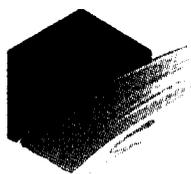


ETUDE
INTER AGENCES
N° 55



Agences de l'Eau

MINISTÈRE DE
L'AMÉNAGEMENT DU TERRITOIRE
ET DE L'ENVIRONNEMENT

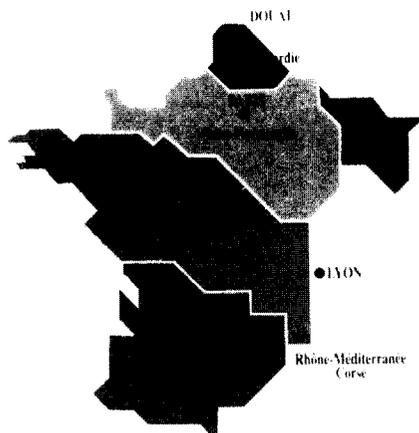
DOCUMENT D'ÉVALUATION D'IMPACT ENVIRONNEMENTAL ET SOCIAL
DE LA PROJET DE CONSTRUCTION ET D'EXPLOITATION D'UN MICROPROJET DES AGENCES DE L'EAU
DE LA RÉGION DE LA GUYANE FRANÇAISE

EIA 067

LES BRYOPHYTES AQUATIQUES
COMME OUTIL DE SURVEILLANCE
DE LA CONTAMINATION DES EAUX COURANTES
PAR LES MICROPOLLUANTS MÉTALLIQUES :

Concept, méthodologie et interprétation des données

67 / 0 7 2 3 0



*Document réalisé sous la direction des Agences de l'Eau et
du Ministère de l'Environnement par l'Université de Metz.*

Prix : 150 F

Tiré en 1000 exemplaires

© Agences de l'Eau - 1998

ORGANISATION ET REALISATION DE L'ETUDE

Chargé d'étude

Jacques MERSCH	}	Université de METZ
Bruno CLAVERI		

COMITE DE SUIVI

Agences de l'Eau

Michel BONNEFILLE	AGENCE DE D'EAU RHONE-MEDITERRANEE-CORSE
Guillaume DEMORTIER	AGENCE DE D'EAU RHIN-MEUSE
Jacky DUROCHER	AGENCE DE D'EAU LOIRE-BRETAGNE
Yannick ERAUD	AGENCE DE D'EAU SEINE NORMANDIE
Danielle MAUPAS	AGENCE DE D'EAU LOIRE-BRETAGNE
LUC PEREIRA RAMOS	AGENCE DE D'EAU SEINE-NORMANDIE

DIREN - SEMA

Paul FERLIN	SEMA HAUTE-NORMANDIE
Edith IMBERT	SEMA CENTRE
Yannick MERLET	SEMA POITOU-CHARENTES

et le concours de Christophe MOUVET - B.R.G.M.

SOMMAIRE

	page
GLOSSAIRE	13
AVANT-PROPOS	15
1. INTRODUCTION	
1.1. Micropolluants métalliques et milieu aquatique	17
1.2. Détection et quantification des micropolluants métalliques	17
1.3. Les mousses aquatiques comme outil de surveillance	19
1.4. Les autres supports d'accumulation	19
1.4.1. Sédiments	19
1.4.2. Mollusques	21
1.4.3. Poissons	21
1.5. Spécificités des mousses	23
2. PROPRIETES INDICATRICES DES MOUSSES AQUATIQUES	
2.1. Caractéristiques biologiques et écologiques des mousses	25
2.2. Mécanismes d'accumulation des métaux traces	25
2.2.1. Echange cationique	25
2.2.2. Cinétiques d'échange	27
2.2.3. Accumulation non ou difficilement réversible	27
2.2.4. Localisation des métaux	27
2.3. Relation entre le compartiment eau et le compartiment mousse	27
2.4. Signification de l'indication	29
2.4.1. Représentativité de l'échantillon	29
2.4.2. Intégration dans le temps	29
2.4.3. Dimensions environnementale et biologique	31

3. UTILISATION DE MOUSSES AUTOCHTONES OU SURVEILLANCE PASSIVE

3.1. Concept et intérêts	33
3.2. Domaines d'application	33
3.2.1. Réseau de surveillance	33
3.2.2. Suivi d'une pollution accidentelle	37
3.3. Echantillonnage de mousses autochtones	37
3.3.1. Biotopes et conditions écologiques	37
3.3.2. Prospection de site	39
3.3.3. Choix de l'espèce de mousse	39
3.3.4. Période de prélèvement	41
3.3.5. Choix et délimitation de l'aire de prélèvement	41
3.3.6. Technique de prélèvement	41
3.3.7. Taille de l'échantillon	43
3.3.8. Nettoyage des mousses <i>in situ</i>	43
3.3.9. Conditionnement et transport	43
3.3.10. Caractérisation du prélèvement et de l'échantillon	45
3.3.11. Matériel nécessaire	45
3.4. Traitement de l'échantillon brut	45
3.4.1. Réception des échantillons	45
3.4.2. Technique du lavage	47
3.4.3. Essorage et séchage	49
3.4.4. Sélection des brins	49
3.4.5. Conservation	49
3.5. Synthèse	51

