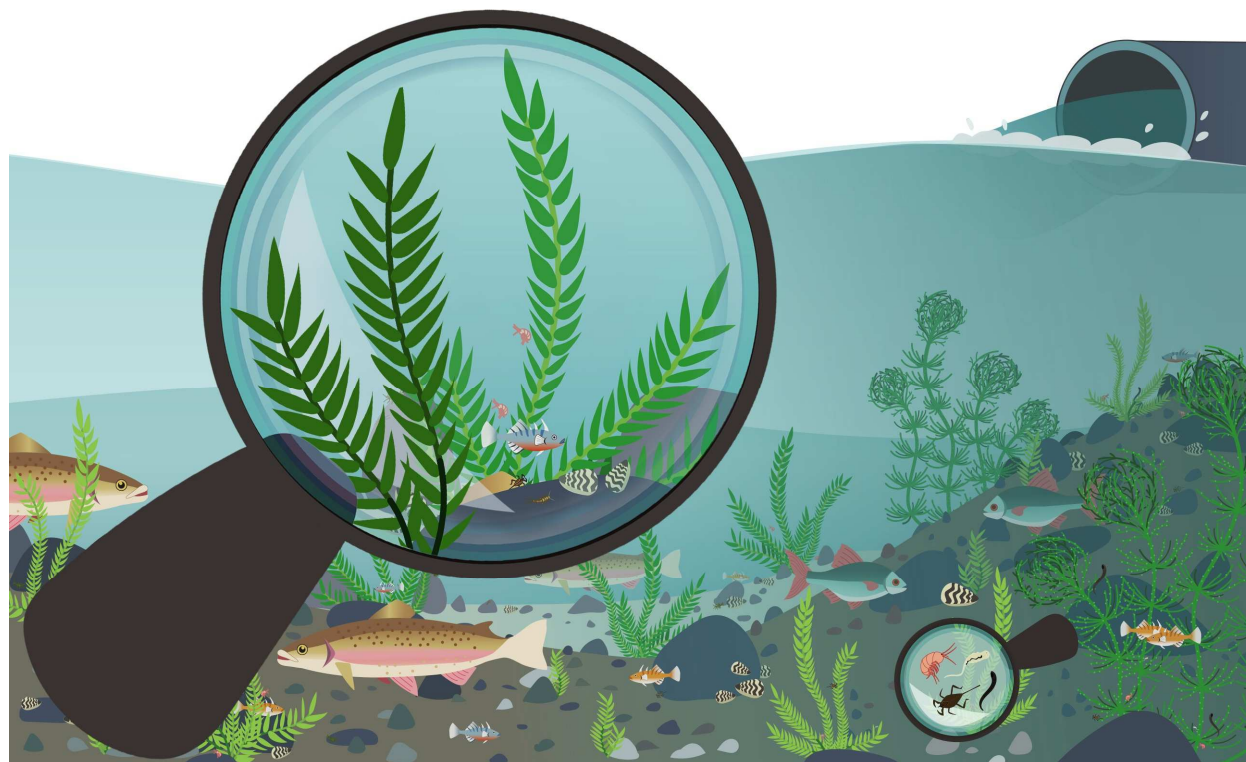


# Guide des gestionnaires

Méthodologie d'évaluation de la qualité des masses d'eau à l'aide de la mousse encagée (*Fontinalis antipyretica*)

Avec le soutien du Fonds Européen pour le Développement Régional (FEDER) et de la Wallonie via la Direction générale de l'Agriculture, des Ressources naturelles et de l'Environnement (DGO3)



## **Avant-propos**

Ce guide méthodologique présente une approche de biosurveillance développée pour répondre au besoin de méthodes d'évaluation de l'état chimique des masses d'eau et des mesures prédictives du risque toxique pour l'homme et l'environnement.

Il a été mis en valeur dans le cadre du projet INTERREG FWVL DIADeM et se base sur une mousse aquatique *Fontinalis antipyretica*. Cette plante revêt plusieurs avantages pour évaluer la contamination chimique et la toxicité des milieux aquatiques.

Le guide décrit la méthodologie d'échantillonnage et d'encagement de la mousse et les méthodes de mesures des biomarqueurs d'écotoxicité.

L'organisation et la rédaction principale ont été réalisées par Khadija Sossey chargée du « Modèle Plante » dans le cadre du projet DIADeM. Ensuite, il a été supervisé par le professeur Bernard Tychon, chef de l'Unité Eau Environnement et Développement de l'Université de Liège, Campus d'Arlon.

# Table des Matières

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| <b>1</b> | <b>Introduction</b>   | <b>1</b>  |
| <b>2</b> | <b>Matériel et méthodes</b>                                       | <b>1</b>  |
| 2.1      | Choix du Modèle biologique . . . . .                              | 1         |
| 2.1.1    | Pourquoi les Bryophytes? . . . . .                                | 1         |
| 2.1.2    | Pourquoi <i>F.antipyretica</i> ? . . . . .                        | 2         |
| 2.1.3    | Collecte et préparation . . . . .                                 | 3         |
| 2.1.4    | Système d'encagement : cages . . . . .                            | 6         |
| 2.1.5    | Quantité de mousses encagée . . . . .                             | 7         |
| 2.1.6    | Conditionnement des échantillons avant l'encagement . . . . .     | 7         |
| 2.1.7    | Echantillons de contrôle . . . . .                                | 7         |
| 2.1.8    | Sites d'exposition . . . . .                                      | 8         |
| 2.2      | Déploiement sur le terrain . . . . .                              | 8         |
| 2.2.1    | Transport vers le site d'encagement . . . . .                     | 8         |
| 2.3      | Exposition par encagement . . . . .                               | 9         |
| 2.3.1    | Localisation des transplantations et support de soutien . . . . . | 9         |
| 2.3.2    | Durée d'exposition . . . . .                                      | 9         |
| 2.3.3    | Nombre de cages par site.....                                     | 10        |
| 2.4      | Récupération des cages.....                                       | 10        |
| 2.5      | Retour au laboratoire.....  | 10        |
| 2.6      | Mesure des traits morphologiques.....                             | 10        |
| 2.7      | Analyse des biomarqueurs d'écotoxicité.....                       | 11        |
| 2.7.1    | Préparation des échantillons pour les analyses.....               | 11        |
| 2.7.1.1  | Lyophilisation.....   | 11        |
| 2.7.1.2  | Broyage des échantillons.....                                     | 11        |
| 2.7.1.3  | Macération.....   | 12        |
| 2.7.2    | Analyse.....  | 12        |
| 2.7.2.1  | Superoxyde dismutase (SOD, EC 1.15.1.1.).....                     | 12        |
| 2.7.2.2  | Catalase (EC 1.11.1.6.).....                                      | 13        |
| 2.7.2.3  | Guaiacol peroxydase (GPX, EC 1.11.1.7.).....                      | 14        |
| 2.7.2.4  | Analyse de la Chlorophylle.....                                   | 14        |
| 2.7.2.5  | Bioaccumulation.....  | 15        |
| 2.7.2.6  | Ascorbate peroxydase (APX, EC 1.11.1.11).....                     | 16        |
| 2.7.2.7  | Glutathion réductase (GR, EC 1.6.4.2).....                        | 16        |
| 2.7.2.8  | Composés thioliques.....  | 17        |
|          | <b>Appendices</b>   | <b>19</b> |

## Table des figures

|   |  |    |
|---|--|----|
| 1 | Sites de récolte de <i>F.antipyretica</i> : La mousse a été collectée dans les sites forestiers et dans les ruisseaux des têtes des sous bassins du bassin Semois-Chiers . . . . . | 4  |
| 2 | cage . . . . .   | 6  |
| 3 | Les différents sites d'exposition de <i>F.antipyretica</i> . . . . .   | 8  |
| 4 | Matériel terrain pour le déploiement.....  | 19 |
| 5 | Matériel terrain pour la récupération.....   | 19 |
| 6 | Fiche1 de terrain.....   | 20 |
| 7 | Fiche2 de terrain.....   | 20 |

## Liste des tableaux

# 1 Introduction

Le besoin de méthodes d'évaluation de l'imprégnation chimique des masses d'eau et des mesures prédictives du risque toxique pour l'environnement et l'homme entraînent un regain d'intérêt pour les biomarqueurs. Ces derniers sont utilisés en tant qu'outils d'aide au diagnostic de contamination et à la gestion du risque toxique.

