72	2,28	47,46	1,59

Cadmium	avril/mai		mai/juin		juin/juillet		juillet/août		août/septembre-octobre	
	M	ET	M	ET	M	ET	M	ET	M	ET
TJ	0,10	0,01	* 0,08	0,01	0,19	0,01	0,09	0,03	0,26	0,03
C	0,15	0,01	0,07	0,00	0,31	0,01	0,57	0,08	0,38	0,02
N	0,10	0,00	0,31	0,02	0,47	0,00	0,66	0,03	* 0,54	0,03
EF1	0,09	0,01	0,24	0,01	0,20	0,01	0,38	0,04	0,57	0,00
EF2	0,21	0,02	0,40	0,03	0,75	0,02	0,49	0,04	1,00	0,01

TJ (Témoin Jenlain), C (Courcelles-les-Lens), N (Noyelles-Godault), EF1 (Evin-Malmaison Ferme Dugardin), EF2 (Evin-Malmaison Ferme Delobel)

Tableau 39 : Moyennes (M) et écart-types (ET) du plomb, du zinc et du cadmium en $\mu\text{g/g}$ de protéines chez *Ceratodon purpureus*. Les résultats non significativement différents ($p < 0,05$), d'un mois à l'autre, pour un même site sont signalés par ce symbole (*).

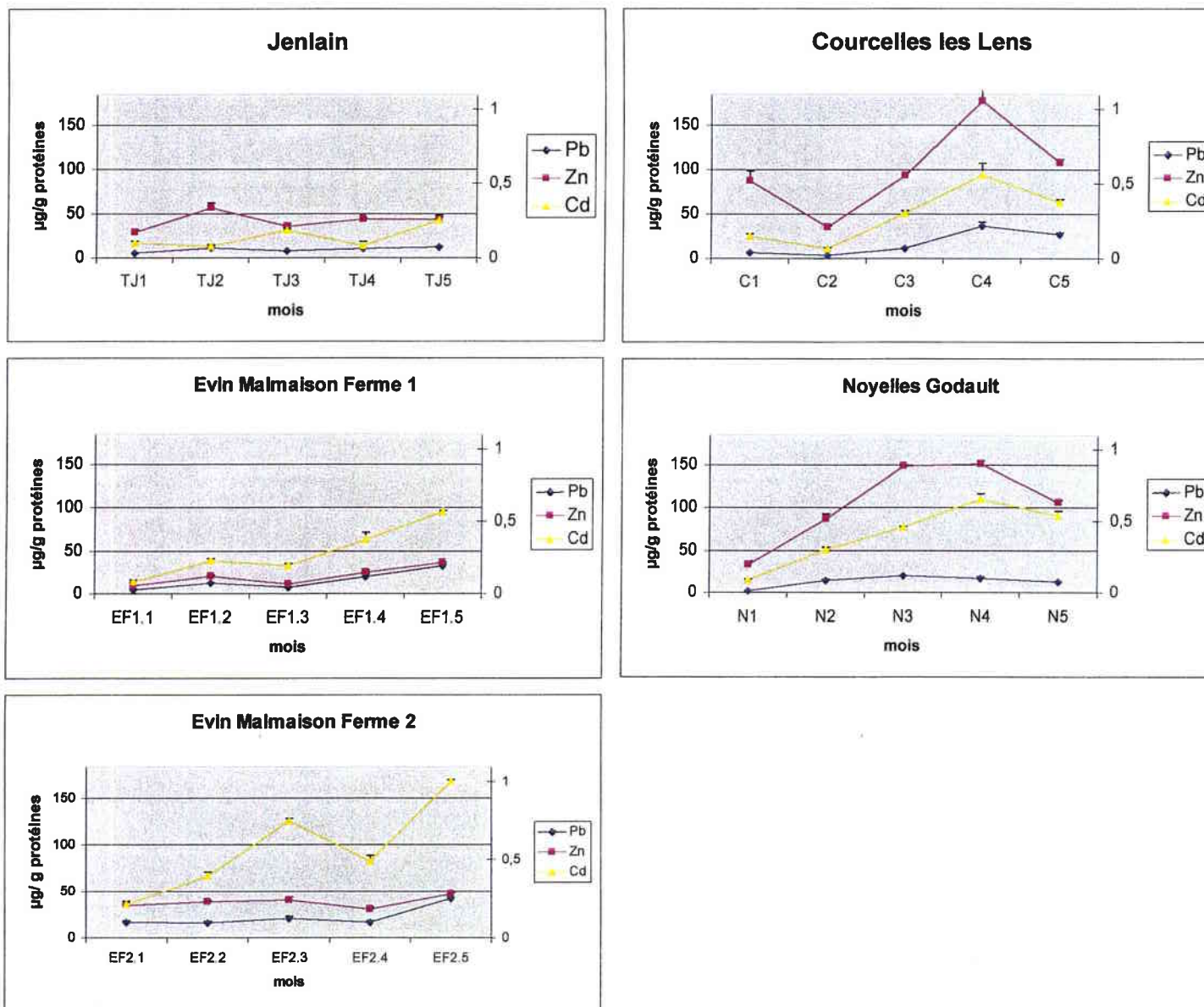


Figure 38 : Concentrations en Pb, Zn et Cd chez *Ceratodon purpureus*, site par site. (mois 1 : avril/mai ; mois 2 : mai/juin ; mois 3 : juin/juillet ; mois 4 : juillet/août ; mois 5 : août/septembre-octobre).

GSH	avril/mai		mai/juin		juin/juillet		juillet/août		août/septembre-octobre	
	M	ET	M	ET	M	ET	M	ET	M	ET
TJ	77,29	47,28	23,12 #	8,06	135,34 #	90,38	23,64 #	11,75	56,14 #	22,11
C	* 24,54	8,74	22,29	7,45	* 18,23	13,83	* 7,79	4,42	* 20,29 #	11,45
N	165,90	84,96	33,29 #	16,79	* 33,21	17,85	* 7,34	4,19	23,73	24,90
EF1	81,19	38,09	14,88 #	6,64	* 18,90	8,06	* 7,24 #	5,77	* 15,72	12,03
EF2	* 24,24	21,40	* 8,95	6,86	* 10,62	3,24	7,69	7,89	* 18,48	16,69

GSSG	avril/mai		mai/juin		juin/juillet		juillet/août		août/septembre-octobre	
	M	ET	M	ET	M	ET	M	ET	M	ET
TJ	30,87	26,18	6,98 #	10,54	37,71 #	36,51	3,54 #	2,62	22,16 #	8,39
C	* 118,12	48,68	10,21 #	12,83	6,56	3,59	9,55	9,32	11,12	6,56
N	64,30	31,51	14,32 #	18,39	36,50	32,37	3,34	2,27	10,08	10,29
EF1	59,89	33,10	17,24 #	20,48	21,57	19,52	2,81 #	0,62	8,51 #	7,20
EF2	37,86	32,89	7,72	6,03	2,80	0,38	4,34	2,25	21,02 #	16,71

GSSG/GSH	avril/mai		mai/juin		juin/juillet		juillet/août		août/septembre-octobre	
	M	ET	M	ET	M	ET	M	ET	M	ET
TJ	0,47	0,53	0,35	0,66	0,22	0,16	0,25	0,29	0,43	0,18
C	* 5,26	2,86	0,44 #	0,49	0,61	0,47	* 1,07	0,97	0,72	0,64
N	0,56	0,48	0,39	0,31	1,01	0,96	0,41	0,16	0,52	0,25
EF1	0,81	0,56	* 1,14	1,17	* 1,04	0,74	0,56	0,29	0,73	0,60
EF2	1,82	1,66	* 0,91	0,50	0,28 #	0,10	1,48 #	1,73	* 1,19	0,44

SOD	avril/mai		mai/juin		juin/juillet		juillet/août		août/septembre-octobre	
	M	ET	M	ET	M	ET	M	ET	M	ET
TJ	9345,86	2996,60	4554,67 #	569,66	3207,77 #	316,93	5278,08 #	616,60	5094,03	793,84
C	* 4248,64	1923,33	3454,01	1608,04	* 2655,98	448,59	4977,68	341,67	5170,82	2666,89
N	9099,02	1562,65	3418,53 #	1591,95	* 3723,90	304,22	* 3420,48	381,00	* 2194,40 #	657,11
EF1	* 6483,62	1271,17	* 2863,37 #	840,79	2822,79	979,07	* 4345,50 #	439,99	4320,28	373,82
EF2	* 4858,29	3444,51	* 3346,21	211,89	4040,33	2109,04	* 3643,57	741,43	5312,28 #	487,72

MDA	avril/mai		mai/juin		juin/juillet		juillet/août		août/septembre-octobre	
	M	ET	M	ET	M	ET	M	ET	M	ET
TJ	46,42	18,07	5,25 #	1,53	18,35 #	12,22	8,52	3,32	8,58	2,25
C	* 58,88	7,84	* 26,82 #	16,91	22,14	9,57	6,60	1,77	* 4,54	1,27
N	34,59	4,93	* 21,46 #	8,37	19,00	4,41	* 4,46 #	1,38	6,64 #	1,27
EF1	* 22,16	4,97	* 13,62 #	5,94	* 35,37 #	21,87	* 4,38 #	1,03	7,56	2,81
EF2	* 27,81	10,32	* 36,54	67,15	22,64	9,10	* 4,77 #	0,53	9,43 #	1,28

TJ (Témoïn Jenlain), C (Courcelles-les-Lens), N (Noyelles-Godault), EF1 (Evin-Malmaison Ferme Dugardin), EF2 (Evin-Malmaison Ferme Delobel)

Tableau 40 : Moyennes (M) et écarts-types (ET) du GSH ($\mu\text{g/g}$ protéines), du GSSG ($\mu\text{g/g}$ protéines), du GSSG/GSH, de l'activité des SOD (U/g protéines), du MDA ($\mu\text{M/g}$ protéines) chez *Ceratodon purpureus*. Les résultats significativement différents ($p < 0,05$), pour un même biomarqueur, entre le témoin d'un mois et les autres sites du même mois, sont signalés par (*). Les résultats significativement différents ($p < 0,05$), pour un même biomarqueur d'un mois à l'autre, pour un même site, sont signalés par (#). 5 répétitions pour sites C, N, EF1, EF2 et 12 répétitions pour le témoin (TJ).

III.2. REPONSES DES BIOMARQUEURS DE STRESS OXYDANT (TAB. 40)

Comme pour les métaux, les biomarqueurs étudiés répondent de manière différente sur le site témoin et sur les quatre sites exposés.

III.2.1. Réponses biologiques en fonction du mois d'exposition

Les résultats obtenus pour le GSH (fig. 39) montrent que les concentrations diminuent en fonction du mois d'exposition, quel que soit le site (exposé ou témoin). La forte augmentation de la concentration en GSH pour le site de Noyelles pendant le premier mois d'exposition n'est pas significative par rapport au site témoin. Par contre, la baisse de GSH, à partir du 3^{ème} mois est significative. Nous pouvons imputer cette modification à une plus grande exposition aux ETM par rapport au site témoin. Les fluctuations du GSH au sein du site témoin sont statistiquement représentatives d'un mois à l'autre. Le site EF2 se comporte comme Courcelles et EF1. Il n'existe pas de relation entre les sites exposés qu'ils soient urbains ou ruraux.

Sur le site témoin, le GSH a tendance à diminuer fortement le second mois puis à augmenter le mois suivant. Par contre, au niveau des sites exposés, les concentrations en glutathion restent stables.

Le GSSG (fig. 40) diminue de manière quasi continue à partir du troisième mois d'exposition. La seule variation pendant le premier mois d'exposition correspond à Courcelles où les concentrations en GSSG sont quatre fois plus importantes.

La baisse de GSSG est très nette pour le site témoin pendant les mois 1, 2, 4 et 5, alors que l'augmentation est importante lors des mois 3 et 5.

Le GSH et le GSSG varient finalement dans le même sens et donc les variations du rapport GSSH/GSH (fig. 41), d'un site exposé par rapport au site témoin, ainsi que les variations d'un mois à l'autre au sein d'un même site ne sont pratiquement jamais significatives.

Cette tendance qu'ont le GSH et le GSSG à globalement évoluer dans le même sens montre bien que ces biomarqueurs sont complètement déstabilisés par un facteur exogène inconnu, autre que les concentrations en ETM.

Le MDA (fig. 42) diminue sensiblement après deux mois d'exposition. On observe une concentration plus élevée le premier mois pour le site de Courcelles par rapport au témoin du même mois. Par contre, les autres sites voient leurs concentrations baisser par rapport au site témoin mais de manière non significative pour Noyelles. Lors du mois 2, le site EF2 voit ses concentrations augmenter par rapport au témoin du mois 2, mais par rapport au mois précédent, cette augmentation n'est pas significative. Il s'est donc probablement passé quelque chose sur ce site. Les concentrations en MDA diminuent le mois 2 par rapport au mois 1, par contre elles augmentent par rapport au témoin. Ce phénomène se retrouve pour le mois 4. En effet, les concentrations en MDA de Noyelles, EF1 et EF2 diminuent du mois 3 au mois 4, mais cette fois diminuent également par rapport au témoin du même mois. Ces variations pourraient s'expliquer par la présence de métaux. En effet, la lipoperoxydase, enzyme intervenant dans la peroxydation lipidique peut être bloquée par certains métaux. De plus, il est connu que les concentrations en MDA n'augmentent qu'en présence de certains métaux.

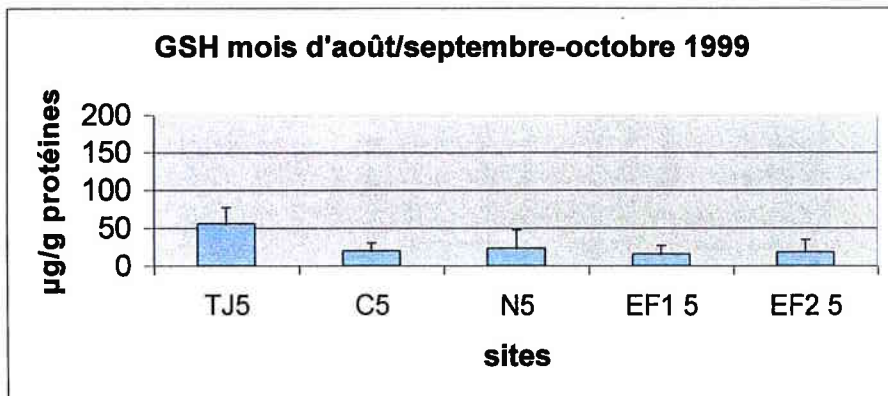
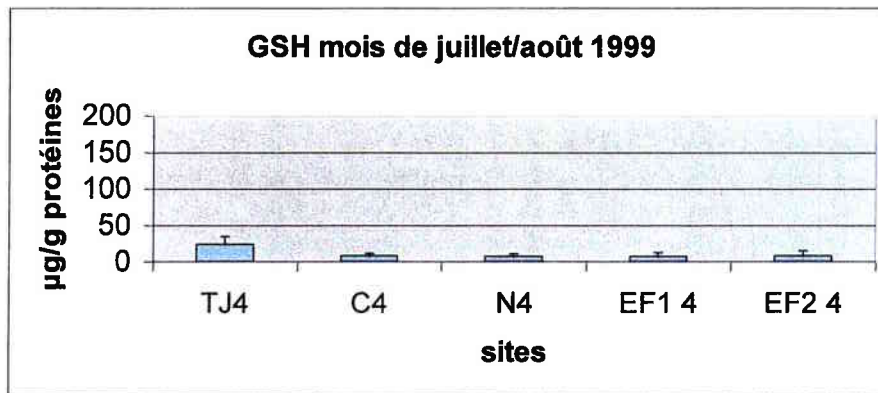
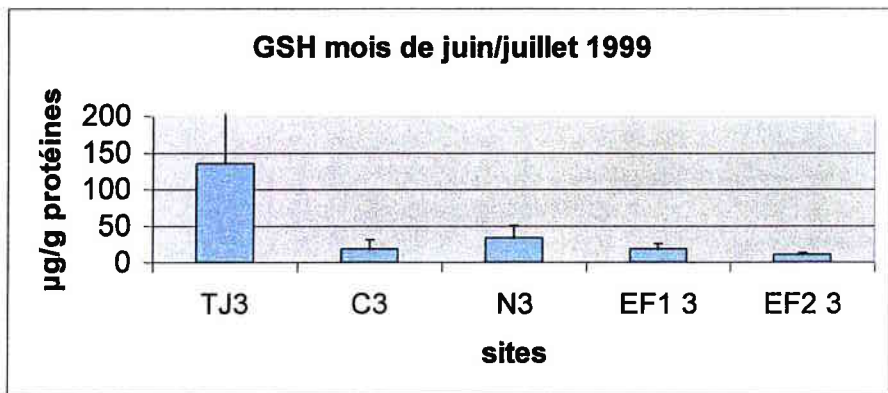
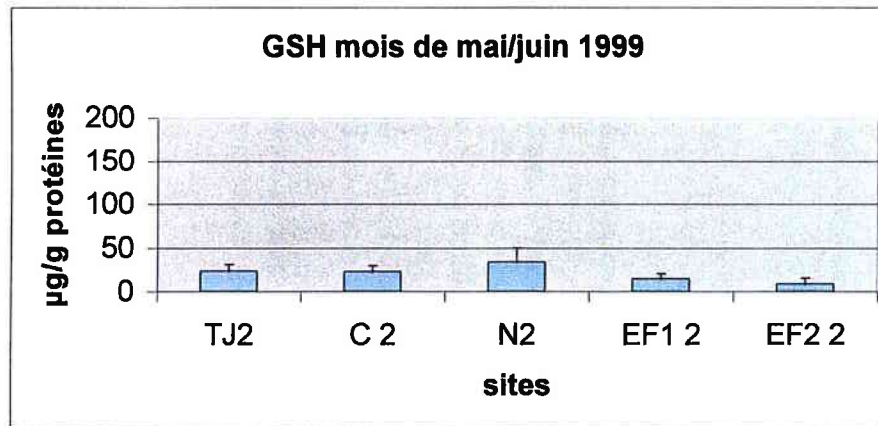
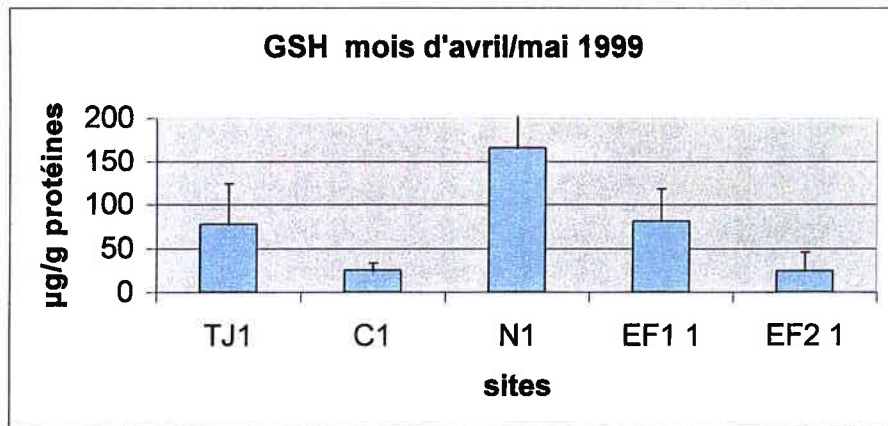


Figure 39 : Concentrations en GSH chez *Ceratodon purpureus*, sur l'ensemble des sites, mois par mois et écarts-types.

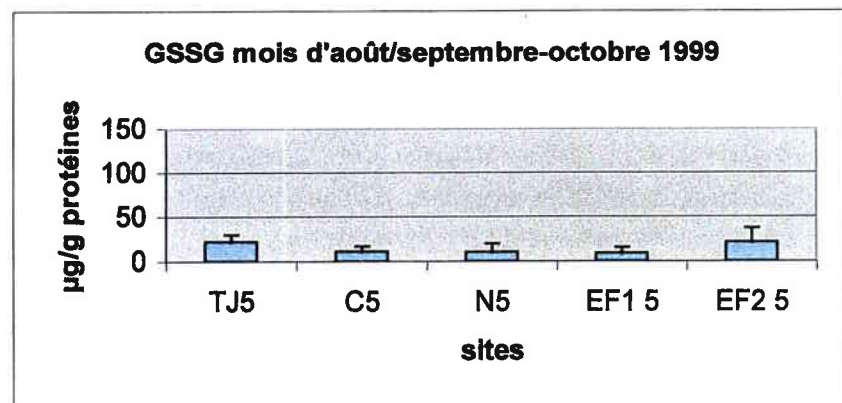
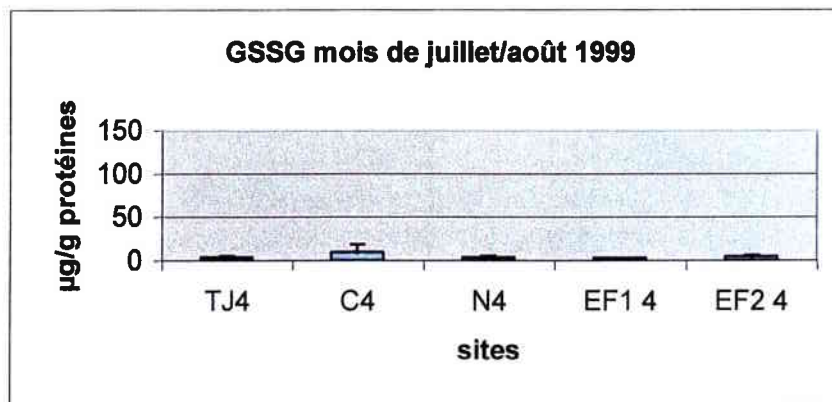
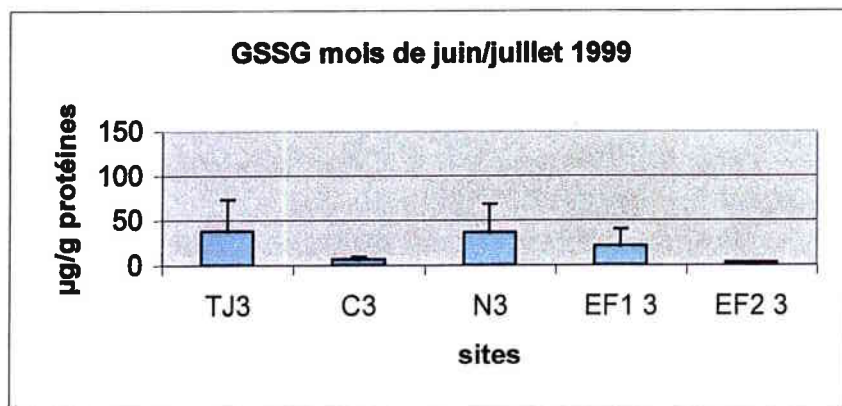
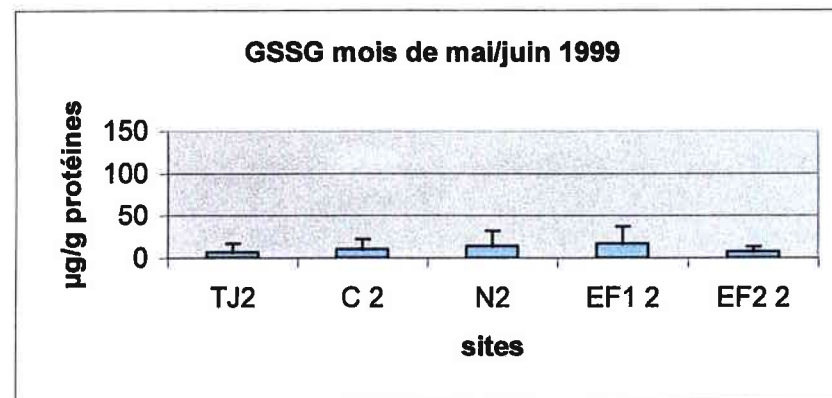
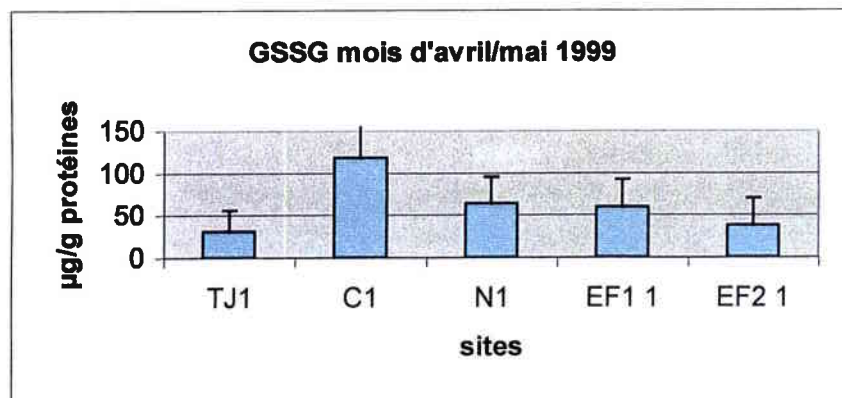


Figure 40: Concentrations en GSSG, chez *Ceratodon purpureus*, sur l'ensemble des sites, mois par mois et écarts-types.

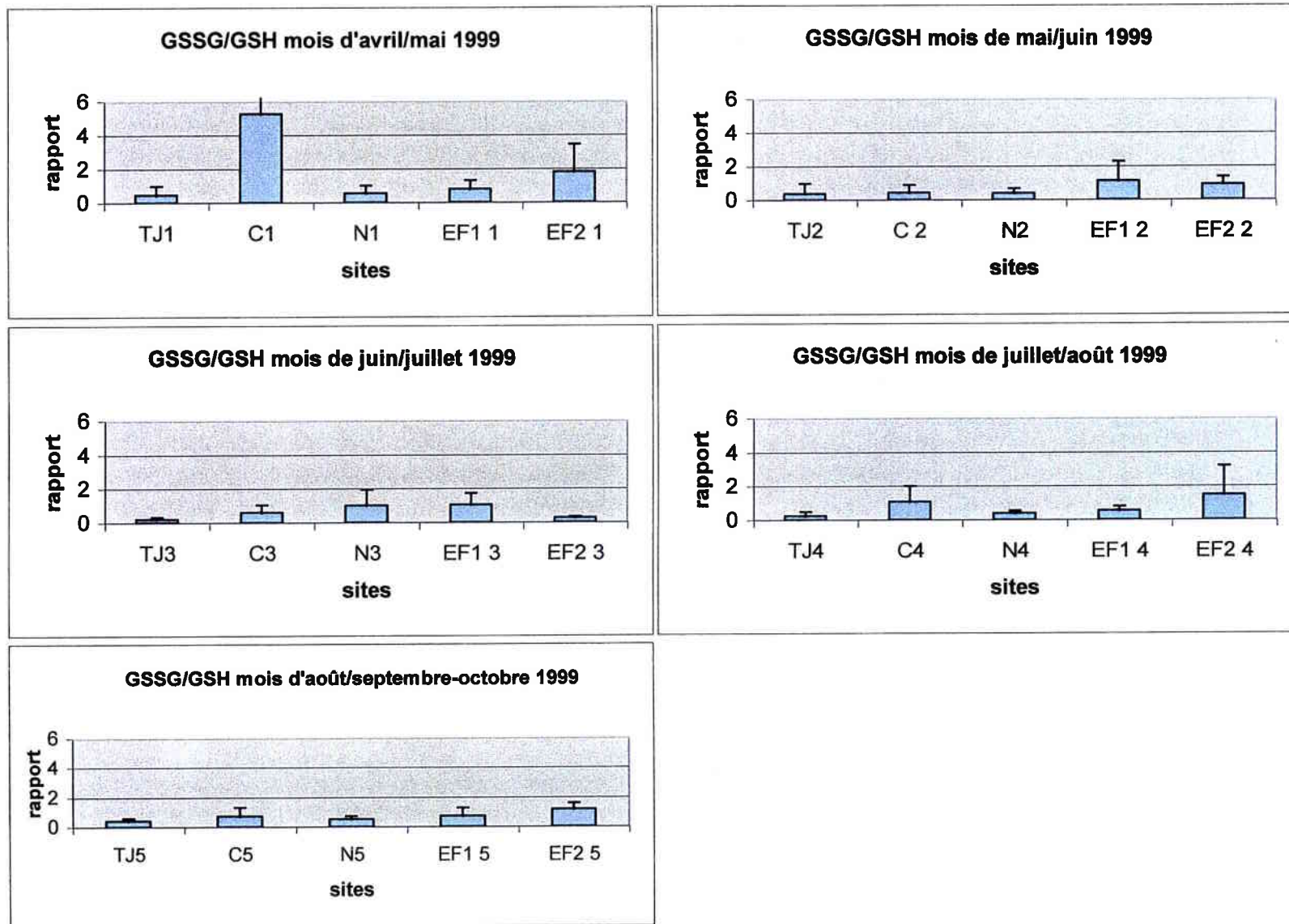


Figure 41 : Rapport GSSG/GSH, chez *Ceratodon purpureus*, sur l'ensemble des sites, mois par mois et écarts-types.

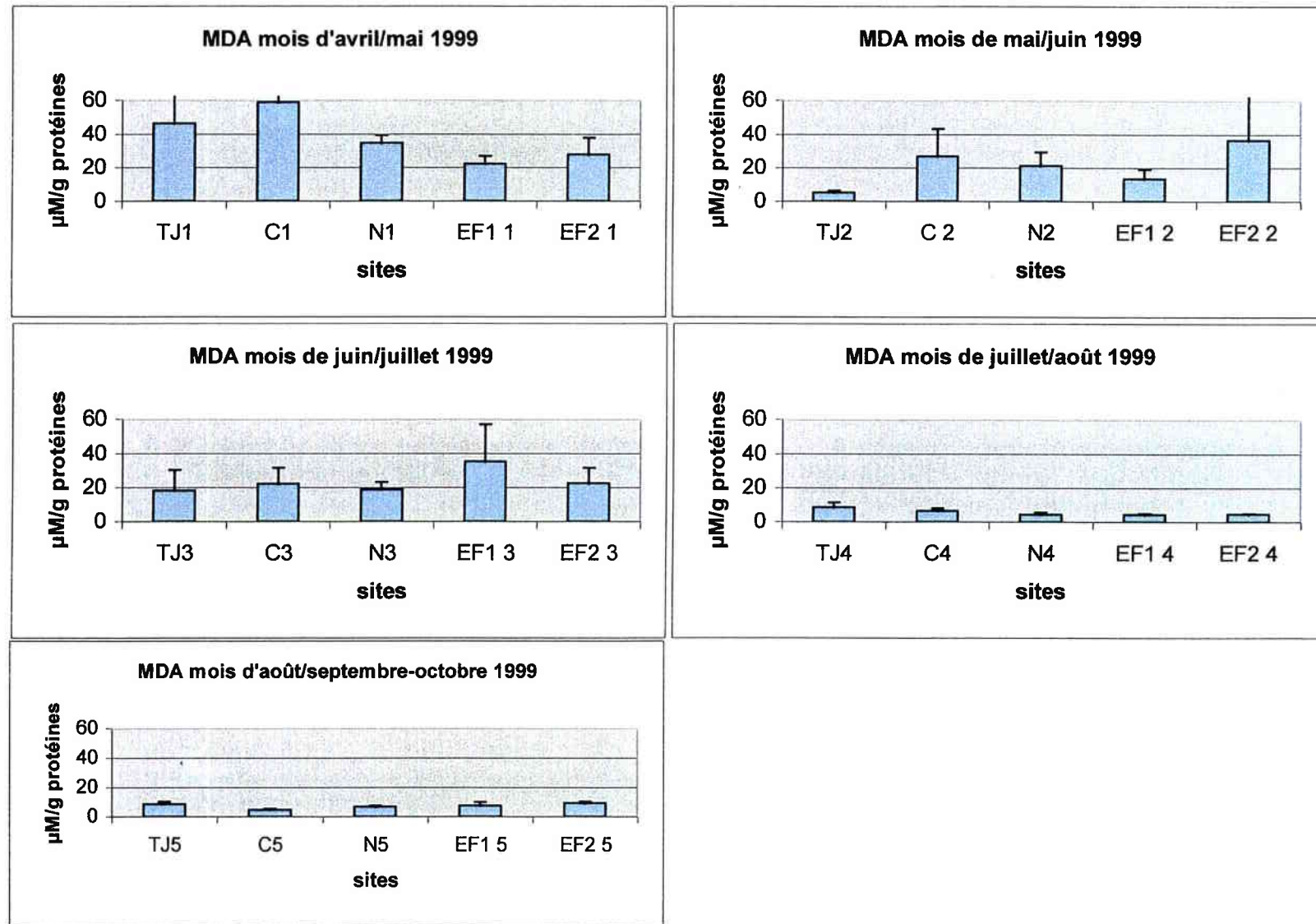


Figure 42 : Concentrations en MDA, chez *Ceratodon purpureus*, sur l'ensemble des sites, mois par mois et écarts-types.

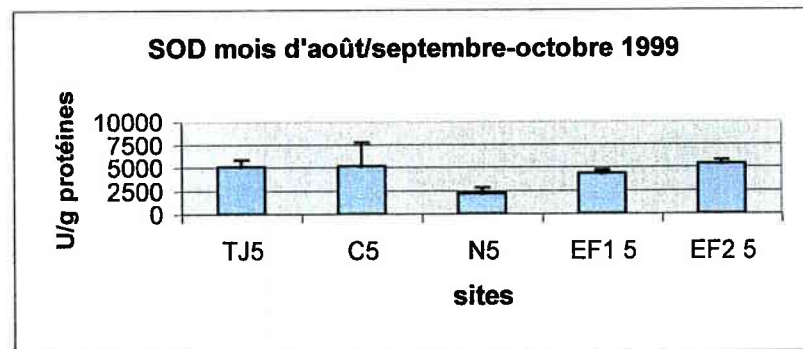
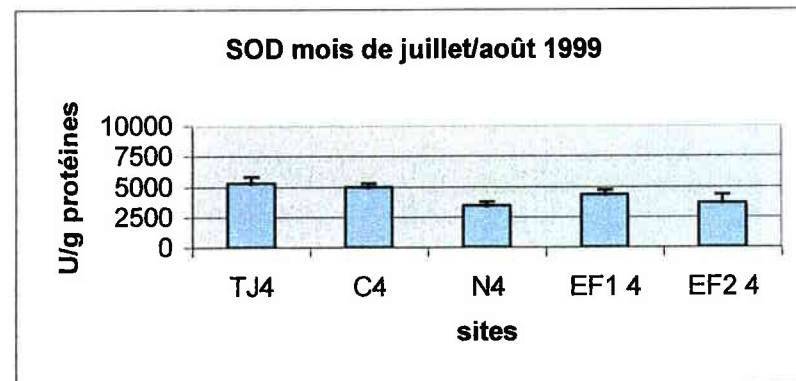
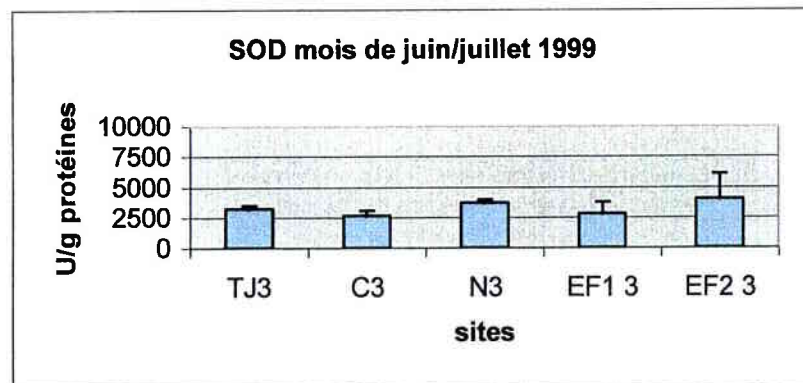
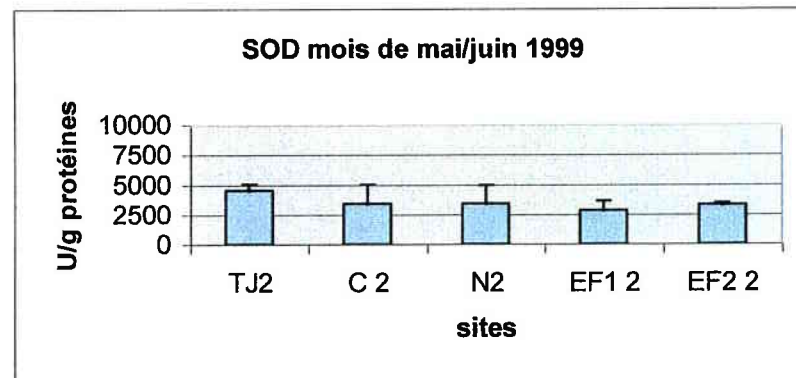
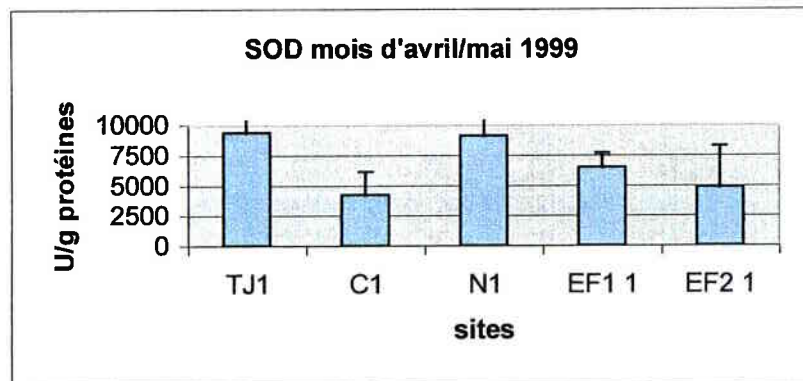


Figure 43 : Activité des SOD chez *Ceratodon purpureus*, pour l'ensemble des sites, mois par mois et écarts-types.