4. SURVEILLANCE ACTIVE OU TECHNIQUE DES TRANSFERTS

4.1. Concept et intérêts	55
4.2. Domaines d'application	57
4.2.1. Réseau de surveillance active	57
4.2.2. Etude d'incidence de rejets et localisation de sources de pollution	57
4.2.3. Rejets industriels	57
4.2.4. Acidification de cours d'eau	57
4.2.5. Pollution radioactive	61
4.2.6. Réseau d'assainissement	61
4.2.7. « Module d'Intégration de la Micropollution »	61

4.3. Méthode	61
4.3.1. Critères de sélection d'un site de référence	61
4.3.2. Epoque des transferts	65
4.3.3. Récolte des mousses	65
4.3.4. Conditionnement des mousses avant le transfert	65
4.3.5. Corbeilles d'exposition	65
4.3.6. Technique de transfert	67
4.3.7. Durée d'exposition	67
4.3.8. Entretien et surveillance	69
4.3.9. Précautions particulières	69
4.3.10. Retrait des échantillons	69
4.3.11. Aspect particulier des témoins	69
4.3.12. Matériel nécessaire	71
4.3.13. Méthode alternative de transfert de mousses	71
4.4. Traitement de l'échantillon brut	71
4.4.1. Réception des échantillons et lavage	71
4.4.2. Sélection des brins	73
4.4.3. Conservation	73

5. PROCEDURES ANALYTIQUES

5.1. Sous-échantillonnage	75
5.2. Extraction des métaux et analyse	75
5.3. Résidu de minéralisation	75
5.4. Echantillon certifié	77

6. PRESENTATION ET VALIDATION DES RESULTATS

6.1. Expression des données	79
6.2. Contrôle de qualité et validation des résultats	79
6.2.1. Qualité du traitement des mousses	83
6.2.2. Répétabilité de l'analyse	83
6.3. Bordereau d'analyse	85
6.3.1. Données générales	85
6.3.2. Résultats d'analyse et critères de validité	85

7. EXPLOITATION ET INTERPRETATION DES RESULTATS	
7.1. Mousses autochtones	89
7.1.1. Grille de qualité	89
7.1.2. Indice polymétallique	95
7.2. Mousses transférées	95
8. REFLEXIONS ET AIDE A L'INTERPRETATION DES DONNEES	
8.1. Analyse des sources de variabilité et d'erreur	101
8.1.1. Variabilité liée à l'environnement de la mousse	101
8.1.2. Variabilité liée à la mousse	101
8.1.3. Variabilité liée à l'expérimentation in situ	103
8.1.4. Variations et erreurs au niveau de la procédure analytique	105
8.1.5. Variabilité acceptable	107
8.2. Qualité du travail de terrain	107
8.3. Quelques difficultés spécifiques de l'interprétation des données	109
8.3.1. Fond métallique géochimique	109
8.3.2. Cas des métaux non cationiques et des conditions environnementales particulières	109
8.4. Physiologie des mousses	109
CONCLUSION	111
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	115
ANNEXES	125
1. Fiches signalétiques des espèces de mousses	127
2. Fiche de terrain	137
3. Protocole d'analyse des métaux traces dans les mousses aquatiques	139
4. Photos	145

GLOSSAIRE

Micropolluant ou **polluant trace**

Composé chimique pouvant avoir des effets néfastes à une très faible concentration dans l'environnement. Cette définition s'applique en particulier aux micropolluants métalliques ou métaux traces traités dans ce document.

Biodisponibilité

Faculté d'un composé chimique à être fixé par une structure biologique. Le terme de disponibilité sera préféré pour décrire des phénomènes dont la composante biologique est mineure.

Bioindication ou **indication biologique**

Information sur la qualité de l'environnement fondée sur l'analyse d'organismes ou de communautés d'organismes.

Accumulation ou **bioaccumulation**

Capacité des organismes à concentrer des substances (naturelles ou non) à des teneurs bien supérieures à celles présentes dans le milieu.

Indicateur d'accumulation ou **biomonitor**

Organisme capable d'accumuler des polluants traces à des teneurs reflétant la contamination moyenne du milieu.

Support analytique

Matrice (biologique ou inerte) utilisée pour l'analyse chimique de polluants.

Surveillance biologique

Utilisation (dans l'espace et dans le temps) de techniques d'indication biologique pour mettre en évidence, localiser et quantifier la pollution de l'environnement. Traduction de la notion anglaise de *biomonitoring*.

AVANT-PROPOS

L'analyse des mousses aquatiques est utilisée en France depuis une dizaine d'années pour évaluer et quantifier la contamination des écosystèmes d'eau courante par les micropolluants métalliques. Le succès de la technique a eu pour corollaire une certaine dérive méthodologique, liée au nombre et à la diversité sans cesse croissants des utilisateurs. Ce constat a motivé les Agences de l'Eau (Groupe Inter-Agences du thème C) à faire réaliser un document de synthèse portant sur l'intégralité de la méthode.