Le présent document présente une approche de biosurveillance développée pour répondre à cette préoccupation. La méthode est basée sur une petite mousse aquatique *Fontinalis antipyretica* qui revêt plusieurs avantages pour évaluer la contamination chimique et la toxicité des milieux aquatiques.

L'approche a été développée dans le cadre d'un projet interrégional (projet DIADeM)(<https://www.interregdiadem.eu/>). Ce dernier propose de développer une procédure de surveillance basée sur l'utilisation de biomarqueurs d'écotoxicité, révélateurs d'une exposition aux contaminants et mesurés chez des espèces représentatives de la flore et de la faune du Bassin de la Meuse.

Dans ce projet, Uliège s'est impliquée dans ce projet et avait comme principale mission de définir les biomarqueurs d'écotoxicité mesurés/observés sur la mousse aquatique dite '*Fontinalis antipyretica*'.

Ce document constitue le guide méthodologique d'encadrement et d'analyse de biomarqueurs d'écotoxicité mesurés sur cette espèce.

## 2 Matériel et méthodes

### 2.1 Choix du Modèle biologique

#### 2.1.1 Pourquoi les Bryophytes ?

Les bryophytes aquatiques plus souvent dénommées mousses aquatiques sont une catégorie de plantes présentant des caractéristiques qui en font d'excellents indicateurs de la qualité du milieu naturel. Dépourvues de système vasculaire développé et de racines, elles sont directement exposées aux variations du milieu et donc très sensibles à toutes modifications de leur habitat. Sous l'eau comme sur terre, les bryophytes sont de petites plantes qui se distinguent des plantes vasculaires par :

- l'absence de véritables vaisseaux conducteurs pour le transport d'eau et de minéraux dans toute la plante. L'absorption des polluants se fait directement à travers les feuilles,
- l'absence de véritables systèmes racinaires (ils disposent de rhizoïdes qui n'ont qu'une fonction d'ancrage),

- le manque de fonctionnalités, comme un épiderme à plusieurs couches ou de l'écorce. Leurs feuilles sont unistartifiées leur permettant une absorption rapide des nutriments.

Elles sont d'excellents bioaccumulateurs de polluants. Elles représentent un point d'entrée des polluants dans la chaîne trophique pouvant mener à leur amplification.

### 2.1.2 Pourquoi *F.antipyretica* ?

*F.antipyretica* revêt plusieurs avantages pour évaluer la contamination chimique et la toxicité des milieux aquatiques :

- Espèce ubiquiste présente en Belgique, en France mais aussi en Europe et dans le monde entier ;
- base de la chaîne trophique et espèce clef pour le fonctionnement des écosystèmes aquatiques. En tant que base principale de la production primaire dans la plupart des hydrosystèmes, les bryophytes en général et la mousse en particulier peuvent apporter des informations précieuses sur l'état de santé des milieux aquatiques ;
- espèce d'intérêt pour les essais d'écotoxicité. Dépourvue de système vasculaire développé et de racines, elle est directement exposée aux variations du milieu. Elle vit également toute l'année et peut être utilisée en biosurveillance à n'importe quelle période de l'année ;
- espèce sensible à la pollution chimique (micropolluants) ;
- elle n'a pas besoin d'être nourrie ;
- elle n'est pas envahissante et son utilisation dans la biosurveillance peut résoudre divers problèmes liés à l'utilisation d'espèces indigènes. Ainsi, son utilisation dans la bryomonitoring active peut être utilisée dans les sites où les bryophytes indigènes sont rares ou absentes. Il permet également d'éviter les éventuelles adaptations phénotypiques ou génotypiques des plantes indigènes aux contaminants dans les zones polluées ;
- elle est connue pour ses capacités de bioaccumulation de métaux lourds et de contaminants organiques.

Sa capacité de résolution, associée à sa plus grande résistance à la pollution et à sa plus grande distribution et abondance, suggère que cette espèce possède toutes les qualités pour être utilisée dans les études de biosurveillance environnementales.

Pour répondre aux objectifs de la directive 2013/39/UE, cette espèce peut

être utilisée comme biote alternatif à la matrice de référence qu'est le poisson pour identifier/prioriser les sites où le prélèvement de poissons s'avère justifié, dans le cadre d'une approche graduée d'évaluation de l'état (tiered-approach for compliance assessment). Cette démarche a l'intérêt de limiter le prélèvement de poissons à l'étape de confirmation du diagnostic d'état, et de préserver ainsi la ressource piscicole.

### **2.1.3 Collecte et préparation**

- **Site de collecte de l'espèce**

La mousse *F.antipyretica* a été prélevée dans les sites forestiers et dans les ruisseaux en têtes des sous bassins du bassin Semois-Chiers. Il s'agit des masses d'eau de référence définies en Wallonie pour le bassin versant de la Meuse [13, 26, 16] (Figure 1). Ces habitats sont situés dans un environnement à faible pression anthropique et aux altérations très limitées de leur physico-chimie, hydromorphologie et de leur qualité biologique.

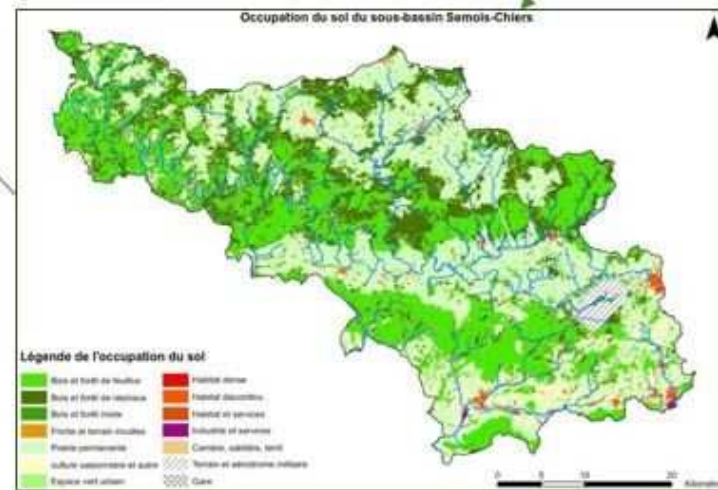
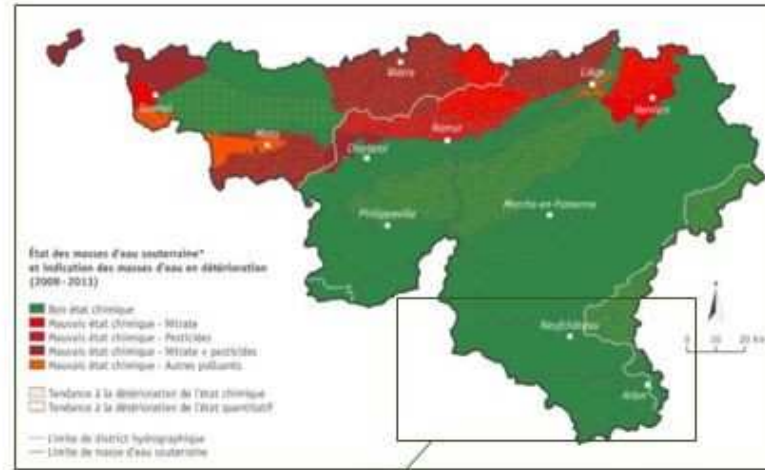