L'activité des SOD (fig. 43) est importante sur l'ensemble des sites lors du premier mois d'exposition. On peut cependant noter un niveau d'activité plus faible pour les sites de Courcelles, EF1 et EF2. Noyelles présente une activité non significativement différente du témoin du même mois. Il semblerait donc que cette enzyme, chez les mousses du site témoin et de Noyelles, est intéressante à prendre en compte malgré une légère défaillance sur les autres sites exposés aux ETM. A partir du second mois, l'activité des SOD dans chaque site diminue de manière significative par rapport au mois précédent sauf pour le site de Courcelles et EF1. Par la suite, l'activité des SOD est plus ou moins stable, la variation n'est pas significative d'un mois à l'autre sur un même site sauf pour le témoin. L'activité de cette enzyme diminue de manière significative pour les sites EF1 et EF2 par rapport au témoin des mois 2 et 4. Le mois 3, l'activité des SOD augmente légèrement pour Noyelles et baisse pour Courcelles. Le mois 4 voit une diminution significative de l'activité des SOD pour l'ensemble des sites exposés aux Pb, Zn et Cd à l'exception de Courcelles qui voit son activité augmenter mais de manière non significative. Lors de la période estivale (mois 3, 4 et 5), l'activité des SOD sur un même site, ne varie pas significativement. Cela peut s'expliquer par des facteurs climatiques (pluviométrie, hygrométrie, températures, vent...) et éventuellement par la présence d'autres polluants, par exemple l'ozone, le SO₂, les peroxyacétyl nitrates ou les oxydes d'azote et éventuellement par la présence d'autres métaux que le Pb, le Zn et le Cd. On peut également noter que les SOD voient leur activité diminuer de manière significative sur l'ensemble des sites (mis à part Noyelles) entre les mois 4 et 5. Cette période a été particulièrement sèche et chargée en ETM ce qui a probablement entraîné un stress oxydatif lié à la dessiccation de la bryophyte.

En observant les variations de l'ensemble des biomarqueurs dans le temps sur chacun des sites, nous observons que l'allure globale des résultats n'est pas nettement différente sur le site témoin et sur les sites exposés aux métaux. Néanmoins, l'échelle prise ici étant relativement grande, nous ne pouvons pas voir nettement les faibles variations qui sont parfois significatives pendant une période plus courte.

Le point zéro, identique pour l'ensemble des mousses, témoigne d'une baisse sensible pour le premier mois, de l'ensemble des biomarqueurs sur chacun des sites. Mais elle n'est pas significative pour Jenlain, Noyelles, et les deux stations d'Evin en ce qui concerne le GSH. Par contre, la nette diminution des concentrations en MDA sur l'ensemble des sites témoigne d'un problème lorsque les mousses sont arrivées au laboratoire (peut-être le stress lié à un long transport, l'humidité, la température...). La baisse de l'activité des SOD n'est pas significative pour les sites Témoin et de Noyelles. Enfin, les concentrations en GSSG diminuent sensiblement sur l'ensemble des sites par rapport au point zéro, mais cette baisse n'est pas significative pour EF2.

Au bout d'un mois d'exposition, les biomarqueurs se sont tous mis à niveau, sans exception, et varient faiblement de manière plus ou moins significative selon le mois et selon le site. Il semblerait qu'il ait eu une période d'adaptation de la bryophyte pendant le premier mois.

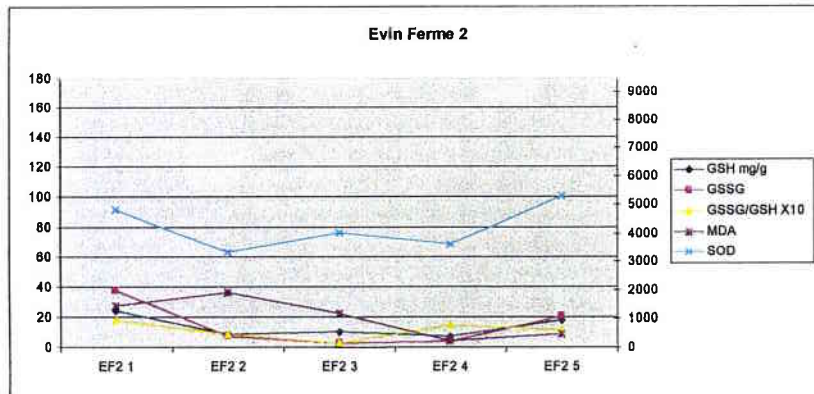
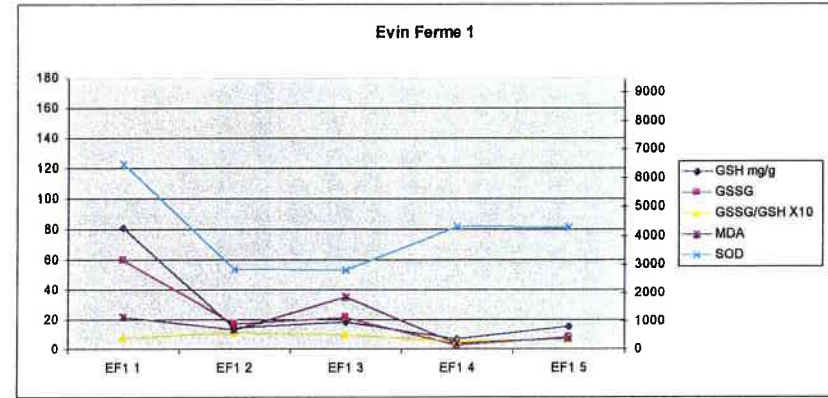
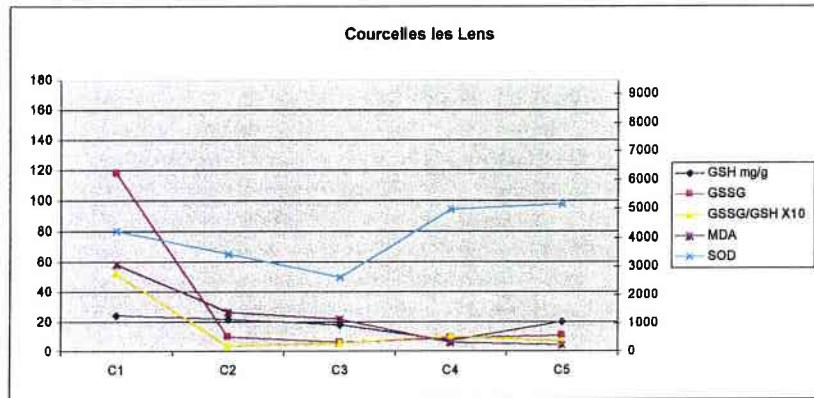
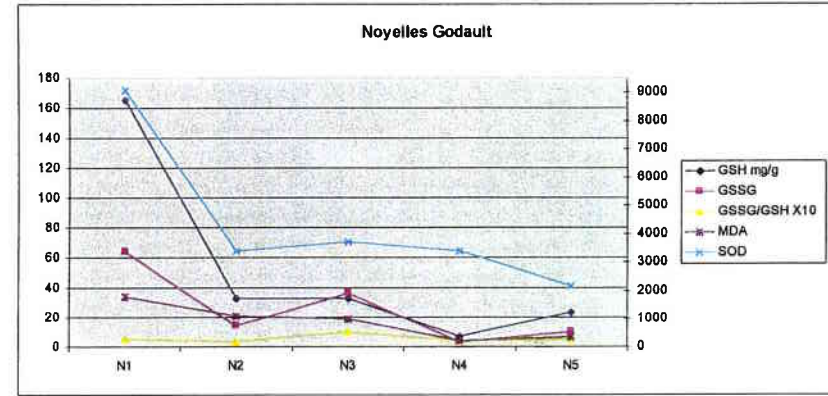
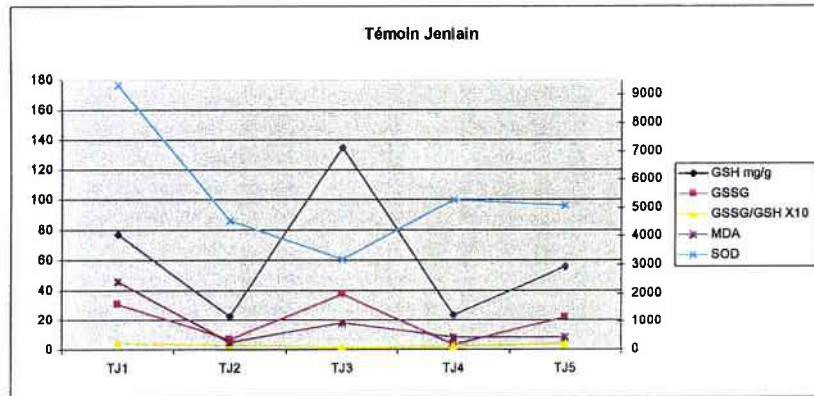


Figure 44 : Représentation graphique des différents biomarqueurs, chez *Ceratodon purpureus*, site par site. GSH ($\mu\text{g/g}$ protéines), GSSG ($\mu\text{g/g}$ protéines), GSSG/GSH, activité des SOD (U/g protéines), MDA ($\mu\text{M/g}$ protéines). Mois 1 : avril/mai, mois 2 : mai/juin, mois 3 : juin/juillet, mois 4 : juillet/août, mois 5 : août/septembre-octobre.

III.2.2. Réponses biologiques par site (fig. 44)

A Jenlain, le GSH et l'activité des SOD varient en sens inverse. C'est le glutathion réduit qui domine en concentration tout au long de l'exposition. Ce n'est pas le cas au niveau des sites exposés. Le GSH, le GSSG, l'activité des SOD et le MDA, à quelques exceptions près (sauf l'activité des SOD et le MDA le mois 5), varient de manière significative du premier au dernier mois. Le troisième mois, quelque chose d'inhabituel s'est passé sur ce site provoquant une augmentation des concentrations en GSH de plus de 7 fois. De plus, l'activité des SOD a chuté par rapport au mois précédent. A partir du mois 4, l'ensemble des biomarqueurs réagissent et voient leurs concentrations augmenter, excepté pour l'activité des SOD et la concentration en MDA qui ne varient pas de manière significative.

Les sites de Noyelles et d'Evin Ferme 1 réagissent de manière similaire au témoin et montrent au mois 3 un léger pic des concentrations en GSH, GSSG et MDA mais de manière non significative (sauf pour le MDA).

Le site d'Evin Ferme 2 a des concentrations plus faibles, le premier mois, que celles des autres sites exposés et du témoin. Le MDA du mois 2 augmente par rapport au mois 1, alors que l'activité des SOD diminue, mais ces variations ne sont pas significatives. Sur ce site, c'est le glutathion oxydé qui semble dominer sur l'ensemble des mois d'exposition. Cela pourrait témoigner d'une oxydation plus ou moins constante du GSH, au fil des mois d'exposition, sans pour autant augmenter de manière significative. Le GSSG semblerait inhibé par un facteur que nous n'arrivons pas à déterminer. Mais les plus fortes concentrations en métaux sur ce site pourraient, en partie, être une explication.

De manière générale, nous pouvons observer que l'ensemble des biomarqueurs répondent, quel que soit le site, de manière très forte, le premier mois d'exposition et que cette réponse diminue, en général, le second mois. La mousse a subi un stress important lors de son transport, malgré toutes les précautions prises. Il semble que l'ensemble des biomarqueurs aient répondu de manière relativement forte. Une fois installée sur le site, il lui a certainement fallu un mois d'adaptation avant qu'elle se stabilise.

A première vue, les réponses des différents biomarqueurs, malgré quelques variations significatives, ne sont pas différentes entre le site témoin et les sites exposés, à l'exception du mois 3, où nous avons observé un pic important sur le témoin (probablement un pic lié à un phénomène climatique). Nous pourrions émettre les hypothèses suivantes :

- *Ceratodon purpureus* des sites exposés aux ETM réagit beaucoup moins au stress oxydant que celui des sites non exposés ;
- *Ceratodon purpureus*, malgré le stress potentiel lié aux ETM, peut piéger les radicaux libres à l'aide de substances particulières comme les polyphénols, les antioxydants, etc. ;
- les concentrations en métaux des sites exposés ne sont pas suffisamment élevées pour occasionner un stress.

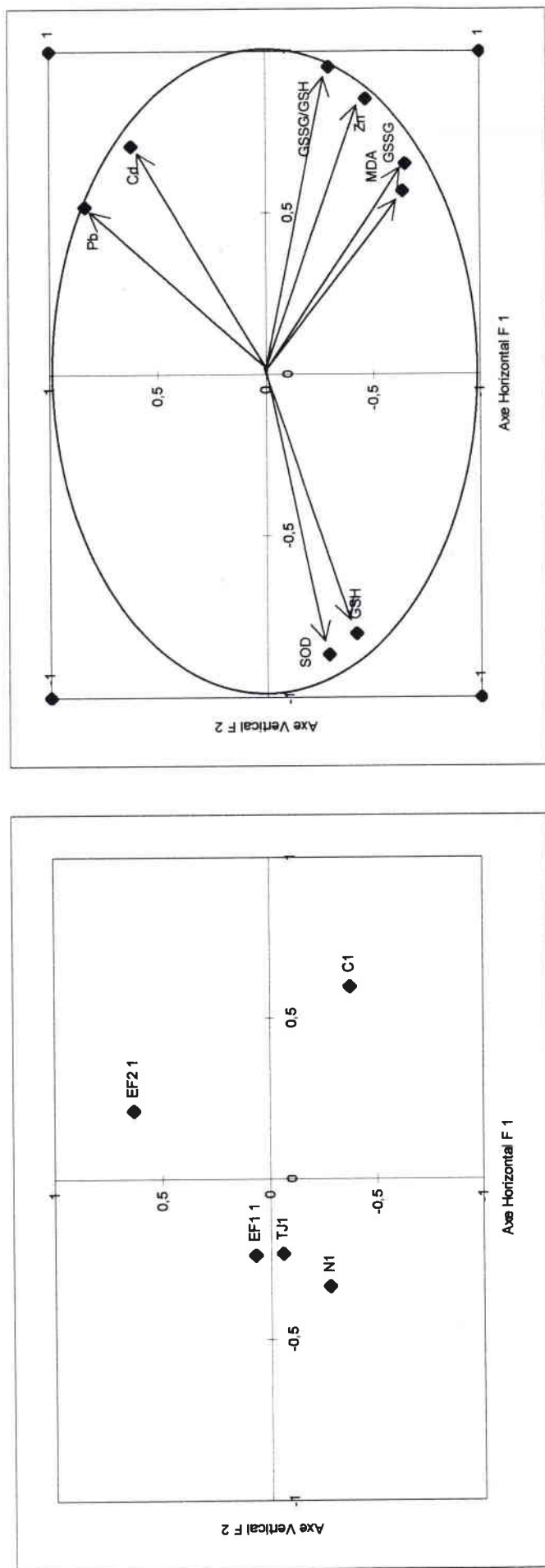


Figure 45 : ACP mois 1, individus et cercle des corrélations selon les axes 1 et 2.

III.3. TRAITEMENT STATISTIQUE DES DONNEES

Afin d'essayer de mieux comprendre les relations éventuelles entre les concentrations en métaux et les réponses biologiques de *Ceratodon purpureus*, nous avons réalisé, pour chaque mois d'exposition, une Analyse en Composantes Principales centrée réduite (ACP). Cela nous permettra de mieux comprendre ce qui s'est réellement produit mois par mois sur chacun des sites.

III.3.1. ACP exposition avril/mai 1999 (mois 1) (fig. 45)

Les deux premiers axes de l'ACP sont suffisants pour expliquer les relations entre les variables. Celles-ci se situent toutes à proximité du cercle de corrélation. Elles sont donc importantes pour la signification des axes. On constate une corrélation positive entre l'axe 1 (contribution à la variance totale 56,8 %) et les teneurs en zinc (Zn, $r=0,85$), le rapport glutathion réduit sur glutathion oxydé (GSSG/GSH, $r=0,95$) et à un degré moindre avec le glutathion oxydé (GSSG, $r=0,65$) et le malondialdéhyde (MDA, $r=0,57$). Il est également corrélé négativement avec le glutathion réduit (GSH, $r=-0,80$) et l'activité des superoxyde dismutases (SOD, $r=-0,87$).

L'axe 2 (30,9 %) est corrélé positivement avec le plomb (Pb, $r=0,84$) et secondairement avec le cadmium (Cd, $r=0,62$).

Le plomb et le cadmium sont donc bien corrélés entre eux, ainsi que l'activité des SOD avec le GSH et le MDA avec le GSSG et le GSSH/GSH. Le plomb et le cadmium sont indépendants du zinc. Cela signifie que la source du Pb et du Cd est différente de celle du zinc.

L'activité des SOD et le GSH sont anti-corrélés avec le MDA, le GSSG et les métaux. Les variables se comportent comme nous le supposions. C'est-à-dire que le GSSG augmente avec les concentrations en métaux, alors que le MDA, l'activité des SOD et les concentrations de GSH diminuent.

C'est ce que nous observons pour le site Evin Ferme 2, qui est surtout soumis au plomb et au cadmium. Les biomarqueurs réagissent comme prévu pour ce site. La station de Courcelles est similaire à EF2, mais elle est plutôt exposée au Zn. Les biomarqueurs suivent également la même tendance. Les stations de Noyelles et d'Evin Ferme 1 se comportent comme le témoin. L'exposition aux métaux est faible et l'activité des SOD et les concentrations en GSH sont élevées. Les sites de Courcelles et EF2 sont donc exposés dès le premier mois à des concentrations en métaux qui font intervenir positivement le GSSG et le MDA, et négativement l'activité des SOD et le GSH.

III.3.2. ACP exposition mai/juin 1999 (mois 2) (fig. 46)

Les trois premiers axes de l'ACP sont suffisants pour expliquer les relations entre les variables. En observant le cercle des corrélations, on constate une corrélation positive entre l'axe 1 (contribution à la variance totale 44,15 %) et les valeurs du rapport GSSG/GSH ($r=0,94$) et du cadmium ($r=0,71$) et à un degré moindre du MDA ($r=0,52$). Il est également corrélé négativement avec l'activité des SOD ($r=-0,83$) et le GSH ($r=-0,73$). L'axe 2 (24,6 %) est corrélé positivement avec le Zn ($r=0,81$) et le plomb ($r=0,75$). Il s'agit donc d'un axe Zn, Pb. L'axe 3 (19 %) est corrélé négativement au GSSG ($r=-0,9$). Le Pb et le Cd sont bien corrélés entre eux, tout comme le Zn avec le GSH.

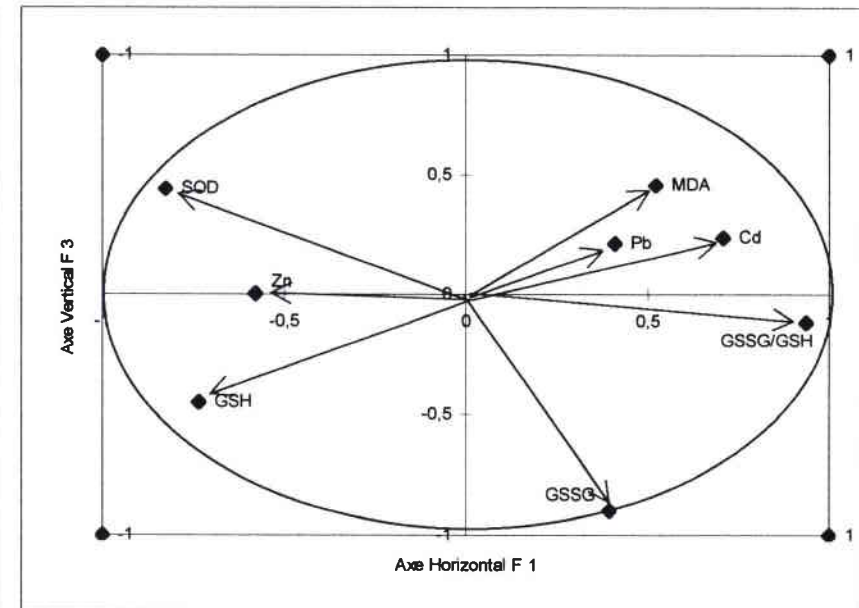
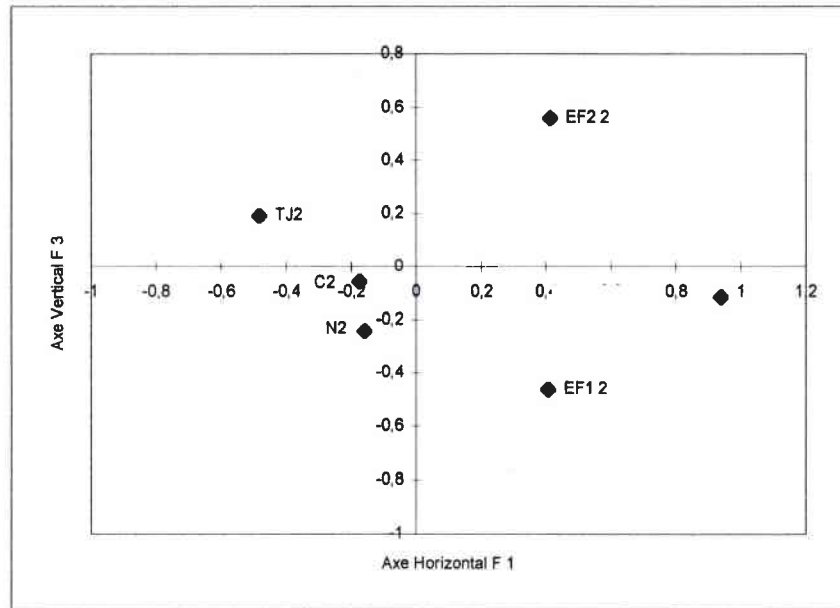
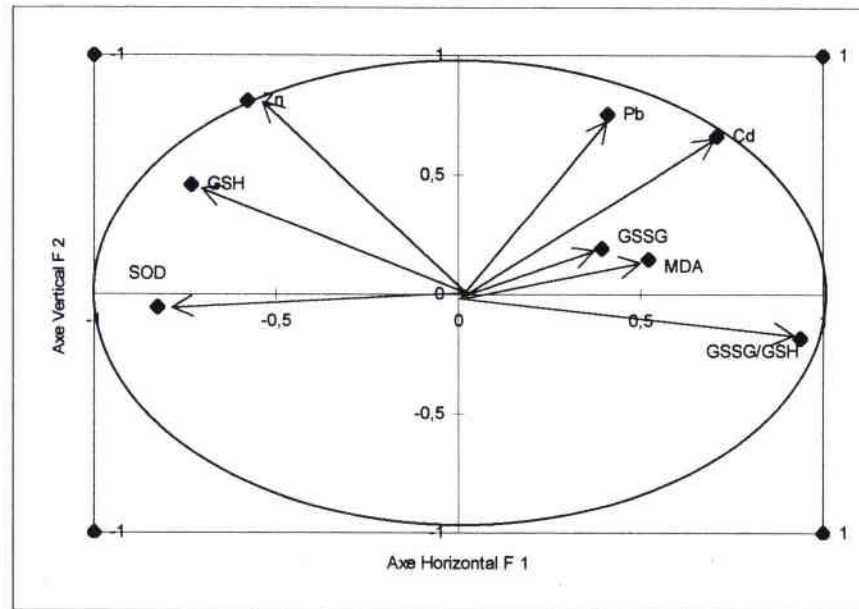
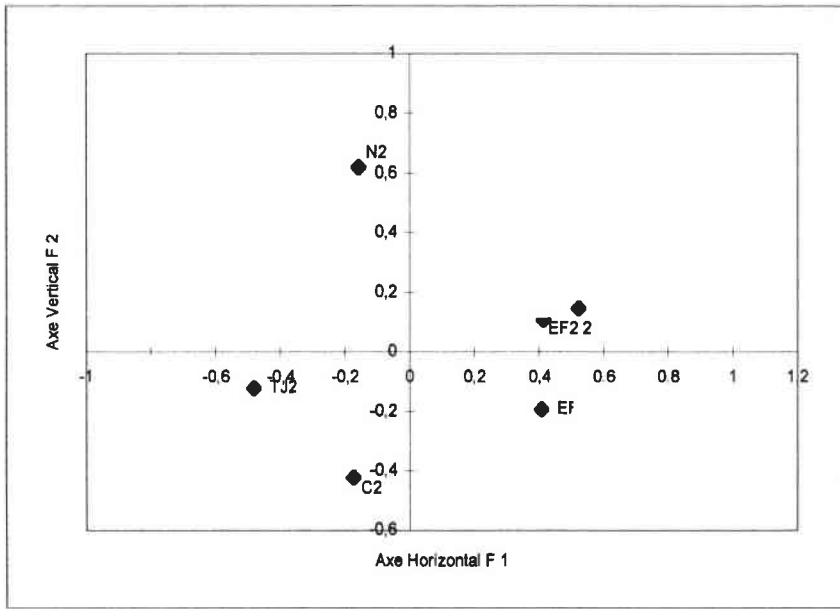


Figure 46 : ACP mois 2, individus et cercles des corrélations selon les axes 1-2 et 1-3.

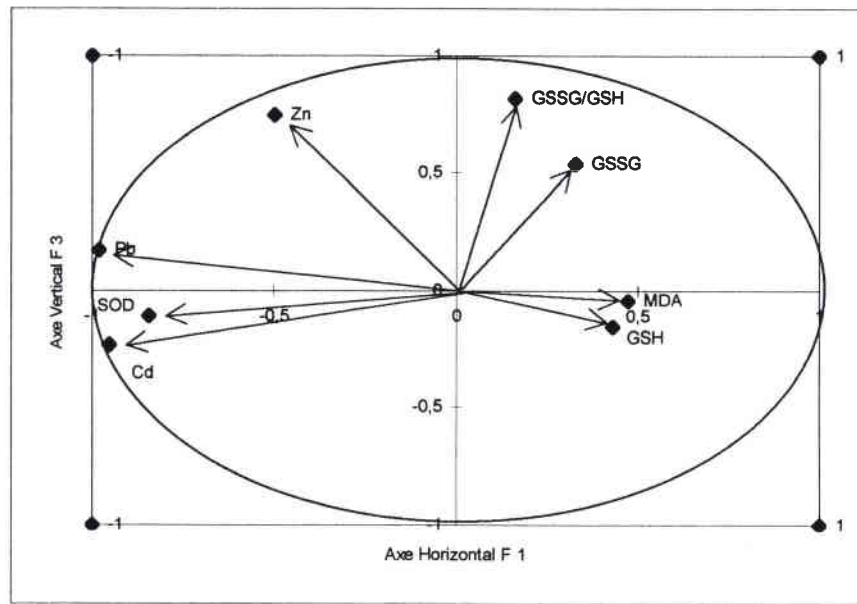
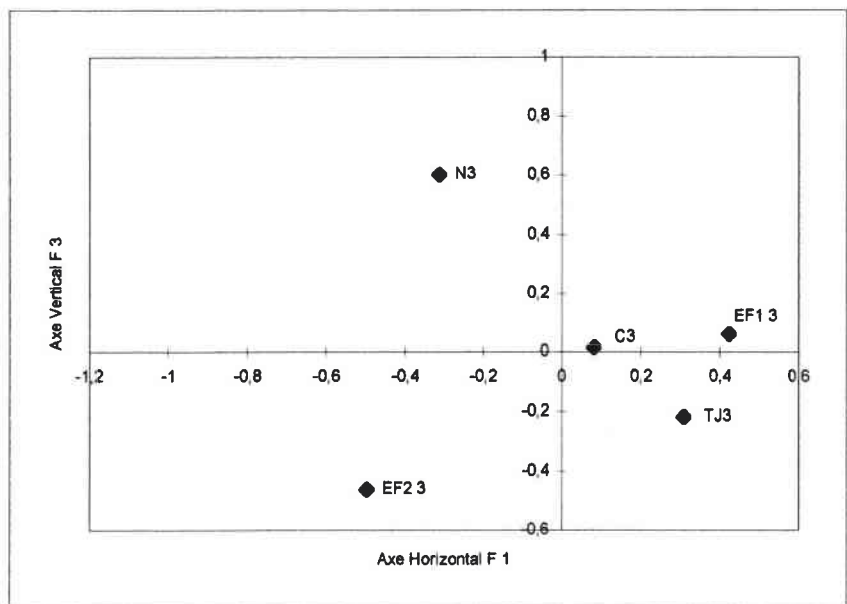
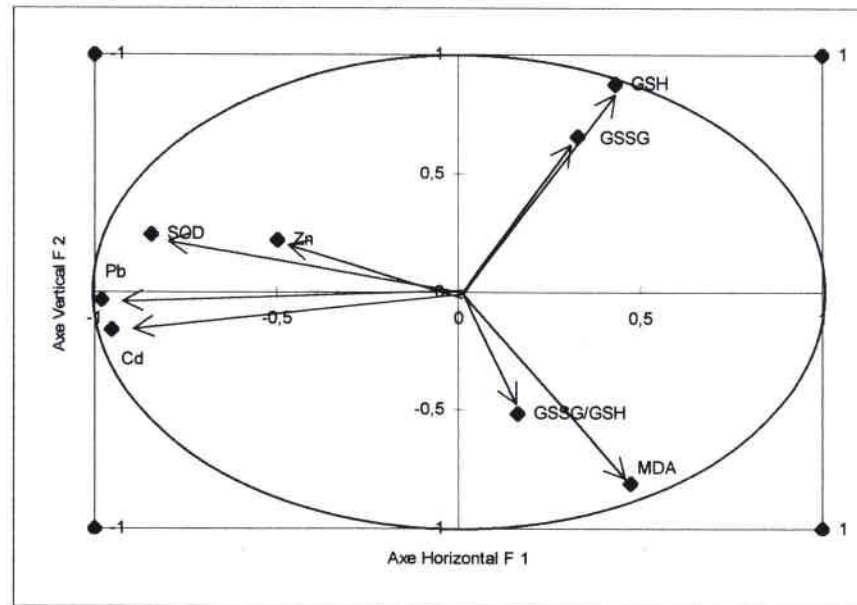
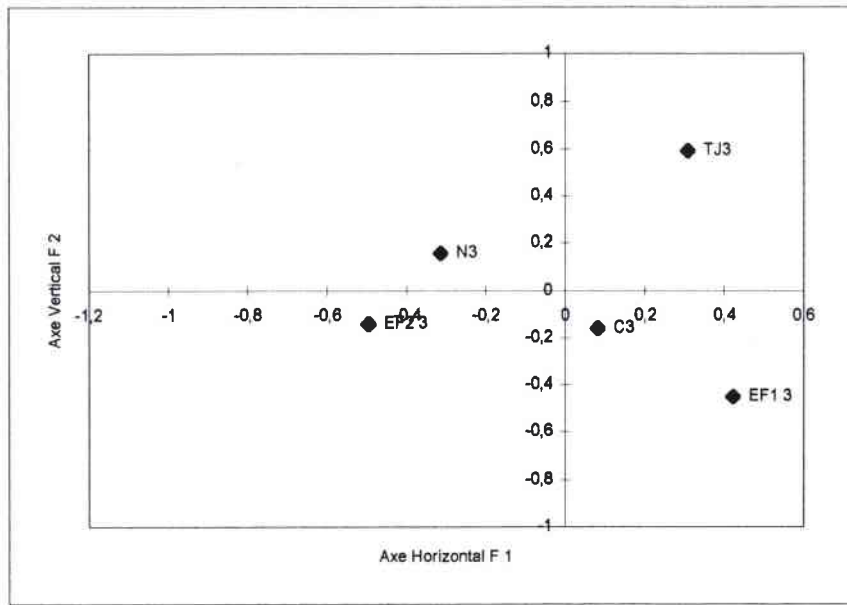


Figure 47 : ACP mois 3, individus et cercles des corrélations selon les axes 1-2 et 1-3.