Ce cahier technique est conçu comme un outil d'orientation méthodologique et d'aide à la décision. Il s'inscrit dans une logique évolutive et fait suite à une première synthèse méthodologique éditée il y a plus de 10 ans [1]. L'ambition de ce guide technique est d'intégrer les évolutions de la méthode et de faire un point complet sur son application pratique.

Ce document est organisé en quatre volets.

- La première partie présente une synthèse des connaissances actuelles concernant l'utilisation des mousses aquatiques comme outil de surveillance de la contamination des eaux courantes par les métaux traces (chapitres 1 et 2).
- Le second volet reprend, avec un maximum de détails pratiques, l'intégralité de la méthodologie mise en œuvre, depuis la préparation d'une étude jusqu'à la présentation des résultats analytiques (chapitres 3 à 6). Le but consiste à fournir à l'utilisateur un cahier des charges qui soit un compromis optimal entre, d'une part le respect d'une rigueur scientifique indispensable à toute technique biologique, et d'autre part le maintien d'une simplicité maximale indispensable à une utilisation de routine.
- Les modalités d'interprétation des données à l'aide de deux outils différents (grille de qualité à 5 niveaux et indice polymétallique) sont présentées dans un troisième volet (chapitre 7). L'objectif consiste à hiérarchiser de la façon la plus objective possible l'état de contamination des sites examinés afin de définir des priorités dans la lutte contre la pollution.
- Le dernier volet de ce cahier technique (chapitre 8) est consacré à quelques éléments de réflexion pouvant s'avérer utiles lors de l'interprétation des résultats.

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

1.1. Micropolluants métalliques et milieu aquatique

Les métaux traces sont des éléments de la croûte terrestre présents de façon naturelle à de faibles concentrations dans l'environnement aquatique (niveau géochimique). Une augmentation des concentrations peut être d'origine naturelle, par exemple lorsqu'une roche enrichie d'un élément métallique subit une forte érosion. Le plus souvent, toutefois, les pollutions métalliques sont liées à l'activité humaine, notamment les extractions minières, la sidérurgie ou le traitement de surface. Une contamination par les métaux traces est qualifiée de micropollution métallique.

La liste des éléments métalliques retenus se compose de la façon suivante : le cadmium (Cd), le chrome (Cr), le cuivre (Cu), le mercure (Hg), le nickel (Ni), le plomb (Pb) et le zinc (Zn) auxquels il faut ajouter le métalloïde arsenic (As). Les termes de métaux traces et de micropolluants métalliques doivent être préférés à celui de métaux lourds, pourtant très employé dans la littérature. C'est un terme impropre dont l'emploi devrait rester limité aux trois métaux non essentiels à la vie que sont le cadmium, le mercure et le plomb.

Parmi les trois compartiments de l'environnement (air, eau, sol), le milieu aquatique peut être considéré comme le plus exposé à la pollution. D'une part, il reçoit par voie directe les effluents industriels qui sont évacués de leur lieu de production vers les océans, et d'autre part, il constitue le réceptacle vers lequel converge la pollution diffuse de l'atmosphère et des sols.

1.2. Détection et quantification des micropolluants métalliques

En eau courante, les niveaux de pollution se caractérisent par de fortes fluctuations liées à des débits variables et des rejets industriels intermittents. Dans ce milieu dynamique, il est difficile d'obtenir des renseignements fiables sur la qualité de l'eau. La collecte d'échantillons d'eau représentatifs de l'évolution temporelle nécessiterait un dispositif expérimental très sophistiqué. Or, des prélèvements d'eau à intervalles réguliers ou même en continu deviennent vite très lourds

et coûteux, car les échantillons sont forcément nombreux et les concentrations métalliques à détecter parfois très faibles. De plus, les échantillons d'eau renseignent uniquement sur la quantité totale de polluants, et non pas sur une fraction biodisponible, c'est-à-dire susceptible d'être accumulée par les organismes vivants.

Une technique d'investigation plus performante consiste à utiliser des organismes capables d'indiquer la présence d'une pollution. Les indicateurs d'accumulation, également appelés biomoniteurs, répondent aux principales critiques formulées à l'encontre des analyses directes par des avantages de trois ordres :

(1) Grâce au phénomène d'accumulation, les niveaux de contamination sont amplifiés par rapport aux concentrations dans le milieu et donc plus faciles à mesurer. (2) De par leur présence permanente, les organismes sentinelles fournissent une indication intégrée dans le temps, plus représentative de la pollution moyenne. (3) Ces organismes renseignent non pas sur une simple présence de micropolluants dans leur milieu, mais bien sur la capacité d'une fraction à être fixée par une structure biologique.