Figure 1: Sites de récolte de *F.antipyretica* :  
 La mousse a été collectée dans les sites forestiers  
 et dans les ruisseaux des têtes des sous bassins du bassin Semois-Chiers



Une fois sur le terrain, les mousses récoltées sont placées dans d'un grand tamis en PVC et subissent un premier lavage dans la rivière avant d'être ramenées au laboratoire. Sur site, les coordonnées géographiques du lieu de prélèvement ainsi que les conditions environnementales sont notées. Les paramètres physico-chimiques dont la température de l'eau, la conductivité, l'oxygène dissout et le pH sont également mesurés à l'aide d'une sonde multiparamétrique et notés dans la fiche de terrain (Figures 6 et 7) des annexes.

- **Condition de transport**

Les mousses collectées sont transportées dans des bacs remplis d'eau de rivière et oxygénés à l'aide d'une pompe à air portable à piles.

- **Traitements pré-exposition**

Une fois au laboratoire les mousses sont nettoyées généralement plusieurs fois avec de l'eau. Tous les débris végétaux, animaux et callouteux sont éliminés. Un tri des parties de la plante à exposer est également réalisé.

Pour l'analyse des traits de vie, les tiges sélectionnées devraient avoir des tailles plus ou moins proches. Pour cela, une quarantaine de tiges par cage est sélectionnée et leurs traits caractéristiques sont mesurés.

Sont considérés dans cette analyse : la couleur des feuilles, la longueur de la tige, la longueur des entrenœuds, la largeur de la feuille, la longueur de la feuille, la surface foliaire, le poids frais, le poids sec, le nombre de rameaux et la couleur des feuilles.

Les mousses dont les traits sont mesurés sont ensuite placées dans la partie supérieure de la cage conçue pour ce type d'échantillon.

- **Préparation de l'échantillon transplanté**

Une sélection appropriée de la partie de pousse utilisée pour les échantillons transplantés est essentielle. Ceci permet de produire du matériel aussi homogène et représentatif que possible pour une comparaison valide de sites d'étude.

Peu d'études antérieures ont montré une différence d'accumulation entre l'apex et la base de la tige [8]. Il est cependant préférable de sélectionner comme matériel d'exposition les parties supérieures de la plante. Ces dernières augmentent l'assimilation des polluants et diminuent les impuretés des échantillons provoquées dans certains cas par les tiges et les rhizoïdes des mousses.

La difficulté de ce dernier choix est de trouver suffisamment de matériel

lors d'une transplantation à grande échelle.

#### 2.1.4 Système d'encagement : cages

Différents systèmes ont été utilisés dans les études antérieures comme outils de transplantation des mousses. Il s'agit notamment de blocs de pierre sur lesquels les mousses sont attachées, de fils de nylon au bout desquels des touffes de mousses sont suspendues dans le milieu d'exposition, des flacons de plastiques présentant une perforation facilitant la circulation de l'eau et finalement le système des cages. Dans notre protocole, nous avons adapté le système le plus utilisé qui est celui des cages.

Cependant, il faut noter que ces cages doivent respecter certains critères à savoir la taille, la largeur des mailles et le type de matériaux utilisé (coton, nylon, etc.). Ces caractéristiques peuvent interférer dans le processus d'absorption et sont à prendre en considération.

Dans notre cas, le matériel utilisé dans la fabrication des cages est le nylon. La cage est constituée de deux parties (Figure 2) :

- une partie inférieure contenant les mousses sont destinées aux analyses enzymatiques et bioaccumulations ;
- et une partie supérieure réservée aux mousses destinées aux mesures des traits morphologiques.

Ces derniers sont mesurés avant et après l'exposition. La taille des cages devrait être proportionnelle à la quantité de mousse désirée et dépend donc des objectifs fixés pour l'étude.

la taille des mailles doit empêcher la perte du matériel mais aussi permettre une circulation suffisante de l'eau et l'assimilation de nutriments. Il est conseillé de prendre un tissu dont la taille des mailles est entre 6 et 30 mm<sup>2</sup>.



Figure 2: cage

### **2.1.5 Quantité de mousses engagée**

Elle peut varier selon l'objectif de l'étude mais en général elle doit être suffisante pour permettre de réaliser plusieurs analyses (bioaccumulation des des polluants organiques et inorganiques, activités enzymatiques et non enzymatiques,..) et d'avoir une certaine quantité en réserve en cas de besoin.

Il faut noter que l'effet mécanique de l'eau entraîne une perte du matériel, particulièrement dans le cas des cages à larges mailles.

Finalement la quantité de mousse devrait être proportionnelle à la taille de la cage. Une quantité importante dans une petite cage empêche la bonne circulation de l'eau entre les différents pieds de mousses et limite l'assimilation aux mousses en contact avec la surface de la cage.

Un poids de 38 à 50 mg par cm<sup>2</sup> est conseillé.

### **2.1.6 Conditionnement des échantillons avant l'encagement**

Pour assurer des conditions optimales aux bryophytes fraîches, le délai entre le prélèvement du matériel sur le site de référence et son exposition dans les sites d'étude doit être minimal. Deux semaines maximum sont conseillées.

Durant cette période de conditionnement, les mousses sont acclimatées dans des aquariums en conditions contrôlées de laboratoire.

L'eau des aquariums provient du ruisseau dans lequel les mousses ont été collectées et elle est renouvelée une fois tous les deux jours.

Les aquariums sont équipés d'un éclairage (cycle lumière/obscurité de 16 :8 h à 15 ± 2 °C, 1920 ± 86 lux), d'un filtre interne et d'une aération constante (système d'aération qui permet d'augmenter le taux d'oxygène dissous dans l'eau).

Après une semaine, les mousses sont placées dans les cages. Pour ce-là, 200g de mousse sont placés dans chaque cage qui est ensuite remise dans les aquariums pour un nouveau conditionnement. Il est nécessaire d'avoir une bonne circulation d'eau dans les cages.

Deux jours avant l'encagement sur le terrain et pour chaque cage, une quarantaine de tiges sont sélectionnés et leurs traits de croissance sont mesurés. Ces échantillons sont ensuite placés dans la partie supérieure de la cage conçue pour les isoler. La veille de la phase d'exposition sur le terrain, chaque cage est fermée et désignée par un fil métallique plastifié de couleur différente et également numérotée à l'aide d'une étiquette plastifiée.