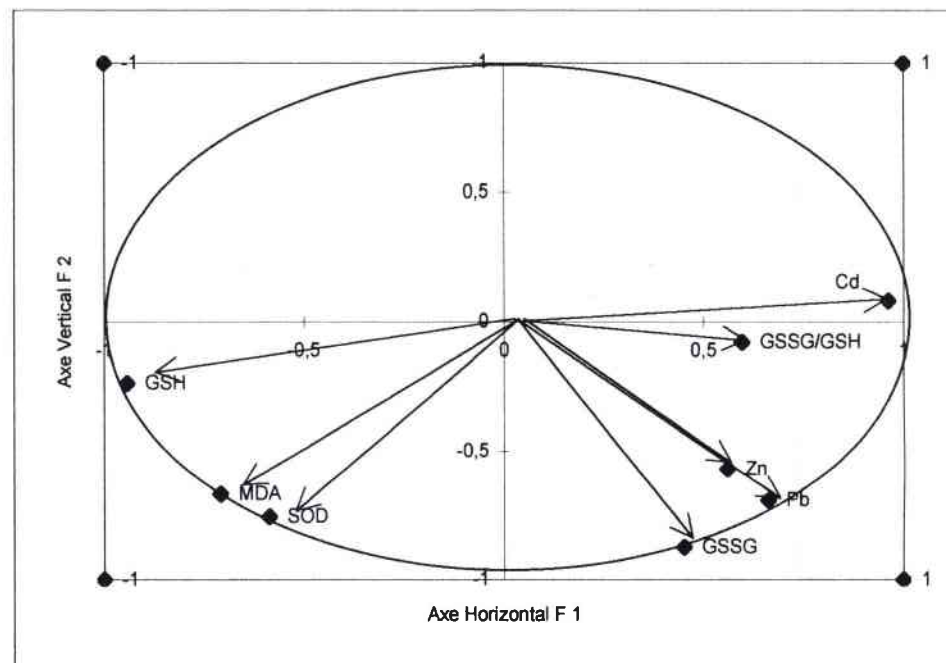
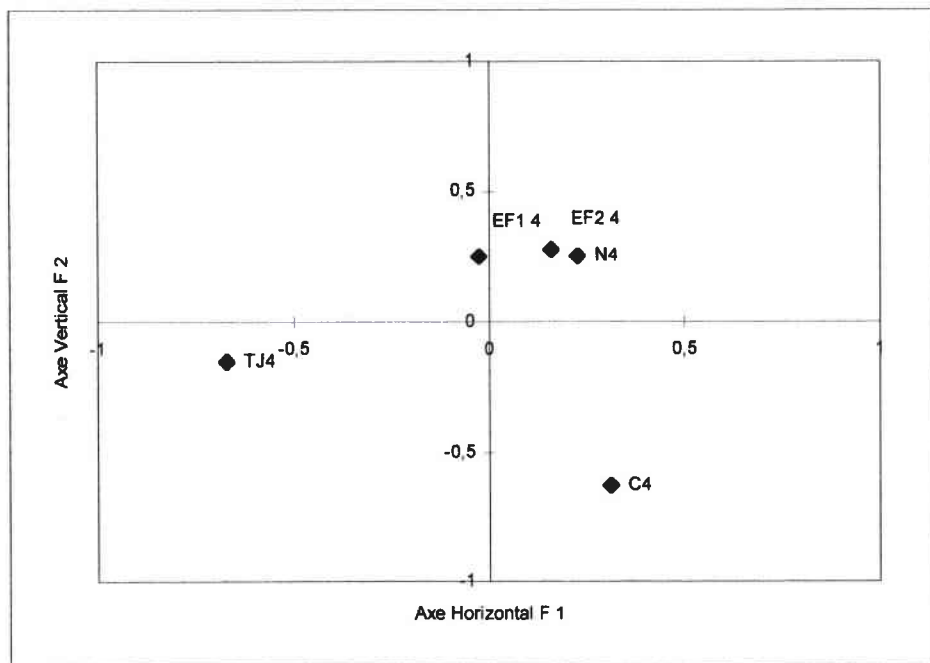


Figure 48 : ACP mois 4, individus et cercle des corrélations selon les axes 1 et 2.

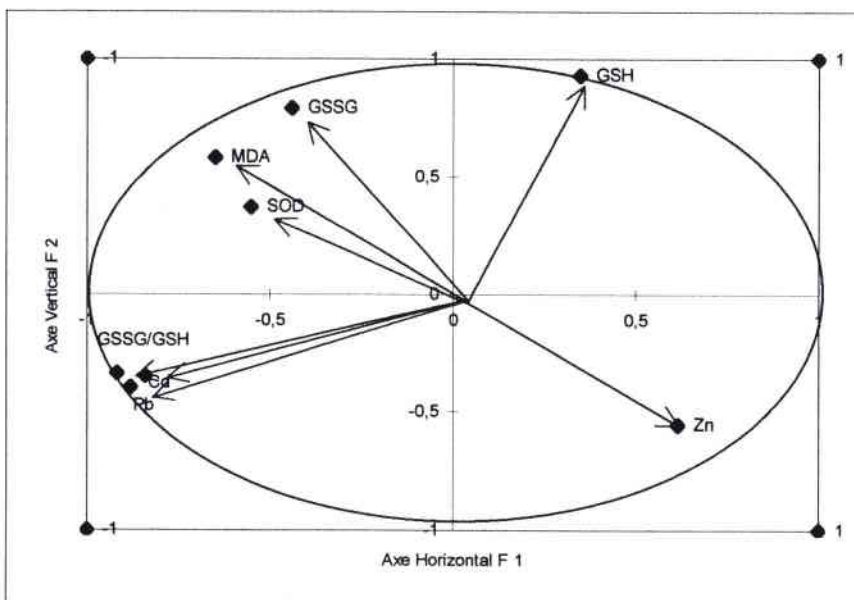
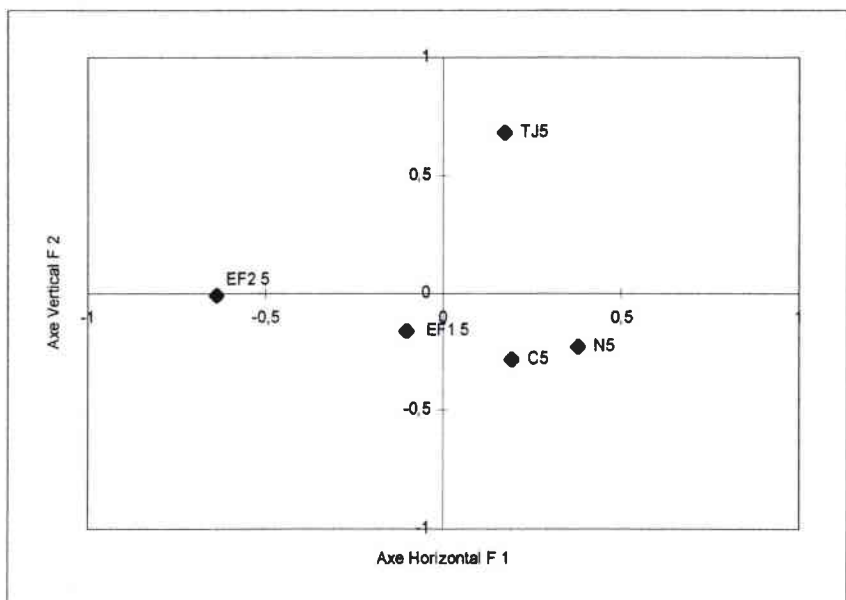
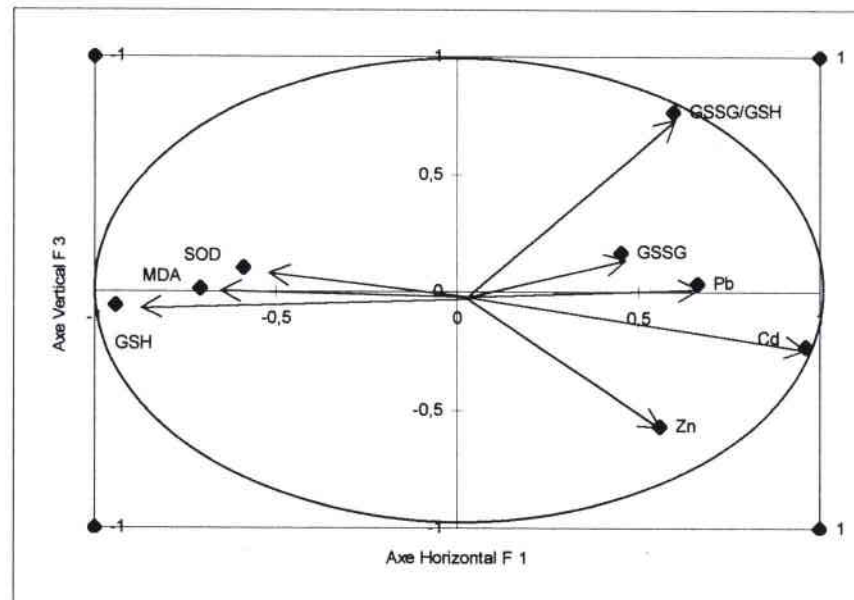
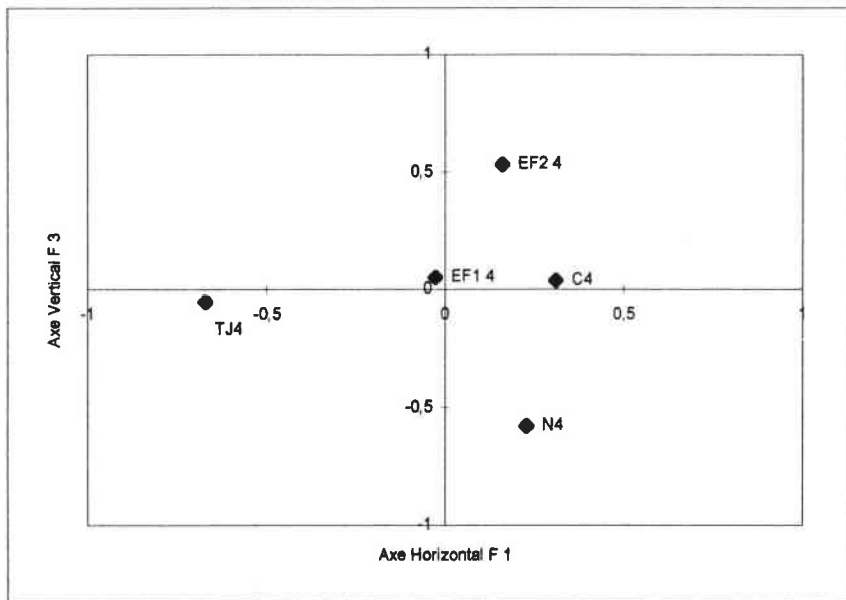


Figure 49 : ACP mois 5, individus et cercles des corrélations selon les axes 1-2 et 1-3.

L'activité des SOD est corrélée négativement avec le GSSG et le GSSG/GSH. Ils sont indépendants du zinc comme le témoigne la mauvaise corrélation. L'activité des SOD et le GSH sont anti-corrélés avec les métaux et le GSSG. Par contre, le Pb et le Cd sont indépendants du Zn et du GSH d'après l'angle droit que forment les deux vecteurs sur le cercle des corrélations. La source du Pb et du Cd est donc toujours différente de celle du zinc. Les variables, comme pour le mois précédent, se comportent normalement. La grosse différence pour le mois 2 est la corrélation du zinc avec l'activité des SOD.

Les sites EF1 et EF2 semblent s'éloigner de l'axe Zn, Pb, mais semblent présenter une relation avec le MDA et le GSSG/GSH et le Cd. En effet, selon l'axe 2, EF1 va s'orienter vers le GSSG et selon l'axe 3, EF2 va se rapprocher du MDA. Il ne semble donc pas qu'il y ait de relation entre le GSSG et les métaux. Par contre, les mousses du site EF2 présenteraient une augmentation du MDA. Le témoin est très éloigné des variables métaux et n'est donc pas exposé à ces derniers. L'activité des SOD et le GSH sont en relation avec le site témoin non contaminé. Il semblerait donc, que pour le mois 2, l'activité des SOD et la concentration en GSH soient inversement proportionnelles à celles des métaux. La station de Noyelles est exposée au Zn, mais également au Pb et au Cd, mais cette station, pour le mois 2, ne montre pas de relation intéressante entre les métaux et les biomarqueurs. Courcelles n'est pas ou très peu exposé au Cd, et comme Noyelles, ne révèle pas de relation entre les biomarqueurs et les métaux.

III.3.3. ACP exposition juin/juillet 1999 (mois 3) (fig. 47)

Les trois premiers axes de l'ACP sont suffisants pour expliquer les relations entre les variables. En observant le cercle des corrélations, on constate une corrélation négative entre l'axe 1 (contribution à la variance totale 42,11 %) et les valeurs du Pb ($r=-0,98$) et du cadmium ($r=-0,95$). Le MDA est trop éloigné du cercle pour être pris en compte. L'axe 2 (28,2 %) est corrélé positivement avec le GSH ($r=0,88$) et négativement avec le MDA ($r=-0,80$). L'axe 3 (20,6 %) est corrélé positivement au GSSG/GSH ($r=0,82$) et au Zn ($r=0,74$). L'exposition au Zn est toujours indépendante de celle au Pb et au Cd.

Nous remarquons que pour le mois 3, l'activité des SOD est corrélée avec les concentrations en Pb et Cd. Le GSSG est faiblement corrélé avec le GSH (0,63) ce qui paraît incohérent. Le GSH et le GSSG sont indépendants de l'activité des SOD et des métaux. De la même manière, le MDA est indépendant du GSH et du GSSG.

Si l'on s'intéresse aux sites, le témoin n'est pas exposé aux métaux. Néanmoins, il est corrélé avec le GSH de manière très importante. Il est anti-corrélé avec le MDA et voit son activité SOD diminuer. La station de Courcelles se retrouve pratiquement à l'origine des axes 1 et 2 mais également 1 et 3. Cela signifie que les variables ne sont pas de signification pour ce site. La station EF1 présente une concentration forte en MDA, il y a donc eu peroxydation des lipides membranaires, mais cela n'est pas lié aux ETM, il y a donc une autre cause aux dommages occasionnés aux bryophytes pendant le mois 3. La station EF2 est très exposée aux métaux, en particulier au Pb et au Cd et voit son activité SOD augmenter nettement, cependant il n'y a aucune relation avec le MDA, le GSH ou le GSSG. Enfin, le site de Noyelles est principalement exposé au Zn. Le rapport GSSG/GSH, mais la relation de cause à effet semble difficile à faire en raison d'une mauvaise corrélation entre le GSSG et le Zn (0,23).

III.3.4. ACP exposition juillet/août 1999 (mois 4) (fig. 48)

Les deux premiers axes de l'ACP sont suffisants pour expliquer les relations entre les variables. Elles se situent toutes à proximité du cercle. En observant le cercle des corrélations, on constate une corrélation positive entre l'axe 1 (contribution à la variance totale 49,63 %) et les valeurs du Cd ($r=0,96$) et dans une moindre mesure du Pb ($r=0,66$). Il est corrélé négativement avec le GSH ($r=-0,94$) et secondairement avec le MDA ($r=-0,71$).

L'axe 2 (33,1 %) est corrélé négativement avec le GSSG ($r=-0,87$) et secondairement avec l'activité des SOD ($r=-0,76$).

Le Pb et le Cd sont très mal corrélés (0,54). Par contre, le Pb semble bien corrélé au GSSG (0,89). Nous ne pouvons plus constater que les métaux proviennent de sources différentes. Il semblerait que l'exposition, plus forte sur les sites exposés, ne provienne que d'une seule source. Mais cette hypothèse est faiblement confortée par la faible corrélation qui existe entre Pb/Zn, Pb/Cd et Zn/Cd (environ 0,6).

On peut noter que le Cd et le GSH sont bien anti-corrélés, par contre la corrélation avec le GSSG ne se vérifie pas. L'activité des SOD est corrélée au MDA, mais ces deux biomarqueurs sont indépendants du Pb et de la GSSG.

Les sites EF1, EF2 et N4 se regroupent et subissent chacun une exposition aux ETM. Cependant, il n'y a pas de relation avec les biomarqueurs étudiés. Le site EF1 ne paraît pas varier avec les variables présentes en raison de ses coordonnées pratiquement nulles sur l'axe 1. EF2 et Noyelles subissent une exposition aux métaux plus importante qu'EF1, en particulier vis-à-vis du Cd, mais ne présentent pas de réponse significative en ce qui concerne les biomarqueurs étudiés. Courcelles, très exposé au Zn et au Pb voit ses concentrations en GSSG et son activité SOD nettement augmenter, alors que la concentration en GSH diminue. Le témoin n'est pas exposé aux ETM, il est corrélé avec le GSH.

III.3.5. ACP exposition août/septembre-octobre 1999 (mois 5) (fig. 49)

Les trois premiers axes de l'ACP sont suffisants pour expliquer les relations entre les variables. En observant le cercle des corrélations, on constate une corrélation négative entre l'axe 1 (contribution à la variance totale 46,82 %) et les valeurs du Pb ($r=-0,88$), du Cd ($r=-0,84$) et du GSSG/GSH ($r=-0,92$). Il est également corrélé positivement mais de manière plus faible avec le Zn ($r=0,62$).

L'axe 2 (33,4 %) est corrélé positivement avec le GSH ($r=0,93$) et le GSSG ($r=0,79$). L'axe 3 (12,5 %) est corrélé positivement à l'activité des SOD ($r=0,74$).

Le plomb et le cadmium sont bien corrélés entre eux (0,77), ils sont indépendants du Zn : la source est une nouvelle fois différente.

Le plomb et le cadmium sont tous deux très bien corrélés avec le GSSG/GSH (0,94/0,90) et relativement bien anti-corrélés avec le GSH (-0,68). Le zinc est anti-corrélé avec le MDA (-0,81). De nouveau le GSH et le GSSG varient dans le même sens, mais sont indépendants l'un de l'autre. De plus, la corrélation est moyenne (0,63). Le GSH est également indépendant des variables SOD et MDA. Enfin, le GSSG est bien corrélé avec le MDA (0,73).

Le site EF1 est indifférents aux variables retenues, excepté pour le Pb et le Cd pour lesquels on note une légère augmentation par rapport au mois précédent.

Le site d'EF2 est encore très exposé au Pb et au Cd et pratiquement pas au Zn. Son rapport GSSG/GSH augmente, ce qui est prévisible puisqu'on observe une légère augmentation du GSSG. Le MDA augmente également mais de manière moins significative.

	Pb H ₂ O	Pb extracell	Pb intracell	Pb HNO ₃	Pb total soluble	Pb total
TJ3	0,86	4,55	0,86	14,80	6,27	21,07
C3	0,30	25,87	1,92	14,65	28,09	42,74
N3	0,12	24,39	1,67	9,42	26,19	35,61
EF1 3	0,10	10,51	0,46	4,44	11,06	15,50
EF2 3	0,27	23,97	1,06	11,99	25,30	37,29
TJ5	1,31	5,30	1,31	19,31	7,92	27,24
C5	0,13	19,75	0,54	4,18	20,41	24,59
N5	0,12	9,14	0,33	4,39	9,60	13,99
EF1 5	0,09	17,12	0,60	8,64	17,80	26,44
EF2 5	0,19	48,01	1,80	21,78	49,99	71,78

	K H ₂ O	K extracell	K intracell	K HNO ₃	K Total soluble	K total
TJ3	562,30	479,80	217,11	312,04	1259,21	1571,26
C3	324,79	141,21	50,76	72,50	516,76	589,26
N3	67,87	55,85	43,45	47,25	167,17	214,41
EF1 3	28,47	31,88	14,66	29,24	75,01	104,25
EF2 3	73,09	110,71	88,25	108,61	272,04	380,66
TJ5	1143,53	516,90	246,05	178,46	1906,48	2084,94
C5	41,36	28,48	14,46	12,91	84,29	97,20
N5	57,40	46,85	37,69	15,55	141,93	157,48
EF1 5	87,70	47,49	41,26	10,26	176,46	186,71
EF2 5	186,66	116,01	63,51	38,59	366,18	404,77

	Zn H ₂ O	Zn extracell	Zn intracell	Zn HNO ₃	Zn total soluble	Zn total
TJ3	1,29	30,90	12,70	42,33	44,89	87,21
C3	7,08	203,40	32,48	54,18	242,97	297,15
N3	21,79	181,42	18,56	17,04	221,77	238,82
EF1 3	0,38	12,70	3,54	7,05	16,62	23,67
EF2 3	1,12	38,45	11,72	19,47	51,30	70,77
TJ5	2,03	42,64	19,14	46,44	63,82	110,25
C5	4,89	71,89	7,27	11,12	84,05	95,17
N5	2,65	89,67	9,74	9,71	102,06	111,76
EF1 5	0,43	16,82	4,62	12,83	21,87	34,70
EF2 5	0,80	39,37	10,30	29,10	50,48	79,57

	Cd H ₂ O	Cd extracell	Cd intracell	Cd HNO ₃	Cd total soluble	Cd total
TJ3	0,09	0,17	0,09	0,11	0,34	0,45
C3	0,03	0,55	0,15	0,25	0,73	0,98
N3	0,01	0,60	0,07	0,10	0,68	0,78
EF1 3	0,01	0,27	0,05	0,05	0,33	0,38
EF2 3	0,03	0,85	0,14	0,09	1,02	1,11
TJ5	0,13	0,26	0,13	0,16	0,52	0,69
C5	0,01	0,21	0,03	0,06	0,25	0,31
N5	0,01	0,40	0,05	0,06	0,46	0,52
EF1 5	0,01	0,25	0,07	0,09	0,33	0,42
EF2 5	0,02	0,87	0,24	0,36	1,13	1,50

Tableau 41 : Concentrations en Pb, Zn, Cd et K (en µg/g de protéines) dans les différents compartiments des gamétophytes de *Ceratodon purpureus*. La différence entre les concentrations moyennes en Pb, Zn, Cd et K pour le mois 3 et le mois 5 ne sont significatives que pour p<0,121. Élément total soluble = E(H₂O)+E(extracell)+E(intracell). Élément total = E(HNO₃)+E(total soluble).

EF1 de nouveau, mis à part une légère augmentation de l'exposition au Pb et Cd, sa concentration en GSGG va légèrement augmenter et donc son rapport GSSH/GSH suivra la même tendance. Les sites de Courcelles et de Noyelles sont très exposés au Zn provenant d'une autre source. Le Zn ne provoque pas de changement sensible au niveau des biomarqueurs. On ne note qu'une augmentation de l'activité des SOD par rapport à l'axe 3. Enfin, le site témoin se situe toujours très loin de l'exposition aux métaux, il est toujours lié au GSH.

D'après ces résultats, nous observons que selon les mois et selon les sites, les biomarqueurs de stress oxydant sont plus ou moins liés à l'exposition aux ETM. De manière générale, les biomarqueurs réagissent et se remettent à niveau un mois après le début de leur exposition mais ne varient que très faiblement pendant leur exposition sur les sites. Par contre, lorsque nous étudions mois par mois les relations entre les métaux et les biomarqueurs, nous voyons que les métaux peuvent entraîner une augmentation ou une diminution des concentrations et/ou de l'activité de ces biomarqueurs. Les résultats montrent également que ces biomarqueurs sont peu spécifiques. En effet, les variations observées sont difficilement explicables avec le peu de variables environnementales dont nous disposons. D'autres facteurs seraient à prendre en considération pour affiner nos résultats. Néanmoins, l'étude de l'exposition aux ETM et celle des biomarqueurs, permettent d'affiner considérablement les tendances observées pour l'ensemble des sites, et ce mensuellement.

III.4. ÉLUTION SÉQUENTIELLE

Afin de mieux comprendre les effets des métaux chez *Ceratodon purpureus*, nous avons réalisé une élution séquentielle aux mois 3 et 5, permettant de différencier les compartiments de fixation des métaux au sein de la mousse.

Le tableau 41 reprend les résultats du dosage du Pb du Zn et du Cd dans les différents compartiments de *Ceratodon purpureus*. Les figures 50a et 50b présentent les différentes teneurs en Zn des différents compartiments au mois 3 et au mois 5 : fraction intercellulaire soluble dans l'eau (Zn H₂O) ; fraction adsorbée sur les sites pariétaux et membranaires (Zn extracell) ; fraction intracellulaire (Zn intracell) et la fraction résiduelle (Zn HNO₃). Nous observons que les concentrations, quel que soit le compartiment, sont plus importantes au mois 3 qu'au mois 5. Ces sont les sites de Courcelles et de Noyelles, tous deux urbains, qui sont les plus contaminés par le zinc. Chez *Ceratodon purpureus*, il semble que la partie extracellulaire soit la partie dominante. Néanmoins, la partie intracellulaire et minérale ne sont pas négligeables. Il y a donc un mécanisme de bioaccumulation qui vient s'ajouter à une simple déposition.

En ce qui concerne le plomb (fig. 51a et 51b), les concentrations sont plus élevées pour le mois 5 que pour le mois 3 et nous n'observons que deux fractions dominantes : extracellulaire (majoritaire) et minérale. Il semblerait, mais cela n'est qu'une tendance, que le plomb ne soit pas facilement bioaccumulable par *Ceratodon*.

Le cadmium présente des concentrations non significativement différentes d'un mois à l'autre (fig. 52a et 52b). La partie extracellulaire domine également, mais le cadmium intracellulaire est relativement plus important pour ce métal que pour les autres. Le cadmium semblerait se fixer de manière préférentielle chez *Ceratodon*.

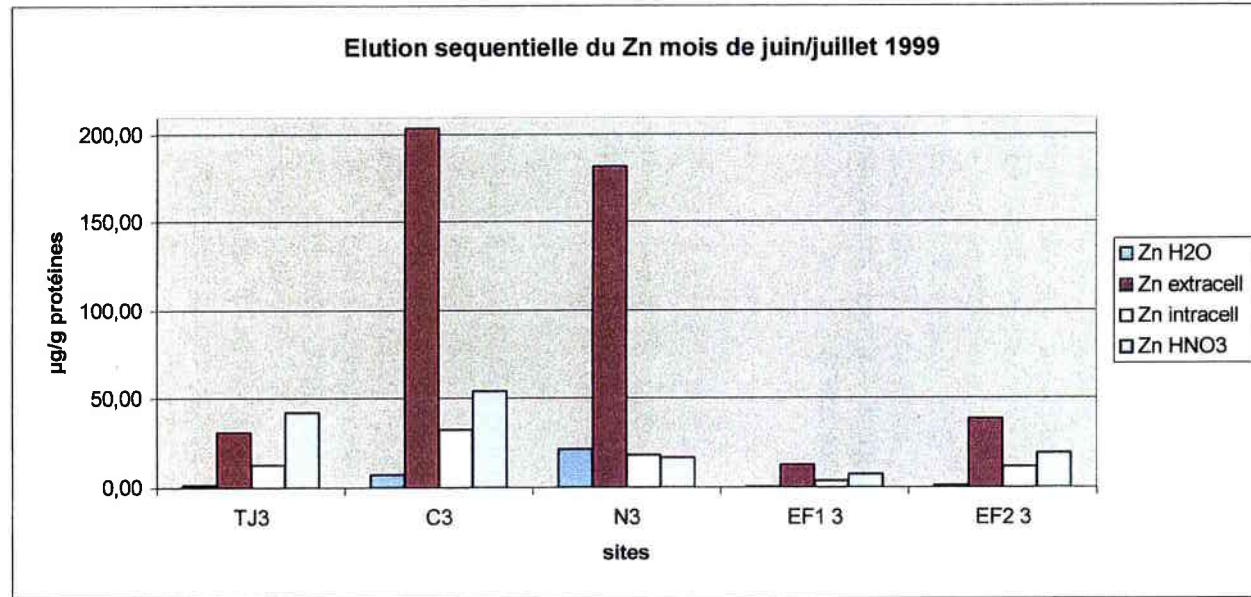
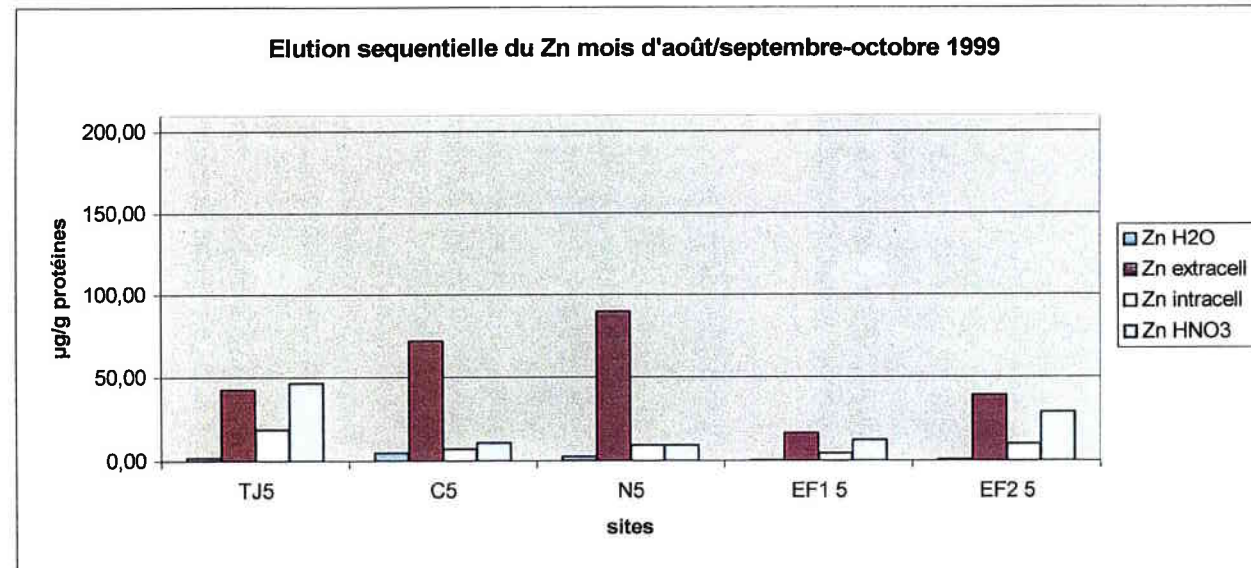
A**B**

Figure 50 : Variations des teneurs moyennes en Zn, au sein des différents compartiments cellulaires de *Ceratodon purpureus*, pour les mois 3 (A) et 5 (B).

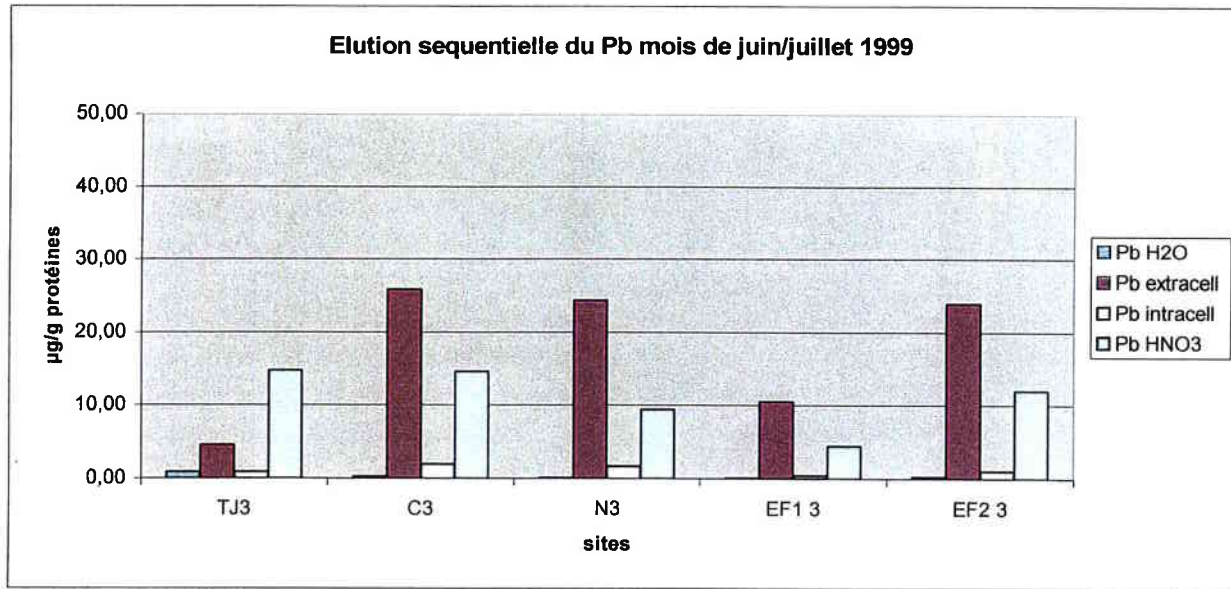
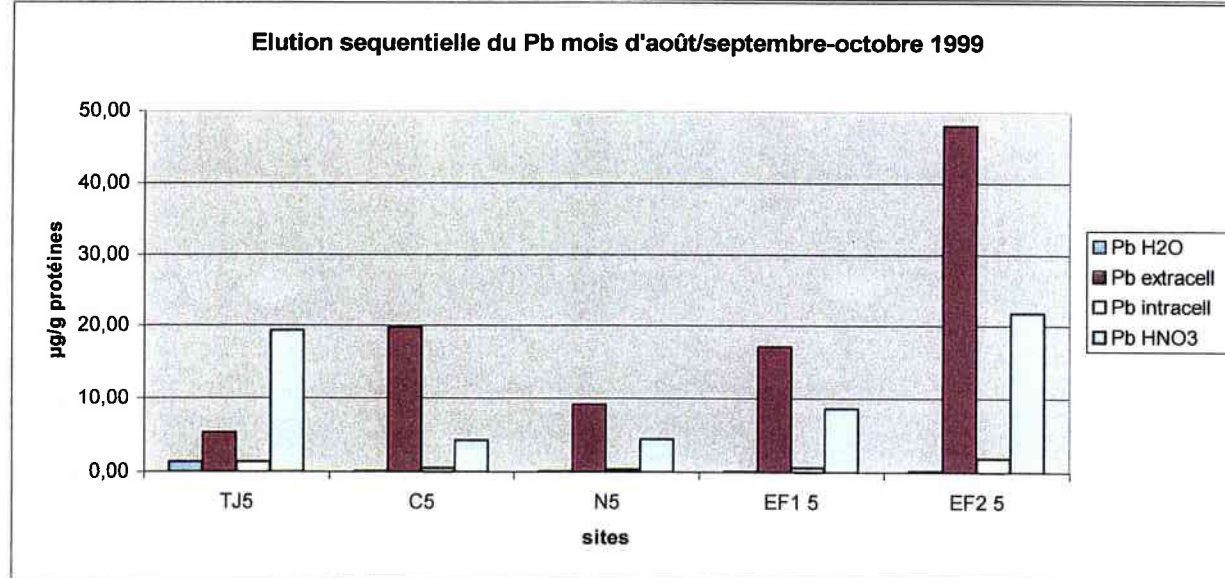
A**B**

Figure 51 : Variations des teneurs moyennes en Pb, au sein des différents compartiments cellulaires de *Ceratodon purpureus*, pour les mois 3 (A) et 5 (B).

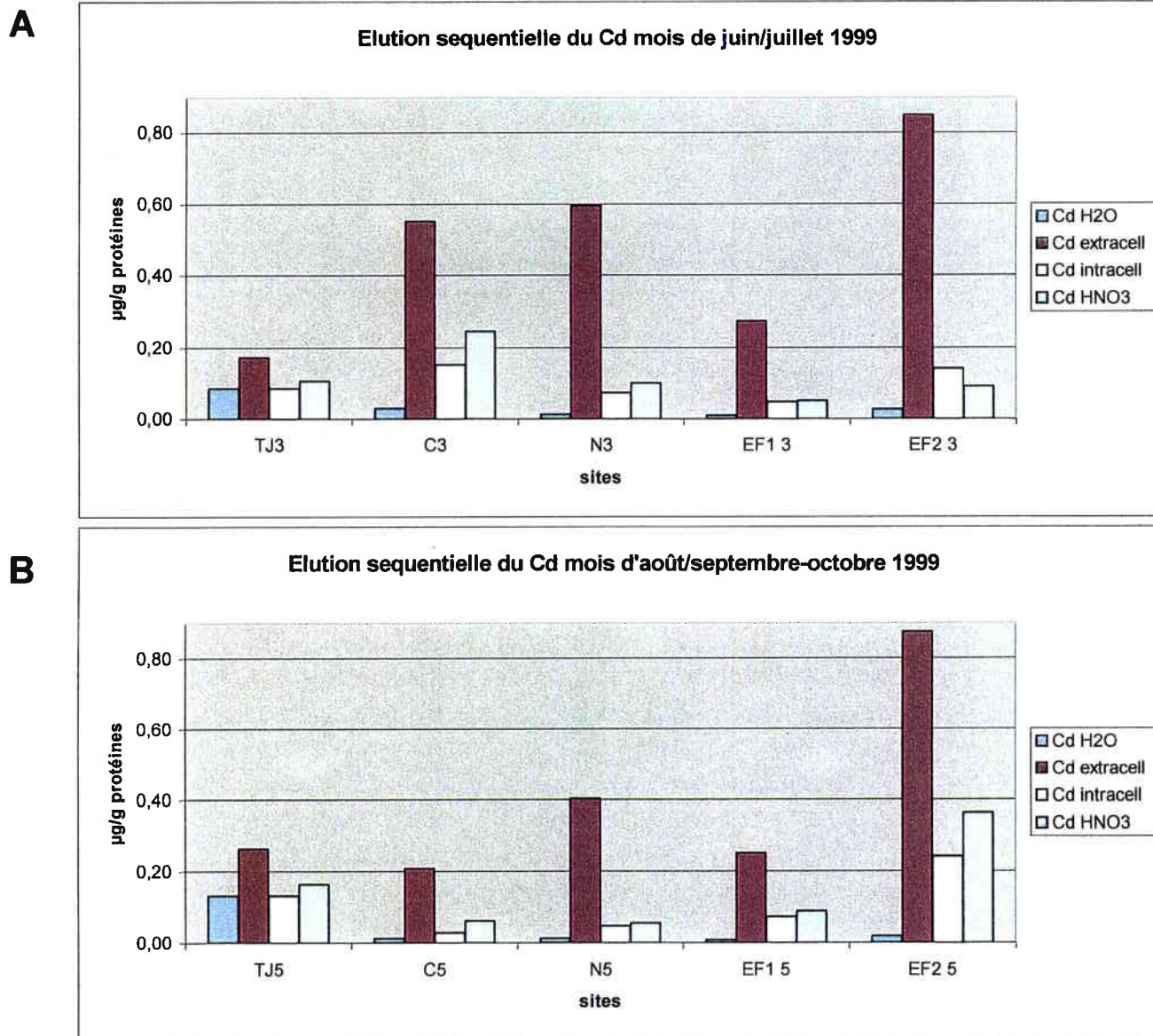


Figure 52 : Variations des teneurs moyennes en Cd, au sein des différents compartiments cellulaires de *Ceratodon purpureus*, pour les mois 3 (A) et 5 (B).