1.3. Les mousses aquatiques comme outil de surveillance

Les mousses aquatiques possèdent un nombre considérable d'avantages pour leur utilisation en tant que indicateur d'accumulation de métaux traces. Elles se caractérisent par :

- une large répartition géographique à travers toute l'Europe,
- une pérennité saisonnière et une stabilité spatio-temporelle des populations,
- une collecte, une manipulation, un transport et une conservation aisés,
- une forte capacité d'accumulation,
- des cinétiques rapides d'accumulation,
- un échange direct entre les feuilles et l'eau.

1.4. Les autres supports d'accumulation

En milieu aquatique, les supports d'analyse les plus utilisés en dehors des mousses sont d'une part les sédiments en tant que matrice inerte, et d'autre part les mollusques et les poissons en tant que biomoniteurs.

1.4.1. Sédiments

Les sédiments sont considérés comme le réceptacle ultime des micropolluants métalliques. Dans la colonne d'eau, les métaux ont tendance à s'associer aux matières en suspension qui décantent progressivement vers le fond.

Leur forte capacité de sorption de micropolluants a fait des sédiments un support abondamment utilisé dans le cadre de la surveillance de l'environnement aquatique. Un avantage intéressant des sédiments est leur capacité à fournir une indication cumulée d'une contamination sur un certain intervalle de temps. Ceci les distingue des organismes biomoniteurs qui fournissent plutôt une indication moyenne intégrée dans le temps. L'analyse de sédiment n'a pas non plus la même valeur indicatrice, car elle fournit une mesure du métal total capable de s'adsorber sans apprécier sa disponibilité vis-à-vis des organismes.

Malgré ses avantages, le sédiment pose une série de difficultés méthodologiques. D'abord, il peut être très variable, autant dans sa composition (fractions organique et minérale) que dans sa granulométrie. Ces propriétés confèrent à chaque type de sédiment des capacités de sorption différentes qui rendent difficile toute comparaison. En rivière vient s'ajouter le problème de la représentativité spatio-temporelle des échantillons. En effet, à la faveur d'une crue, le sédiment peut être déplacé d'une zone contaminée pour être redéposé beaucoup plus loin. Ainsi, dans la pratique, il peut s'avérer difficile de prélever des échantillons de sédiment représentatifs d'un point de vue spatio-temporel et ayant des caractéristiques équivalentes. En revanche, l'analyse de sédiment est appropriée pour étudier le transfert de pollution dans un cours d'eau en fonction des événements hydrologiques.

1.4.2. Mollusques

Les mollusques bivalves figurent parmi les organismes animaux les plus employés comme biomoniteurs vis-à-vis des micropolluants métalliques. En eau douce, beaucoup de travaux se sont concentrés sur la moule zébrée *Dreissena polymorpha*. Comme tous les bivalves, cette espèce fixée au substrat par l'intermédiaire de filaments byssaux vit en contact très étroit avec son environnement de par son mode d'alimentation par filtration de l'eau ambiante. La large répartition géographique de la dreissène rend possible des études de biosurveillance aussi bien en Europe que sur le continent nord-américain.

Chez les mollusques, comme chez les biomoniteurs animaux en général, les métaux pénètrent à l'intérieur des cellules où ils sont pris en charge, détoxifiés et acheminés vers un organe d'élimination ou vers un organe de stockage. La bioaccumulation résiduelle traduit donc un véritable impact biologique d'une pollution. Les difficultés méthodologiques qui peuvent apparaître sont principalement de deux ordres : (1) la manipulation d'animaux vivants et (2) l'interprétation des données au regard de bouleversements physiologiques considérables en relation notamment avec la reproduction en été et la constitution de réserves pour l'hiver.

1.4.3. Poissons

La plupart des espèces de poisson possèdent un système d'homéostasie métallique suffisamment efficace pour maintenir des concentrations métalliques faibles dans le tissu musculaire. Pour

obtenir une indication aussi fiable que possible, il est par conséquent nécessaire de procéder à l'analyse de micropolluants métalliques dans des organes cibles, comme par exemple le foie pour le cuivre et le rein pour le zinc et le cadmium. L'étape de dissection et d'isolation des organes, souvent de faible masse, constitue une complication considérable pour une utilisation de routine.

L'avantage primordial de certaines espèces de poisson est leur intérêt économique pour l'homme. L'analyse des poissons fournit directement une indication de l'état de contamination d'une denrée alimentaire et donc de l'exposition potentielle d'une population humaine. Toutefois, outre la difficulté de la capture, les inconvénients des poissons sont d'une part leur mobilité, et d'autre part la zonation écologique selon les espèces. Dans la pratique, il peut être difficile de capturer des échantillons homogènes d'une même espèce sur un secteur de rivière étendu.

1.5. Spécificités des mousses

Par rapport aux autres supports analytiques communément utilisés, les spécificités des mousses peuvent se résumer par deux aspects distinctifs essentiels :

(1) L'accumulation de micropolluants métalliques par les mousses est fondée principalement sur des phénomènes de biosorption sur la paroi cellulaire (voir 2.2). Ce mécanisme confère à l'indication une dimension qui n'est ni celle d'une simple sorption comme pour les sédiments, ni celle d'un véritable impact biologique comme chez les biomoniteurs animaux (mollusques et poissons).