### **2.1.7 Echantillons de contrôle**

Une partie du matériel collecté sur le site de référence est stockée pour la détermination ultérieure des concentrations initiales de chacun des contaminants

considérés. Ces valeurs sont ensuite utilisées pour calculer le facteur d'enrichissement ( $EF = \text{concentration finale} / \text{concentration initiale}$ ) et l'enrichissement net ( $NE = \text{concentration finale} - \text{concentration initiale}$ ) pour chacun des échantillons et des contaminants étudiés.

### 2.1.8 Sites d'exposition

Au cours de l'automne 2018, les encagements des différents modèles biologiques (5 organismes : la mousse *F.antipyretica*, le crustacé gammare (*Gammarus* sp.), le mollusque bivalve (*Dreissena polymorpha*), le poisson épinouche (*Gasterosteus aculeatus*) et la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus myliss*) ont été menés de façon conjointes sur différentes stations wallonnes et françaises du bassin de la Meuse (amont/aval des STEP de Charleville-Mézières, Namur, Bouillon, Charleroi et Avesnes-sur-Helpe). L'exposition de *F.antipyretica* a été limitée aux 4 steps dont Charleville-Mézières, Namur, Bouillon et Avesnes-sur-Helpe (Figure3). Le protocole décrit dans ce document est celui appliqué dans cette étude réalisée dans le cadre du projet DIADem (<https://www.interregdiadem.eu/>).



Figure 3: Les différents sites d'exposition de *F.antipyretica*

## 2.2 Déploiement sur le terrain

### 2.2.1 Transport vers le site d'encagement

Les triplicatas de chaque site sont placés dans un bac rempli d'eau et oxygéné à l'aide d'une pompe uniclife à air portable à piles avec pierres à air et tube en Silicone.

## **2.3 Exposition par engagement**

Les cages préparées sont exposées aux conditions environnementales du site d'étude. Il faut noter que les concentrations finales des contaminants dans la mousse sont affectées par la combinaison des différents aspects de l'exposition : emplacement des cages, type de système utilisé, durée d'exposition et nombre de sacs par site. Nous tenons donc à les préciser dans les paragraphes suivants.

### **2.3.1 Localisation des transplantations et support de soutien**

Dans les rivières, le débit très variable dans la colonne d'eau peut affecter la disponibilité des contaminants et leur absorption par les mousses. Il est donc préférable de placer les trois cages dans trois endroits éloignés d'au moins 4 m mètres. Ceci évite la perte totale en cas de vandalisme et expose la mousse à différentes situations hydrologiques permettant d'augmenter l'assimilation des polluants.

Dans le cas d'évaluation d'amont et d'aval d'un rejet, les cages du site amont devraient être placées à plus de 5 mètres en amont du rejet afin d'éviter une éventuelle contamination en cas de refoulement.

Les cages doivent être attachées à un support situé sur la berge (arbre dans notre cas) à l'aide d'un fil de nylon tressé souple de 2 mm de diamètre. La couleur de ce dernier devrait être discrète pour réduire sa visibilité et éviter toute tentative de vandalisme. La longueur du fil devrait être suffisante pour permettre aux cages de s'éloigner du pied de berge pour une bonne assimilation des contaminants. Cinq mètres sont conseillés.

Les cages déposées sur chaque point sont identifiées à l'aide de la fiche terrain. Des photos sont prises pour repérer les lieux et leurs numéros sont notés dans la fiche terrain de suivi. Ceci permettra de reconnaître plus facilement les emplacements des cages le jour du prélèvement.

Les points GPS des emplacements sont également notés dans la fiche de terrain.

### **2.3.2 Durée d'exposition**

Les quantités d'éléments accumulés par les mousses dépendront en grande partie de la durée d'exposition [5, 17, 11, 10].

Dans le cas des métaux lourds par exemple, la teneur en métaux de la mousse atteint le point de saturation lorsque tous les sites d'échange ionique sont occupés [8].

La durée d'exposition varie généralement entre 1 et 2 semaines [27, 21, 14] et 3-4 semaines [19, 2, 3]. Un délai d'un mois >minimum est conseillé dans notre protocole.

### **2.3.3 Nombre de cages par site**

Le nombre de cages de mousse exposés dans les études de biosurveillance active varie entre 1 et 13. En revanche de nombreuses études ont montré que le coefficient de variation entre les concentrations mesurées sur les cages exposées dans un site reste faible [14, 18, 23]. Peu d'études ont montré une grande variation [24, 23]. Nous recommandons l'option de trois réplicats par site.

## **2.4 Récupération des cages**

La récupération des cages se fait 30 jours après la date de leur dépôt.

Une fois sur place, la situation des trois cages sera localisée grâce aux photos et aux coordonnées GPS notées lors de dépôt.

Les paramètres physico-chimiques et hydrologiques seront mesurés. La position des cages dans l'eau sera notée et comparée à leur position initiale. Les cages sont ensuite sorties de l'eau à 10 minutes d'intervalle.

Les cages seront ensuite placées dans des bacs thermotactiles remplis d'eau du ruisseau et oxygénée à l'aide de l'uniclife pompe à air à piles.

## **2.5 Retour au laboratoire**

Au laboratoire, les mousses sont gardées dans l'eau du site et placées dans une chambre à température constante jusqu'au lendemain.

Le lendemain les échantillons sont mis dans des flacons numérotés et étiquetés. Le type d'analyse auxquelles les mousses sont destinées est également noté sur l'étiquette du flacon.

Les flacons dont les échantillons sont destinées aux analyses de bioaccumulation et antioxydants enzymatiques et non enzymatiques sont conservés à une température de -20°C jusqu'à la date prévue pour l'analyse. Une partie des mousses est également conservée dans des flacons pour d'éventuelles analyses.

Les échantillons destinés aux analyses des activités chlorophylliennes et des traits morphologiques sont directement analysés. Analyse des biomarqueurs Les biomarqueurs d'écotoxicité correspondent à divers traits morphologiques associés à des réponses physiologiques impliquées dans les fonctions anti-oxydante, immunitaire et de détoxification ont été mesurées chez la mousse *F.antipyretica*.

## **2.6 Mesure des traits morphologiques**

Les traits morphologiques demandent des échantillons frais et sont mesurés directement dans les trois jours qui suivent la récupération des cages.

Les échantillons sont d'abord lavés à l'eau distillée et les mesures sont réalisées

sous une loupe binoculaire en utilisant une règle graduée ou en SVT avec le logiciel Mesurim.

Les mousses mesurées sont conservées une semaine dans une chambre thermostatée avant d'être jetées.

Il est possible d'estimer la surface foliaire avec un mesureur laser portable CI-203 de surface de feuilles. Il s'agit d'un Planimètre mesureur laser portatif de surface des feuilles (CI-203 | CID BIO-SCIENCE). Six paramètres mesurables (surface, largeur, longueur, périmètre, facteur de forme, et ratio d'aspect) peuvent être mesurés par cette appareil et peuvent être compilés simultanément, enregistrés et transférés à un PC ou une imprimante externe.

## **2.7 Analyse des biomarqueurs d'écotoxicité**

### **2.7.1 Préparation des échantillons pour les analyses**

Avant chaque analyse, les échantillons conservés sont retirés du congélateur et subissent différentes étapes de préparation. Notons par exemple la lyophilisation, broyage, macération, filtration,..... .