R = 0,99999997 R ² = 0,99999994 R ² ajusté = 0,99999975 F(3,1) = 5411E3 p<0,00032 Err- Type de l'estim. : 0,00014						
MDA	Beta	Err-Type Beta	B	Err-Type B	t(1)	niveau p
OrdOrig.			2,86	0,00	5792,24	0,00
Cd intracell	2,12	0,00	0,72	0,00	2419,00	0,00
Cd HNO ₃	-1,22	0,00	-0,45	0,00	-1408,27	0,00
Zn intracell	-0,03	0,00	-0,02	0,00	-110,08	0,01

R = 0,99626206 R ² = 0,99253810 R ² ajusté = 0,97015241 F(3,1) = 44,338 p<0,10985 Err- Type de l'estim. : 0,06452						
SOD	Beta	Err-Type Beta	B	Err-Type B	t(1)	niveau p
OrdOrig.			7,81	0,25	31,84	0,02
Pb intracell	1,86	0,18	1,00	0,10	10,04	0,06
Cd intracell	-1,40	0,19	-0,63	0,09	-7,36	0,09
Zn extracell	-0,36	0,10	-0,20	0,06	-3,72	0,17

R = 0,99381570 R ² = 0,98766966 R ² ajusté = 0,95067862 F(3,1) = 26,700 p<0,14109 Err- Type de l'estim. : 0,11091						
GSH	Beta	Err-Type Beta	B	Err-Type B	t(1)	niveau p
OrdOrig.			1,01	0,38	2,69	0,23
Zn intracell	1,05	0,12	1,01	0,12	8,41	0,08
Cd extracell	-0,44	0,11	-0,38	0,10	-3,84	0,16
Zn extracell	-0,16	0,12	-0,12	0,09	-1,31	0,41

R = 0,99958994 R ² = 0,99918004 R ² ajusté = 0,99672016 F(3,1) = 406,19 p<0,03645 Err- Type de l'estim. : 0,02525						
GSSG	Beta	Err-Type Beta	B	Err-Type B	t(1)	niveau p
OrdOrig.			-0,65	0,13	-5,11	0,12
Zn HNO ₃	1,05	0,03	0,68	0,02	34,81	0,02
Zn extracell	0,37	0,03	0,25	0,02	12,20	0,05
Pb extracell	0,23	0,03	0,12	0,02	7,86	0,08

R = 0,99997801 R ² = 0,99995601 R ² ajusté = 0,99982404 F(3,1) = 7577,2 p<0,00844 Err- Type de l'estim. : 0,00511						
GSSG/GSH	Beta	Err-Type Beta	B	Err-Type B	t(1)	niveau p
OrdOrig.			-1,40	0,02	-71,78	0,01
Pb extracell	0,96	0,01	0,44	0,00	138,84	0,00
Cd intracell	0,09	0,01	0,04	0,00	12,49	0,05
Zn extracell	-0,04	0,01	-0,02	0,00	-5,25	0,12

Tableau 42 : Résultats de l'analyse de régression du mois 5, pour le MDA, l'activité des SOD, le GSH, le GSSG et le rapport GSSG/GSH chez *Ceratodon purpureus*.

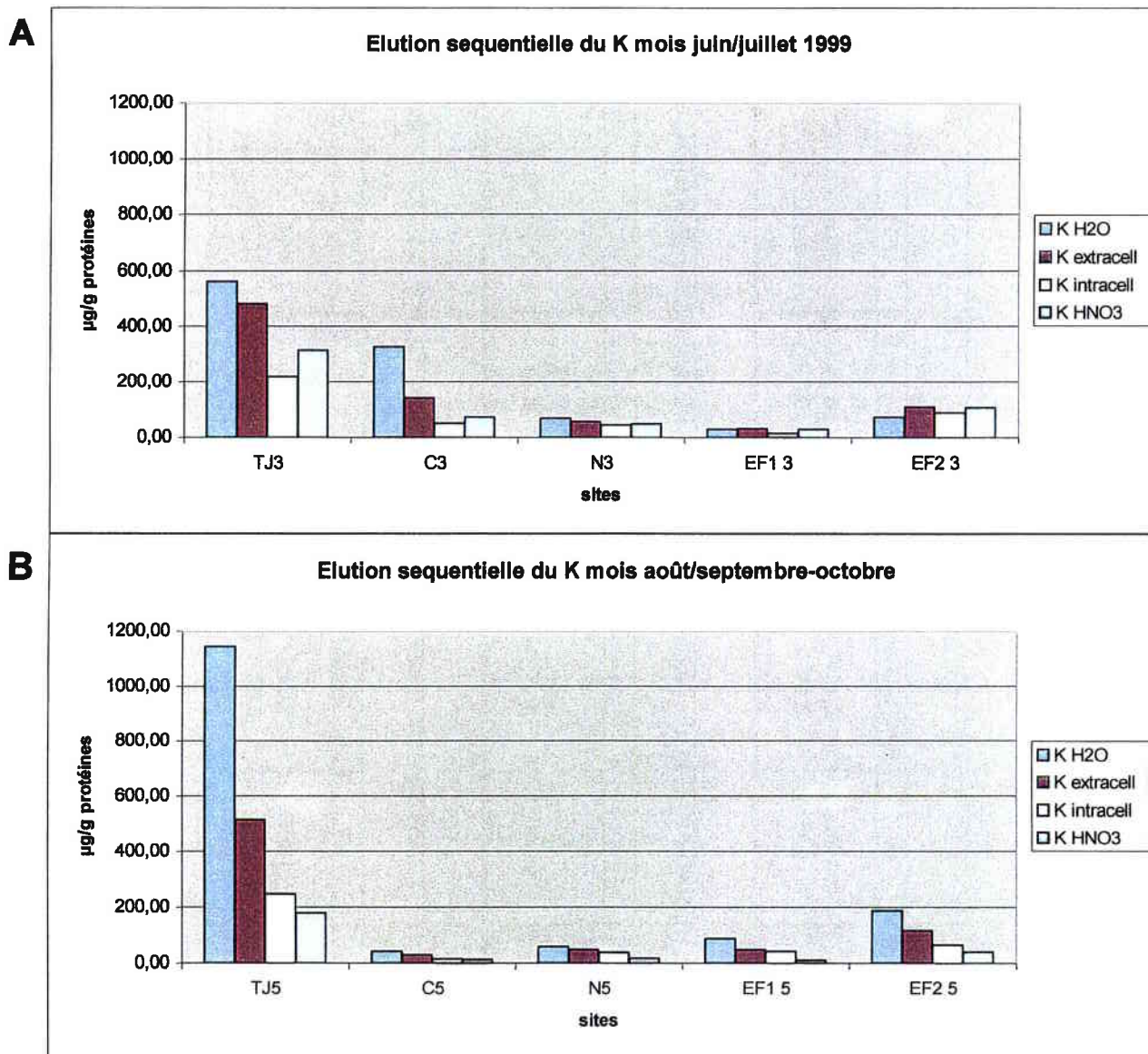


Figure 53 : Variations des teneurs moyennes en K, au sein des différents compartiments cellulaires de *Ceratodon purpureus*, pour les mois 3 (A) et 5 (B).

III.5. INTERPRETATION DES RESULTATS PAR ANALYSE DE REGRESSION

Nous rappelons que ces analyses ont pour but de savoir s'il existe un lien entre les paramètres physiologiques et les concentrations en ETM dans les différents compartiments de *Ceratodon purpureus*. La vérification préalable des variables a nécessité une transformation logarithmique de celles-ci. Le tableau 42 présente les résultats de ces analyses.

Les variations du taux de MDA chez *Ceratodon* ne dépendent pas de l'ensemble des variables retenues. Ces variations pourraient être expliquées de manière significative par la concentration en Cd intracellulaire, la concentration en Zn intracellulaire et la concentration résiduelle en Cd. Les différents coefficients de régression sont significatifs à $p < 0,05$. Le Cd intracellulaire est positivement lié au MDA. Cet élément semble donc participer à un mécanisme de stress oxydatif à l'intérieur des cellules. Le Cd résiduel et le Zn intracellulaire sont reliés négativement aux taux de MDA. Le Cd intracellulaire semble intervenir de manière assez importante car le coefficient de corrélation est relativement bon. Cette analyse nous donne simplement une tendance générale. Elle nous permet d'éliminer des variables ne participant pas statistiquement aux variations du MDA. Mais il faudrait un nombre d'observations beaucoup plus grand pour valider cette tendance.

Les variations de l'activité des SOD pourraient être expliquées par le Pb intracellulaire, le Cd intracellulaire et le Zn extracellulaire. Mais les coefficients de régression ne sont pas significatifs à $p < 0,05$. Ils ne le sont qu'à $p < 0,1$ pour le Pb et le Cd intracellulaires. Il ne semble donc pas que les métaux établissent une réelle relation avec l'activité des SOD. Néanmoins, le Cd au sein des cellules végétales semble participer à un mécanisme générant du peroxyde d'hydrogène. Cette espèce réactive de l'oxygène étant ensuite transformée par les SOD. Mais il a été également montré par Rucinska (1999) que les SOD pouvait être bloquée par le Cd chez certains végétaux. Cette enzyme étant métallo-dépendante, en présence de certains cations métalliques, peut être bloquée et ne pas intervenir lorsqu'il y a présence de peroxyde d'hydrogène.

Les variations du GSH pourraient être expliquées par le Zn intracellulaire, le Cd extracellulaire et le Pb extracellulaire. Mais les coefficients de régression ne sont pas statistiquement significatifs à $p < 0,05$. Il est clair qu'en regardant les résultats, les fortes concentrations en GSH s'observent chez le témoin non exposé aux ETM. Cela ne signifie pas qu'il n'y a pas une synthèse de GSH pour une être éventuellement utilisé dans l'élaboration de phytochélatines. En effet, les phytochélatines sont bien développées chez les végétaux, mais leur présence n'a pas encore été démontrée chez les bryophytes. A la vue de nos résultats, il est évident que les concentrations de GSH diminuent au fil du temps et ce, particulièrement sur les sites très exposés aux métaux. *A contrario*, la GSSG semble aller dans le même sens que la GSH pour certains sites et pour les derniers mois d'exposition. Par ailleurs, nous n'avons pas réussi, malgré plusieurs essais, à détecter la présence de glutathion peroxydase et de glutathion réductase au sein de nos bryophytes (voir annexe 4).

Les variations du GSSG pourraient être expliquées par la fraction résiduelle du Zn, le Zn et le Pb extracellulaires. Mais ce dernier n'est pas significatif à $p < 0,05$. Le GSSG aurait donc une certaine relation avec le Zn.

Nous avons également analysé le potassium au sein de *Ceratodon* pour les mois 3 et 5. La figure 53 et le tableau 41 montrent que les témoins du mois 5 possèdent beaucoup plus de

R = 0,99972555 R ² = 0,99945118 R ² ajusté = 0,99780470 F(3,1) = 607,3 p<0,02983 Err- Type de l'estim. : 0,05484						
K HNO ₃	Beta	Err-Type Beta	B	Err-Type B	t(1)	niveau p
OrdOrig.			-1,10	0,20	-5,41	0,12
Zn HNO ₃	0,65	0,04	1,11	0,07	17,00	0,04
Zn intracell	0,36	0,04	0,81	0,10	8,40	0,08
Pb extracell	-0,16	0,03	-0,22	0,04	-5,53	0,11

R = 0,99977359 R ² = 0,99954723 R ² ajusté = 0,99818892 F(3,1) = 735,88 p<0,02709 Err- Type de l'estim. : 0,04387						
K intracell	Beta	Err-Type Beta	B	Err-Type B	t(1)	niveau p
OrdOrig.			-5,13	0,26	-20,09	0,03
Zn HNO ₃	1,19	0,06	1,80	0,09	21,11	0,03
Pb intracell	-1,50	0,07	-2,23	0,10	-22,57	0,03
Pb HNO ₃	1,12	0,08	1,46	0,10	14,67	0,04

R = 0,99996739 R ² = 0,99993479 R ² ajusté = 0,99973911 F(3,1) = 5110,3 p<0,01028 Err- Type de l'estim. : 0,01849						
K extracell	Beta	Err-Type Beta	B	Err-Type B	t(1)	niveau p
OrdOrig.			-2,70	0,12	-23,44	0,03
Zn HNO ₃	1,54	0,02	2,60	0,03	84,07	0,01
Pb intracell	-0,87	0,02	-1,44	0,04	-38,09	0,02
Cd intracell	0,23	0,02	0,31	0,02	13,01	0,05

Tableau 43 : Résultats de l'analyse de régression du mois 5, pour le potassium dans les différents compartiments cellulaires de *Ceratodon purpureus*.

K que ceux du mois 3 et qu'il est très peu présent sur les sites contaminés aux mois 3 et 5 par rapport à leur site témoin respectif. D'une manière générale, le K est très soluble et la partie résiduelle (KHNO_3) est très faible par rapport aux autres fractions. Cette plus grande quantité de K intercellulaire (KH_2O) et extracellulaire par rapport au K intracellulaire montre qu'il y a eu une fuite potassique chez les mousses témoin et exposées, mais les différences de concentrations entre le témoin et les sites exposés aux métaux semble difficilement interprétables. En général, le K extracellulaire et intracellulaire sont importants car ils permettent de mettre en évidence des fuites potassiques occasionnées lors d'atteintes membranaires.

L'analyse de régression faite sur le potassium extracellulaire pour le mois 5 montre que les variations pourraient être expliquées par le Pb et le Cd intracellulaires et la fraction résiduelle du Zn (tab. 43). Le Zn minéral et le Cd intracellulaire sont positivement liés au potassium extracellulaire. A l'inverse, le Pb intracellulaire est corrélé négativement. Le Zn et le Cd auraient donc tendance à favoriser la fuite potassique chez *Ceratodon*.

Les résultats pour le mois 5 montrent une forte corrélation entre le K extracellulaire et le GSH (0,83), le GSSG (0,84) et le MDA (0,7) (tab. 44). Les corrélations sont également intéressantes en ce qui concerne les métaux.

Les bryophytes doivent être étudiées au cas par cas. En effet, dans la littérature, les auteurs se mettent à étudier certains biomarqueurs de stress chez les bryophytes, principalement lors des phénomènes de dessiccation et de réhydratation. Mais certaines espèces sont plus tolérantes que d'autres au stress hydrique. Il doit certainement en être de même pour les autres types de stress et en particulier celui engendré par les ETM.

III.6. LA TECHNIQUE DU « MOSS BAG »

Les derniers résultats de notre étude portent sur les moss bag. Nous sommes conscient que ces résultats demandent à être confirmés par des expériences à plus grande échelle, mais ils nous donnent une certaine tendance quant aux potentialités d'accumulation qu'a une bryophyte morte par rapport à une bryophyte vivante.

Les résultats montrent clairement que la mousse traitée préalablement à l'acide nitrique a accumulé les ETM présents dans l'atmosphère, sans discontinuité et nous pouvons voir dans le tableau 45, que les différences de concentrations pour un même site et une même durée d'exposition sont très significatives y compris pour le site témoin. Cela met donc en avant le fait qu'en biomonitoring, il faut faire attention au type de matériel que l'on utilise. Le choix de l'espèce est important lorsqu'on veut observer les impacts des ETM ou de n'importe quel polluant sur un organisme vivant. Dans ce cas, nous allons prendre toutes les précautions nécessaires pour respecter son écologie et ses conditions de vie. C'est ce que nous avons essayé de faire avec notre « bryocapteur ». Dans ce cas de figure, nous pouvons utiliser des biomarqueurs d'effets ou d'exposition qui vont nous renseigner sur l'état physiologique de la mousse et sur les réponses qu'elle va engendrer face à un grand nombre de toxiques présents en faible quantité dans l'air.

A contrario, lorsque nous voulons simplement évaluer les retombées d'ETM, il paraît plus judicieux d'utiliser une mousse morte puisque son organisme ne va pas interférer avec les polluants et donc ne va pas chercher à se défendre ou à les éliminer.

En étudiant les diverses expériences menées à l'aide de moss bags constitués de mousses vivantes, nous avons du mal à comprendre comment on peut estimer les effets des polluants sur une mousse lorsqu'elle est en état de stress permanent, dans un sachet soumis à

	<i>K H2O</i>	<i>K extracell</i>	<i>K intracell</i>	<i>K HNO3</i>	<i>K Total soluble</i>	<i>K total</i>
K H2O	1,000					
K extracell	0,999	1,000				
K intracell	0,996	0,997	1,000			
K HNO3	0,998	0,999	0,993	1,000		
K Total soluble	1,000	1,000	0,997	0,998	1,000	
K total	1,000	1,000	0,997	0,998	1,000	1,000

	<i>K H2O</i>	<i>K extracell</i>	<i>GSH</i>	<i>GSSG</i>	<i>SOD</i>	<i>GSSG/GSH</i>	<i>MDA</i>
K H2O	1,000						
K extracell	0,999	1,000					
GSH	0,969	0,965	1,000				
GSSG	0,729	0,758	0,633	1,000			
SOD	0,339	0,339	0,178	0,559	1,000		
GSSG/GSH	-0,449	-0,419	-0,607	0,223	0,437	1,000	
MDA	0,463	0,494	0,294	0,701	0,217	0,349	1,000

Tableau 44 : Coefficients de corrélation, pour le mois 5, entre les divers compartiments cellulaires pour le potassium et les autres biomarqueurs de stress oxydant chez *Ceratodon purpureus*.

<i>Ceratodon</i> mort	Pb µg/g prot	ET Pb	Zn µg/g prot	ET Zn	Cd µg/g prot	ET Cd
MTJ3	11,74	1,03	65,61	4,94	0,12	0,03
MC3	44,26	2,70	181,37	2,51	1,34	0,01
MN3	18,13	1,33	109,93	5,95	0,42	0,04
MEF1.3	11,50	0,48	58,31	3,81	0,32	0,01
MEF2.3	68,26	0,00	94,84	1,86	3,63	0,10
MC5	53,48	0,00	321,61	0,00	1,85	0,00
MEF1.5	18,69	0,46	120,01	5,59	0,69	0,02
MEF2.5	126,04	0,43	229,47	5,17	8,15	0,05
<i>Ceratodon</i> vivant						
TJ3	8,28	0,24	36,62	2,55	0,19	0,01
C3	11,99	0,61	93,81	4,33	0,31	0,01
N3	20,92	0,00	149,21	0,00	0,47	0,00
EF1.3	8,17	0,79	11,90	0,71	0,20	0,01
EF2.3	21,05	2,41	40,97	3,29	0,75	0,02
C5	27,78	1,57	108,64	3,65	0,38	0,02
EF1.5	33,13	1,26	37,29	0,78	0,57	0,00
EF2.5	42,35	1,14	47,46	1,59	1,00	0,01

TJ (Témoins Jenlain), C (Courcelles-les-Lens), N (Noyelles-Godault), EF1 (Evin-Malmaison Ferme Dugardin), EF2 (Evin-Malmaison Ferme Delobel)

Tableau 45 : Valeurs moyennes (M) et écart-types (ET), en Pb, Zn et Cd, aux mois 3 et 5, pour le *Ceratodon purpureus* mort (M suivi du site) et le *Ceratodon* vivant. Les moss bags des sites TJ et N pour le mois 5 ont disparu (vandalisme).

diverses conditions, qui lui sont nettement défavorables (humidité résiduelle, développement de moisissures, de nécroses etc.). A l'inverse, pourquoi utiliser une mousse vivante et faire en sorte qu'elle puisse vivre dans des conditions satisfaisantes, malgré le stress permanent (alimentation constante en eau par capillarité, etc.), alors que nous voyons nettement qu'une mousse traitée à l'acide augmente ses capacités d'échanges cationiques et permet donc d'avoir une sensibilité supplémentaire que n'ont pas les mousses en général.

Cette étude montre bien à quel point l'interprétation d'un phénomène à l'aide de variables biologiques est difficile. L'ensemble des résultats de cette étude n'est qu'une tendance. En effet, pour avoir une meilleure représentativité, il faudrait multiplier le nombre de stations, augmenter le nombre de marqueurs biologiques, ajouter des variables explicatives comme la température, l'hygrométrie et augmenter le nombre de toxiques étudiés.

La pollution de nos jours est très diffuse et un très grands nombre de composants en faibles quantité dans l'air peuvent avoir un effet synergique sur un organisme vivant, d'où l'intérêt de la bioindication en complémentarité des mesures physico-chimiques.

CONCLUSION GENERALE

ET

PERSPECTIVES

Au cours de ce travail, nous avons eu pour objectif d'étudier l'écotoxicité des éléments traces métalliques (Cd, Pb et Zn) chez les bryophytes. Grâce à une approche pluridisciplinaire, nous avons pu observer les impacts de ces éléments traces à trois niveaux d'organisation biologique : la communauté, l'individu et la cellule. Nous avons pu également mettre au point et tester l'efficacité d'un bryocapteur des retombées atmosphériques en ETM grâce à *Ceratodon purpureus* (Hedw.) Brid. Les principaux résultats acquis au cours de cette étude peuvent être résumés comme suit :

Les impacts des éléments traces sur les communautés bryophytiques. Nous avons effectué des relevés floristiques sur quatre sites contaminés en éléments traces appartenant à la zone du PRC. Les deux sites les plus contaminés présentent des taux en plomb, en cadmium et en zinc supérieurs aux seuils d'urgence fixés par la norme AFNOR NF U 44-041. Nous avons montré que les éléments traces métalliques modifient la structure des communautés bryophytiques terricoles. La composition spécifique de ces communautés varie en fonction de leur teneur en éléments traces, mais également en fonction d'autres paramètres édaphiques du sol, comme la matière organique, le pH ou la capacité d'échanges cationiques. Cette variation, nous a permis d'établir une première échelle de diagnostic de la contamination des sols basée sur l'observation de la flore bryophytique. Cette échelle est constituée de cinq groupes écologiques se répartissant de la manière suivante : deux groupes d'espèces métallophobes, deux groupes d'espèces présentant une capacité croissante à se développer sur des sites riches en éléments traces et un groupe d'espèces métallophytes.

Nous avons voulu confirmer ces premiers résultats en appliquant notre échelle *aux communautés de bryophytes et de lichens*. En effet, ces organismes sont capables de coloniser un sol nu et de le stabiliser pour ensuite permettre le développement d'espèces végétales. Les sols rencontrés dans la zone du PRC sont, pour certains, très contaminés en éléments traces et ne sont constitués que de communautés bryolichéniques. Nous avons montré que les éléments traces métalliques modifient également la structure de ces communautés en fonction de leurs concentrations dans le sol. Une nouvelle échelle a été établie afin de réaliser des diagnostics précoces de contamination des sols par les éléments traces en observant les communautés bryolichéniques. Nous retrouvons cinq groupes écologiques d'espèces se répartissant de la manière suivante : deux groupes d'espèces métallophobes, deux groupes d'espèces présentant une capacité croissante à se développer sur des sites riches en éléments traces et un groupe d'espèces métallophytes (composé exclusivement de lichens).

La comparaison de nos deux échelles ne mettent pas en opposition l'utilisation des communautés bryophytiques et les communautés bryolichéniques. Au contraire, il semblerait que les lichens apportent une dimension supplémentaire d'un point de vue dynamique, mais à l'inverse peuvent compliquer la compréhension de certains phénomènes à cause de la compétition inévitable entre des deux organismes. Il est donc important de constater le type d'organismes présents sur le site que l'on veut étudier et d'employer l'échelle correspondante. Il est clair que sur des sites composés de mousses et de lichens, l'utilisation seule des lichens sera moins pertinente que l'utilisation des bryophytes et des lichens associés.

Parmi les espèces ubiquistes qui peuvent se rencontrer sur des terrains très pollués, nous avons observé, *Diploschistes muscorum*, *Pohlia nutans*, *Bryum capillare* et *Ceratodon purpureus*. Nous avons utilisé cette espèce comme modèle pour la mise au point d'un bryocapteur des retombées atmosphériques en éléments traces métalliques. Nous avons pu ainsi étudier les impacts des métaux à l'échelle individuelle et cellulaire.

Grâce à la société Bryotec, nous avons pu utiliser une grande quantité de *Ceratodon purpureus*, cultivé de manière standardisée, faisant l'objet d'un dépôt de brevets européen, américain et japonais. En collaboration avec l'usine Metaleurop, nous avons choisi quatre

stations exposées aux retombées en éléments traces de l'usine et y avons placé notre mousse pendant une durée de six mois.

Les analyses mensuelles totales en Cd, Pb et Zn ont montré que cette bryophyte avait une réelle capacité à accumuler et bioaccumuler ces éléments au sein de son organisme. L'étude en parallèle des biomarqueurs de stress oxydant ont montré que le *Ceratodon* pouvait subir certains dommages, mis en évidence par des augmentations de concentrations en potassium, une augmentation du MDA. Néanmoins, ces dommages semblent rester limités, puisque le *Ceratodon* exposé pendant plus de cinq mois sur certaines stations, malgré une nette croissance des concentrations en métaux, n'a pas vu certains de ses marqueurs croître de manière significative.

Les analyses en composantes principales ont permis de mettre en évidence, certains mois, que le cadmium, le plomb ou le zinc provoquaient selon les stations (et donc selon l'exposition du *Ceratodon* aux retombées en ETM) une augmentation de la concentration en MDA ou en GSSG. Cela suggère qu'une partie des dommages soient dus à un stress oxydant. Parmi les éléments étudiés, il semble que le cadmium soit celui qui provoque le plus de troubles. Enfin, la baisse croissante des concentrations en GSH dans le temps, laisse penser que cette protéine est utilisée par le *Ceratodon*. La synthèse de phytochélatines (polymères de glutathion), non encore mise en évidence chez les bryophytes, semble être une piste intéressante.

Les expériences d'éluion séquentielle sur les mois 3 et 5, nous ont permis de localiser les éléments traces au sein des différents compartiments du *Ceratodon*. La fraction particulière est peu importante et forme la fraction résiduelle. La fraction soluble des éléments se répartit au sein de trois compartiments : le compartiment intercellulaire, le compartiment extracellulaire (adsorption des éléments sur les sites pariétaux et membranaires) et le compartiment intracellulaire. Les trois éléments étudiés se retrouvent en majorité dans la fraction extracellulaire. Il faut noter que le zinc et le cadmium semblent également passer les membranes du *Ceratodon* et se retrouver au sein du compartiment intracellulaire, mais pas le plomb.

Nous ne savons toujours pas si cette mousse présente une tolérance vis-à-vis des éléments traces métalliques, mais la place qu'elle occupe au sein de nos communautés bryophytiques et bryolichéniques de sols contaminés, ainsi que les premiers résultats concernant les impacts de ces éléments au niveau cellulaire, commencent à nous donner quelques pistes sérieuses. Dietz *et al.* (1999) rapportent qu'une plante tolérante aux éléments traces métalliques présente une certaine capacité à éviter la production d'espèces réactives de l'oxygène ou à en limiter les effets. Ainsi, les biomarqueurs d'effets ne donneraient pas une réponse forte.

Enfin, une expérience, menée en parallèle, à l'aide de moss bags de *Ceratodon* tué à l'acide nitrique, nous a permis de soulever plusieurs questions quant à l'utilisation de mousses mortes ou vivantes dans l'appréciation des retombées atmosphériques en éléments traces.

Il se dégage de nos réflexions qu'en fonction de l'étude à réaliser, il faudra utiliser l'outil le plus pertinent pour réaliser notre diagnostic. En effet, lorsque nous voudrions apprécier les impacts des éléments traces métalliques sur les organismes vivants, il sera indispensable d'utiliser les bryophytes vivantes et d'associer à l'étude des éléments traces, l'étude d'un panel de biomarqueurs de stress oxydant. Ces investigations au sein de la bryophyte viendront en complémentarité des résultats des capteurs physico-chimiques et d'autres variables comme le climat. Enfin, lorsque nous voudrions juste apprécier un dépôt en retombées atmosphériques et utiliser les grandes capacités d'échanges cationiques qu'ont les parois des bryophytes, nous choisirons une mousse morte, traitée à l'acide, permettant ainsi

d'avoir un outil diagnostique plus sensible, qui n'interfère pas avec les concentrations en métaux accumulés.

Dans ce travail, nous avons associé différentes approches au sein d'une étude pluridisciplinaire. Cette démarche originale s'est révélée tout à fait efficace et ouvre des perspectives intéressantes pour chacun des niveaux étudiés.

Au niveau communautaire, il serait intéressant d'appliquer notre échelle de diagnostic sur d'autres sites en France et en Europe, présentant les mêmes problématiques que ceux de notre région. Cela pourrait parfaitement s'intégrer dans les différents programmes d'inventaires des sites et sols pollués. Il serait également utile de tester notre méthodologie sur des sites soumis à des conditions climatiques différentes (sites miniers du sud de la France). Enfin, la technique de bioestimation de la contamination pourrait être transposée à d'autres types de pollutions comme les hydrocarbures.

Ceratodon purpureus semble être un bon bryocapteur des retombées atmosphériques en éléments traces. Mais nous avons vu que d'autres espèces rencontrées sur nos sites sont également intéressantes. Les cultures réalisées par la société Bryotec, nous fournissant des gamétophytes feuillés bien développés, nous permettront d'envisager des investigations *in vitro*. Cet aspect indispensable, complétera notre étude *in situ*. Existe-t-il réellement des écotypes pour ces différentes espèces métallotolérantes, quelles sont leurs stratégies d'adaptation ? Il faut désormais mieux comprendre la physiologie de ces espèces vis-à-vis des mécanismes d'accumulation, de bioaccumulation et étudier plus en détail les impacts des éléments traces métalliques au niveau cellulaire. *Ceratodon purpureus*, est-elle réellement tolérante aux éléments traces métalliques, possède-t-elle des mécanismes de défense ou de réparation particuliers, synthétise-t-elle des molécules capables de piéger certains éléments traces comme le cadmium (phytochélatines) ? L'étape supérieure sera de s'intéresser à ces voies de synthèse, si elles existent, et de nous orienter en parallèle vers les biomarqueurs de génotoxicité, comme la 8OHdG. Ces études nous amèneront à développer des outils en biologie moléculaire, voie novatrice chez les bryophytes pour ce genre d'études. Une voie de synthèse potentielle pouvant aboutir à la formation de phytochélatines chez *Ceratodon purpureus*, pourra nous orienter vers la recherche de gènes codant pour ces protéines.

Dans le cadre d'une collaboration avec la Société Bryotec, nous avons pu équiper quatre biostations. Nous avons vu à quel point le vandalisme était présent sur ces sites et nous ne pourrions pas valider ce bryocapteur, tant que nous n'aurons pas réussi à le miniaturiser, afin de l'employer, n'importe où, à l'abri des regards indiscrets.

Grâce aux cultures standardisées de cette bryophyte, le développement de nouveaux outils diagnostics, comme des tests d'écotoxicologie à partir de protonémas de *Ceratodon*, sera réalisable, permettant ainsi d'ajouter à l'ensemble des tests existant, une dimension écologique supplémentaire.

**RÉFÉRENCES
BIBLIOGRAPHIQUES**

- Acworth I.N. & Bailey P.B., 1995. *The handbook of oxidative metabolism*, ESA (ed.), 50p.
- Aebi H., 1984. Catalase *in vitro*. In : Packer, L. (ed.), *Methods in enzymology*, **105**, Academic Press Publisher, London, pp. 121-126.
- Alloway B.J., 1995a. The mobilisation of trace elements in soils. In : C.R. congrès « *Biogéochimie des éléments traces* » Symposium A2, Paris, 15-19 mai 1995, np.
- Alloway B.J., 1995b. *Heavy metals in soils*. Blackie academic and Professional, 367p.
- 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.
- Alscher R.G., Donahue J.L. & Cramer C.L., 1997. Reactive oxygen species and antioxidants relationships in green cells. *Physiologia plantarum*, **100**, 224-233.
- Amiard J.-C., Caquet Th. & Lagadic L., 1997. Les biomarqueurs parmi les méthodes d'évaluation de la qualité de l'environnement. In : Lagadic L., Caquet Th., Amiard J.-C. & Ramade F. (eds.), *Utilisation de biomarqueurs pour la surveillance de la qualité de l'environnement*, Lavoisier Tech & Doc, Paris, pp. XXI-XXXI.
- Anschütz I. & Gessner F., 1954. Der Ionenaustausch bei Torfmossen (*Sphagnum*). *Flora*, **141**, 178-236.
- Antonovics J., 1968. Evolution in closely adjacent plant populations. VI. Manifold effects of gene flow. *Heredity*, **23**, 507-524.
- Antonovics J., Bradshaw A.D. & Turner R.G., 1971. Heavy metal tolerance in plants. *Advances in ecological research*, **7**, 1-85.
- Arkeboom T.P.M. & Sies H., 1990. Glutathione transport and its significance in oxidative stress. In : VIÑA, J. (ed.), *Glutathione : metabolism and physiological functions*, CRC Press Publisher, Boston, pp. 45-54.
- Arndt U., Nobel W. & Schweitzer B., 1987. *Bioindikatoren, Möglichkeiten, Grenzen und neue Erkenntnisse*, Ulmer, V.E. (ed.), Stuttgart, 388p.
- Arnold C. & Gobat J.M., 1998. Modifications texturales des sols alluviaux de la Sarine (Suisse) par les bryophytes. *Ecologie*, **29** (3) : 483-492.
- Arnold F., 1891-1901, Zur Lichenflora von München, *Berichte der Bayerischen Botanischen Gesellschaft zur Erforschung des heimischen Flora*, **1891**, 1-147, **1892**, 1-76, **1897**, 1-45, **1898**, 1-82, **1900**, 1-100, **1901**, 1-24.
- Asada K. & Kiso K., 1973. Initiation of aerobic oxidation of sulfite by illuminated spinach chloroplasts. *European journal of biochemistry*, **33**, 253-257.
- Asada K. & Takahashi M., 1987. Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis. In : Kyle D.J., Osmond C.B. & Arntzen C.J. (eds.), *Photoinhibition*, Elsevier, Amsterdam, pp. 227-288.
- Asakawa Y., 1990. Terpenoids and aromatic compounds with pharmacological activity from bryophytes. In : Zinsmeister H.D. & Mues R. (eds.), *Bryophytes, their chemistry and chemical taxonomy*, Oxford science publication, Clarendon Press, Oxford, pp. 369-410.
- Augier J., 1966. *Flore des bryophytes*. Lechevallier, Paris, 702 pp.