(2) Les mousses se distinguent nettement des autres supports par une relative simplicité dans les procédures de collecte, de manipulation, de transport, de traitement et de préparation des échantillons à l'analyse.

CHAPITRE 2

PROPRIETES INDICATRICES DES MOUSSES AQUATIQUES

2.1. Caractéristiques biologiques et écologiques des mousses

Les mousses sont des végétaux primitifs formés d'une tige (souvent ramifiée) portant des feuilles (**Annexe 4 planche 1**). Elles ne possèdent ni racines, ni système conducteur développé. Elles sont ancrées sur un support dur par des rhizoïdes. Les échanges de gaz et d'éléments nutritifs s'effectuent à travers la surface des feuilles constituées généralement d'une seule couche cellulaire. A côté de la reproduction sexuée, les mousses possèdent un mode de dissémination asexuée par l'intermédiaire de propagules.

Les mousses se sont adaptées à des environnements très contrastés, mais restent inféodées à un milieu humide pour leur développement. Elles peuvent constituer des colonies très denses qui forment des touffes ou des tapis. Les espèces les plus communément utilisées comme indicateurs d'accumulation de métaux traces en milieu aquatique appartiennent à la classe des Musci, sous-classe des Bryidae et aux genres *Fontinalis*, *Rhynchostegium* et *Cinclidotus* (voir clichés en **annexe 4**).

2.2. Mécanismes d'accumulation des métaux traces

2.2.1. Echange cationique

La forte capacité des mousses à accumuler les métaux traces s'explique par la présence à la surface des feuilles de nombreux groupements chimiques chargés négativement capables de fixer des cations [2-4]. Les liaisons électrostatiques qui se forment sont non-sélectives et réversibles, c'est-à-dire qu'il peut y avoir substitution d'un cation par un autre. L'accumulation d'un cation est fonction à la fois de sa concentration dans le milieu, de son affinité spécifique pour les sites d'échange et de la présence d'éléments compétiteurs [3]. Ainsi, à concentration molaire égale dans l'eau, les éléments à forte affinité comme le plomb et le cadmium seront accumulés de façon préférentielle par rapport aux métaux à plus faible affinité comme le calcium et le magnésium. La surface des mousses se comporte alors comme un échangeur d'ions [4].

2.2.2. Cinétiques d'échange

La biosorption des métaux est un phénomène très rapide. Selon les conditions expérimentales, un plateau d'équilibre est atteint après quelques heures à quelques jours d'exposition [5-10]. Les mousses sont donc capables de rendre compte d'une pollution dans de très brefs délais.

Une fois le plateau d'équilibre atteint, l'accumulation peut se poursuivre, mais à un taux nettement plus réduit. Cette seconde phase peut être interprétée comme une pénétration progressive des métaux, soit dans les couches profondes de la paroi, soit à l'intérieur des cellules [11-13].

En situation de décontamination, l'élimination est toujours plus lente que la prise de métal et, à échelle de temps équivalente, n'est jamais complète [7-11]. Cette propriété confère aux mousses la capacité de conserver une empreinte d'un épisode de pollution, même lorsque celui-ci n'est plus détectable dans l'eau.

2.2.3. Accumulation non ou difficilement réversible

A côté des échanges cationiques, il existe une autre forme d'enrichissement métallique dans les mousses aquatiques. Cette accumulation est d'origine chimique et liée à des phénomènes de précipitation d'oxydes d'aluminium, de fer et de manganèse en surface.

En se déposant, les précipités peuvent entraîner des métaux traces sous forme de coprecipité. D'autre part, les couches minérales successives offrent autant de possibilités pour une fixation cumulée de micropolluants par sorption chimique. Ces phénomènes provoquent une amplification de l'accumulation par une fraction métallique considérée comme non ou difficilement échangeable. La formation progressive d'une gangue de concrétion permet d'expliquer l'augmentation des concentrations métalliques depuis les parties apicales jeunes vers les parties basales les plus âgées. Les différences peuvent atteindre des facteurs de concentration situés entre 1,5 et 5, plus exceptionnellement au-delà [14-17].

2.2.4. Localisation des métaux

Les connaissances actuelles suggèrent qu'une proportion majoritaire des micropolluants accumulés demeure piégée à l'extérieur des cellules, soit dans l'épaisseur de la paroi par biosorption, soit en surface des parois par sorption et coprecipitation. Seule une fraction minoritaire pénètre à l'intérieur des cellules. Cette présence a été mise en évidence par des techniques histochimiques et microanalytiques [18-20].

2.3. Relation entre le compartiment eau et le compartiment mousse

La fiabilité d'un biomoniteur peut être mesurée par sa capacité à refléter la contamination du milieu par une accumulation d'importance proportionnelle. Chez les mousses, une relation de type linéaire a été observée dans de nombreuses études de laboratoire [7, 9, 10, 12, 21].