#### **2.7.1.1 Lyophilisation**

Les échantillons conservés à -20 °c sont retirés et placés dans un congélateur à 0°C pendant 24h avant la lyophilisation. Ils sont ensuite placés sur les différents plateaux du lyophilisateur (0,1 m<sup>2</sup> de surface d'exploitation par plateaux) avant sa fermeture et sa mise en marche. Le lyophilisateur est équipé d'une technologie avec piège séparé, et vanne d'isolation entre chambre de sublimation et piège. Il est à température de -80°C nécessaire pour obtenir dans la cuve un vide optimum en vue de faciliter l'extraction de l'humidité résiduelle des échantillons et de permettre de fixer des solvants non aqueux. La température de -80°C permet aussi d'augmenter la quantité de glace condensable dans le piège (Capacité du piège de 3Kg de glace).

Après 48h, les échantillons sont retirés du lyophilisateur et placés dans des flacons étiquetés et sont conservés ensuite dans des dessinateurs avant d'être broyés.

#### **2.7.1.2 Broyage des échantillons**

Après lyophilisation, les échantillons sont broyés par un broyeur électrique d'analyse (A 11 basic(IKA)). Souvent, l'azote liquide est utilisé en cas de détection d'humidité dans les échantillons.

### 2.7.1.3 Macération

#### Liste du matériel

- Echantillons de mousse.
- Méthanol, extra sec 99.9%, AcroSeal™ (i.e. Réf 326950025 - VWR).
- Potassium Chloride (KCl). CAS Number 7447-40-7 (i.e. Réf P9541 - Sigma-Aldrich).
- Potassium phosphate monobasic anhydrous (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>). CAS Number 7778-77-0 (i.e. Réf P9791 - Sigma-Aldrich).
- Sodium chloride (NaCl). CAS Number 7647-14-5 (i.e. Réf S3014 - Sigma-Aldrich).
- Sodium hydroxide (NaOH). CAS Number 1310-73-2 (i.e. Réf 795429 - Sigma-Aldrich).
- Potassium dihydrogénophosphate, cristallisé, EMPROVE® ESSENTIAL Ph. Eur., BP.
- di-Potassium hydrogénoorthophosphate, EMSURE® pour analyses, Supelco®(i.e. Réf 1.05104.1000P - VWR).
- Filtre Whatman GF/F en microfibres de verre (0,7 µm).

Après lyophilisation et broyage, 2g est prélevée sur chaque échantillon exposé à chaque traitement et mis en suspension dans 10 ml solvant en utilisant 80% (v/v) de tampon de phosphate, à un rapport solide/solvant de 1 :10 (p/v) à une température ambiante.

Après 24 heures de macération, les surnageants sont filtrés à travers un filtre Whatman GF/F en microfibres de verre (0,7 µm). La suspension obtenue est centrifugée à 15000 g pendant 10 minutes à 4 °C et le surnageant est stocké à -80 °C jusqu'à l'analyse des enzymes.

Toutes les méthodes présentées dans cette section sont optimisées (par rapport aux conditions expérimentales) avant d'être affectées à nos échantillons. Les protocoles modifiés sont donc présentés ci-dessous avec des références aux articles originaux. Pour chaque enzyme, trois réplicats ont été considérés pour chacune des conditions du mélange.

### 2.7.2 Analyse

#### 2.7.2.1 Superoxyde dismutase (SOD, EC 1.15.1.1.)

#### Liste du matériel

- Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA). CAS Number 60-00-4 (i.e. Réf J65585.22 - VWR)



- L-Méthionine pour la synthèse, (i.e. Réf 8.16010.0025 - VWR)
- Riboflavine. (i.e. Réf 47861. - VWR)
- Bleu nitro-tétrazolium chlorure (NBT), Sigma-Aldrich® (i.e. Réf N6876-1G - VWR)
- Magnésium sulfate (MgSO<sub>4</sub>), EMSURE® pour analyses, Supelco® (i.e. Réf E797-500G - VWR).

L'activité de la SOD (EC 1.15.1.1) est mesurée sur la base de l'inhibition de la photoréduction du bleu nitro tétrazolium en présence de riboflavine [9].

La mesure de l'activité et la purification de l'enzyme sont essentiellement effectuées selon les méthodes de Dazy et al. [7] and Qiu-Fang et al. [22] où des détails supplémentaires peuvent être trouvés.

Le milieu réactionnel (volume final : 1 ml) contenait 100 µl de méthionine (130 mM), 100 µl de riboflavine (600 IM), 100 µl de NBT (22,5 mM), 100 µl d'extrait de plante et une solution de 600 µl d'un tampon de phosphate de potassium 125 mM (pH 7,8) contenant 3mM de MgSO<sub>4</sub>, 3,1 mM d'EDTA et 2% de poly-pyrrolidone polyvinylique (PVPP).

La réaction a commencé en plaçant des tubes sous deux lampes fluorescentes de 15 W pendant 15 minutes.

La réaction est arrêtée en maintenant les tubes dans l'obscurité pendant 10 min. Une réaction témoin est réalisée sans extrait de plante, qui est remplacée par un volume égal de tampon, et la réaction est mesurée par spectrophotométrie à 560 nm.

Une unité d'activité enzymatique est définie comme la quantité d'enzyme qui a réduit de 50% l'absorption à 560 du témoin.

#### **2.7.2.2 Catalase (EC 1.11.1.6.)**

Liste des produits

- Peroxyde d'hydrogène 27% stabilisé, GPR RECTAPUR® (i.e. Réf 6171.9025 - VWR)
- Catalase From Bovine Liver CA. 11000 U/M 1 \* 1 g (i.e. Réf SERA26910.02 - VWR).

La catalase (CAT, EC1.11.1.6) est déterminée selon Claiborne [4], en utilisant H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> comme substrat. Le mélange réactionnel (volume final : 1 ml) contient 100 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100 mM), 100 µl d'extrait de plante et 125 mM de tampon phosphate de potassium (pH 7,0).

La disparition de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est évaluée en mesurant la diminution de l'absorbance à 240 nm (coefficient d'extinction molaire :  $s = 36 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

L'activité enzymatique est déterminée en calculant la quantité de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dissociée et rapportée en unités enzymatiques par gramme de poids frais des espèces de mousses.

### 2.7.2.3 Guaiacol peroxidase (GPX, EC 1.11.1.7.)

Liste des produits

- Guaiacol 99+% (i.e. Réf ACRO120192500 - VWR)
- Peroxyde d'hydrogène 27% stabilisé, GPR RECTAPUR® (i.e. Réf 1.04873.0250-VWR)
- Potassium dihydrogénophosphate, EMSURE® ISO pour analyses, Supelco® (i.e. Réf 6171.9025 - VWR)
- Di-Potassium hydrogénéorthophosphate, EMSURE® pour analyses, Supelco® (i.e. Réf 1.05104.1000P - VWR).

Pour le GPX (Guaiacol, EC 1.11.1.7), le mélange réactionnel est constitué de 100 µL d'extrait de plante, 100 µL de guaiacol (22 mM), 100 µL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100 mM) et complété à 1 ml de volume final avec 125 mM de tampon phosphate de potassium (pH 7,0). L'activité enzymatique est mesurée en surveillant l'augmentation de l'absorbance à 470 nm (coefficient d'extinction de 26,6/mM par cm) pendant la polymérisation du guaiacol [12].