- Babior B.M., 1978. Oxygen dependant microbial killing by phagocytes. *New England journal of medicine*, **298**, 659-668, 721-725.
- Baize D., 1997. *Teneurs totales en éléments traces dans les sols (France)*. I.N.R.A. (ed.), Paris, 401p.
- Baker A.J.M. & Walker P.L., 1990. Ecophysiology of metal uptake by tolerant plants. In : Shaw, A.J. (ed.), *Heavy metal tolerance in plants : evolutionary aspects*. CRC Press, Inc., Boca Raton, FL, pp. 155-177.
- Balachandran S., Hurry V.M., Kelley S.E., Osmond C.B., Robinson S.A., Rohozinski J., Seaton G.G.R. & Sims D.A., 1997. Concept of plant biotic stress some insights into stress physiology of virus-infected plants from the perspective of photosynthesis. *Physiologia plantarum*, **100**, 203-213.
- Barclay-Estrup P. & Rinne R.J.K., 1978. Lead and zinc accumulation in two feather mosses in northwestern Ontario, Canada. *Oikos*, **30**, 106-108.
- Bargagli R., 1993. Plant leaves and lichens as biomonitors of natural and anthropogenic emissions of mercury. In : Markert, B. (ed.), *Plants as biomonitors indicators for heavy metals in the terrestrial environment*, VCH Publisher, Weinheim, pp. 461-484.
- Barkman J.J., 1958. *Phytosociology and ecology of cryptogamic epiphytes*. Van Gorcum, Assen, The Netherlands.
- Bartosz G., 1997. Oxidative stress in plants. *Acta physiologiae plantarum*, **19**, 47-64.
- Basile A., Giordano S., Cafiero G., Spagnuolo V. & Castaldo Cobianchi R., 1994. Tissue and cell localization of experimentally-supplied lead in *Funaria hygrometrica* Hedw. using X-ray SEM and TEM microanalysis. *Journal of bryology*, **18**, 69-81.
- Basile A., Giordano S., Spagnuolo V., Alfano F. & Castaldo Cobianchi R., 1995. Effect of lead and colchicine on morphogenesis in protonemata of the moss *Funaria hygrometrica*. *Annals of botany*, **76**, 597-606.
- Basile D.V., 1964. New procedures of Bryophyte culture which permit alteration of the culture medium during the life cycle. *The bryologist*, **67**, 141-146.
- Bates J.W., 1979. The relationship between physiological vitality and age in shoots segments of *Pleurozium schreberi* (Brid.) Mitt. *Journal of bryology*, **10**, 339-351.
- Bates J.W., 1982. The role of exchangeable calcium in saxicolous calcicole and calcifuge mosses. *New phytologist*, **90**, 239-252.
- Bates J.W., 1987. Nutrient retention by *Pseudoscleropodium purum* and its relation to growth. *Journal of bryology*, **14**, 565-580.
- Bates J.W., 1989. Retention of added K, Ca and P by *Pseudoscleropodium purum* growing under an oak canopy. *Journal of bryology*, **15**, 589-605.
- Bates J.W., 1990. Interception of nutrients in wet deposition by *Pseudoscleropodium purum* : an experimental study of uptake and retention of potassium and phosphorus. *Lindbergia*, **15**, 93-98.
- Bates J.W., 1992. Mineral nutrient acquisition and retention by bryophytes. *Journal of bryology*, **17**, 223-240.
- Bates J.W. & Brown D.H., 1974. The control of cation levels in seashore and inland mosses. *New phytologist*, **73**, 483-495.

- Becker B.F., 1993. Towards the physiological function of uric acid. *Free radicals in biology and medicine*, **14**, 615-631.
- Beckett R.P. & Brown D.H., 1983. *Cellular uptake of heavy metals by bryophytes and lichens*. Proceedings of the 4th international conference on heavy metals in the environment, 447-450.
- Bell B.G., 1980. Cultivation of mosses. *The bryological times*, **2**, 1-2.
- Bell P.R., 1959. The ability of *Sphagnum* to absorb cations preferentially from dilute solutions resembling natural waters. *Journal of ecology*, **47**, 351-355.
- Benedetti A., Comporti M. & Esterbauer H., 1980. Identification of 4-hydroxynonenal as a cytotoxic product originated from the peroxidation of liver microsomal lipids. *Biochimica et biophysica acta*, **620**, 281-296.
- Bengtsson C., Folkeson L. & Göransson A., 1982. Growth reduction and branching frequency at *Hylocomium splendens* near a foundry emitting copper and zinc. *Lindbergia*, **8**, 129-138.
- Berg T. & Steinnes E., 1997. Use of mosses (*Hylocomium splendens* and *Pleurozium schreberi*) as biomonitors of heavy metal deposition : from relative to absolute deposition values. *Environmental pollution*, **98** (1), 61-71.
- Berrie G.G., 1951. Culture of small bryophytes. *Transactions of the british bryological society*, **1**, 485.
- Beyer R.E., 1992. An analysis of the role of coenzyme Q in a free radical generation and as an antioxidant. *Biochemistry and cell biology*, **70**, 390-403.
- Beyer W., Imlay J. & Fridovich I., 1991. Superoxide dismutases. *Progress in nucleic acid research and molecular biology*, **40**, 221-253.
- Biebl R., 1947. Über die gegensätzliche Wirkunde der Spurenelemente Zink und Bor auf die Blattzellen von *Mnium rostratum*. *Österreichische botanische Zeitschrift*, **94**, 61-73.
- Bielski B.H.J. & Richter H.W., 1975. Some properties of the ascorbate free radical. *Annals of the New York academy of sciences*, **258**, 231-237.
- Blandin P., 1986. Bioindicateurs et diagnostic des systèmes écologiques. *Bulletin d'écologie*, **17** (4), 215-307.
- Bloemen M.L., Markert B. & Lieth H., 1995. The distribution of Cd, Cu, Pb and Zn in topsoils of Osnabrück in relation to land use. *Science of the total environment*, **166**, 137-148.
- Boissière J.C., 1991. Chromatographie des substances lichéniques notions de base. *Bulletin de l'association française de lichénologie*, **16** (1), 11-20.
- Bopp M., 1963. Development of the protonemata and bud formation in mosses. *Journal of the linnean society*, **58**, 305-309.
- Borraccino G., Dipiero S., Arrigoni O. 1986. Purification and properties of ascorbate free-radical reductase from potato tubers. *Planta*, **167**, 521- 526.
- Boullet V., 1989. *Expertise écologique de la pelouse métallicole de Mortagne. Bilan et perspectives*. Centre régional de phytosociologie, Haendries, Bailleul, np.
- Boutin A.C., Shirali P., Garçon G., Gosset P., Leleu B., Marez T., Bernard A. & Haguenoer J.M., 1998. Peripheral markers (Clara Cell Protein and α -glutathione S-transferase)

- and lipoperoxidation (malondialdehyde) assessment in Sprague-Dawley rats instilled with haematite and benzo[a]pyrene. *Journal of applied toxicology*, **18** (1), 39-45.
- Boveris A., 1984. Determination of the production of superoxide radicals and hydrogen peroxide in mitochondria. *Methods in enzymology*, **105**, 429-435.
- Bowler C., Van Montagu M. & Inze D., 1992. Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology*, **43**, 83-116.
- Branquinho C. & Brown D.H., 1994. A new method for studying the cellular location of lead in lichens. *The lichenologist*, **26** (1), 83-90.
- Branquinho C., Brown D.H. & Catarino F., 1997a. The cellular location of Cu in lichens and its effects on membrane integrity and chlorophyll fluorescence. *Environmental and experimental botany*, **38**, 165-179.
- Branquinho C., Brown D.H., Máguas C. & Catarino F., 1997b. Lead (Pb) uptake and its effects on membrane integrity and chlorophyll fluorescence in different lichen species. *Environmental and experimental botany*, **37**, 95-105.
- Bray T.M. & Taylor C.G., 1993. Tissue glutathione, nutrition, and oxidative stress. *Canadian Journal of physiology and pharmacology*, **71**, 746-751.
- Brehm K., 1968. Die Bedeutung des Kationenaustausches für den Kationengehalt lebender Sphagnen. *Planta*, **79**, 324-345.
- Brennan R. & Schienstl R.H., 1996. Cadmium is an inducer of oxidative stress in yeast. *Mutation research*, **356**, 171-178.
- Briggs D., 1972. Population differentiation in *Marchantia polymorpha* L. in various lead pollution levels. *Nature*, **238**, 166-167.
- Brot N. & Weissbach I.I., 1983. Biochemistry and physiological role of methionine sulfoxide residues in proteins. *Archives of biochemistry and biophysics*, **223**, 271-281.
- Brown D.H., 1982. Mineral nutrition. In : Smith A.J.E. (ed.), *Bryophyte ecology*, Chapman & Hall, London, pp. 383-444.
- Brown D.H., 1984. Uptake of mineral elements and their use in pollution monitoring. In : Dyer A.F. & Duckett J.G. (eds.), *The experimental biology of bryophytes*, Academic Press, London, pp. 229-255.
- Brown D.H. & Bates J.W., 1972. Uptake of lead by two populations of *Grimmia doniana*. *Journal of bryology*, **7**, 187-193.
- Brown D.H. & Bates J.W., 1990. Bryophytes and nutrient cycling. *Botanical Journal of the linnean society*, **104**, 129-147.
- Brown D.H. & Beckett R.P., 1985. Intracellular and extracellular uptake of cadmium by the moss *Rhytidiadelphus squarrosus*. *Anna. Bot. Lond.*, **42**, 1383.
- Brown D.H. & Brumelis G., 1996. A biomonitoring method using the cellular distribution of metals in moss. *The science of the total environment*, **187**, 153-161.
- Brown D.H. & Buck G.W., 1978. Cation contents of acrocarpous and pleurocarpous mosses growing on a strontium-rich substratum. *Journal of bryology*, **10**, 199-209.
- Brown D.H. & Buck G.W., 1979. Desiccation effects and cation distribution in bryophytes. *New phytologist*, **82**, 115-125.

- Brown D.H. & Buck G.W., 1985. The cellular location of metals in two bryophytes and a lichen. *Cryptogamie, bryologie lichénologie*, **6** (3), 279-286.
- Brown D.H. & House K.L., 1978. Evidence of a copper-tolerant ecotype of the hepatic *Solenostoma crenulatum*. *Ann. Bot.*, **42**, 1383-1392.
- Brown D.H. & Sidhu M., 1992. Heavy metal uptake, cellular location, and inhibition of moss growth. *Cryptogamic botany*, **3**, 82-85.
- Brown D.H. & Wells J.M., 1990. The extracellular and intracellular uptake of inorganic chemicals by bryophytes. In : Zinsmeister H.D. & Mues R. (eds.), *Bryophytes their chemistry and chemical taxonomy*, Clarendon Press, Oxford, pp. 299-318.
- Brown D.H. & Whitehead A., 1986. The effect of mercury on the physiology of *Rhytidiadelphus squarrosus* (Hedw.) Warnst. *Journal of bryology*, **14**, 367-374.
- Bruns I., Friese K., Markert B. & Krauss G.J., 1997. The use of *Fontinalis antipyretica* L. ex Hedw. as a bioindicator for heavy metals. 2. Heavy metal accumulation and physiological reaction of *Fontinalis antipyretica* L. ex Hedw. in active biomonitoring in the River Elbe. *The Science of the total environment*, **204**, 161-176.
- Bruns I., Siebert A., Baumbach R., Miersch J., Günther D., Markert, B. & Krauß G.J., 1995. Analysis of heavy metals and sulphur-rich compounds in the water moss *Fontinalis antipyretica* L. ex Hedw. *Fresenius journal of analytical chemistry*, **353**, 101-104.
- Burcham P.C., 1998. Genotoxic lipid peroxidation products : their DNA damaging properties and role in formation of endogenous DNA adducts. *Mutagenesis*, **13**, 287-305.
- Burton M.A.S. & Peterson P.J., 1979. Metal accumulation by aquatic bryophytes from polluted mine streams. *Environmental pollution*, **19**, 39-46.
- Büscher P., Koedam N. & Van Speybroeck D., 1990. Cation-exchange properties and adaptation to soil acidity in bryophytes. *New phytologist*, **115**, 177-186.
- Byczkowski J.L. & Gessner T., 1988. Biological role of superoxide dismutase. *International Journal of biochemistry*, **20**, 569-589.
- Cadenas E., 1989. Biochemistry of oxygen toxicity. *Annual review of biochemistry*, **58**, 79-110.
- Cai L., Koropatnick J. & Cherian M.G. 1995. Metallothionein protects DNA from copper-induced but not iron-induced cleavage *in vitro*. *Chemico-biological interactions*, **96**, 143-155.
- Cameron A.J. & Nickless G., 1977. Use of mosses as collectors of airborne heavy metals near a melting complex. *Water, air and soil pollution*, **7**, 117-125.
- Candelone J.P., Hong S., Pellone C. & Boutron, C.F., 1995. Post industrial revolution changes in large-scale atmospheric pollution of the northern hemisphere by heavy metals as documented in central Greenland snow and ice. *Journal of geophysical researches*, **100**, 16605-16616.
- Caro A. & Puntarulo S., 1996. Effect of *in vivo* iron supplementation on oxygen radical production by soybean roots. *Biochem. Biophys.*, **320**, 106-114.
- Castaldo R., Ligrone R. & Gambardella R., 1979. A light and electron microscope study on the phylloids of *Leucobryum candidum* (P. Beauv.) Wills. *Revue bryologique et lichénologique*, **45**, 345-360.

- Chance B., Sies H. & Boveris A., 1979. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiological review*, **59**, 527-589.
- Chaoui A., Mazhoudi S., Ghorbal 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.
- Chugh L.K., Gupta V.K. & Sawhney S.K., 1992. Effect of cadmium on enzymes of nitrogen metabolism in pea seedlings. *Phytochemistry*, **31** (2), 395-400.
- Clauzade G. & Roux C., 1985. Likenoj de okcidenta Eŭropo illustrita determinlibro. *Bulletin de la société botanique du centre ouest, N.S.*, numéro spécial 7, 893p.
- Clough W.S., 1975. The deposition of particles on moss and grass surfaces. *Atmospheric environment*, **9**, 1113-1119.
- Clymo R.S., 1963. Ion exchange in *Sphagnum* and its relation to bog ecology. *Annals of botany, N.S.*, **27**, 19-24.
- Combes A.J. & Lepp N.W., 1974. The effect of Cu and Zn on the growth of *Marchantia polymorpha* and *Funaria hygrometrica*. *The bryologist*, **77**, 447-452.
- Corley M.F.V. & Crundwell A.C., 1991. Additions and amendments to the mosses of Europe and the Azores. *Journal of bryology*, **16**, 337-356.
- Corley M.F.V., Crundwell A.C., Düll R., Hill M.O. & Smith A.J.E., 1981. Mosses of Europe and the Azores: an annotated list of species, with synonyms from the recent literature. *Journal of bryology*, **11**, 609-689.
- Corley M.F.V. & Perry A.R., 1985. *Scopelophila cataractae* (Mitt.) Broth. in South Wales, New to Europe. *Journal of bryology*, **13**, 323-328.
- Corpas F.J., Gomez M., Hernandez J.A. & del Rio L.A., 1993. Metabolism of activated oxygen in peroxisomes from two *Pisum sativum* L. cultivars with different sensitivity to sodium chloride. *Journal of plant physiology*, **141**, 160-165.
- Corradini P., 1996. Aide à la décision dans le choix des méthodes de culture des bryophytes : revue bibliographique critique. *Cryptogamie, bryologie lichénologie*, **17** (2), 103-117.
- Cossu C., Doyotte A., Jacquin M.-C. & Vasseur P., 1997. Mécanismes de formation et effets des espèces réactives de l'oxygène. In : Lagadic L., Caquet T., Amiard J.-C. & Ramade F. (eds.), *Biomarqueurs en écotoxicologie aspects fondamentaux*, Masson, Paris, pp. 125-147.
- Costa G. & Spitz E., 1997. Influence of cadmium on soluble carbohydrates free amino acids protein content of *in vitro* cultured *Lupinus albus*. *Plant science*, **128**, 131-140.
- Cotgreave I.A., Weis M., Atzori L. & Moldeus P., 1990. Glutathione and protein function. In : VIÑA, J. (eds.), *Glutathione : metabolism and physiological functions*, CRC Press Publisher, Boston, pp. 155-176.
- Craigie J.S. & Mass W.S.C., 1966. The cation-exchanger in *Sphagnum* spp. *Annals of botany (London) (N.S.)*, **30**, 153-154.
- Cuny D., 1999. *Les impacts communautaires, physiologiques et cellulaires des éléments traces métalliques sur la symbiose lichénique, mise en évidence de mécanismes de tolérance chez Diploschistes muscorum (Scop.) R. Sant.* Thèse pour l'obtention du grade de docteur de l'Université de Lille 2, Lille, 317p.

- Czarnowska K., 1974. The accumulation of heavy metals in soils and plants in Warsaw area exemplified by grasses and mosses. *Polish journal of soil science*, **7**, 117-122.
- Dansereau P. & Pageau G., 1966. Distribution géographique et écologique du *Betula alleghaniensis*. *Mémoire du jardin botanique de Montréal*, **58**, 51-60.
- Daub M.E. & Hangarter R.P., 1983. Production of singlet oxygen and superoxide by the fungal toxin, cersosporin. *Plant physiology*, **73**, 855-857.
- Davies B.E. & White H.M., 1981. Environmental pollution by wind blown lead mine waste : a case study in Wales, U.K. *Science of the total environment*, **20**, 57-74.
- Davies K.J.A., 1986. Intracellular proteolytic systems may function as secondary antioxidant defenses : an hypothesis. *Free radicals in biology and medicine*, **2**, 155-173.
- Davies, K.J.A., 1988. Proteolytic systems as secondary antioxidant defenses. In : Chow C.K. (ed.), *Cellular antioxidant defense mechanisms*, CRC, Boca Raton, FL, pp. 25-67.
- Davies K.J.A. & Goldberg A.L., 1987. Proteins damaged by oxygen radicals are rapidly degraded in extracts of red blood cells. *Journal of biological chemistry*, **262**, 8227-8234.
- De Filippis L.F., 1979. The effects of heavy metal compounds on the permeability of *Chlorella* cells. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, **92**, 39-49.
- De Sloover J. & Le Blanc F., 1970. Pollutions atmosphériques et fertilité chez les mousses et chez les lichens épiphytes. *Bulletin de l'académie et de la société lorraine des sciences*, **9** (1), 82-90.
- De Vos C.H.R., Schat H., Vooijs R. & Ernst W.H.O., 1989. Copper-induced damage to the permeability barrier in roots of *Silene cucubalus*. *Journal of plant physiology*, **135**, 164-169.
- De Vos C.H.R., Vonk M.J., Vooijs R. & Schat H., 1992. Glutathione depletion due to copper-induced damage of the root cell plasmalemma in copper tolerant *Silene cucubalus*. *Physiologia plantarum*, **82**, 523-528.
- Deisseroth A. & Dounce A.L., 1970. Catalase : Physical and chemical properties, mechanism of catalysis and physiological role. *Physiological reviews*, **50**, 319-375.
- del Rio L.A., Palma J.M., Sandalio L.M., Corpas F.J., Pastori G.M., Bueno P. & Lopez-Huertas E., 1996. Peroxisomes as a source of superoxide and hydrogen peroxide in stressed plants. *Biochemistrical society transaction*, **24**, 434-438.
- Deleve L.D. & Kaplowitz N., 1991. Glutathione metabolism and its role in hepatotoxicity. *Pharmacology & Therapeutics*, **52**, 287-305.
- Denayer F.-O., Van Haluwyn C., de Foucault B., Schumacker R. & Colein P., 1999. Use of bryological communities as a diagnostic tool of heavy metal soil contamination (Cd, Pb, Zn) in northern France. *Plant ecology*, **140**, 191-201.
- Deneke S.M. & Fanburg B.L., 1989. Regulation of cellular glutathione. *American journal of physiology*, **257**, 163-173.
- Depledge M.H., Amaral-Mendes J.J., Daniel B., Halbrook R.S., Klopper-Sams P., Moore M.N. & Peakall D.B., 1993. The conceptual basis of the biomarker approach. In : Peakall D.B. & Shugart L.R. (eds.), *Biomarkers research and application in the assessment of environmental health*, NATO Advance Sciences Institutes Series, Springer Verlag, Berlin, pp. 15-29.

- Dhindsa R.S., 1987. Glutathione status and protein synthesis during drought and subsequent rehydration in *Tortula ruralis*. *Plant physiology*, **83**, 816-819.
- Dhindsa R.S., 1991. Drought stress, enzymes of glutathione metabolism, oxidation injury, and protein synthesis in *Tortula ruralis*. *Plant physiology*, **95**, 648-651.
- Dietz F., 1973. The enrichment of heavy metals in submerged plants. In : *Advances in water pollution research*. **62**, Pergamon Press Oxford.
- Dietz K.J., Baier M. & Krämer U., 1999. Free radicals and reactive oxygen species as mediators of heavy metal toxicity in plants. In : Prasad M.N.V. & Hagemayer J. (eds.), *Heavy metal stress in plants. From molecules to ecosystems*, Springer, Berlin, pp. 73-97.
- Dipiero S. & Borracino G., 1991. Dehydroascorbate reductase from potato tubers. *Phytochemistry*, **30**, 427-429.
- Doelman P., 1994. *European perspectives of field research on bioremediation special attention to the Netherlands*, 15^e Congrès mondial de la Science du sol. Acapulco Mexico, juillet 1994, vol 4a, 307-321.
- Doetsch P.W., Helland D.E. & Haseltine W.A., 1986. Mechanism of action of a mammalian DNA repair endonuclease. *Biochemistry*, **25**, 2212-2220.
- Doke N., Miura Y., Sanchez L.M., Park H.J., Noritake T., Yoshioka H. & Kawakita K., 1996. The oxidative burst protects plants against pathogen attack : mechanism and role as an emergency signal for plant bio-defiance - a review. *Gene*, **179**, 45-51.
- Dominy P.J. & Heath R.L., 1985. Inhibition of the K⁺-stimulated ATPase of the plasmalemma of pinto bean leaves by ozone. *Plant physiology*, **77**, 43-45.
- DRIRE 1996. *L'industrie au regard de l'environnement en 1995*. Rapport DRIRE Nord-Pas-de-Calais, 342p.
- Droillard M.J., Paulin, A. & Massot J.C., 1987. Free radical production, catalase and superoxide dismutase activities and membrane integrity during senescence of petals of cut carnations (*Dianthus caryophyllus*). *Plant physiology*, **71**, 197-202.
- Drumm-Herrel H., Gerhäuser U. & Mohr H., 1989. Differential regulation by phytochrome of the appearance of plastidic and cytoplasmic isoforms of glutathione reductase in mustard (*Sinapis alba* L.) cotyledons. *Planta*, **178**, 103-109.
- During H.J., 1979. Life strategies of bryophytes : a preliminary review. *Lindbergia*, **5**, 2-18.
- Dykeman W.R. & de Sousa A.S., 1966. Natural mechanisms of copper tolerance in a copper swamp forest. *Canadian journal of botany*, **44**, 871-878.
- Ebadi M., Leuschen M.P., el Refaey H., Hamada F.M. & Rojas P., 1996. The antioxidant properties of zinc and metallothionein. *Neurochem. Int.*, **29**, 159-166.
- Edwards E.A., Rawsthorne S. & Mullineaux P.M., 1990. Subcellular distribution of multiple forms of glutathione reductase in leaves of pea (*Pisum sativum* L.). *Planta*, **180**, 278-284.
- Egger R., Schlee D. & Türk R., 1994. Changes of physiological and biochemical parameters in the lichen *Hypogymnia physodes* (L.) Nyl. due to action of air pollutants a field study. *Phyton*, **34** (2), 229-242.
- Eichler A., 1875. *Blüthendiagramme*. Engelmann, Leipzig.

- Elia M.R., Borracino G. & Dipiero S., 1992. Soluble ascorbate peroxidase from potato tubers. *Plant Science*, **85**, 17-21.
- Ellison G., Newham J., Pinchin M.J. & Thompson I., 1976. Heavy metal content of moss in the region of Consett (Northeast England). *Environmental pollution*, **11**, 167-174.
- Elstner E.F., 1991. Oxygen radicals - biochemical basis for their efficacy. *Klinischen Wochenschriften*, **69**, 949-956.
- Empain A., 1976. Les bryophytes aquatiques utilisés comme traceurs de la contamination en métaux lourds des eaux douces. *Bulletin de la société royale de botanique de Belgique*, **1. Mémoires**, **7**, 141-156.
- Engel H., 1949. Die Trümmerpflanzen von Münster. *Natur und Heimat (Münster)*, **9**, 1-12.
- Ernst W., 1965. Ökologisch-soziologische Untersuchungen der Schwermetall-Pflanzengesellschaften Mitteleuropas unter Einschluss der Alpen. *Abhand Landesmuseum Naturkunde Münster Westfalen*, **27**, 1-54.
- Ernst W., 1974. *Schwermetallvegetation der Erde*. G. Fischer Verlag, Stuttgart.
- Eshdat Y., Holland D., Faltin Z. & BenHayyim G., 1997. Plant glutathione peroxidases. *Physiologia plantarum*, **100**, 234-240.
- Esterbauer H., Zollner H. & Schaur R., 1988. Hydroxyalkenals : cytotoxic products of lipid peroxidation. *ISI ATLAS of science biochemistry*, **1**, 311-315.
- Estrela J.M. & Pallardó F.V., 1990. Role of glutathione in the regulation of protein synthesis and degradation in eukaryotes. In: VIÑA, J. (eds.), *Glutathione : metabolism and physiological functions*, CRC Press Publisher, Boston, pp. 177-185.
- Fagan J.M. & Waxman L., 1992. The ATP-independent pathway in red blood cells that degrades oxidant-damaged hemoglobin. *Journal of biological chemistry*, **267**, 23015-23022.
- Fagot J., 1993. *Apport de la botanique dans la stratégie de réhabilitation des sites contaminés par les métaux lourds*. Dissertation originale présentée en vue de l'obtention du grade de Docteur en Sciences Agronomiques, Faculté des Sciences Agronomiques de Gembloux, Belgique, 158pp.
- Farage P.K., Long, S.P., Lechner E.G. & Baker N., 1991. The sequence of change within the photosynthetic apparatus of wheat following short-term exposure to ozone. *Plant physiology*, **95**, 529-535.
- Farrington J.A., Ebert M., Land E.J. & Flechter K., 1973. Bipyridylum quaternary salts and related compounds. V. Pulse radiolysis studies of the mode of action of bipyridyl herbicides. *Biochimica et biophysica acta*, **314**, 372-381.
- Fauth H., Hindel R., Siewers U. & Zinner J., 1985. *Geochemischer Atlas Bundesrepublik Deutschland - Verteilung von Schwermetallen in Wässern und Baschsedimenten, Bundesanstalt für Geowissenschaften und Rohstoffe*. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung. Nägele & Obermüller (eds.), Stuttgart.
- Fenton H.J.H., 1894. Oxidation of tartaric acid in the presence of iron. *Journal of chemical society*, **65**, 899-910.
- Flohé L. & Schlegel W., 1971. Glutathion-peroxidase. IV. Intracellular distribution of the glutathione peroxidase system in the rat liver. *Hoppe-Seylers Zeitschrift für Physiologie und Chemie*, **352**, 1401-1410.

- Folkesson L., 1979a. Interspecies calibration of heavy-metal concentrations in nine mosses and lichens-applicability to deposition measurements. *Water, air and soil pollution*, **11**, 253-260.
- Folkesson L., 1979b. *Changes in the cover of mosses and lichens in coniferous woodland polluted with copper and zinc*. National Swedish Environmental Protection Board, Report PM 1151, Solna, Sweden, 59-61.
- Folkesson L., 1983. *Heavy-metal pollution of forest ecosystems*. Dissertation of the University of Lund, Department of Plant Ecology. Lund, Sweden.
- Folkesson L. & Andersson-Bringmark E., 1988. Impoverishment of vegetation in a coniferous forest polluted by copper and zinc. *Canadian journal of botany*, **66**, 417-428.
- Fordham Skelton, A. P., Robinson N. J. & Goldsbrough P. B., 1997. Methalothionein-like genes and phytochelatin in higher plants. In: Silver S. & Walden W. (eds.), *Metal ions in gene regulation*, Chapman, New York, 398-430.
- Foster J.G. & Hess J.L., 1980. Responses of superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities in cotton leaf tissue exposed to an atmosphere enriched in oxygen. *Plant physiology*, **66**, 482-487.
- Foti M., Piatelli M., Baratta M.T. & Ruberto G., 1996. Flavonoids, coumarins, and cinnamic acids as antioxidants in a micellar system. Structure-activity relationship. *Journal of agricultural and food chemistry*, **44**, 497-501.
- Foyer C.H. & Halliwell B., 1976. The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic metabolism. *Planta*, **133**, 21-25.
- Frahm J.-P., 1981. Moose – Leben Fossilien. *Biu Zeitschrift*, **24**, 120-124.
- Frankel E. & Neff W., 1983. Formation of malondialdehyde from lipid oxidation products. *Biochimica et biophysica acta*, **754**, 264-270.
- Frei B., Kim M.C. & Ames B.N., 1990. Ubiquinol-10 is an effective lipid-soluble antioxidant at physiological concentrations. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*, **87**, 4879-4883.
- Fridovich I., 1975. Superoxide dismutases. *Annual review of biochemistry*, **44**, 147-159.
- Furr A.K., Schofield C.L., Grandolfo M.C., Hofstader R.A., Gutenmann W.H., John L.E. & Lisk D.J., 1979. Element content of mosses as possible indicators of air pollution. *Archives of environmental contamination and toxicology*, **8**, 335-343.
- Gallego S.M., Benavides M.P. & Tomaro M.L., 1996. Effect of heavy metal ion excess on sunflower leaves evidence for involvement of oxidative stress. *Plant science*, **121**, 151-159.
- Ganeva A., 1998. Airborne pollution in « Parangalitzta » biosphere reserve (Rila Mountain) estimated by means of bryophytes. *Herzogia*, **13**, 113-118.
- Garty J., 1993. Lichens as biomonitors for heavy metal pollution. In: Markert, B. (ed.), *Plants as biomonitors indicators for heavy metals in the terrestrial environment*, VCH Publisher, Weinheim, pp. 193-264.
- Gaspar T., Penel C., Thorpe T. & Greppin H., 1982. *Peroxidases. 1970-1980. A survey of their biochemical and physiological roles in higher plants*. Centre de Botanique, Université de Genève, Geneva.

- Gay L., 1970. Contribution à l'étude du pouvoir de régénération du gamétophyte feuillé de *Polytrichum juniperinum* Willd. *Bulletin de la société botanique de France*, **117**, 77-82.
- Geldreich E., 1949. Summary of literature on nutrient media used in culturing liverworts, Ohio. *Journal of science*, **49**, 191-194.
- Gerard-Monnier D. & Chaudière J., 1996. Métabolisme et fonction antioxydante du glutathion. *Pathologies et biologie*, **44**, 77-85
- Gerschman R., Gilbert D.L., Nye S.W., Dwyer P. & Fenn W.O., 1954. Oxygen poisoning and X-irradiation : a mechanism in common. *Science*, **119**, 623-626.
- Gignac L.D., 1987. Ecological tolerance and niche structure of *Sphagnum* along a pollution gradient near Sudbury, Ontario, Canada. *Canadian journal of botany*, **65**, 1268-1274.
- Gilbert O.L., 1970. Further studies on the effect of sulphur dioxide on lichens and bryophytes. *New phytologist*, **69**, 605-627.
- Gill R., Martin M.H., Nickless G. & Shaw T.L., 1975. Regional monitoring of heavy metal pollution. *Chemosphere*, **2**, 113-118.
- Gilles G. & Sigler K., 1995. Oxidative stress and living cells. *Folia microbiologica*, **40**, 131-152.
- Gillet F., de Foucault B. & Julve Ph., 1991. La phytosociologie synusiale intégrée : objets et concepts. *Candollea*, **46**, 315-340.
- Glooschenko W.A. & Capobianco J.A., 1978. Metal content of *Sphagnum* mosses from two northern Canadian bog ecosystems. *Water, air and soil pollution*, **10**, 215-220.
- Godbeer W.C., Morgan N.C. & Swaine D.J., 1986. The use of moss to monitor trace elements. *International clean air conference, Sydney Australia*, 789-798.
- Goebel K., 1930. *Organographie der Pflanzen insbesondere der Archegoniaten und Samenpflanzen*. Fischer G. (ed.), Jena.
- Gombert S. & Asta J., 1997. Etude du suivi de la pollution chlorée émise par une usine d'incinération d'ordures ménagères par l'utilisation de bioindicateurs végétaux : lichens et sphaignes. *Ecologie*, **28** (4), 365-372.
- González C., Casanovas S.S. & Pignata M.L., 1996. Biomonitoring of air pollution from traffic and industries employing *Ramalina ecklonii* (Spreng.) Mey. & Flot. in Córdoba, Argentina. *Environmental pollution*, **91** (3), 269-277.
- Goodman G.T. & Roberts T.M., 1971. Plants and soils as indicators of metals in the air. *Nature*, **231**, 287-292.
- Gorenflot R., 1983. *Biologie végétale, plantes supérieures, 1. Appareil végétatif*. Abrégés Masson, Masson, Paris, 240p.
- Goyal R. & Seaward M.R.D., 1982. Metal uptake in terricolous lichens. II. Effects on the morphology of *Peltigera canina* and *Peltigera rufescens*. *New phytologist*, **90**, 73-84.
- Graf E. 1992. Antioxidant potential of ferulic acid. *Free radicals in biology and medicine*, **13**, 435-448.
- Graf E. & Eaton J.W., 1990. Antioxidant functions of phytic acid. *Free radicals in biology and medicine*, **8**, 61-69.