Sur le terrain, cette relation n'existe pas toujours [14, 16, 21-25]. Trois raisons essentielles peuvent être invoquées. D'abord, la contamination n'est pas constante dans le temps ; les échantillons d'eau (ponctuels) prélevés sont donc rarement représentatifs d'une situation moyenne. Ensuite, un échantillon d'eau n'a pas la même signification écotoxicologique qu'un échantillon de mousse ; le premier donne une information instantanée alors que le second fournit une vue intégrée complexe d'un certain nombre d'événements qui se sont produits dans un passé plus ou moins proche. Enfin, la mousse accumule une fraction métallique bien spécifique en fonction d'un environnement physico-chimique complexe, alors qu'aucune technique ne permet de sélectionner celle-ci par un dosage direct dans l'eau.

En définitive, la capacité biomonitrice des mousses aquatiques est clairement établie en laboratoire où les paramètres susceptibles d'intervenir sur le processus d'accumulation sont mieux contrôlés. En conditions naturelles, une relation significative eau-mousse est plus difficile à établir, car trop de facteurs incontrôlés interviennent. L'absence d'une telle relation ne doit donc pas remettre en cause la fiabilité d'un biomoniteur.

2.4. Signification de l'indication

2.4.1. Représentativité de l'échantillon

En rivière, les concentrations et la disponibilité des métaux traces fluctuent dans le temps. Entre la contamination du milieu et le niveau d'accumulation dans les mousses, il ne peut donc y avoir d'état d'équilibre durable et figé, mais un équilibre dynamique régi par des phases successives d'accumulation et de relargage. Au moment précis du prélèvement, l'opérateur intervient à un instant donné dans un cycle dynamique sans être en mesure d'apprécier s'il est en présence d'un pic ou d'un creux de pollution. L'information n'est donc jamais qu'une indication et non pas une mesure définitive, car, hormis la variabilité liée aux procédures expérimentales, elle est soumise à la subjectivité du moment précis de prélèvement.

2.4.2. Intégration dans le temps

L'intégration temporelle de la pollution par les mousses est assurée par une élimination des métaux moins rapide que leur accumulation (voir 2.2.2). De plus, le relargage est d'autant plus incomplet que le niveau d'accumulation atteint est plus élevé [10] et que l'épisode de pollution a été plus long [26]. Le biomoniteur est donc capable de garder « en mémoire » des événements d'accumulation passés et les cumule avec les épisodes plus récents. A ceci viennent s'ajouter deux types d'interférences antagonistes : d'une part des phénomènes de fixation plus durable par précipitation et sorption chimiques (voir 2.2.3) et, d'autre part, un renouvellement perpétuel de la réponse dû à la croissance de la plante.

A un moment donné, la quantité de métal accumulé par la mousse est donc une résultante complexe d'une mémoire durable formée par des résidus fixés de façon plus ou moins irréversible et d'une mémoire vive qui intègre les événements plus récents. La mousse présente donc à la fois des aspects de forte inertie et des aspects de faible inertie par rapport aux fluctuations des niveaux de contamination dans le milieu.

2.4.3. Dimensions environnementale et biologique

L'indication apportée par les mousses intègre toute une dimension environnementale. En effet, la réponse est modulée à la fois par les caractéristiques intrinsèques au biomoniteur (mécanismes d'accumulation, espèce de mousse) et par les conditions externes, essentiellement la concentration du polluant dans l'eau et les paramètres physico-chimiques du milieu. Ces derniers déterminent aussi bien la forme chimique des métaux que leur aptitude à se fixer à une structure biologique (présence d'agents chélatants, d'ions compétiteurs).

Par conséquent, les mousses renseignent non pas sur la quantité absolue de micropolluants métalliques dans l'eau, mais sur une fraction spécifique accumulable pour la plante en fonction d'un environnement physico-chimique donné.

CHAPITRE 3

UTILISATION DE MOUSSES AUTOCHTONES OU SURVEILLANCE PASSIVE

3.1. Concept et intérêts

La surveillance passive fait appel à des mousses issues de populations qui se développent de façon naturelle sur un site. Le suivi peut être réalisé aussi bien dans l'espace que dans le temps. Dans le cas d'une surveillance spatiale, les stations de prélèvement sont réparties selon un transect longitudinal, soit en fonction de rejets ou de confluences (surveillance orientée), soit de façon indépendante par rapport aux influences majeures (surveillance non orientée). Le suivi dans le temps consiste à répéter un prélèvement à des intervalles de temps plus ou moins espacés. Les deux types d'approches peuvent évidemment être combinés en une surveillance spatio-temporelle.

La limite pratique de toute surveillance passive est l'absence de l'espèce recherchée ou même de toute espèce de mousse aquatique sur un site retenu. Dans le premier cas, il est possible de se rabattre sur une autre espèce avec des capacités d'accumulation similaires (voir 3.3.3). Dans le deuxième cas, on peut avoir recours à la technique des transferts (voir 4). Cependant, comme l'information obtenue est très différente, la solution qui consiste à compléter une étude de surveillance passive par des mousses transférées est à proscrire. Il vaut mieux alors appliquer intégralement la technique des transferts.