### 2.7.2.4 Analyse de la Chlorophylle

Liste des produits

- Acétone, Supelco® (i.e. Réf 90872-10ML-F - VWR)
- Calcium carbonate (i.e. Réf USPH1086403 - VWR) .

L'analyse de la chlorophylle qui nécessite des échantillons frais est réalisée quelques jours après les prélèvements des cages.

L'extraction des chlorophylles est effectuée selon la méthode de [15], qui consiste en une macération de la plante dans de l'acétone.

Le traitement des échantillons se fait comme suit : 1 g de parties vertes de la mousse est broyé à froid dans un mortier avec 20 ml d'acétone à 80 % et environ 100 mg de bicarbonate de calcium Ca(HCO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.

Après broyage total, la solution est ensuite filtrée et mise dans des boîtes noires pour éviter l'oxydation des chlorophylles par la lumière.

L'absorbance est ensuite mesurée par spectrophotométrie avec un spectro-photomètre (Jenway 6300) à 663 et 645 nm après étalonnage de l'appareil avec la solution de contrôle à 80% d'acétone.

Les valeurs des niveaux de chlorophylles sont calculées à l'aide de l'équation d'Arnon[1].

## 2.7.2.5 Bioaccumulation

### ☞ Préparation de l'échantillon

Un échantillon de mousse (2 g) homogénéisé placé dans un tube à centrifuger en polypropylène de 15 ml est dopé avec 50 µl de solution IS et le mélange est laissé au repos pendant 15 min.

Cinq ml d'acétonitrile sont utilisés pour extraire les résidus de médicaments. L'échantillon est ensuite soigneusement agité à température ambiante pendant 15 min et centrifugé à 4650 g pendant 5 min.

L'extrait est ensuite recueilli et chargé sur une cartouche Oasis HLB (préconditionnée avec 3 ml de méthanol et 3 ml d'eau) sous vide pour obtenir un débit d'environ 1 ml/min.

La cartouche est ensuite rincée avec 3 ml d'eau ultra-pure et séchée sous vide pour éliminer l'excès d'eau. Enfin, les composants retenus sont élués avec 3 ml de méthanol.

L'éluat est évaporé à sec sous un léger courant d'azote dans un bain d'eau réglé à 40°C.

Le granulé est ensuite remis en suspension dans 1 ml d'ACN/eau (10 :90, v/v). L'extrait est centrifugé à 11500 g pendant 5 minutes à 20°C. Le surnageant clair est transféré dans un flacon avant l'analyse UHPLC-MS/MS.

### ☞ Analyse par chromatographie liquide / spectrométrie de masse. Les

analyses sont effectuées à l'aide d'un système UHPLC Acquity (Waters, Milford, MA, USA) et les séparations chromatographiques sont effectuées en injectant 20 µl d'échantillon sur une colonne HSS T3 de l'UPLC Acquity (150 particules de 2,1 mm, 1,7 µm, Waters).

Les phases mobiles sont constituées d'eau avec 0,05 % d'acide formique (A) et d'ACN avec 0,05 % d'acide formique en (B). Le gradient linéaire utilisé est le suivant : 0-1,0 min : 0% B, 1,0-6,0 min : augmentation à 100% B, 6,0-7,0 min : 100% B ; 7,1-8,0 min : diminution à 0% B à un débit de 0,5 ml/min. La colonne et l'échantillonneur automatique sont réglés respectivement à 50°C et 15°C.

La détection est effectuée avec un spectromètre de masse Waters Acquity TQ (Waters, Manchester, UK). Ce dernier est équipé d'une source d'ionisation par électrospray fonctionnant en mode d'ionisation positive (ESI+) et utilisant les paramètres suivants : tension capillaire 2,50 kV, température de la source 150°C, température de désolvantation 600 °C, débit de gaz conique (azote) 50 l/h, débit de gaz de désolvantation (également azote) 1200 l/h.

La dissociation induite par la collision est réalisée avec de l'argon comme gaz de collision à une pression de  $4 \cdot 10^3$  mbar dans la cellule de collision. Les tensions du cône, les énergies de collision, les ions précurseurs et produits sont optimisés par infusion directe de la solution étalon individuelle pure à une concentration de  $10 \mu\text{g/mL}$  et à un débit de  $5 \mu\text{l/min}$ . Les temps de séjour sont optimisés pour chaque polluant afin d'obtenir au moins 12 points par pic. L'acquisition des données est réalisée avec le logiciel MassLynx 4.1 et le logiciel TargetLynx 4.1 (Waters). Des courbes de calibration matricielles allant de  $1 \mu\text{g/kg}$  à  $100 \mu\text{g/kg}$  sont préparées dans l'échantillon de mousse témoin. Pour la quantification des résidus, leurs analogues deutérés correspondants sont utilisés comme étalons internes.

#### **2.7.2.6 Ascorbate peroxydase (APX, EC 1.11.1.11)**

- Sodium L(+)-ascorbate 99%, TECHNICAL (i.e. Réf 27688.235- VWR)
- Peroxyde d'hydrogene 27% stabilisé, GPR RECTAPUR® (i.e. Réf 6171.9025 - VWR)
- Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA). CAS Number 60-00-4 (i.e. Réf J65585.22 - VWR)
- Potassium dihydrogénophosphate, EMSURE® ISO pour analyses, Supelco® (i.e. Réf 6171.9025 - VWR)
- di-Potassium hydrogéoorthophosphate, EMSURE® pour analyses, Supelco®(i.e. Réf 1.05104.1000P - VWR).

L'ascorbate peroxydase est déterminée selon la methode de NEZ-DIÂAZ and TENA [20]. Le mélange réactionnel est constitué de  $100 \mu\text{l}$  d'ascorbate ( $5 \text{ mM}$ ),  $100 \mu\text{L H}_2\text{O}$  ( $100 \text{ mM}$ ),  $100 \mu\text{l}$  EDTA ( $1 \text{ mM}$ ),  $100 \mu\text{l}$  d'extrait de plante et est complétée à un volume final de  $1 \text{ ml}$  avec Tampon de phosphate de potassium  $125 \text{ mM}$  ( $\text{pH } 7,0$ ).

L'oxydation d'ascorbate est déterminée par l'augmentation de l'absorbance à  $290 \text{ nm}$  ( $\epsilon = 2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

#### **2.7.2.7 Glutathion réductase (GR, EC 1.6.4.2)**

- Anti-NOX4 Rabbit Polyclonal Antibody (i.e. Réf -USBIN5376-77- VWR)
- NADPH- $\text{Na}_4$ , Sigma-Aldrich® (i.e. Réf 1.24540.0050 - VWR) .

La glutathion réductase est dosée selon la méthode NEZ-DIÂAZ and TENA [20]. Le mélange réactionnel est constitué de  $100 \mu\text{l}$  d'extrait de plante,  $100 \mu\text{l}$  du de NADPH ( $60 \text{ mM}$ ),  $100 \mu\text{l}$  du glutathion oxydé ( $5 \text{ mM}$ ) et est complétée

à un volume final de 1 ml avec tampon de phosphate de potassium 125 mM (pH 7,8).