- Grant C.M. & Dawes I.W., 1996. Synthesis and role of glutathione in protection against oxidative stress in yeast. *Redox report*, **2**, 223-229.
- Grodzińska K., 1978. Mosses as bioindicators of heavy metal pollution in Polish national parks. *Water, air and soil pollution*, **9**, 897.
- Groet S.S., 1976. Regional and local variations in heavy metal concentrations of bryophytes in the northeastern United States. *Oikos*, **27**, 445-456.
- Grolle R., 1983. Hepatics of Europe including the Azores: an annotated list of species, with synonyms from the recent literature. *Journal of bryology*, **12**, 403-459.
- Gullvåg B.M., Skaar H. & Ophus E.M., 1974. An ultrastructural study of lead accumulation with leaves of *Rhytidiadelphus squarrosus* (Hedw.) Warnst. A comparison between experimental and environmental poisoning. *Journal of bryology*, **8**, 117-122.
- Gutteridge J.M.C. & Halliwell B., 1993. Transition metal ions and antioxidant proteins in extracellular fluids. In: Scott G. (ed.), *Atmospheric oxidation and antioxidants*, 3, Elsevier Publisher, UK.
- Hadac E. & Smarda J., 1944. Příspěvek k výzkumu společenstev našich rezervací. (Ein Beitrag zur Erforschung der Pflanzengesellschaften unserer Naturschutzgebiete). *Kráska našeho domova, Praha*, **36**, 120-122.
- Halleraker J.H., Reimann C., de Caritat P., Finne T.E., Kashulina G., Niskaavaara H. & Bogatyrev I., 1998. Reliability of moss (*Hylocomium splendens* and *Pleurozium schreberi*) as a bioindicator of atmospheric chemistry in the Barents region: interspecies and field duplicate variability. *The science of the total environment*, **218**, 121-139.
- Halliwell B., 1985. The toxic effects of oxygen on plant tissues. In: Oberley L.W. (ed.), *Superoxide dismutase*, vol. 1, CRC Press, Boca Raton, pp. 89-123.
- Halliwell B., 1987. Oxidative damage, lipid peroxidation and antioxidant protection in chloroplasts. *Chemistry and physiology of lipids*, **44**, 327-340.
- Halliwell B. & Gutteridge J.M.C., 1989. *Free radicals in biology and medicine*, 2nd ed. Clarendon Press, Oxford.
- Hartman E.L., 1969. The ecology of the « copper moss » *Mielichhoferia mielichhoferi* in Colorado. *The bryologist*, **72**, 56-59.
- Haseloff H.P., 1979. Veränderungen in CO₂-Gaswechsel von Laubmosen nach experimentellen Belastungen mit Schwermetallverbindungen. *Bryophytorum bibliotheca*, **19**, 1-126.
- Haseloff H.P. & Winkler S., 1980. Influence of heavy metal ions on the gas exchange of mosses. *Cryptogamie, bryologie lichénologie*, **1**, 53-65.
- Hazell P. & Gustafsson 1999. Retention of trees at final harvest - evaluation of a conservation technique using epiphytic bryophyte and lichen transplants. *Biological conservation*, **90**, 133-142.
- Héban C., 1977. *The conducting tissues of bryophytes*. Cramer, J. (ed.), Vaduz.
- Hébrard J.P., Foulquier L. & Grauby A., 1974. Approche expérimentale sur les possibilités du transfert du ⁹⁰Sr d'un substrat solide à une mousse terrestre : *Grimmia orbicularis* Bruch. *Bulletin de la société botanique de France*, **121**, 235-250.

- Heinrich W., 1984. Über den Einfluß von Luftverunreinigungen auf Ökosysteme. III. Beobachtungen im Immissionsgebiet eines Düngemittelwerkes. *Wissenschaftliche Zeitschrift der Universität Jena, naturwissenschaftliche Reihe*, **33**, 251-289.
- Hernandez J.A., Corpas F.J., Gomez M., del Rio L.A. & Sevilla, F., 1993. Salt-induced oxidative stress mediated by activated oxygen species in pea leaf mitochondria. *Physiologia plantarum*, **89**, 103-110.
- Herrmann R., 1976. Modellvorstellungen zur räumlichen Verteilung von Spurenmetall-Verunreinigungen in der Bundesrepublik Deutschland, angezeigt durch den Metallgeschalt in epiphytischen Moosen. *Erdkunde*, **30**, 241-253.
- Hippeli S. & Elstner E.F., 1996. Mechanisms of oxygen activation during plant stress : biochemical effects of air pollutants. *Journal of plant physiology*, **148**, 249-257.
- Holmgren A., 1989. Thioredoxin and glutaredoxin systems. *Journal of biological chemistry*, **264**, 13963- 13966.
- Howlett N. & Avery S., 1997. Induction of lipid peroxidation during heavy metal stress in *Saccharomyces cerevisiae* and the influence of plasma membrane fatty acid unsaturation. *Applied and environmental microbiology*, **63** (8), 2971-2976.
- Huckabee J.W., 1973. Mosses : sensitive indicators of airborne mercury pollution. *Atmospheric environment*, **7**, 749-754.
- Huckabee J.W. & Janzen S.A., 1975. Mercury in moss : derived from the atmospheric or from the substrate ? *Chemosphere*, **1**, 35-60.
- Hynninen V., 1986. Monitoring of airborne metal pollution with moss bags near an industrial source at Harjavalta, southwest Finland. *Annales botanici fennici*, **23**, 890.
- IFEN, 1998. *L'environnement en France*, Institut Français de l'Environnement, La découverte, Paris, p85.
- Ingold K.U., Webb A.C., Witter D., Burton G.W., Metcalfé T.A., Muller D.P.R., 1987. Vitamin E remains the major lipid-soluble, chain-breaking antioxidant in human plasma even in individuals suffering severe vitamin E deficiency. *Archives of biochemistry and biophysics*, **259**, 224-225.
- Inoue S., Ishida A. & Kodama M., 1981. Cellulose and uronic acid contents of cell-wall isolated from gametophytes of some mosses and liverworts. *Journal of the Hattori botanical laboratory*, **49**, 141-145.
- Jackson P.P., Robinson N.J. & Whitton B.A., 1991. Low molecular weight metal complexes in the freshwater moss *Rhynchostegium riparioides* exposed to elevated concentrations of Zn, Cu, Cd and Pb in the laboratory and field. *Environmental and experimental botany*, **31**, 359-366.
- Jahnke L.S., Hull M.R. & Long, S.P., 1991. Chilling stress and oxygen metabolizing enzymes in *Zea mays* and *Zea diploperennis*. *Molecular and cellular biochemistry*, **158**, 77-79.
- Joenje H., 1989. Genetic toxicology of oxygen : a review. *Mutation Research*, **219**, 193-208.
- Johnsen I. & Rasmussen L., 1977. Retrospective study (1944-1976) of heavy metals in the epiphyte *Pterogonium gracile* collected from one phorophyte. *The bryologist*, **80**, 625-629.

- Johnsen I., Pilegaard K. & Nyman E., 1983. Heavy metal uptake in transplanted and *in situ* yarrow (*Achillea millefolium*) and epiphytic cryptogams at rural urban and industrial localities in Denmark. *Environmental Monitoring and Assessment*, **3**, 13-22.
- Julve Ph., 1993. Synopsis phytosociologique de la France (communautés de plantes vasculaires). *Lejeunia* N.S., **140**, 1-160.
- Kaiser W.M., 1979. Reversible inhibition of the Calvin cycle and activation of oxidative pentose phosphate cycle in isolated chloroplasts by hydrogen peroxide. *Planta*, **145**, 377-382.
- Kamal-Eldin A. & Appelqvist L.A., 1996. The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids*, **31**, 671-701.
- Kamp-Nielsen L., 1971. The effect of deleterious concentrations of mercury on the photosynthesis and growth of *Chlorella pyrenoidosa*. *Physiologia plantarum*, **24**, 556-561.
- Kandasamy M.K. & Kristen U., 1989. Influence of triethylenediamine on growth and ultrastructure of tobacco pollen tubes. *Environmental experimental botany*, **29**, 283-292.
- Kehrer J.P., 1993. Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *Critical reviews in toxicology*, **23**, 21-48.
- Keller T., 1974. Verkehrsbedingte Luftverunreinigungen und Vegetation. Eidgenössische Anstalt für das Forstliche. *Versuchswesen Bericht*, **132**, Birmensdorf.
- Kendall A.C., Keys A.J., Turner J.C., Lea P.J. & Mifflin B.J., 1983. The isolation and characterization of a catalase-deficient mutant of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Planta*, **159**, 505-511.
- Klein R.M. & Bliss M., 1984. Decline in surface coverage by mosses on Camels Hump Mountain, Vermont : possible relationship to acidic deposition. *The bryologist*, **87**, 128-131.
- Kneer R. & Zenk M.H., 1992. Phytochelatins protect plant enzymes from heavy metal poisoning. *Phytochemistry*, **31** (8), 2663-2667.
- Knight A.H., Crooke W.M. & Inkson H.E., 1961. Cation-exchange capacities of tissues of higher and lower plants and their related uronic acid contents. *Nature*, **192**, 142-143.
- Koedam N. & Büscher P., 1983. Studies on the possible role of cation exchange capacity in the soil preferences of mosses. *Plant and soil*, **70**, 77-93.
- Koeman J.H., Köhler-Günther A., Kurelec B., Rivière J.L., Versteeg D. & Walker C.H., 1993. Applications and objectives of biomarkers research. In : Peakall D.B. & Shugart L.R. (eds.), *Biomarkers research and application in the assessment of environmental health*, NATO Advance Sciences Institute Series vol. 68, Springer Verlag, Berlin, pp. 1-13.
- Kofler L., 1959. Contribution à l'étude biologique des mousses cultivées *in vitro* : germination des spores, croissances et développement du protonéma chez *Funaria hygrometrica*. *Revue bryologique et lichénologique*, **28** (1-2), 1-202.
- Kozubek A., Nienartowicz B., 1995. Cereal grain resorcinolic lipids inhibit H₂O₂-induced peroxidation of biological membranes. *Acta biochimica polonica*, **42**, 309-316.

- Kranmer I. & Grill D., 1994. Rapid changes of the glutathione status and the enzymes involved in the reduction of glutathione disulfide during the initial stage of wetting of lichens. *Cryptogamic botany*, **4**, 203-206.
- Kranmer I. & Grill D., 1995. The role of glutathione and related enzymes in seeds and poikilohydric plants during desiccation and rehydratation. *Acta pharmacologica*, **45**, 157-163.
- Krupinska J., 1976. Influence of lead tetraethyl on the growth of *Funaria hygrometrica* L. and *Marchantia polymorpha* L. *Acta societatis botanicorum poloniae*, **45**, 421-432.
- Kuik P., Blauw M., Sloof J.E. & Wolterbeek, H.Th., 1993. Application of Monte-Carlo assisted factor analysis to large sets of environmental pollution data. *Atmospheric environment*, **27A** (13), 1975-1983.
- Kuik P. & Wolterbeek H.Th., 1994. Factor analysis of trace-element data from tree-bark samples in the Netherlands. *Environmental monitoring and assessment*, **32**, 207-226.
- Kuik P. & Wolterbeek H.Th., 1995. Factor analysis of atmospheric trace-element deposition data in the Netherlands obtained by moss monitoring. *Water, air and soil pollution*, **84**, 323-346.
- Lagadic L. & Caquet T., 1996. Marqueurs biologiques de pollution. *Phytoma*, **480**, 10-13.
- Lagadic L., Caquet T. & Amiard J.C., 1997. Biomarqueurs en écotoxicologie, principes et définitions. In: Lagadic L., Caquet T., Amiard J.C. & Ramade F. (eds.), *Biomarqueurs en écotoxicologie, aspects fondamentaux*, Masson, Paris, pp. 1-10.
- Lal M., 1984. The culture of bryophytes including apogamy, apospory, parthenogenesis and protoplasts. In: Dyer A.F. & Duckett J.G. (eds.), *The experimental biology of bryophytes*, Academic Press, London, pp. 97-116.
- Lambinon J. & Auquier P., 1963. La flore et la végétation des terrains calaminaires de la Wallonie septentrionale et de la Rhénanie aixoise. Types chorologiques et groupes écologiques. *Natura mosana*, **16**, 113-130.
- Landwehr J., 1980. *Atlas Nederlands Levermossen*. Koninklijke Nederlands Naturhistorische Vereniging, Netherlands, 283 pp.
- Landwehr J., 1984. *Nieuwe Atlas Nederlands Bladmossen*. Koninklijke Nederlands Naturhistorische Vereniging, Netherlands, 568 pp.
- Larson D.W., 1981. Differential wetting in some lichens and mosses: The role of morphology. *The bryologist*, **84**, 1-15.
- Le Blanc F. & Rao D.N., 1966. Réaction de quelques lichens et mousses épiphytes à l'anhydride sulfureux dans la région de Sudbury. *The bryologist*, **69**, 338-345.
- Le Blanc F. & Rao D.N., 1973. Effects of sulphur dioxide on lichen and moss transplanted. *Ecology*, **54** (3), 612-614.
- Le Blanc F., Robitaille G. & Rao D.N., 1974. Biological response of lichens and bryophytes to environmental pollution in the Murdockville copper mine area, Quebec. *Journal of the Hattori botanical laboratory*, **38**, 405-433.
- Lecointe A. & Provost M., 1970. Etude de la végétation du mont Pinçon (Calvados), recherches écologiques, phytosociologiques et phytogéographiques, sur les phanérogames et les bryophytes. *Mémoires de la société linnéenne de Normandie*, **3**, 213p.

- Lecoïnte A. & Schumacker R., 1988. *Scopelophila cataractae* (Mitt.) Broth. (Musci, Pottiaceae), nouveau pour la Normandie, dans l'Orne. *Bulletin de la société botanique du Centre-Ouest*, **19**, 245-248.
- Lécuru C. & Courtecuisse R., 1998. Analyse de la fonge du terril Sainte-Marie à Auberchicourt (Nord). *Bulletin de la société mycologique du Nord*, **64**, 17-30.
- Lee C.K., Low K.S. & Looi P.S.T., 1983. Heavy metals in some Malaysian mosses. *Pertanica*, **6**, 48-55.
- Lee, J.A., 1972. Lead pollution from a factory manufacturing anti-knock compounds. *Nature*, **238**, 165-166.
- Legendre L., Rueter S., Heinsteïn P.F. & Low P.S., 1993. Characterization of the oligogalacturonide-induced oxidative burst in cultured soybean (*Glycine max*) cells. *Plant physiology*, **102**, 233-240.
- Lellouch J. & Lazar P., 1974. *Méthodes statistiques en expérimentation biologique*. Editions Flammarion Médecine-Sciences, 283p.
- Lembrechts J.F.M. & Vanderborght L.J., 1985. Mineral content of *Sphagnum* mosses in Belgian bog ecosystems. *Journal of environmental quality*, **14**, 217-224.
- Lepp N.W. & Roberts M.J., 1977. Some effects of cadmium on growth of bryophytes. *The bryologist*, **80**, 533-536.
- Levine A., Tenhaken R., Dixon R. & Lamb C., 1994. H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell*, **79**, 583-593.
- Levitt J., 1980. *Responses of plants to environmental stress. 1 : Chilling, freezing and high temperature stress*, Academic Press, New York.
- Lim B.P., Nagao A., Terao J., Tanaka K., Suzuki T. & Takama K., 1992. Antioxidant activity of xanthophylls on peroxy radical-mediated phospholipid peroxidation. *Biochimica et biophysica acta*, **1126**, 178-184.
- Lind C., Hochstein P. & Ernster L., 1982. DT-Diaphorase as a quinone reductase : a cellular control device against semiquinone and superoxide radical formation. *Archives of biochemistry and biophysics*, **216**, 178-185.
- Little P. & Martin M.H., 1974. Biological monitoring of heavy metal pollution. *Environmental pollution*, **6**, 1-19.
- Lobreaux S. & Briat, J.F., 1991. Ferritin accumulation and degradation in different organs of pea (*Pisum sativum*) during development. *Biochemical journal*, **274**, 601-606.
- Longton R.E., 1981. Inter-population variation in morphology and physiology in the cosmopolitan moss *Bryum argenteum* Hedw. *Journal of bryology*, **11**, 501-520.
- Lötschert W., 1982. The heavy metal content of some Irish plants. *Journal of life sciences*, **3**, 261-266.
- Lötschert W., 1983. Immissionsanalysen in Raum Frankfurt unter Verwendung pflanzlicher Bioindikatoren. *Verhandlungen der Gesellschaft für Ökologie (Festschrift Ellenberg)*, **11**, 277-290.
- Lötschert W. & Wandtner R., 1982. Schwermetallakkumulation of *Sphagnetum magellanici* aus Hochmooren der Bundesrepublik Deutschland. *Berichte der deutschen botanischen Gesellschaft. Berlin*, **95**, 341-355.

- Lötschert W., Wandtner R. & Hiller H., 1975. Schwermetallanreicherung bei Bodenmoosen in Immissionsgebieten. *Berichte der deutschen botanischen Gesellschaft. Berlin*, **88**, 419-431.
- Low K.S., Lee C.K., Loi S.T. & Phoon A., 1985. The use of the moss, *Calymperes delessertii* Besch., as a bioindicator to airborne heavy metals. *Pertanika*, **8**, 109-114.
- Low P.S. & Merida J.R., 1996. The oxidative burst in plant defense : function and signal transduction. *Physiologia plantarum*, **96**, 533-542.
- MacNair M.R., 1977. Major genes for copper tolerance in *Mimulus guttatus*. *Nature*, **268**, 428-430.
- Mäkinen A., 1983. *Heavy metal and arsenic concentration of a woodland moss Hylocomium splendens (Hedw.) Br. et Sch. growing around a coal-fired power plant in coastal souther Finland*. Statens Vattenfallsverk, proj. Kol-Hälsa-Miljö, Vällingby, Sweden.
- Makomaska M., 1979. Heavy metals contamination of pinewoods in the Niepolomice forest (Southern Poland). *Bulletin de l'académie polonaise des sciences, série des sciences biologiques*, **26**, 679-685.
- Manning W.J. & Feder W.A., 1980. *Biomonitoring air pollutants with plants*. Applied Science Publishers, London.
- Margot J., 1980. *Vegetative multiplication of cryptogams, an experimental test of pollution by heavy metals*. Proceedings of the 3rd international conference « Bioindicateurs deteriorationis regionis », Liblice, sept. 1977 Praha, 391-401.
- Markert B., 1991. Inorganic chemical investigations in the Forest Biosphere reserve near Kalinin, USSR. I. Mosses and peat profiles as bioindicators for different chemical elements. *Vegetatio*, **95**, 127-135.
- Markert B. (ed.), 1993. *Plants as biomonitors indicators for heavy metals in the terrestrial environment*, VCH Publisher, Weinheim, 644p.
- Markert B., 1994. The Biological System of the Elements (BSE) for terrestrial plants (glycophytes). *The science of the total environment*, **155**, 221-228.
- Markert B. & de Li Z., 1991. Inorganic chemical investigations in the Forest Biosphere reserve near Kalinin, USSR II. Distribution of lanthanide elements in the vegetation cover. *Vegetatio*, **97**, 57-62.
- Markert B. & Weckert V., 1989. Grenzen passiven Biomonitorings am Beispiel von *Polytrichum formosum* (Hedw.). *Verhandlungen der Gesellschaft für Ökologie (Essen 1988)*, **18**, 867-872.
- Markert B. & Wtorova W., 1992. Inorganic chemical investigations in the Forest Biosphere reserve near Kalinin, USSR. III. Comparison of the multielement budget with a forest ecosystem in Germany - aspects of rejection, indication and accumulation of chemical elements. *Vegetatio*, **98**, 43-58.
- Markert B., Herpin U., Berlekamp J., Oehlmann J., Grodzinska K., Mankovska B., Suchara I., Siewers U., Weckert V. & Lieth H., 1996. A comparison of heavy metal deposition in selected Eastern European countries using the moss monitoring method, with special emphasis on the « Black Triangle ». *The science of the total environment*, **193**, 85-100.
- Marstaller R., 1987. Zur Beeinflussung einiger Mossgesellschaften durch Luftverunreinigung. 26. Beitrag zur Mossvegetation Thüringens. *Hercynia*, **24**, 279-297.

- Mårtensson O. & Berggren A., 1954. Some notes on the ecology of the « copper mosses ». *Oikos*, **5**, 99-100.
- Martin M.H. & Coughtrey P.J., 1982. *Biological monitoring of heavy metal pollution land and air*. Applied Science, London.
- Maschke J., 1981. Moose als Bioindikatoren von Schwermetall-Immissionen. *Bryophytorum bibliotheca*, **22**, 1-492.
- Maurel-Kermarrec A., Pally M., Foulquier L. & Hébrard J.P., 1983. Cinétique de la fixation d'un mélange de césium 137, de chrome 51, de cobalt 60, de manganèse 54 et de sodium 22 par *Platyhypnidium riparioides* (Hedw.) Dix. *Cryptogamie, bryologie lichénologie*, **4**, 299.
- McCord J.M., 1983. The superoxide free radical in biochemistry and pathophysiology. *Surgery*, **94** (3), 412-414.
- McCord J.M., 1985. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *New England journal of medicine*, **312**, 159-163.
- McCord J.M. & Day E.D., 1978. Superoxide-dependent production of hydroxyl radical catalyzed by iron EDTA complex. *Federation of european biochemical societies letters*, **86**, 139-142.
- McCord J.M. & Fridovich I., 1969a. Superoxide dismutase activity in red blood cells. *Journal of biological chemistry*, **244**, 6049-6055.
- McCord J.M. & Fridovich I., 1969b. Superoxide dismutase. An enzymatic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *Journal of biological chemistry*, **244**, 6049-6055.
- McGrath S.P., 1997. Behaviour of trace elements in terrestrial ecosystems. In : *Contaminated soils*, Prost R. (ed.), I.N.R.A., Paris, pp. 35-54.
- McLean R.O. & Jones A.K., 1975. Studies of tolerance to heavy metals in the flora of the rivers Ystwyth and Clarach, Wales. *Freshwater biology*, **5**, 431-444.
- McNeilly T., 1968. Evolution in a closely adjacent plant populations. III. *Agrostis tenuis* on a small copper mine. *Heredity*, **23**, 99-108.
- McNeilly T., 1979. Studies on the ecological genetics of heavy metal tolerant plant populations. *Aquilo, series in zoology*, **20**, 17-25.
- McQueen C.B., 1991. Laboratory and greenhouse cultures and the experimental taxonomic of bryophytes. *Advances in bryology*, **4**, 103-120.
- Meister A., 1983. Selective modification of glutathione metabolism. *Science*, **220**, 472-477.
- Meister A. & Anderson M.E., 1983. Glutathione. *Annual review of biochemistry*, **52**, 711-760.
- Merian E. (ed.), 1991. *Metal and their compounds in the environment : occurrence, analysis and biological relevance*, VCH, 1438p.
- Métraux J.P., 1998. *Role of salicylic acid in systemic induced resistance in plant*. Conférence plénière aux 19^{èmes} International Conference on polyphenols, Lille, 1-4 septembre, np.
- Miller N.D., 1984. Tertiary and quaternary fossils. In : Schuster R.M. (ed.), *New manual of bryology*, vol. 2, Hattori botanical laboratory, Nichinan Miyazaki, pp. 1194-1232.
- Miller N.G. & Ambrose J.H., 1976. Growth in culture of wind-blown Bryophytes gametophyte fragments from Arctic Canada. *The bryologist*, **79**, 55-63.

- Modenesi P., 1993. An SEM study of injury symptoms in *Parmotrema reticulata* treated with paraquat or growing in sulphur dioxide-polluted air. *The lichenologist*, **25** (4), 423-433.
- Mondano M. & Smith W.H., 1974. Mercury content of soil, mosses, and conifers along an urban-suburban transect. *Environmental conservation*, **1**, 201-203.
- Monk L. S., Fagerstedt K. V. & Crawford R. M., 1989. Oxygen toxicity and superoxide dismutase as an antioxidant in physiological stress. *Physiologia plantarum*, **76**, 456-459.
- Motoyama T., Miki M., Mino M., Takahaschi M. & Niki E., 1989. Synergistic inhibition in dispersed phosphatidylcholine liposomes by a combination of vitamin E and cysteine. *Archives of biochemistry and biophysics*, **270**, 655-661
- Munday R. & Winterbourn C.C., 1989. Reduced glutathione in combination with superoxide dismutase as an important biological anti-oxidant defence mechanism. *Biochemical pharmacology*, **38** (24), 4349-4352.
- Naef J. & Simon P., 1978. Etude de la croissance de protonemas de mousse *Funaria hygrometrica* en milieu liquide. *Saussurea*, **9**, 51-56.
- Nagano I., Kato Y. & Ezaki H., 1969. Ecological notes of *Scopelophila (Merceya)*. *Journal of the college of liberal arts, Saitama university of natural sciences*, **5**, 5-13.
- Nakano Y. & Asada K., 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant cell physiology*, **22**, 867-880.
- National Research Council, 1987. Biological markers in environmental health research. *Environmental health perspectives*, **74**, 3-9.
- Navari-Izzo F., Quartacci M.F. & Sgherri C.M.L., 1996. Superoxide generation in relation to dehydration and rehydration. *Biochemical society transactions*, **24**, 447-451.
- Neuzil J. & Stocker R., 1993. Bilirubin attenuates radical-mediated damage to serum albumin. *Federation of european biochemical societies letters*, **331**, 281-284.
- Nicklasson A. & Söderberg I., 1980. Växtligheten vid gruvfältet Fredriksberg i Småland. *Svensk botanisk tidskrift*, **74**, 19-24.
- Nieboer E. & Richardson H.S., 1980. The replacement of the nondescript term « heavy metals » by a biologically and chemically significant classification of metal ions. *Environmental pollution (series B)*, **1**, 3-26.
- Nieboer E., Puckett K.J., Richardson D.H.S., Tomassini F.D. & Grace B., 1977. Ecological and physiochemical aspects of the accumulation of heavy metals and sulphur in lichens. *International conferences on heavy metals in environment (Symp. Proc.) 1st, 1975, vol 2*, 331-352.
- Nieboer E., Richardson D.H.S. & Tomassini F.D., 1978. Mineral uptake and release by lichen an overview. *The bryologist*, **81**, 226-246.
- Niewiadomska E. & Miszalski Z., 1997. Determination of some oxidative stress parameters in variegated leaves of *Chlorophytum comosum* (Thunb.) Bak. *Acta physiologiae plantarum*, **19** (1), 33-39.
- Noguchi A., 1956. On some mosses of *Merceya*, with special reference to the variation and ecology. *Kumamoto journal of science*, **2**, 239-257.

- Nylander M.W., 1866. Les lichens du jardin du Luxembourg. *Bulletin de la société botanique de France*, **13**, 364-372.
- Okuda T., Matsuda Y., Sugawara M. & Sagisaka S., 1992. Metabolic response to treatment with cold, paraquat or 3-amino-1,2,4-triazole in leaves of winter wheat. *Bioscience biotechnology and biochemistry*, **56**, 1911-1915.
- Oliver M.J., Wood A.J. & O'Mahony P., 1997. How some plants recover from vegetative desiccation : A repair based strategy. *Acta physiologiae plantarum*, **19** (4), 419-425.
- Onianwa P.C. & Ajayi S.O., 1987. Heavy metal contents of epiphytic acrocarpous mosses within inhibited sites in southwest Nigeria. *Environmental interest*, **13**, 191-196.
- Pakarinen P., 1977. Element contents of *Sphagna* : variation and its sources. *Bryophytorum bibliotheca*, **13**, 751-762.
- Pakarinen P., 1978. Distribution of heavy metals in the *Sphagnum* layer of bog hummocks and hollows. *Annales botanici fennici*, **15**, 287-292.
- Pakarinen P., 1981. Metal content of ombrotrophic *Sphagnum* mosses in NW Europe. *Annales botanici fennici*, **18**, 281-292.
- Pakarinen P. & Rinne R.J.K., 1979. Growth rates and heavy metal concentrations of five moss species in paludified spruce forests. *Lindbergia*, **5**, 77-83.
- Pakarinen P. & Tolonen K., 1976. Regional survey of heavy metals in peat mosses (*Sphagnum*). *Ambio*, **5**, 38-40.
- Palozza P. & Krinsky N.I., 1992. Astaxanthin and canthaxanthin are potent antioxidants in a membrane model. *Archives of biochemistry and biophysics*, **297**, 291-295.
- Pastori G.M. & Trippi V.S., 1992. Oxidative stress induces high rate of glutathione reductase synthesis in a drought-resistant maize strain. *Plant cell physiology*, **33**, 957-961.
- Paus S.M., 1997. Die Erdflechtenvegetation nordwestdeutschlands und einiger Randgebiete. *Bibliotheca lichenologica*, **66**, 1-222.
- Pelmont J., 1989. *Enzymes*. Presses Universitaires de Grenoble, Grenoble, 147p.
- Pendias A. & Pendias H., 1992. *Trace elements in soils and plants*. CRC Press, Boca Raton.
- Percy K.E., 1983. Heavy metals and sulphur concentrations in *Sphagnum magellanicum* Brid. in the maritime provinces. Canada. *Water, air and soil pollution*, **19**, 341-349.
- Percy K.E. & Borland S.A., 1985. A multivariate analysis of element concentrations in *Sphagnum magellanicum* Brid. in the maritime provinces, Canada. *Water, air and soil pollution*, **25**, 331-338.
- Persson H., 1948. On the discovery of *Merceya ligulata* in the Azores with a discussion of the so-called « copper mosses ». *Revue bryologique et lichénologique*, **17**, 75-78.
- Persson H., 1956. Studies in « copper mosses ». *Journal of the Hattori botanical laboratory*, **17**, 1-18.
- Pickering D.C. & Puia I.L., 1969. Mechanism for the uptake of zinc by *Fontinalis antipyretica*. *Physiologia plantarum*, **22**, 653-661.
- Pilegaard K., 1979. Heavy metals in bulk precipitation and transplanted *Hypogymnia physodes* and *Dicranoweisia cirrata* in the vicinity of a Danish steelwork. *Water, air and soil pollution*, **11**, 77-91.

- Polle A., Otter T. & Seifert T., 1994. Apoplastic peroxidases and lignification in needles of Norway spruce (*Picea abies* L.). *Plant physiology*, **106**, 53-60.
- Pré J., 1991. La lipoperoxydation. *Pathologie biologique*, **39** (7), 716-736.
- Price A.H., Atherton N.M. & Hendry G.A.F., 1989. Plants under drought-stress generate activated oxygen. *Free Rad. Res. Comm.*, **8**, 61-66.
- Proctor M.C.F., 1984. Structure and Ecological Adaptation. In : Dyer A.F. & Duckett J.G. (eds.), *The experimental biology of bryophytes*. Academic Press, London, pp. 9-37.
- Proskauer J., 1969. Studies on Anthocerotales VIII. *Phytomorphology*, **19**, 52-66.
- Prost R., 1997. *Contaminated soils*, I.N.R.A. (ed.), Paris, 525p.
- Prudent P., Valentin N., Domeizel, M., Massiani C. & Prone A., 1995. Spéciation du plomb dans un sol amendé par compost : apport de différentes techniques analytiques. In : C.R. congrès « Biogéochimie des éléments traces » *Symposium A1*, Paris, 15-19 mai 1995.
- Purvis O.W., Coppins B.J., Hawksworth D.L., James P.W. & Moore D.M., 1992. *The lichen flora of Great Britain and Ireland*. Natural History Museum Publications (ed.), London, 710p.
- Puustjärvi V., 1955. On the colloïdal nature of peat-forming mosses. *Archivum societatis zoologicae botanicae fennicae « Vanamo »*, supplement, **9**, 257-272.
- Puustjärvi V., 1959. On the cation uptake mechanism of *Sphagnum* mosses. *Maataloust. aikakausk.*, **31**, 103-119.
- Rabinovitch H.D. & Fridovich I., 1983. Superoxide radicals, superoxide dismutases and oxygen toxicity in plants. *Photochemistry and photobiology*, **37**, 679-690.
- Rabinovitch H. D. & Sklan D., 1981. Superoxide dismutase activity in ripening cucumber and pepper fruit. *Physiologia plantarum*, **52**, 380-384.
- Raeymaekers G. & Glime J.M., 1986. Effects of simulated acid rain and lead interaction on the phenology and chlorophyll content of *Pleurozium schreberi* (Brid.) Mitt. *Journal of the Hattori botanical laboratory*, **61**, 525-541.
- Ramos J.A., Bermejo E., Zapardiel A., Pérez J.A. & Hernández L., 1993. Direct determination of lead by bioaccumulation at a moss-modified carbon paste electrode. *Analytica chimica acta*, **273**, 219-227.
- Rasmussén L., 1978. Element content of epiphytic *Hypnum cupressiforme* related to element content of the bark of different species of phorophytes. *Lindbergia*, **4**, 209-218.
- Rasmussén L. & Johnson I., 1976. Uptake of minerals, particularly metals, by epiphytic *Hypnum cupressiforme*. *Oikos*, **27**, 483-487.
- Ratcliffe J.M., 1975. An evaluation of the use of biological indicators in an atmospheric lead survey. *Atmospheric environment*, **9**, 623-629.
- Raunkiaer C., 1934. *The life forms of plants*. Clarendon, Oxford, 632p.
- Redinbaugh M.G., Sabre M. & Scandalios J.G., 1990. The distribution of catalase activity, isozyme protein and transcript in the tissues of the developing maize seedling. *Plant physiology*, **92**, 375-380.
- Rejmont-Grochowska I., 1976. Concentration of heavy metals lead, iron, manganese, zinc and copper, in mosses. *Journal of the Hattori botanical laboratory*, **41**, 225-230.

- Rennenberg H. & Lamoureux G., 1990. In : Rennenberg H., Brunold Ch., De Kok L.J. & Stulen I. (eds.), *Sulfur nutrition and sulfur assimilation in higher plants*, SPB Academic Publishing, The Hague, pp. 53.
- Rhee S.G. & Chae H.Z. 1994. Thioredoxin peroxidase and peroxiredoxin family. *Molecular cells*, **4**, 137-142.
- Rice-Evans C.A., Diplock A.T. & Symons M.C.R., 1991. *Techniques in free radical research in laboratory techniques in biochemistry and molecular biology*, Burton, R.H. & Van Knippenberg, P.H. (eds.).
- Richards P.W., 1947. The cultivation of mosses and liverworts. *Transactions of the british bryological society*, **1**, 1-3.
- Rinne R.J.K. & Barclay-Estrup P., 1980. Heavy metals in a feather moss, *Pleurozium schreberi*, and in soils in NW Ontario, Canada. *Oikos*, **34**, 59-64.
- Robert M., 1996. *Le sol : interface dans l'environnement ressource pour le développement*, Masson, Paris, 244p.
- Roderer G. & Reiss HD., 1988. Different effects of inorganic and triethyl lead on growth and ultrastructure of Lily pollen tubes. *Protoplasma*, **144**, 101-109.
- Ross H.B., 1990. On the use of mosses (*Hylocomium splendens* and *Pleurozium schreberi*) for estimating atmospheric trace metal deposition. *Water, air and soil pollution*, **50**, 63-76.
- Roveri A., Maiorino M. & Ursini F., 1994. Enzymatic and immunological measurements of soluble and membrane-bound phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase. In : Packer L. (ed.), *Methods in enzymology, part C : Oxygen radicals in biological systems*, Academic Press Publisher, London, pp. 202-212.
- Roy S., Sen C.K. & Hänninen O., 1996. Monitoring of polycyclic aromatic hydrocarbons using « moss bags » : bioaccumulation and responses of antioxidant enzymes in *Fontinalis antipyretica* Hedw. *Chemosphere*, **32** (12), 2305-2315.
- Rucińska R., Wapłak S. & Gwóźdź E.A., 1999. Free radical formation and activity of antioxidant enzymes in lupin roots exposed to lead. *Plant physiology and biochemistry*, **37** (3), 187-194.
- Rudolph H., 1990. Biochemical and physiological aspects of bryophytes. In : Zinsmeister H.D. & Mues R. (eds.), *Bryophytes, their chemistry and chemical taxonomy*, Oxford science publication, Clarendon Press, Oxford, pp. 227-252.
- Rühling Å., 1985. *Mätning av metalldeposition genom mossanalys*. IVL B782, Institutet för Vatten- och luftvårdsforskning, Göteborg.
- Rühling Å. & Tyler G., 1968. An ecological approach to the lead problem. *Botaniska notiser*, **121**, 321-342.
- Rühling Å. & Tyler G., 1969. Ecology of heavy metals - a regional and historical study. *Botaniska notiser*, **122**, 248-259.
- Rühling Å. & Tyler G., 1970. Sorption and retention of heavy metals in the woodland moss *Hylocomium splendens* (Hedw.) Br. et Sch. *Oikos*, **21**, 92-97.
- Rühling Å. & Tyler G., 1971. Regional differences in the deposition of heavy metals over Scandinavia. *Journal of applied ecology*, **8**, 497-507.