3.2. Domaines d'application

3.2.1. Réseau de surveillance

L'objectif d'un réseau de surveillance consiste à suivre l'évolution à moyen ou long terme de la qualité de l'eau d'un site aussi bien dans le sens d'une dégradation que dans le sens d'une amélioration. Généralement, la fréquence des prélèvements est faible (comparée aux cinétiques

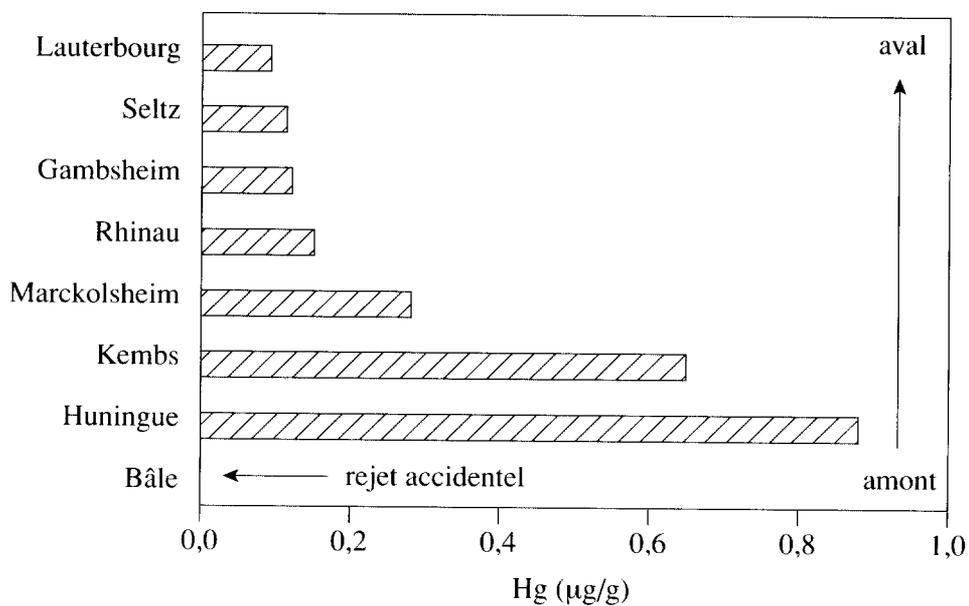


Figure 1. Concentration en mercure dans des mousses aquatiques de l'espèce *Cinclidotus sp.* prélevées dans le Rhin à sept stations en aval de Bâle 13 jours après l'accident de Sandoz en novembre 1986 (adapté de Mouvet et al., 1993 [27]).

d'échange eau/mousses) et l'espacement entre les stations d'étude important. Par conséquent, l'indication obtenue demeure grossière. Le but n'est pas de surveiller directement l'incidence de rejets, mais plutôt de dégager des tendances générales au niveau d'un bassin et d'identifier des points noirs. Ces diagnostics réguliers permettent par la suite d'entreprendre des études complémentaires plus ciblées sur des sites jugés préoccupants et, le cas échéant, de proposer des actions de dépollution.

3.2.2. Suivi d'une pollution accidentelle

De par les cinétiques d'échange rapide et leur potentiel important d'accumulation, les mousses sont particulièrement intéressantes pour suivre des épisodes de pollution de type accidentel, c'est-à-dire de forte intensité, mais de faible durée.

Ces potentialités ont été démontrées dans la pratique dans le cas de l'accident de Sandoz sur le Rhin [27]. Des mousses du genre *Cinclidotus* rendaient encore parfaitement compte de la contamination par le mercure lors d'une récolte effectuée 13 jours après le passage de la vague de pollution. Les concentrations les plus élevées étaient observées à la station la plus proche du rejet accidentel et diminuaient progressivement vers l'aval (**figure 1**).

La possibilité de réaliser une rétroévaluation d'un épisode de pollution accidentelle à l'aide de plusieurs prélèvements successifs effectués en phase de décontamination a été étudiée dans un travail récent [10]. Cette voie se trouve toutefois encore au stade expérimental.

3.3. Echantillonnage de mousses autochtones

3.3.1. Biotopes et conditions écologiques

Les mousses aquatiques colonisent préférentiellement les eaux courantes ; leur présence est plus rare ou plus localisée en eau stagnante.

La répartition des populations est conditionnée essentiellement par quatre facteurs :

- Les mousses nécessitent un **substrat dur et stable** pour leur ancrage. En tête de bassin, elles colonisent la surface de blocs et les racines d'arbres, et sur les tronçons aval, principalement des ouvrages construits tels que radier, barrage, pile de pont ou mur de soutènement.
- Les mousses se développent à faible profondeur d'eau à cause de leur **besoin en lumière**. Ainsi, les touffes sont généralement visibles depuis la berge.
- Une forte **turbidité de l'eau** est un facteur très limitant, d'une part parce que la lumière est atténuée, et d'autre part, parce que les matières en suspension exercent un effet abrasif et de colmatage.
- Les mousses supportent difficilement une **température de l'eau** supérieure à 25 °C [28-30].