L'oxydation du NADPH est déterminée par sa diminution d'absorbance à 340 nm ( $\epsilon = 6,2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

### 2.7.2.8 Composés thioliques

Les thiols sont quantifiés à l'aide d'une courbe d'étalonnage du glutathion, et les étalons de phytochélatine (PC) sont produits *in vitro* comme décrit par Ruotolo et al. [25]. Les teneurs en thiols sont mesurées selon la méthode de Courbot et al. [6].

#### ☞ Réduction et dérivatisation précolonne des thiols

Liste des produits

- Tributylphosphine 95%, AcroSeal™ (i.e. Réf 427308000.- VWR)
- Solutions tampons, AVS TITRINORM 20 °C (i.e. Réf 32032.260-VWR)
- ABD-F [=4-(Aminosulphonyl)-7-fluoro-2,1,3-benzoxadiazole] 98% (i.e. Réf B23586.MB.- VWR)
- N-Diméthylformamide, EMPLURA®, Supelco®(i.e. Réf 8.22275.1000.- VWR).

L'étape de réduction est initiée en ajoutant à 100 µl d'extrait de plante, 20 µl de 2 M NaOH, 270 µl de tampon 0,2 M borate (pH 9,0) et enfin 50 µl de solution à 5 % de tri-n-butylphosphine (TBP) dans le diméthylformamide (DMF). Le mélange réactionnel est agité et maintenu à 50 °C pendant 5 minutes sous une atmosphère isotherme d'azote pour éviter l'oxydation des échantillons.

Pour la dérivatisation, 30 µl de la solution de 11,5 mM de 7-fluoro-2,1,3-benzoxadiazole-4-sulfonamide (ABD-F) dans le DMF est ajoutée et incubée pendant 20 minutes à 50 °C.

Pour arrêter la réaction, les échantillons sont placés sur de la glace et 70 µl de HCl 1M sont ajoutés pour ajuster le pH à 1.

#### ☞ Détermination des thiols par CLHP

Les échantillons sont stockés dans le plateau échantillonneur automatique du HPLC à 4 °C et analysés dans les 12 heures.

Les adduits thiol-ABD sont séparés et quantifiés à l'aide d'une colonne à phase inversée de 250 x 3 mm (Nucleosil 100 C18, Macherey Nagel) et un détecteur à fluorescence. La température de la colonne est fixée à 40 °C et la phase mobile à 0,4 ml min<sup>-1</sup> de débit.

Les phases mobiles A et B contiennent 0,1 % de trifluoroacétique acide (TFA) dans l'eau et 0,1% TFA dans l'acétonitrile/eau (50 :50, v/v) respectivement.

Un gradient d'élution est réalisé pour améliorer la séparation des composés et le nettoyage des colonnes avant les injections ultérieures.

Le profil d'élution est le suivant : 0-5 min, 20% B ; 5-20 min, 20-40% B ; 20-50 min, 40-100% B ; 50-55 min, 100% B ; 55-60 min, 100-20% B ; 60-80 min, 20% B. Le détecteur de fluorescence est fixé à 385 nm et 515 nm pour l'excitation et l'émission respectivement.

Normes GSH, c-Glu-Cys et cystéine (Sigma-Aldrich, France) sont utilisées pour obtenir des courbes d'étalonnage.

# Annexes

## Annexe 1 : liste du matériel pour le déploiement

| <b>Matériel terrain pour le déploiement</b>            |
|--|
| Fiches terrain + crayon de papier + marqueur           |
| GPS  |
| Appareil photo   |
| Bottes et <u>waders</u>                                |
| Glacières thermo-statée avec seaux                     |
| Bulleur à pile + tuyau + sucres ou cônes P1000         |
| Cages étiquetées                                       |
| Sonde de température <u>Tidbit</u>                     |
| Sonde multiparamétrique VWR MU 6100 H                  |
| Gilet de sauvetage                                     |
| Fil de fer ( $\varnothing > 1.2\text{mm}$ )            |
| Perche télescopique à crochet                          |
| Piles LR20 (bulleurs) + AA (pour GPS)                  |
| Poids de plongée                                       |
| <u>Serflex</u> , gants, sopalin, sac poubelle, scalpel |
| Trousse de secours                                     |
| Vêtements de rechange                                  |

Figure 4: Matériel terrain pour le déploiement

## Annexe 2 : liste du matériel pour la récupération

| <b>Matériel terrain pour la récupération</b>                      |
|---|
| Fiches terrain + crayon de papier + marqueur                      |
| GPS   |
| Bottes et <u>waders</u>   |
| Glacières thermo-statées avec seaux                               |
| Bulleur à pile + tuyau  |
| Gilet de sauvetage  |
| Sonde multiparamétrique VWR MU 6100 H                             |
| Piles LR20 (bulleurs) + AA (pour GPS)                             |
| Perche télescopique à crochet                                     |
| Perche à godet pour récupérer l'eau                               |
| Bidon de 2L couvercle blanc fermé annoté « eau de site » (3/site) |
| Seau poubelle ( <u>Serflex</u> coupés, fil de fer, poids....)     |
| Grand seau pour transporter les bidons d'eau du site à la voiture |
| Trousse de secours  |
| Vêtements de rechange   |

Figure 5: Matériel terrain pour la récupération

### Annexe 3 : Fiche de terrain

| Encagement de la mousse <i>Fontinalis antipyretica</i> |  |                               |  | Fiche de terrain                                |     |            |   |
|--|--|-------------------------------|--|---|-----|------------|---|
| <b>Cours d'eau</b>                                     |  |                               |  | <b>Date :</b>                                   |     |            |   |
| Nom de la station :                                    |  | .....                         |  | Code station :.....                             |     |            |   |
| Point de prélèvement :                                 |  | .....                         |  |   |     |            |   |
| Organisme :  |  | .....                         |  | opérateur :.....                                |     |            |   |
| <b>Point de prélèvement</b>                            |  |                               |  | <b>Numéros de photos :.....</b>                 |     |            |   |
| Coordonnées  |  | Relevées sur GPS...           |  | sur carte IGN.....                              |     |            |   |
| Lambert 93 (système français)                          |  | En mètres                     |  | X :   | Y : | altitude : | m |
| WGS 84 (système GPS)                                   |  | Deg min. sec.<br>Deg décimaux |  | E/W :   | N : | altitude : | m |
| Conditions d'observation                               |  | Hydrologie :                  |  | Etiage..... Moyennes eaux..... Hautes eaux..... |     |            |   |
|  |  | Météo :                       |  | Nuageux..... Pluie..... Orages pluie forte..... |     |            |   |
|  |  | Turbidité :                   |  | Nulle..... Faible..... Moyenne..... Forte.....  |     |            |   |
|  |  | Fond visible :                |  | Oui..... Non..... Partiellement.....            |     |            |   |

Figure 6: Fiche1 de terrain

| Morphologie  |  |
|--|--|
| Profondeur (m)   | .....P<0.1 .....0.1=<P<0.5 .....0.5=<P<1 .....1=<P<=2 .....P>2                 |
| Vitesse du courant(m/s)  | .....V<0.05 .....0.05=<V<0.2 .....0.2=<V<0.5 .....0.5=<V<1 .....V>1            |
| Eclairement  | .....très ombragé .....ombragé .....peu ombragé .....éclairé .....très éclairé |
| substrat   |  |
| Type de substrat   | ...Va .....Sa .....Ca .....Te .....Bl .....Ra .....De .....Ar                  |
| Va : Vases, limons (substrat meuble)    Ca : Cailloux, pierres, gallets    Sa : Sables, graviers (substrat mobile)<br>Te : Terre, Argile, marne (substrat solide)    Bl : Blocs, Dalles    Ra : Racines et branchages<br>De : Debres organiques    Ar : Artificiel (béton) |  |
| Paramètres physico-chimiques   |  |
| Température (°C)   |  |
| Conductivité (µs/cm)   |  |
| pH   |  |
| Oxygène (%O2)  |  |
| Remarques/commentaires   | .....  |