- Rühling Å. & Tyler G., 1973. Heavy metal deposition in Scandinavia. *Water, air and soil pollution*, **2**, 445-455.
- Rühling Å. & Tyler G., 1984. Recent changes in the deposition of heavy metals in northern Europe. *Water, air and soil pollution*, **22**, 173-180.
- Rühling Å., Rasmussen L., Pilegaard K., Mäkinen A. & Steinnes E., 1987. Survey of atmospheric heavy metal deposition in the Nordic countries in 1985 monitored by moss analyses. *Nordisk Ministerråd, NORD 1987*, **21**, 1-44.
- Rumsey F.J. & Newton M.E., 1989. *Scopelophila cataractae* (Mitt.) Broth. in North Wales. *Journal of bryology*, **15**, 519-524.
- Sabri N., Pelissier B. & Teissié J., 1996. Electroporabilization of intact maize cells induces an oxidative stress. *European journal of biochemistry*, **238**, 737-743.
- Sakagami H., Sakagami T., Yoshida H., Omata T., Shiota F., Takahashi H., Kawazoe Y. & Takeda M., 1995. Hypochlorite scavenging activity of polyphenols. *Anticancer researches*, **15**, 917-922
- Salin M.L., 1987. Toxic oxygen species and protective systems of the chloroplast. *Physiologia plantarum*, **72**, 681-689.
- Santamaría J.M. & Martín A., 1997. Moss bags as biomonitors of heavy metal deposition in Navarra, Spain. *Toxicological and environmental chemistry*, **60**, 65-73.
- Saran M., Michel C. & Bors W., 1988. Reactivities of free radicals. In : Schulte-Hostede S., Darrall N.M., Blank L.W. & Wellburn A.L. (eds.), *Air pollution and plant metabolism*, Elsevier Applied Science, London, pp. 76-93.
- Särkelä M. & Nuorteva P., 1987. Levels of aluminium, iron, zinc, cadmium and mercury in some indicator plants growing in unpolluted Finnish Lapland. *Annales botanici fennici*, **24**, 301-305.
- Sastre Cl., 1994. Paléoclimats, spéciation et taxonomie. Quelques exemples chez les Ochnacées néotropicales. *Mémoires de la société de biogéographie*, sér. 3, **IV**, 3-10.
- Satake K. & Miyasaka K., 1984. Evidence of high mercury accumulation in the cell wall of the liverwort *Jungermannia vulcanicola* Steph. to form particles of a mercury-sulphur compound. *Journal of bryology*, **13**, 101-105.
- Satake K., Shibata K., Nishikawa M. & Fuwa K., 1988. Copper accumulation and location in the moss *Scopelophila cataractae*. *Journal of bryology*, **15**, 353-376.
- Scandalios J. G., 1992. Regulation of the antioxidant defense genes CAT and SOD of maize. In : Scandalios J.G. (ed.), *Molecular biology of free radical scavenging systems*, Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp. 117-152.
- Scandalios J. G., 1993. Oxygen stress and superoxide dismutases. *Plant physiology*, **101**, 7-12.
- Schaedle M. & Bassham J.A., 1977. Chloroplast glutathione reductase. *Plant physiology*, **59**, 1011-1012.
- Schat H., Sharma S.S. & Vooijs R., 1997. Heavy metal-induced accumulation of free proline in a metal-tolerant and a non-tolerant ecotype of *Silene vulgaris*. *Physiologia plantarum*, **101**, 477-482.

- Schipperges B. & Rydin H., 1998. Response of photosynthesis of *Sphagnum* species from contrasting microhabitats to tissue water content and repeated desiccation. *New phytologist*, **140**, 677-684.
- Schlee D., Kandzia R., Tintemann H. & Türk, R., 1995. Activity of superoxide dismutase and malondialdehyde content in lichens along an altitude profile. *Phyton*, **35** (2), 233-242.
- Schmithüsen J., 1961. *Allgemeine Vegetations geographie*, 2eme éd., Berlin, De Gruyter.
- Schumacker R. & Brugués M., 1991. *Scopelophila cataractae* (Mitt.) Broth. (Pottiaceae, Bryophytina), new for Spain. *Journal of bryology*, **16**, 486-488.
- Schwarzmaier U. & Brehm K., 1975. Detailed characterization of the cation exchanger in *Sphagnum magellicanum* Brid. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, **75**, 250-255.
- Seaward M.R.D. & Bylinska E.A., 1980. Plant-substrate correlations in bioindication studies of metal. In : Schubert R. & Schuh (eds.), *Methodische und theoretische Grundlagen der Bioindikation*, pp. 45-51.
- Seel W.E., Hendry A.F. & Lee J.A., 1991. Radical formation and accumulation in vivo, in desiccation tolerant and intolerant mosses. *Free Rad. Comms.*, **15** (3), 133-141.
- Serbinova E., Kagan E., Han D. & Packer L. 1991. Free radical recycling and intramembrane mobility in the antioxidant properties of alpha-tocopherol and alpha-tocotrienol. *Free radicals in biology and medicine*, **10**, 263-275.
- Shacklette H.T., 1961. Substrate relationships of some bryophyte communities on Latouche Island, Alaska. *The bryologist*, **64**, 1-16.
- Shacklette H.T., 1965a. Bryophytes associated with mineral deposits and solutions in Alaska. *Geological survey bulletin*, **1198-C**, 1-18.
- Shacklette H.T., 1965b. Element content of bryophytes. *Geological survey bulletin*, **1198-D**, 1-21.
- Shacklette H.T., 1967. Copper mosses as indicators of metal concentrations. *Geological survey bulletin*, **1198-G**, 1-18.
- Shaw J., 1986. A new approach to the experimental propagation of Bryophytes. *Taxon*, **35** (4), 671-675.
- Shaw J., 1987a. Evolution of heavy metal tolerance in bryophytes. II. An ecological and experimental investigation of the «copper moss», *Scopelophila cataractae* (Pottiaceae). *American journal of botany*, **74**, 813-821.
- Shaw J., 1987b. Effect of environmental pre-treatment on tolerance to copper and zinc in the moss *Funaria hygrometrica*. *American journal of botany*, **74**, 1466-1475.
- Shaw J., 1988. Genetic variation for tolerance to copper and zinc within and among populations of the moss, *Funaria hygrometrica* Hedw. *New phytologist*, **109**, 211-222.
- Shaw J., 1990a. Genetic and environmental effects of morphology and asexual reproduction in the moss, *Bryum bicolor*. *The bryologist*, **93** (1), 1-6.
- Shaw J., 1990b. Intraclonal variation in morphology, growth rate, and copper tolerance in the moss, *Funaria hygrometrica*. *Evolution*, **44** (2), 441-447.
- Shaw J., 1990c. Metal tolerances and cotolerances in the moss *Funaria hygrometrica*. *Canadian journal of botany*, **68**, 2275-2282.

- Shaw J. & Albright D., 1990. Potential for the evolution of heavy metal tolerance in *Bryum argenteum*, a moss. II. Generalized tolerances among diverse populations. *The bryologist*, **93**, 187-192.
- Shaw J. & Anderson L.E., 1988. Factors affecting the distribution and abundance of the « copper moss » *Scopelophila ligulata*, in North America. *Lindbergia* **14**, 55-58.
- Shaw J., Antonovics J. & Anderson L.E., 1987. Inter- and intraspecific variation of mosses in tolerance to copper and zinc. *Evolution*, **41**, 1312-1325.
- Shaw J. & Beer S.C., 1989. *Scopelophila cataractae* (Mitt.) Broth. in Pennsylvania. *The bryologist*, **92**(1), 112-115
- Shaw J., Beer S.C. & Lutz J., 1989. Potential for the evolution of heavy metal tolerance in *Bryum argenteum*, a moss. I. Variation within and among populations. *The bryologist*, **92** (1), 73-80.
- Shaw J., Jules E.S. & Beer S.C., 1991. Effects of metals on growth, morphology and reproduction of *Ceratodon purpureus*. *The bryologist*, **94** (3), 270-277.
- Shimwell D.W. & Laurie A.E., 1972. Lead and zinc contamination of vegetation in the southern Pennines. *Environmental pollution*, **3**, 291-301.
- Shirali P., Tessier E., Marez T., Hildebrandt H.F. & Haguenoer J.M., 1994. Effect of $\alpha\text{Ni}_3\text{S}_2$ on arachidonic acid metabolites in cultured human lung cells (L132 cell line). *Carcinogenesis*, **4**, 749-762.
- Sies H., 1991. Oxidative stress introduction. In : Sies H. (ed.), *Oxidative stress oxidants and antioxidants*, Academic Press, San Diego, pp. 1-15.
- Siewers U. & Roostai A.H., 1990. *Schwermetallbilanz aus Immission und geogenem Anteil im Einzugsgebiet der Sösetalsperre/Harz*, Ber. d. Forschungszentrums Waldökosysteme, B 19, Göttingen.
- Silberstein L., Siegel B.Z., Siegel S.M., Mukhtar A. & Galun M., 1996. Comparative studies on *Xanthoria parietina* a pollution-resistant lichen and *Ramalina duriaei* a sensitive species. II. Evaluation of possible air pollution-protection mechanisms. *The lichenologist*, **28** (4), 367-383.
- Simmons T.W. & Jamall I.S., 1988. Significance of alterations in hepatic antioxidant enzymes. *Biochemistry journal*, **251**, 913-917.
- Simola L.K., 1977a. The effect of lead, cadmium, arsenate, and fluoride ions on the growth and fine structure of *Sphagnum nemoreum* in aseptic culture. *Canadian journal of botany*, **55**, 426-435.
- Simola L.K., 1977b. Growth and ultrastructure of *Sphagnum fimbriatum* cultured with arsenate, fluoride, mercury and copper ions. *Journal of the Hattori botanical laboratory*, **43**, 365-377.
- Simontacchi M., Caro A. & Puntarulo S., 1995. Oxygen-dependant increase of antioxidants in soybean embryonic axes. *International journal of biochemistry and cellular biology*, **27**, 1221-1229.
- Singh B.R., Narwal R.P. & Almas A., 1995. Residual effect of organic matter on cadmium uptake by plants and its distribution in soils. In : C.R. congrès « Biogéochimie des éléments traces » *Symposium A1*, Paris, 15-19 mai 1995, sous presse.

- Skaar H., Ophus E. & Gullvåg B.M., 1973. Lead accumulation within nuclei of moss leaf cells. *Nature*, **241**, 215-216.
- Smith A.J.E., 1978a. *The Liverworts flora of Britain & Ireland*. Cambridge University Press, Great Britain., 3ème édition, 706 pp.
- Smith A.J.E., 1978b. *The Moss flora of Britain & Ireland*. Cambridge University Press, Great Britain., 3ème édition, 350 pp.
- Smith I.K., Polle A. & Rennenberg H., 1990. In : Alscher R.G. & Cumming J.R. (eds.), *Stress responses in plants : Adaptation mechanisms*, Wiley-Liss, Inc., New York, 201p.
- Smith P.K., Krohn R.I., Hemranson G.T., Mallia A.K., Gartner F.H., Provenzana M.D., Fujimoto E.K., Goeke N.M., Olson B.J. & Klenk D.C., 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analysis in biochemistry*, **150**, 76-85.
- Sotiaux A., De Zuttere Ph., Schumacker R., Pierrot R.B. & Ulrich Cl., 1987. *Scopelophila cataractae* (Mitt.) Broth. (Pottiaceae, Musci) nouveau pour le continent européen en France, en Belgique, aux Pays-Bas et en République Fédérale Allemande. *Cryptogamie, bryologie, lichénologie*, **8**, 95-108.
- Spallholz J.E. & Boylan L.M., 1991. Glutathione peroxidase : the two selenium enzymes. *Peroxidases in chemistry and biology*, **1**, 259-272.
- Spearing A.M., 1972. Cation-exchange capacity and galacturonic acid content of several species of *Sphagnum* in Sandy Ridge Bog, Central New York State. *The bryologist*, **75**, 154-158.
- Spivey Fox M.R. & Tao S.H., 1981. Mineral content of human tissues from a nutrition perspective. *Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*, **40**, 2130-2134.
- Stadtman E.R., 1991. Ascorbic acid and oxidative inactivation of proteins. *American journal of clinical nutrition*, **54**, 1125-1128.
- Statens Naturvårdsverk, 1987. *Tungmetaller-förekomst och omsättning i naturen*. Monitor, National Swedish Environment Protection Board, Solna, Sweden, np.
- Stegeman J.J., Brouwer M., Digiulio R.T., Förllin L., Fowler B.A., Sanders B.M. & Van Veld P.A., 1992. Molecular responses to environmental contamination : enzyme and protein systems as indicators of chemical exposure and effect. In : Hugget R.J., Kimerle R.A., Mehrle Jr. P.M., Bergman H.L. (eds.), *Biomarkers*, Lewis Publishers, London, pp. 235-335.
- Steinnes E., 1977. *Atmospheric deposition of trace elements in Norway studied by means of moss analysis*. Kjeller Report 154. Norway.
- Steinnes E., 1980. Atmospheric deposition of heavy metals in Norway studied by the analysis of moss samples using neutron activation analysis and atomic absorption spectrometry. *Journal of radioanalytical chemistry*, **58**, 387-391.
- Sterckeman T., Douay F. & Proix N., 1996. *Etude de la migration verticale de Cd, Cu, Pb et Zn*. Rapport P.R.C., Etude d'un secteur pollué par les métaux, 20-23.
- Stocker R., Yamamoto Y., McDonagh A.F., Glazer A.N. & Ames B.N., 1987. Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science*, **235**, 1043-1046.
- Stodiek E., 1937. *Soziologische und ökologische Untersuchungen an den xerotopen Moosen und Flechten des Muschelkalkes in der Umgebung von Jena*. Dissertation Jena Witzgenhausen.

- Streit B. & Stumm W., 1993. Chemical properties of metals and the process of bioaccumulation in terrestrial plants. In: Markert M. (ed.), *Plants as biomonitors indicators for heavy metals in the terrestrial environment*, VCH, Weinheim, pp. 31-62.
- Stroiński A. & Zielezińska M., 1997. Cadmium effect on hydrogen peroxide, glutathione and phytochelatins levels in potato tuber. *Acta physiologiae plantarum*, **19** (2), 127-135.
- Sun W. Q. & Leopold A.C., 1995. The Maillard reaction and oxidative stress during aging of soybean seeds. *Plant physiology and biochemistry*, **27**, 407-413.
- Tamm C.P., 1953. Growth yield and nutrition in carpets of a forest moss (*Hylocomium splendens*). *Meddelanden från statens Skogsforskningsinstitut*, **43**, 1-140.
- Taylor J. & Kaufman P.B., 1976. Neutral sugar, uronic acid, cellulose and protein content of cell walls isolated from gametophytes of the liverworts *Lophocolea heterophylla* and *Conocephalum conicum*. *Journal of the Hattori botanical laboratory*, **40**, 115-120.
- Temple P.J., McLaughlin D.L., Linzon S.N. & Wills R., 1981. Moss bags a monitors of atmospheric deposition. *Journal of the air pollution control association*, **31**, 668-670.
- Thomas J.P., Geiger P.G., Maiorino M., Ursini F. & Girotti A.W., 1990. Enzymatic reduction of phospholipid and cholesterol hydroperoxides in artificial bilayers and lipoproteins. *Biochimica et biophysica acta*, **1045**, 252-260.
- Thomas W., 1986. Representativity of mosses as biomonitor organisms for the accumulation of environmental chemicals in plants and soils. *Ecotoxicology and environmental safety*, **11**, 339-346.
- Thompson J.P., Legge R.L. & Barber R.F., 1987. The role of free radicals in senescence and wounding. *New phytologist*, **105**, 317-344.
- Thöni L. & Hertz J., 1987. Moose als Biomonitoren für die flächenhafte Abschätzung der Schwermetallbelastung in der Schweiz. *VDI Berichte*, **609**, 755-763.
- Thöni L., Schmid-Grob I., Hertz J. & Urmi E., 1986. Kartierung der Blei-, Kupfer-, Zink- und Cadmium-Belastung im Raume Zürich anhand des Moooses *Bryum argenteum* Hedw. als Biomonitor. *Staub-Reinhaltung der Luft*, **46** (6), 295-299.
- Timbrell J.A., Draper R. & Waterfield C.J., 1994. Biomarkers in toxicology : new uses for some old molecules. *Toxicology and ecotoxicology news*, **1** (1), 4-14.
- Tuba Z., Csintalan Z. & Proctor M.C.F., 1996. Photosynthetic responses of a moss, *Tortula ruralis*, ssp. *ruralis*, and the lichens *Cladonia convoluta* and *C. furcata* to water deficit and short periods of desiccation, and their ecophysiological significance : a baseline study at present-day CO₂ concentration. *New phytologist*, **133**, 353-361.
- Tüxen R., 1947. *Die Pflanzengesellschaften Nordwestdeutschlands*. Im 81-87 Jahresbericht der Naturhistorischen Gesellschaft zu Hannover 1929-1930, 1935-1936.
- Tyler G., 1970. *Moss analysis - a method for surveying heavy metal deposition*. Proceedings of the second international clean air congress, Washington D.C., 129-132.
- Tyler G., 1990. Bryophytes and heavy metals : a literature review. *Botanical journal of the linnean society*, **104**, 231-253.
- Tyler G., Bergkvist B., Rühling Å & Wiman B., 1983. *Metaller i skogsmärk - deposition och omsättning* - SNV PM 1692. National Swedish Environment Protection Board, Solna, Sweden.

- Url W., 1956. Über Schwermetall-, zumal Kupferresistenz einiger Moose. *Protoplasma*, **46**, 768-793.
- Valenzuela A., 1991. The biological significance of malondialdehyde determination in the assessment of tissue oxidative stress. *Life sciences*, **48**, 301-309.
- Van Assche F., Cardinaels C. & Clijsters H., 1988. Induction of enzyme capacity in plants as a result of heavy metal toxicity : dose-response in *Phaseolus vulgaris* L., treated with zinc and cadmium. *Environmental pollution*, **52**, 103-115.
- Van der Hoeven E.C., 1999. Reciprocal transplantations of three chalk grassland bryophytes in the field. *Lindbergia*, **24**, 23-28.
- 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.
- Van Haluwyn C., Languereau F. & Cuny D., 1995. Quelques lichens se développant sur *Armeria maritima* Willd. ssp. *halleri* (Wallr.) Rothm. *Documents mycologiques*, **25** (98-100), 459-464.
- Van Haluwyn C., Petit D. & Mériaux, J.L. 1987. Végétations métallicoles dans la région Nord-Pas-de-Calais. *Bulletin de la société botanique du nord de la France*, **40** (1-2), 7-15.
- Vangronsveld J., Mench M., Mocquot B. & Clijsters H., 1998. Biomarqueurs d'exposition des végétaux terrestres aux polluants application à la pollution par les métaux. In : Lagadic L., Caquet T., Amiard J.C. & Ramade F. (eds.), *Utilisation des biomarqueurs pour la surveillance de la qualité de l'environnement*, Lavoisier Technique & Documentation, Paris, pp. 165-179.
- Vangronsveld J., Mocquot B., Mench M. & Clijsters H., 1997. Biomarqueurs du stress oxydant chez les végétaux. In : Lagadic L., Caquet T., Amiard J.C. & Ramade F. (eds.), *Biomarqueurs en écotoxicologie aspects fondamentaux*, Masson, Paris, pp. 165-184.
- Vasander H. & Millila J., 1986. Sammalpallomenetelmä lyijsulaton päästöjen tutkimuksessa (Monitoring lead emissions with moss bags near a lead smelter in southern Finland). *Suo*, **37**, 89-97.
- Vasconcelos M.T.S.D. & Tavares H.M.F., 1998. Atmospheric metal pollution (Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb and Zn) in Oporto city derived from results for low-volume aerosol samplers and for the moss *Sphagnum auriculatum* bioindicator. *The science of the total environment*, **212**, 11-20.
- Von Hilde N-N.S., 1949. Mosskleingesellschaften des Städte. *Nova Hedwigia*, **II** (3), 425-462.
- Von Hübschmann A., 1975. Mossgesellschaften des nordwestdeutschen tieflandes zwischen Ems un Weser. II Teil : Erdmoss-Gesellschaften. *Herzogia*, **3**, 275-326.
- Wade C. & Van Rij A., 1985. *In vivo* lipid peroxidation in man as measured by the respiration excretion of ethane, pentane and other low molecular weight hydrocarbons. *Analytical biochemistry*, **150**, 1-7.
- Walker C.H., Hopkin S.P., Sibly R.M. & Peakall D.B., 1996. *Principles of ecotoxicology*. Taylor & Francis (ed.), London, 321p.
- Wallin T., 1976. Deposition of airborne mercury from six Swedish chlor-alkali plants surveyed by moss analysis. *Environmental pollution*, **10**, 101-114.

- Wandtner R. & Lötschert W., 1980. Schwermetallakkumulation in Hochmooren im Gebiet des Nationalparks Bayerischer Wald. *Verhandlungen der Gesellschaft für Ökologie, Freising-Weißenstephan*, **8**, 247-251.
- Ward M., 1964. Induced aberrant gametophytes from *Polytrichum commune*. *The bryologist*, **67**, 356-358.
- Ward N.I., Brooks R.R. & Roberts E., 1977. Heavy metals in some New Zealand bryophytes. *The bryologist*, **80**, 304-312.
- Watkinson S.C. & Watt F., 1992. The cellular localisation of elements in leaf cells of *Sphagnum* with the scanning proton microprobe. *The bryologist*, **95** (2), 181-185.
- Webster H.J., 1985. Elemental analyses of *Pohlia nutans* growing on coal seeps in Pennsylvania. *Journal of the Hattori botanical laboratory*, **58**, 207-224.
- 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.
- Wells J.M. & Brown D.H., 1987. Factors affecting the kinetics of intra- and extracellular cadmium uptake by the moss *Rhytidiadelphus squarrosus*. *New phytologist*, **105**, 123-137.
- Wells J.M., 1988. *The role of the cell wall in metal uptake, redistribution and tolerance in the moss Rhytidiadelphus squarrosus*. Ph. D. Thesis, University of Bristol, Bristol.
- Wendel A., 1981. Glutathione peroxidase. In: Jakoby W.B. (ed.), *Methods in enzymology*, **77**, Academic Press Publisher, London, pp. 325-332.
- Werner O., Espin R.M.R., Bopp M. & Atzorn R., 1991. Abscisic-acid-induced drought tolerance in *Funaria hygrometrica* Hedw. *Planta*, **186**, 99-103.
- White J.A. & Scandalios J.G., 1989. Deletion analysis of the maize mitochondrial superoxide dismutase peptide. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*, **86**, 3534-3538.
- Whitehead A., 1983. A study of the effect of mercuric chloride on the moss *Rhytidiadelphus squarrosus* (Hedw.) Warnst. *BSc Thesis*, University of Bristol.
- Wilkins P., 1977. Observations on ecology of *Mielichhoferia elongata* and other copper mosses in the British Isles. *The bryologist*, **80**, 175-181.
- Williams K.J. & Thompson T.G., 1936. *Internationale Revue der gesamten Hydrobiologie und Hydrographie*, **33**, 309.
- Wilson W., 1900. The great smoke-cloud of the north of England and its influence on plants. *British association of advanced sciences*, 930-931.
- Winkler, S., 1976. Mosse als Indikatoren bei SO₂- und Bleibelastung. *Daten Dokumentation Umweltschutz*, **19**, 43-55.
- Wiseman H., 1993. Vitamin D is a membrane antioxidant. Ability to inhibit iron-dependent lipid peroxidation in liposomes compared to cholesterol, ergosterol and tamoxifen and relevance to anticancer action. *Federation of european biochemical societies letter*, **326**, 285-288.
- Wittig R., 1993. General aspects of biomonitoring heavy metals by plants. In: Markert, B. (ed.), *Plants as biomonitors indicators for heavy metals in the terrestrial environment*, VCH Publisher, Weinheim, pp. 3-28.

- Wolf A., Schramel P., Lill G. & Hohn H., 1984. Bestimmung von Spurenelementen in Moos- und Bodenproben zur Untersuchung der Eignung als Indikatoren für Umweltbelastungen. *Fresenius Zeitschrift für analytische Chemie*, **317**, 512-519.
- Wolterbeek H.Th., Kuik P., Verburg T.G., Herpin U., Markert B. & Thöni L., 1995. Moss interspecies comparisons in trace element concentrations. *Environmental monitoring and assessment*, **35**, 263-286.
- Wu L. & Bradshaw A.D., 1972. Aerial pollution and the rapid evolution of copper tolerance. *Nature*, **238**, 167-169.
- Yeaple D.S., 1972. Mercury in bryophytes (moss). *Nature*, **235**, 229-230.
- Yu B.P., 1994. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiological reviews*, **74** (1), 139-163.
- Yule F.A. & Lloyd O.L.L., 1984. Metal content of an indigenous moss in Armadale, central Scotland. *Water, air and soil pollution*, **21**, 261-270.
- Zenk M.H., 1996. Heavy metal detoxification in higher plants-a review. *Gene*, **179**, 21-30
- Zhang J. & Kirkham M.B., 1994. Drought stress-induced changes in activities of superoxide dismutase, catalase and peroxidase in wheat species. *Plant cell physiology*, **35**, 785-791.

LISTE DES ILLUSTRATIONS



LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Localisation du secteur d'étude du Programme de Recherches Concertées (P.R.C.).....	8
Figure 2 : Localisation des principaux sites pollués par les installations de fonderie, de sidérurgie, de métallurgie et de traitement de surface métallique dans la région Nord-Pas-de-Calais (d'après DRIRE, 1996).....	8
Figure 3 : Représentation schématique des relations entre la concentration en éléments traces et la réponse biologique d'un organisme vivant (d'après Spivey Fox & Tao, 1981).	12
Figure 4 : Classification périodique simplifiée des éléments montrant la répartition des ions métalliques et métalloïdes dans les différentes classes : classe A, classe B et éléments de transition. Le Pb et le Cu en fonction de leur état électronique appartiennent soit à la classe B soit aux éléments de transition (Pb ²⁺ et Cu ²⁺). ¹ Famille du lanthane ; ² famille de l'actinium (d'après Nieboer & Richardson, 1980).	13
Figure 5 : Différentes formes et localisations des éléments traces dans les sols (d'après Baize, 1997).....	16
Figure 6 : a - <i>Bryum capillare</i> (acrocarpe) et b - <i>Scleropodium purum</i> (pleurocarpe), d'après Landwehr, 1984. .20	
Figure 7 : La reproduction chez les bryophytes. A - Protonéma (microscopie photonique X 40) ; B - Bourgeon feuillé se développant sur un caulonéma (microscopie X 10) ; C - Gamétophyte de <i>Funaria hygrometrica</i> ; D - Anthéridies et archégones chez une mousse (microscopie photonique X 10), (A, B, D : photos Franck Denayer ; C : d'après Goebel (1930)).	24
Figure 8 : Échelle des statuts physiologiques d'un organisme permettant de distinguer trois principaux états : l'état sanitaire optimal régi par des mécanismes d'homéostasie, le stress nécessitant la mise en place de mécanismes de compensation pour revenir à l'état précédent et le dernier stade étant la pathologie . Celle-ci est soit curable et nécessite des mécanismes de réparation, soit incurable et aboutit à la mort de l'organisme (d'après Depledge <i>et al.</i> , 1993).....	60
Figure 9 : Principales espèces réactives de l'oxygène (ERO) formées chez les organismes vivants (d'après Bartosz, 1997).	64
Figure 10 : Voie d'activation des ERO chez les plantes sous l'effet d'un stress induisant un excès d'H ₂ O ₂ (LH, acides gras ; L [•] , radical acide gras ; LOOH, lipide hydroperoxyde ; LOH, lipide hydroperoxyde réduit ; LOX, lipoxygénase ; GST, glutathion transférase ; PLHGPx, phospholipide hydroperoxyde glutathion peroxydase) (d'après Eshdat <i>et al.</i> , 1997).	64
Figure 11 : Exemple de deux produits formés par l'attaque du radical OH [•] sur les bases de l'ADN.	66
Figure 12 : Exemple de réaction dite de transfert d'électron.....	66
Figure 13 : Composés à doubles liaisons conjuguées comme les carotènes et les chlorophylles réagissant avec l'oxygène singulet pour produire des endoperoxydes.	68
Figure 14 : Principaux produits d'oxydation de la 2'-desoxyguanosine par l'oxygène singulet.	68
Figure 15 : Mécanismes de la lipoperoxydation (d'après Halliwell & Gutteridge, 1989).....	70
Figure 16 : Répartition du glutathion (GSH) et de certaines enzymes antioxydantes avec leurs inhibiteurs (en italique), au sein d'une cellule végétale. (SOD, superoxyde dismutase ; Se GPx, glutathionperoxydase sélénium dépendante ; GPx Se ind, glutathion peroxydase sélénium indépendante ; GR, glutathion réductase ; PLHGPx, phospholipide hydroperoxyde glutathion peroxydase, (d'après Cossu <i>et al.</i> , 1997, modifié).....	72
Figure 17 : Systèmes de défense antioxydants enzymatiques et non enzymatiques (d'après Kehrer, 1993).....	74
Figure 18 : Mécanisme de la réaction de décomposition du peroxyde d'hydrogène catalysée par la catalase (d'après Pelmont, 1989).	74
Figure 19 : Piégeage des ERO dans le chloroplaste impliquant la SOD : voies stromatique et thylacoïdienne. Dans les piégeages associés aux thylacoïdes, les radicaux superoxydes sont dismutés par la superoxyde dismutase (SOD) (forme Fe ou Cu/Zn) et le peroxyde d'hydrogène résultant est récupéré par l'ascorbate peroxydase intra-thylacoïdienne (tAPx). Dans les piégeages associés au stroma, les ERO qui échappent à la voie thylacoïdienne sont dismutés par la Fe (ou Cu/Zn) SOD et l'APx stromatique (sAPx). Les radicaux monodeshydroascorbates (MDA [•]) produits par l'APx sont convertis en ascorbate (AsA) à travers une réaction avec la ferredoxine (Fd) thylacoïdienne ou la monodeshydroascorbate réductase (MDHAR) stromatique. La réduction du deshydroascorbate (DHA) en AsA est catalysée par la deshydroascorbate réductase (DHAR), (d'après Alscher <i>et al.</i> , 1997).	78
Figure 20 : Cycle Halliwell-Asada.	78
Figure 21 : Les différentes voies de synthèse et d'utilisation du glutathion au sein des cellules (d'après Grant & Dawes, 1996 ; Kneer & Zenk, 1992 ; Vangronsveld <i>et al.</i> , 1997, 1998).....	80
Figure 22 : Régénération de l'α-tocophérol et piégeage de radicaux alkylperoxyl (MDHAR, monodeshydroascorbate réductase ; MDA, monodeshydroascorbate ; AsA, ascorbate ; ERO, espèces réactives de l'oxygène (d'après Alscher <i>et al.</i> , 1997).	82

Figure 23 : Résumé de la formation de complexes Cd-PC chez les plantes et chez <i>Schizosaccharomyces pombe</i> (LMW Cd-PC, complexes Cd-PC de faible poids moléculaire ; hmt1, transporteur tolérant aux éléments traces métalliques ; HMW Cd-PC, complexes Cd-PC de haut poids moléculaire ; CAD 1, produit du gène <i>cad1</i> chez <i>Arabidopsis halleri</i> modulant sa tolérance au Cd ²⁺ ; CAD2, produit du gène <i>cad2</i> chez <i>Arabidopsis halleri</i> modulant sa tolérance au Cd ²⁺ ; <i>ade 2</i> , <i>ade 6</i> , <i>ade 7</i> , <i>ade 8</i> , produits des gènes respectifs pour <i>Schizosaccharomyces pombe</i> (d'après Fordham Skelton <i>et al.</i> , 1997).....	92
Figure 24 : Principaux adduits formés durant les réactions des composés énal, ainsi que de leurs produits d'époxydation avec l'ADN (d'après Burcham, 1998).....	94
Figure 25 : Localisation des sites d'étude des communautés bryophytiques.	98
Figure 26 : Localisation des sites d'étude des communautés bryolichéniques.....	106
Figure 27 : Plan expérimental pour la mise au point d'un bryocapteur des retombées atmosphériques à l'aide de <i>Ceratodon purpureus</i> (Hedw.) Brid. (a – site témoin, b – sites exposés).....	125
Figure 28 : Réaction de l'acide thiobarbiturique (TBA) avec le malondialdéhyde (MDA) et les structures tautomériques des adduits (d'après Valenzuela, 1991).	128
Figure 29 : Représentation schématique du protocole d'éluion séquentielle (d'après Branquinho & Brown, 1994 ; Branquinho <i>et al.</i> , 1997a, 1997b ; In : Cuny, 1999).	130
Figure 30 : Carte factorielle représentant les axes 1 et 2 de l'AFC.	136
Figure 31 : Carte factorielle représentant les axes 1 et 2 de l'ACP.	138
Figure 32 : Cercle des corrélations de l'ACP (axes 1 & 2).	138
Figure 33 : Carte factorielle représentant les axes 1 et 2 de l'AFCM.	142
Figure 34 : Représentation graphique des individus selon les axes 1 et 2 de l'AFD (A) et représentation des variables canoniques (B).	149
Figure 35 : Représentation graphique des individus selon les axes 1 et 2 (A) et représentation des variables canoniques (B).....	152
Figure 36 : Représentation graphique des résultats de l'AFCM selon les axes 1 et 2. Pour la signification des abréviations voir le tableau 36.....	156
Figure 37 : Représentation graphique des résultats de l'ACP (A) et cercle des corrélations selon les axes 1 et 2.	160
Figure 38 : Concentrations en Pb, Zn et Cd chez <i>Ceratodon purpureus</i> , site par site (mois 1 : avril/mai ; mois 2 : mai/juin ; mois 3 : juin/juillet ; mois 4 : juillet/août ; mois 5 : août/septembre-octobre.....	165
Figure 39 : Concentrations en GSH chez <i>Ceratodon purpureus</i> , sur l'ensemble des sites, mois par mois et écarts-types.....	168
Figure 40 : Concentrations en GSSG chez <i>Ceratodon purpureus</i> , sur l'ensemble des sites, mois par mois et écarts-types.....	169
Figure 41 : Concentrations en GSSG/GSH chez <i>Ceratodon purpureus</i> , sur l'ensemble des sites, mois par mois et écarts-types.....	170
Figure 42 : Concentrations en MDA chez <i>Ceratodon purpureus</i> , sur l'ensemble des sites, mois par mois et écarts-types.....	171
Figure 43 : Activité des SOD chez <i>Ceratodon purpureus</i> , pour l'ensemble des sites, mois par mois et écarts-types.....	172
Figure 44 : Représentation graphique des différents biomarqueurs, chez <i>Ceratodon purpureus</i> , site par site. GSH (mg/g protéines), GSSG (mg/g protéines), GSSG/GSH, activité des SOD (U/g protéines), MDA (µM/g protéines). Mois 1 : avril/mai, mois 2 : mai/juin, mois 3 : juin/juillet, mois 4 : juillet/août, mois 5 : août/septembre-octobre.....	174
Figure 45 : ACP mois 1, individus et cercle des corrélations selon les axes 1 et 2.....	176
Figure 46 : ACP mois 2, individus et cercle des corrélations selon les axes 1-2 et 1-3.....	178
Figure 47 : ACP mois 3, individus et cercle des corrélations selon les axes 1-2 et 1-3.....	179
Figure 48 : ACP mois 4, individus et cercle des corrélations selon les axes 1 et 2.....	180
Figure 49 : ACP mois 5, individus et cercle des corrélations selon les axes 1-2 et 1-3.....	181
Figure 50 : Variations des teneurs moyennes en Zn, au sein des différents compartiments cellulaires de <i>Ceratodon purpureus</i> , pour les mois 3 (A) et 5 (B).	186
Figure 51 : Variations des teneurs moyennes en Pb, au sein des différents compartiments cellulaires de <i>Ceratodon purpureus</i> , pour les mois 3 (A) et 5 (B).	187
Figure 52 : Variations des teneurs moyennes en Cd, au sein des différents compartiments cellulaires de <i>Ceratodon purpureus</i> , pour les mois 3 (A) et 5 (B).	188
Figure 53 : Variations des teneurs moyennes en K, au sein des différents compartiments cellulaires de <i>Ceratodon purpureus</i> , pour les mois 3 (A) et 5 (B).	190

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Concentrations de quelques éléments traces métalliques dans les sols « normaux » et dans la lithosphère (d'après Fagot, 1993).	12
Tableau 2 : Principaux ligands des éléments en fonction de leur classe. R symbolise dans la majorité des cas un radical carboné aliphatique (d'après Nieboer & Richardson, 1980).	13
Tableau 3 : Sites pollués recensés dans différents pays. La définition peut correspondre à des sites potentiellement ou effectivement pollués (d'après Doelman (1994) modifié par Robert, 1996).	14
Tableau 4 : Emissions globales d'éléments traces dans l'air, l'eau et le sol (en milliers de tonnes par an) (d'après McGrath, 1997).	14
Tableau 5 : Concentrations seuils (en mg.kg ⁻¹ de sol) en cadmium, cuivre, plomb et zinc fixées par la norme AFNOR NF U 44-041.	16
Tableau 6 : Normes de concentrations des ETM pour quelques sols européens, en mg.kg ⁻¹ de matière sèche (Cd : cadmium, Cr : chrome, Co : cobalt, Cu : cuivre, Hg : mercure, Ni : nickel, Pb : plomb, Se : sélénium, Zn : zinc) (d'après IFEN, 1998).	18
Tableau 7 : Comparaison entre les bryophytes endohydriques et ectohydriques.	22
Tableau 8 : Adaptations des bryophytes et des lichens face à l'eau (facteur limitant), (d'après Barkman, 1958). 26	
Tableau 9 : Niveau de tolérance au Cu et au Zn de bryophytes récoltées dans une forêt de conifères de Gusum, au sud de la Suède (Folkesson, 1983 ; Folkesson & Andersson-Bringmark, 1988) (<i>In</i> : Tyler, 1990).	44
Tableau 10 : Espèces de bryophytes observées sur substrat présentant de fortes concentrations en cations métalliques, en sulfates et/ou une forte acidité (d'après Tyler, 1990).	46
Tableau 11 : La technique des « moss bags » en biomonitoring des dépôts de polluants (d'après Tyler, 1990). ...	50
Tableau 12 : Principales voies de formation des espèces réactives de l'oxygène (ERO) <i>in vivo</i> (d'après Saran <i>et al.</i> , 1988).	62
Tableau 13 : Sources des espèces réactives de l'oxygène (d'après Bartosz, 1997).	83
Tableau 14 : Agents induisant un stress oxydatif chez les végétaux (d'après Bartosz, 1997).	84
Tableau 15 : Composés de faible poids moléculaire agissant comme antioxydants (d'après Bartosz, 1997).	85
Tableau 16 : Protéines protégeant des ERO (d'après Bartosz, 1997).	86
Tableau 17 : Biomarqueurs à prendre en considération lors d'utilisation de bryophytes pour le diagnostic précoce de pollutions dues à des polluants.	94
Tableau 18 : Classes de concentrations des ETM et des variables édaphiques pour l'AFCM, dans les sols des sites pollués et du site témoin.	112
Tableau 19 : Dates des récoltes de <i>Ceratodon purpureus</i> pour les barquettes et les moss bags sur le terrain.	122
Tableau 20 : Protocoles d'extraction, de dosage des protéines et de l'activité des SOD.	126
Tableau 21 : Protocole d'extraction et de dosage du malondialdéhyde (MDA).	126
Tableau 22 : Protocole de dosage du glutathion réduit et oxydé (GSH et GSSG).	130
Tableau 23 : Tableau phytosociologique élaboré des espèces observées sur les différents sites pollués et le site témoin.	137
Tableau 24 : Valeurs moyennes (m) et écarts-types (sd) des différents paramètres physico-chimiques (MO : matière organique ; N : azote total ; C/N : rapport carbone sur azote ; pH ; Zn : zinc ; Pb : plomb ; Cd : cadmium) des onze groupes de sites définis par l'ACP.	139
Tableau 25 : Corrélation entre les variables édaphiques des sites étudiés.	139
Tableau 26 : Corrélation entre les groupes de l'AFC et ceux de l'ACP.	140
Tableau 27 : Valeurs moyennes (m) et écarts-types (sd) des paramètres physico-chimiques des sols (MO : matière organique ; N : azote total ; C/N : rapport carbone sur azote ; pH ; Zn : zinc ; Pb : plomb ; Cd : cadmium) dans les différentes Unités Biologiques Fonctionnelles (UBF).	140
Tableau 28 : Classes des paramètres physico-chimiques des sols (MO : matière organique ; CEC : capacité d'échanges cationiques ; N : azote total ; C/N : rapport carbone sur azote ; pH ; Zn : zinc ; Pb : plomb ; Cd : cadmium) utilisés pour l'AFCM.	142
Tableau 29 : Classement des Unités Biologiques Fonctionnelles selon les variables physico-chimiques des sols par AFCM (cf. tableau 28 pour les valeurs des différentes classes), (norme AFNOR NFU 44-041, Cd 2 ppm, Pb 100 ppm, Zn 300 ppm).	143
Tableau 30 : Résultats bruts des différents paramètres physico-chimiques des sols pollués et du sol témoin. ...	148
Tableau 31 : Résultats de l'analyse factorielle discriminante des sites selon les variables édaphiques. Les groupes estimés sont ceux établis par l'AFD. Les colonnes « Axe » reprennent les coordonnées des individus sur la représentation graphique. Les sites mal classés sont en gras.	149
Tableau 32 : Coefficients de corrélation entre les variables édaphiques. (MO : matière organique ; N : azote organique ; CEC : capacité d'échanges cationiques ; pH).	150

Tableau 33 : Coefficients de corrélation entre les éléments traces métalliques. (NS = Non Significatif).....	150
Tableau 34 : Résultats de l'analyse factorielle discriminante des sites selon les concentrations en éléments traces. Les groupes estimés sont ceux établis par l'AFD. Les colonnes « Axe » reprennent les coordonnées des individus sur la représentation graphique. Les sites mal classés sont en gras.....	152
Tableau 35 : Coefficients de corrélation entre les différentes variables édaphiques et les éléments traces métalliques. (NS = Non Significatif).....	152
Tableau 36 : Résultats bruts des relevés bryolichéniques sur les sites pollués par les ETM et le site témoin.....	154
Tableau 37 : Composition spécifique des groupes écologiques déterminés par l'AFCM. Les abréviations sont celles utilisées pour l'AFCM. Nous avons replacé les classes de variables physico-chimiques qui caractérisent les groupes.	158
Tableau 38 : Matrice des données de l'ACP.....	160
Tableau 39 : Moyennes (M) et écart-types (ET) du plomb, du zinc et du cadmium en mg/g de protéines chez <i>Ceratodon purpureus</i> . Les résultats non significativement différents ($p < 0,05$) d'un mois à l'autre pour un même site sont signalés par ce symbole (*).	164
Tableau 40 : Moyennes (M) et écart-types (ET) du GSH (mg/g protéines), du GSSG (mg/g protéines), du GSSG/GSH, de l'activité des SOD (U/g protéines), du MDA ($\mu\text{M/g}$ protéines) chez <i>Ceratodon purpureus</i> . Les résultats significativement différents ($p < 0,05$), pour un même biomarqueur, entre le témoin d'un mois et les autres sites du même mois, sont signalés par (*). Les résultats significativement différents ($p < 0,05$), pour un même biomarqueur d'un mois à l'autre, pour un même site, sont signalés par (#). 5 répétitions pour sites C, N, EF1, EF2 et 12 répétitions pour le témoin (TJ).....	166
Tableau 41 : Concentrations en Pb, Zn, Cd et K (en mg/g de protéines) dans les différents compartiments des gamétophytes de <i>Ceratodon purpureus</i> . La différence entre les concentrations moyennes en Pb, Zn, Cd et K pour le mois 3 et le mois 5 ne sont significatives que pour $p < 0,121$. Elément total soluble = $E(\text{H}_2\text{O}) + E(\text{extracell}) + E(\text{intracell})$. Elément total = $E(\text{HNO}_3) + E(\text{total soluble})$	184
Tableau 42 : Résultats de l'analyse de régression du mois 5, pour le MDA, l'activité des SOD, le GSH, le GSSG et le rapport GSSG/GSH chez <i>Ceratodon purpureus</i>	189
Tableau 43 : Résultats de l'analyse de régression du mois 5, pour le potassium dans les différents compartiments cellulaires de <i>Ceratodon purpureus</i>	192
Tableau 44 : Coefficients de corrélation, pour le mois 5, entre les divers compartiments cellulaires pour le potassium et les autres biomarqueurs de stress oxydant chez <i>Ceratodon purpureus</i>	194
Tableau 45 : Valeurs moyennes (M) et écart-types (ET), en Pb, Zn et Cd, aux mois 3 et 5, pour le <i>Ceratodon purpureus</i> mort (M suivi du site) et le <i>Ceratodon</i> vivant. Les moss bags des sites TJ et N pour le mois 5 ont disparu (vandalisme).....	195

LISTE DES PHOTOGRAPHIES

Photographie 1 : Exemple de communauté de bryophytes (photo Franck Denayer).....	98
Photographie 2 : Exemple de communauté bryolichénique à <i>Diploschistes muscorum</i> (photo Franck Denayer).	110
Photographie 3: Feuilles de <i>Ceratodon purpureus</i> (Hedw.) Brid. en microscopie photonique (photos Franck Denayer).....	114
Photographie 4 : Site témoin de Jenlain (photo Chantal Van Haluwyn).....	116
Photographie 5 : Station de Noyelles-Godault (photo Franck Denayer).....	116
Photographie 6 : Station de Courcelles-les-Lens (photo Franck Denayer).	118
Photographie 7 : Station d'Evin-Malmaison 1, ferme Dugardin (photo Franck Denayer).....	118
Photographie 8 : Station d'Evin-Malmaison 2, ferme Delobel (photo Franck Denayer).	119
Photographie 9 : Usine Metaleurop (photo Franck Denayer).....	119
Photographie 10 : Barquettes de bryophytes avant la mise en place dans les stations (photo Chantal Van Haluwyn).....	120
Photographie 11 : Exemple d'une biostation équipée de trois grandes et trois petites barquettes (photo Chantal Van Haluwyn).	120
Photographie 12 : <i>Ceratodon purpureus</i> au temps t0 (X 15) (photo Franck Denayer)	124
Photographie 13 : Vandalisme sur la station de Courcelles-les-Lens (photo Franck Denayer)	124
Photographie 14 : Etat des barquettes au troisième mois d'exposition (photo Franck Denayer)	124
Photographie 15 : <i>Ceratodon purpureus</i> et son substrat (photo Franck Denayer).....	124

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1 : Utilisation de bryophytes dans la surveillance de dépôts métalliques. (<i>Hypn. cupr. (Hypnum cupressiforme)</i> , <i>Hyl. spl. (Hylocomium splendens)</i> , <i>Pl. schr. (Pleurozium schreberi)</i>).....	
Annexe 2 : Programme de recherches concertées.....	
Annexe 3 : Organigramme du PRC.....	
Annexe 4 : Détermination de la prise d'essai de <i>Ceratodon purpureus</i> pour le dosage des activités GPx, GR et SOD.....	
Annexe 5 : Brevet Bryotec.....	
Annexe 6 : Contrôle qualité de la méthode analytique des dosages des ETM par ICP/MS.....	



ANNEXES



Pays	Type d'étude/source	Type de bryophyte employé	Espèces utilisées	Références bibliographiques
Belgique	Surveillance, 30 sites		<i>Sphagnum</i>	Lembrechts & Vanderborght, 1985
Canada	Fonderie de cuivre Comparaison régionale Comparaison régionale, subarctique Source ponctuelle Surveillance régionale, Ontario Surveillance régionale, provinces maritimes Source ponctuelle, Sudbury, Ontario Etude d'une province maritime	Epigéique Epigéique Epigéique Epigéique	<i>Hyl. spl.</i> <i>Hyl. spl. Pl. schr.</i> <i>Sphagnum</i> <i>Pl. schr.</i> <i>Pl. schr.</i> <i>Sphagnum</i> <i>Sphagnum</i> <i>Sphagnum magellanicum</i>	Le Blanc <i>et al.</i> , 1974 Barclay-Estrup & Rinne, 1978 Glooschenko & Capobianco, 1978 Barclay-Estrup & Rinne, 1978 Rinne & Barclay-Estrup, 1980 Percy, 1983 Gignac, 1987 Percy & Borland, 1985
Danemark	Local, étude rétrospective Etude des relations entre substrats Travaux sur acier, étude de transplants Surveillance régionale, étude de transplants	Epiphyte Epiphyte Epiphyte Epiphyte	<i>Pterogonium gracile</i> <i>Hypn. cupr.</i> <i>Dicranoweisia cirrata</i> <i>Dicranoweisia cirrata</i>	Johnsen & Rasmussen, 1977 Rasmussen, 1978 Pilegaard, 1979 Johnsen <i>et al.</i> , 1983
Finlande	Surveillance régionale avec comparaisons Surveillance régionale, centrale thermique au charbon Surveillance subarctique	 Epigéique Epigéique	<i>Sphagnum</i> <i>Hyl. spl.</i> <i>Pl. schr.</i>	Pakarinen, 1977, 1978, 1981 Pakarinen & Tolonen, 1976 Pakarinen & Rinne, 1979 Mäkinen, 1983 Särkelä & Nuorteva, 1987
Allemagne (R.F.A.)	Surveillance, zone urbaine Surveillance d'une zone industrielle Surveillance nationale Surveillance de la Bavière Surveillance nationale Comparaisons de méthodes Etude méthodologique	Epigéique, acrocarpe Epiphyte	<i>Bryum argenteum</i> <i>Polytrichum formosum</i> <i>Hypn. cupr.</i> <i>Sphagnum</i> <i>Sphagnum</i> <i>Hypn. cupr.</i> <i>Hypn. cupr.</i>	Lötschert <i>et al.</i> , 1975 Markert & Weckert, 1989 Herrman, 1976 Wandtner & Lötschert, 1980 Lötschert & Wandtner, 1982 Wolf <i>et al.</i> , 1984 Thomas, 1986

Annexe 1 : Utilisation de bryophytes dans la surveillance de dépôts métalliques. (*Hypn. cupr.* (*Hypnum cupressiforme*), *Hyl. spl.* (*Hylocomium splendens*), *Pl. schr.* (*Pleurozium schreberi*)).

Grande-Bretagne	Surveillance d'une zone industrielle, étude de transplants Source ponctuelle Source ponctuelle Source ponctuelle Surveillance d'une zone urbaine	Epiphyte Epigéique Epigéique	<i>Hypn. cupr.</i> <i>Plusieurs</i> <i>Hypn. cupr.</i> <i>Hypn. cupr.</i>	Goodman & Roberts, 1971 Lee, 1972 Ratcliffe, 1975 Ellison <i>et al.</i> , 1976 Yule & Lloyd, 1984
USA	Surveillance régionale, NE des USA (Hg) Centrale thermique au fuel (Hg)	Epigéique, acrocarpe Epigéique, acrocarpe Epigéique acrocarpe	<i>Dicranum scoparium</i> , <i>Polytrichum</i> <i>Dircanella</i> , <i>Bryum</i>	Yeaple, 1972
	Zone urbaine (Hg)			Huckabee, 1973
	Surveillance de 6 états dans le NE des USA Surveillance régionale			Mondano & Smith, 1974 Groet, 1976 Furr <i>et al.</i> , 1979
URSS	Surveillance d'une réserve naturelle	Epigéique, acrocarpe Epigéique, acrocarpe Epigéique acrocarpe	<i>Polytrichum commune</i> <i>Sphagnum</i> , <i>Polytrichum</i> <i>Sphagnum</i> , <i>Polytrichum formosum</i>	Markert, 1991
	Surveillance d'une réserve naturelle			Markert & de Li, 1991
	Comparaison multi-élémentaire			Markert & Wtorova, 1992

Annexe 1 (suite)

	Surveillance d'une zone industrielle de Francfort (Main)	Epigéique acrocarpe	<i>Bryum argenteum</i>	Lötschert, 1983
Irlande	Etude locale	Epigéique		Lötschert, 1982
Malaisie	Zones urbaines et rurales	?	<i>Calymperes delessertii</i>	Lee <i>et al.</i> , 1983
Nouvelle-Zélande	District minier et zone en arrière plan		<i>Hypn. cupr.</i>	Ward <i>et al.</i> , 1977
Niger	Etude régionale	Epiphyte	Plusieurs	Onianwa & Ajayi, 1987
Pays nordiques	Surveillance nationale Surveillance nationale	Epigéique Epigéique	<i>Hyl. spl. (Pl. schr.)</i> <i>Hyl. spl. (Pl. schr.)</i>	Rühling & Tyler, 1973 Rühling <i>et al.</i> , 1987
Norvège	Surveillance nationale	Epigéique	<i>Hyl. spl.</i>	Steinnes, 1977, 1980
Pologne	Surveillance zone urbaine Surveillance zone urbaine Surveillance de parcs nationaux	Epigéique Epigéique, acrocarpe Epigéique	<i>Polytrichum, Ceratodon, Atrichum</i> <i>Hyl. spl., Pl. schr.</i>	Czarnowska, 1974 Rejmont-Grochowska, 1976 Grodzińska, 1978 Makomaska, 1979
Suède	Surveillance régionale et étude rétrospective Comparaison régionale Etude méthodologique Surveillance nationale Surveillance nationale Source ponctuelle en Hg Plusieurs surveillances dans des zones urbaines et près de sources ponctuelles Surveillance de plusieurs sites	Epigéique Epigéique et épiphyte Epigéique Epigéique Epigéique Epigéique/épilithe Epigéique	<i>Hyl. spl., Pl. schr., Hyp. cupr.</i> <i>Sphagnum</i> Plusieurs <i>Hyl. spl., (Pl. schr.)</i> <i>Hyl. spl., (Pl. schr.)</i> <i>Hypn. cupr.</i> <i>Hypn. cupr.</i> <i>Hyl. spl., Pl. schr.</i>	Rühling & Tyler, 1968, 1969, 1971 Rühling & Tyler, 1971 Folkeson, 1979a, b Rühling & Tyler, 1984 Statens Naturvårdsverk, 1987 Wallin, 1976 Rühling (dans la majorité de ses études) Ross, 1990
Suisse	Surveillance d'une zone urbaine Etude locale	Epigéique, acrocarpe Epigéique	<i>Bryum argenteum</i> <i>Hyl. spl., Hypn. cupr.</i>	Thöni <i>et al.</i> , 1986 Thöni & Hertz, 1987

PROGRAMME DE RECHERCHES CONCERTÉES

Le Programme de Recherches Concertées (PRC) intitulé "Environnement et activités humaines, évaluation d'un site pollué en vue de sa requalification" a été initié par le Conseil Régional du Nord-Pas-de-Calais en 1993 et est inscrit au Contrat de Plan Etat - Région (1994 -1999).

Il doit répondre à un double objectif :

- La prise en compte des spécificités du Nord-Pas-de-Calais dans le domaine de l'environnement (cessation d'activité industrielle, impact sur la pollution des sols, la santé humaine).

Le Bassin Minier a naturellement été choisi puisqu'il comporte des sites industriels anciens et actuels, des sites urbains, des espaces ruraux résiduels, plus ou moins pollués : l'aire de référence retenue a été le site industriel délimité par les retombées des cheminées d'usines de Métaleurop et d'Union Minière à Courcelles-lès-Lens et Auby.

- La structuration de la recherche sur ces objectifs environnementaux.

Ce Programme de Recherches Concertées concrétise l'apport de la recherche scientifique pour le réaménagement du territoire régional. Par-delà le gain de connaissance qu'il engendre, il a déjà permis de constituer un groupe scientifique régional conséquent et compétent dans le domaine de l'environnement : l'aspect transversal des recherches mises en œuvre dans cette coopération permet d'aborder les problèmes complexes d'un environnement dans sa globalité systémique.

Sur la période 1994 - 1999, le Programme de Recherches Concertées privilégie un thème particulier : l'évaluation du degré de pollution d'une zone minière et industrielle et la mesure de son impact sur l'environnement, la santé et les systèmes socio-économiques.

Il permet la structuration pluridisciplinaire de nombreuses équipes de chercheurs. Des physico-chimistes, des biologistes, des médecins, des sociologues et des économistes étudient les mécanismes de transfert des polluants des industries, au sol à l'eau, aux chaînes végétales, animales jusqu'à l'homme et leurs impacts socio-économiques.

Par ailleurs, dans le Nord-Pas-de-Calais, des réseaux se sont mis en place en prenant l'exemple du PRC :

- le Comité Régional Stratégique de Recherche en Environnement qui associe et rassemble toutes les composantes scientifiques régionales compétentes en matière de recherche en environnement.

- le Pôle de Compétence sur les Sites et Sols Pollués dont l'objectif est de générer des synergies entre les nombreux acteurs dans ces domaines (industriels, organismes publics et privés, collectivités territoriales, administrations, associations, ...).

"Environnement et activités humaines, évaluation d'un site pollué en vue de sa requalification"

Le PRC est le résultat d'une concertation engagée avec l'ensemble des établissements et organismes de recherches régionaux

Evaluation du degré de pollution d'une zone et de l'impact sur l'environnement, la santé et les systèmes socio-économiques

De plus, il a également été créé, à Douai, le Centre National de Recherche sur le Traitement des Sols et Sites Pollués.

Enfin, par les analyses qu'il a menées, ce programme a participé à la dynamique de reconquête du territoire qui se met actuellement en place autour de Métaeurop.

Rappelons que pour ce site un Projet d'Intérêt Général (PIG) a été arrêté en décembre 1997 sur le territoire qui concerne les communes de Courcelles-lès-Lens, Evin Malmaison et Noyelles Godault. Il intègre les pollutions des sols au plomb et au cadmium et définit différents zonages dans lesquelles des mesures devront être intégrées dans les règlements des Plans d'Occupation des Sols. Une concertation locale a été organisée par la Préfecture du Pas-de-Calais en juillet 1998.

Par ailleurs, un projet de territoire expérimental sera présenté dans le cadre du CIADT (Comité Interministériel de l'Aménagement du Territoire) concernant les opérations à mener au niveau de la Conférence Permanente du Bassin Minier (requalification des sols pollués, prévention et aménagement).

Le territoire Métaeurop étant à ce jour le site français pour l'expérimentation de la dépollution, il nous semblerait nécessaire de réfléchir à la création d'un « outil » régional fédérateur de recherche (tel un GIP) qui permettrait de mettre en œuvre le diagnostic environnemental et sanitaire, et l'éventuelle requalification des sols pollués (traitement, surveillance, banalisation). Cet outil viserait à la conception d'instruments d'aide à la décision en matière de requalification territoriale, de prévention et d'aménagement.

Cela conforterait alors les approches transversales et favoriserait la mise en commun de compétences pour répondre aux problématiques engendrées par les zones pollués sous des aspects sanitaires, biologiques, biochimiques, chimiques, physiques, géologiques et socio-économiques.

En fonction des priorités et orientations définies en concertation Etat - Région, des schémas d'évaluation des risques pourraient être réalisés (les résultats du PRC sont une base conséquente en ce sens) et devraient permettre l'élaboration de normes sur les sols qui existent déjà dans certains pays mais pas en France.

Par cet investissement la région répondrait à un réel problème de santé publique et d'aménagement du territoire et pourrait être pionnière au niveau national et international en " requalification des sites et sols pollués ".

Développer une politique régionale globale sur les problèmes d'environnement

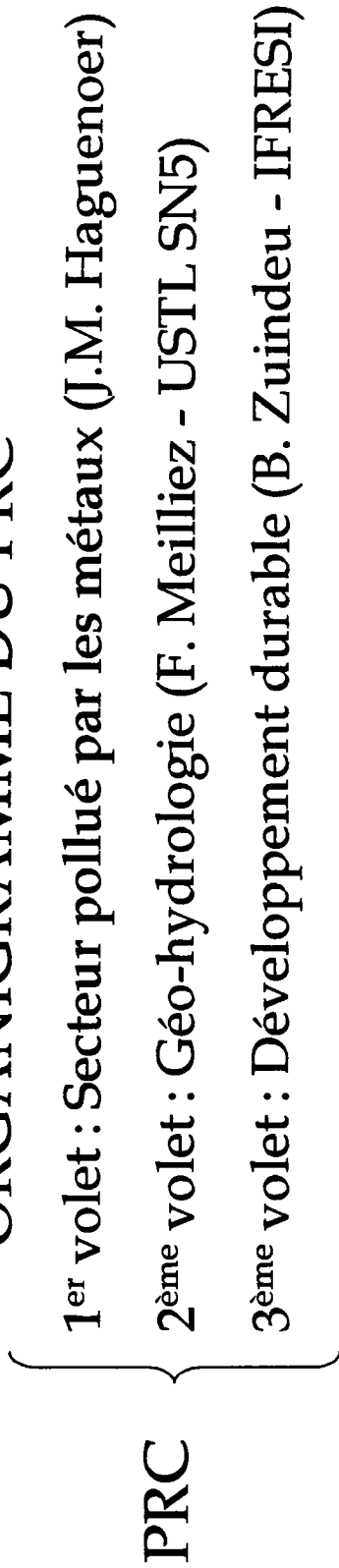
Recherche des solutions aux problèmes de sites pollués

« Outil » régional fédérateur

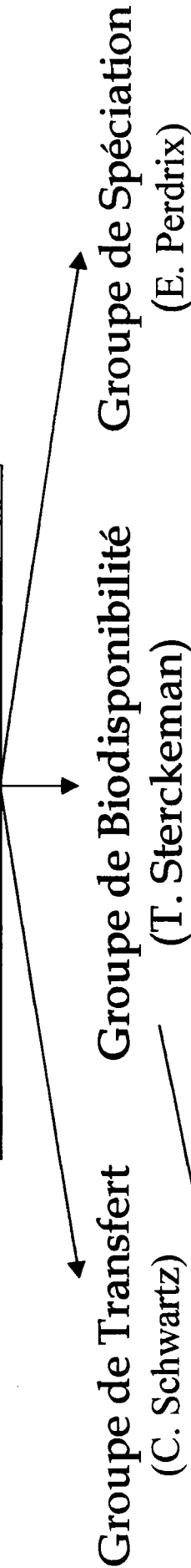
Diagnostic, requalification, prévention et aménagement des sols pollués

Elaboration des schémas d'évaluation des risques et des normes sur les sols

ORGANIGRAMME DU PRC



1^{er} volet (J.M. Haguenoer)



- Toxicologie (J.M. Haguenoer)
- Épidémiologie (A. Leroyer)
- Botanique (C. Van Haluwyn)
- ISA (C. Schwartz)
- INRA (T. Sterckeman)
- USTL (M. Petit, M. Descamps, LASIR)
- École des Mines de Douai (E. Perdrix)

Il y a un conseil scientifique constitué d'experts nationaux et internationaux qui évalue les travaux

PRC : Programme de Recherches Concertées

**Mécanismes de pollutions des sites et sols en vue
de leurs requalifications. Impact sur l'environnement, la santé et les
systèmes socio-économiques**

J. M. HAGUENOER - M. MAZZUCA

**VOLET 1 : Secteur pollué par les métaux
J.M. HAGUENOER (Université Lille II)**

Transfert : C. Schwartz (ISA)

Spéciation : E. Perdrix (Ecole des Mines de Douai)

Bioaccessibilité : T. Streckeman (INRA)

**VOLET 2 : Géo-hydrogéologie
F. MEILLIEZ (USTL)**

**VOLET 3 : Développement durable
B. ZUINDEAU et E. TORRES (IFRESI)**

Dosage d'enzymes antioxydantes dans des broyats de mousse *Ceratodon*

	Pesée	Protéines	Glutathion réductase	Glutathion peroxydase	Superoxyde dismutase	Superoxyde dismutase
	mg	mg/ml	U/L	U/L	U/ml	U/mg prot
X 1.1	100	0,415	2,60 < seuil	0	0,76	1,83
X 1.2	100	0,329	3,55 < seuil	0	0,80	2,43
X 1.3	100	0,351	3,17 < seuil	0	0,88	2,51
X 2.1	50	0,212	4,06 < seuil	0	0,46	2,17
X 2.2	50	0,226	4,45 < seuil	0	0,47	2,08
X 2.3	50	0,222	5,57 < seuil	0	0,34	1,53
X 3.1	20	0,180	1,71 < seuil	0	0,29	1,61
X 3.2	20	0,157	1,71 < seuil	0	0,22	1,40
X 3.3	20	0,157	1,94 < seuil	0	0,21	1,34

* aberrante

Commentaires:

Décongélation, agitation au vortex puis centrifugation 10 min. 3000 g

Glutathion réductase: Valeurs inférieures au seuil de linéarité

Glutathion peroxydase: non détectable

Superoxyde dismutase: pour X1, dilution au 1/2 dans Tp réactionnel
pour X3, augmentation de la prise d'essai

Conclusion:

Une pesée comprise entre 50 at 100 mg serait suffisante

Dosage d'enzymes antioxydantes dans la mousse Ceratodon

	Protéines		SOD		Facteur de dilution		SOD		SOD		GPX		GR	
	mg/ml	U/ml	U/ml	U/ml	dilution	U/ml	U/mg prot	U/L	U/L	U/L	U/L	U/L	U/L	
Broyés	50 mg	0,075	0,26	0,52	2	0,52	6,93	0	< seuil					
Broyés	100 mg	0,183	0,51	1,02	2	1,02	5,57	0	< seuil					
Broyés	150 mg	0,102	0,28	0,56	2	0,56	5,49	0	< seuil					
Broyés	200 mg	0,203	0,71	1,42	2	1,42	7,00	0	< seuil					
Non broyés	50 mg	0,014 *	0,02	0,02	1	0,02	1,43	0	< seuil					
Non broyés	100 mg	0,091 *	0,01	0,01	1	0,01	0,11	0	< seuil					
Non broyés	150 mg	0,033 *	0,00	0,00	1	0,00	0,00	0	< seuil					
Non broyés	200 mg	0,036 *	0,04	0,04	1	0,04	1,11	0	< seuil					

Echantillons repris dans 2 ml de tampon phosphate au lieu de 6

Broyés et non broyés

Centrifugation 1500 trs/mn pendant 10 minutes, filtration

SOD passée pur et 1/2 * < seuil de linéarité

GPX et GR prise d'essai 50 µL au lieu de 10

Brevet Bryotec

Le brevet Bryotec est copropriété de Michel CHIAFFREDO et Claude FIGUREAU.

La société MCK Environnement est licenciée exclusive pour la fabrication.

La société BRYOTEC assure la commercialisation des produits.

EN EUROPE ET EN FRANCE : Type = Brevet Européen (Validation)

- France : 0478474
- Allemagne : 691 10 389.5
- Autriche : E123622
- Espagne : 0478474-ES
- Pays Bas : 0478474-NL
- Belgique : 0478474
- Italie : 0478474-IT
- Suisse : 0478474.1

AUX USA : Patent number 5441877 du 15 Août 1995.

Contrôle qualité de la méthode analytique des dosages des ETM par ICP

Les analyses des éléments traces métalliques ont été réalisées par la société AGREN (Vennecy).

Les mesures ont été effectuées sur spectromètre I.C.P./ AES de marque Jobin Yvon, modèle 138 ULTRACE. C'est un appareil séquentiel de 1m de focale, avec une puissance de générateur de 1000 watts, une chambre cyclonique et un nébuliseur Meinhard. Le gaz porteur est de l'argon 12 l/min et gainage argon 0,2 l/min.

Conditions analytiques :

Mesure de plomb :

Longueur d'onde retenue : 220,353 nm, limite de dosabilité : 40 ppb

Mesure du zinc :

Longueur d'onde retenue : 213,856 nm, limite de dosabilité : 10 ppb

Mesure du cadmium :

Longueur d'onde retenue 228,802 nm, limite de dosabilité : 1 ppb

Pour le dosage du cadmium dans le milieu chlorure de nickel (lors de l'éluion séquentielle), il a été mis en évidence une interférence faussant la mesure du cadmium. Après plusieurs essais, la longueur d'onde de 214,438 nm a été retenue. La limite de dosabilité dans ce cas est de 1 ppb.

Cette limite de dosabilité est établie par une méthode interne basée sur des mesures et un traitement statistique.

RESUME EN FRANÇAIS

Cette recherche est axée sur l'écotoxicité des éléments traces métalliques à différents niveaux d'organisation des Bryophytes. Ainsi, dans une approche écotoxicologique pluridisciplinaire de la pollution métallique, nous abordons chez les Bryophytes, considérés comme des sentinelles de l'environnement, des aspects communautaires, physiologiques et cellulaires. Nous avons pu ainsi établir une échelle de diagnostic de la contamination des sols par l'observation des communautés bryophytiques et bryolichéniques terricoles. Nous avons mis au point un bryocapteur des retombées atmosphériques à l'aide de *Ceratodon purpureus*. Cette Bryophyte ubiquiste présente une certaine capacité à tolérer les fortes concentrations en éléments traces métalliques mais arrive également à se développer sur des sols non contaminés. L'exposition de ce bryocapteur à des retombées en Cd, Pb et Zn (à proximité de Metaleurop, une usine de métaux non ferreux située à Noyelles-Godault, Pas-de-Calais, France), nous a permis d'observer les réponses biologiques de cette Bryophyte par l'intermédiaire de biomarqueurs de stress oxydant. Le stress oxydant causé par les éléments traces métalliques au niveau cellulaire provoque la mise en place de mécanismes de compensation tels que l'augmentation de l'activité des superoxyde dismutases et de la biosynthèse du glutathion. Ces phénomènes sont très peu étudiés en bryologie et permettent la mise en place d'outils de diagnostic précoce de la présence et des effets de polluants dans l'environnement.

Cette recherche s'est effectuée dans le cadre d'un programme de recherches concertées, inscrit dans le contrat de plan Etat-Région 1994-1999.

Mots-clés : Bryophytes, bioindicateur, biosurveillance, stress oxydant, éléments traces métalliques, tolérance, biocapteur

TITRE EN ANGLAIS

Ecotoxicity of heavy metals in Bryophytes:

Setting up of an atmospheric repercussions bryocaptor with Ceratodon purpureus (Hedw.) Brid.

ENGLISH SUMMARY

This research is focused on the heavy metals ecotoxicity at various organization levels in Bryophytes. In a multi-disciplinary ecotoxicological approach of metal pollution, we have studied in Bryophytes, considered as sentinels of the environment, community, physiological and cellular aspects. Thus, we have been able to set up a scale of soil contamination diagnosis thanks to the observation of bryophytic and bryolichenic terricolous communities. We have developed a bryocaptor of atmospheric fallouts using *Ceratodon purpureus*. This ubiquitous Bryophyte has some ability to tolerate high heavy metals concentrations but is also able to grow on non-contaminated grounds. The exposure of this bryocaptor to Cd, Pb and Zn fallouts (near Metaleurop, a non-ferrous metals plant located in Noyelles-Godault, department of Pas-de-Calais, France), enabled us to observe the biological answers of this Bryophyte via biomarkers of oxidative stress. This heavy metals-induced stress initiated at the cellular level compensation mechanisms such as the increase of the 1) superoxide dismutases activity and 2) glutathion biosynthesis. These phenomena are poorly studied in bryology and yield the setting-up of tools useful for an early diagnosis of the presence and effects of pollutants in the environment.

This research has been carried out within the framework of a concerted research program, registered in the "Contrat de Plan Etat - Région" 1994-1999.

Key words: bryophytes, bioindication, biomonitoring, oxidative stress, heavy metals, tolerance, biocaptor

DISCIPLINE

TOXICOLOGIE DE L'ENVIRONNEMENT