Figure 7: Fiche2 de terrain



## Références

- [1] D. I. Arnon. Copper enzymes in isolated chloroplasts. polyphenoloxidase in beta vulgaris. *Plant physiology*, 24(1) :1, 1949.
- [2] R. M. CENCI. The use of aquatic moss (fontinalis antipyretica) as monitor of contamination in standing and running waters : limits and advantages. 2001.
- [3] M. Cesa, A. Baldisseri, G. Bertolini, E. Dainese, M. Dal Col, U. Dalla Vecchia, P. Marchesini, and P. L. Nimis. Implementation of an active 'bryomonitoring' network for chemical status and temporal trend assessment under the water framework directive in the chiampo valley's tannery district (ne italy). *Journal of environmental management*, 114 :303–315, 2013.
- [4] A. Claiborne. Catalase activity in : Greenwald ra (ed) handbook of methods for oxygen free radical research, 1985.
- [5] B. Claveri, E. Morhain, and C. Mouvet. A methodology for the assessment of accidental copper pollution using the aquatic moss rhynchostegium riparioides. *Chemosphere*, 28(11) :2001–2010, 1994.
- [6] M. Courbot, L. Diez, R. Ruotolo, M. Chalot, and P. Leroy. Cadmium-responsive thiols in the ectomycorrhizal fungus paxillus involutus. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(12) :7413–7417, 2004.
- [7] M. Dazy, E. Béraud, S. Cotelle, E. Meux, J.-F. Masfaraud, and J.-F. Féraud. Antioxidant enzyme activities as affected by trivalent and hexavalent chromium species in fontinalis antipyretica hedw. *Chemosphere*, 73(3) : 281–290, 2008.
- [8] S. Debén, J. Aboal, A. Carballeira, M. Cesa, and J. Fernández. Monitoring river water quality with transplanted bryophytes : A methodological review. *Ecological Indicators*, 81 :461–470, 2017.
- [9] R. S. Dhindsa, P. Plumb-Dhindsa, and T. A. Thorpe. Leaf senescence : correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation, and decreased levels of superoxide dismutase and catalase. *Journal of Experimental botany*, 32(1) :93–101, 1981.
- [10] S. Díaz, R. Villares, and A. Carballeira. Uptake kinetics of as, hg, sb, and se in the aquatic moss fontinalis antipyretica hedw. *Water, Air, & Soil Pollution*, 223(6) :3409–3423, 2012.

- [11] D. Ferreira, P. Ciffroy, M.-H. Tusseau-Vuillemin, C. Garnier, and J.-M. Garnier. Modelling exchange kinetics of copper at the water-aquatic moss (*fontinalis antipyretica*) interface : influence of water cationic composition (ca, mg, na and ph). *Chemosphere*, 74(8) :1117–1124, 2009.
- [12] J. L. Fielding and J. Hall. A biochemical and cytochemical study of peroxidase activity in roots of *pisum sativum* : Ii. distribution of enzymes in relation to root development. *Journal of Experimental Botany*, 29(4) : 983–991, 1978.
- [13] D. Galoux, F. Chérot, F. Rosillon, and K. Sossey-Alaoui. Contribution to the macrophytic typology of belgian reference watercourses. *Advances in Botany*, 2015, 2015.
- [14] S. Herrmann, J. Turner, J. Carsella, D. Lehmpuhl, and D. Nimmo. Bioaccumulation of selenium by the bryophyte *hygrohypnum ochraceum* in the fountain creek watershed, colorado. *Environmental management*, 50(6) : 1111–1124, 2012.
- [15] M. Holden. Chlorophylls i, chemistry and biochemistry of plant pigments. 2 ème edition. tw goodwin, 1975.
- [16] S.-A. Khadija, R. Francis, T. Bernard, et al. Trend analysis in ecological status and macrophytic characterization of watercourses : Case of the semois-chiers basin, belgium wallonia. *Journal of Water Resource and Protection*, 7(13) :988, 2015.
- [17] R. J. Martins and R. A. Boaventura. Uptake and release of zinc by aquatic bryophytes (*fontinalis antipyretica* l. ex. hedw.). *Water Research*, 36(20) : 5005–5012, 2002.
- [18] J. Mersch and M. Reichard. In situ investigation of trace metal availability in industrial effluents using transplanted aquatic mosses. *Archives of Environmental contamination and toxicology*, 34(4) :336–341, 1998.
- [19] J. Mersch, F. Guérol, P. Rousselle, and J.-C. Pihan. Transplanted aquatic mosses for monitoring trace metal mobilization in acidified streams of the vosges mountains, france. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 51(2) :255–259, 1993.
- [20] R. M. J. NEZ-DIÂAZ and M. TENA. Induction of an antioxidant enzyme system and other oxidative stress markers associated with compatible and

- incompatible interactions between chickpea (*cicer arietinum* l.) and *fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. *Physiological and molecular plant pathology*, 61 :325–337, 2002.
- [21] D. W. R. Nimmo, S. J. Herrmann, J. A. Romine, K. W. Meyer, R. W. Johnson, P. H. Davies, D. L. Hansen, and S. F. Brinkman. Cadmium and zinc accumulation in aquatic bryophytes immersed in the arkansas river, colorado : comparison of fall versus spring. *Journal of Freshwater Ecology*, 21(2) :331–339, 2006.
- [22] Z. Qiu-Fang, L. Yuan-Yuan, P. Cai-Hong, L. Cong-Ming, and W. Bao-Shan. Nacl enhances thylakoid-bound sod activity in the leaves of c3 halophyte *suaeda salsa* l. *Plant Science*, 168(2) :423–430, 2005.
- [23] G. Rabnecz. A water quality investigation around an oil refinery in hungary using the *fontinalis antipiretica* (hedw.) as bioindicator. *Acta Biologica Szegediensis*, 52(1) :75–77, 2008.
- [24] G. Rasmussen and S. Andersen. Episodic release of arsenic, copper and chromium from a wood preservation site monitored by transplanted aquatic moss. *Water, Air, and Soil Pollution*, 109(1-4) :41–52, 1999.
- [25] R. Ruotolo, A. Peracchi, A. Bolchi, G. Infusini, A. Amoresano, and S. Ottonello. Domain organization of phytochelatin synthase functional properties of truncated enzyme species identified by limited proteolysis. *Journal of Biological Chemistry*, 279(15) :14686–14693, 2004.
- [26] K. Sossey Alaoui and F. Rosillon. Macrophytic distribution and trophic state of some natural and impacted watercourses-belgium wallonia. *International Journal of Water Sciences*, 2(3) :1–11, 2013.
- [27] J. Wehr, M. Kelly, and B. Whitton. Factors affecting accumulation and loss of zinc by the aquatic moss *rhynchostegium riparioides* (hedw.) c. jens. *Aquatic Botany*, 29(3) :261–274, 1987.