En revanche, elles sont relativement peu influencées par la qualité chimique du milieu. De ce fait, elles sont capables de se développer dans des environnements très variés du point de vue de la composition de l'eau [14, 29, 31, 32].

3.3.2. Prospection de site

En préparation d'une campagne de prélèvement de mousses aquatiques, une sortie de prospection préalable est **indispensable**. L'objectif consiste :

- à se familiariser avec le site d'étude,
- à contrôler l'accessibilité aux stations d'étude souvent choisies sur une carte topographique,
- à vérifier la présence de populations suffisantes de mousses aquatiques,
- à identifier les espèces afin d'orienter son choix.

3.3.3. Choix de l'espèce de mousse

Règle 1

Comme les capacités d'accumulation peuvent varier selon les espèces, il est important de n'utiliser, autant que possible, qu'**une seule et même espèce** sur l'ensemble des stations d'étude d'un même bassin.

L'ordre de **préférence** des espèces de mousses s'établit comme suit :

1. *Fontinalis antipyretica* et *Rhynchostegium riparioides*
2. *Cinclidotus nigricans* et *Cinclidotus danubicus*
3. toute autre espèce

Le choix des deux premières espèces est motivé par leur large répartition géographique, leur capacité d'accumulation similaire [15, 21, 24, 33] et leur identification relativement aisée. Deux espèces du genre *Cinclidotus* ont été rajoutées pour favoriser une utilisation aussi large que possible de la méthode. En effet, contrairement aux deux premières, ces espèces colonisent fréquemment les grandes rivières de plaine. Elles possèdent toutefois des capacités d'accumulation plus faibles [7, 24, 34] et sont plus difficiles à identifier.

Règle 2

S'il s'avère impossible d'utiliser une seule espèce, il faut privilégier les **associations** suivantes à toute autre combinaison :

1. *Fontinalis antipyretica*/*Rhynchostegium riparioides*
2. *Cinclidotus nigricans*/*Cinclidotus danubicu*

Ces 4 espèces de mousses font l'objet de **fiches signalétiques** illustrées de photos (**annexe 4**).

3.3.4. Période de prélèvement

Contrairement à beaucoup d'autres macrophytes, les mousses aquatiques sont présentes et peuvent être échantillonnées pendant toute l'année. Toutefois, la collecte en période d'étiage prononcé est à éviter pour deux raisons essentielles : le risque de prélever des échantillons qui ont connu des périodes d'émersion et la mauvaise qualité des échantillons due à une température élevée de l'eau qui, bien souvent, favorise la formation d'un feutrage d'algues sur les touffes. Une autre restriction concerne les périodes de crue, pour de simples raisons d'accessibilité aux sites, mais aussi de commodité de prélèvement et de risque pour l'opérateur.

En régime pluvial, les périodes de prélèvement les plus favorables sont d'une part le **printemps** (avril, mai et juin), et d'autre part l'**automne** (octobre, novembre et décembre). En régime nival, l'échantillonnage de la première période peut être retardé en raison des crues de printemps.

Les prélèvements d'un même réseau de surveillance doivent être réalisés dans un **intervalle de temps** aussi **court** que possible (de l'ordre d'une quinzaine de jours), afin de minimiser les influences saisonnières. Dans le cas d'un prélèvement annuel, il faut veiller à ce que les conditions hydrologiques soient similaires d'année en année. L'établissement d'un profil en long d'un cours d'eau exige que la collecte des échantillons successifs d'amont en aval soit effectuée le plus rapidement possible (dans la foulée).

3.3.5. Choix et délimitation de l'aire de prélèvement

La **station de prélèvement** doit être **représentative** du tronçon de rivière étudié en ce qui concerne les caractéristiques morphologiques et écologiques telles que la largeur du lit, la hauteur d'eau, la vitesse du courant et la constitution des berges.

Pour le prélèvement, il est important de prendre en compte l'**hétérogénéité de la station**, formée par l'ensemble de ses habitats [33]. Dans la pratique, ceci se traduit par la collecte d'un échantillon composite le plus représentatif possible de l'ensemble de l'aire délimitée. Dans les rivières praticables à pied, le prélèvement est réalisé sur un transect transversal d'une largeur d'au moins 10 m. Dans les grandes rivières, il est effectué sur un secteur de 20 à 50 m le long des deux berges ou sur des ouvrages à l'aide d'un bateau.

3.3.6. Technique de prélèvement

Afin de constituer un **échantillon composite** à partir des différents habitats représentatifs, il est nécessaire de prospector minutieusement l'aire de prélèvement. Il faut éviter de prélever toute touffe qui se trouve à faible profondeur (et donc susceptible de subir des périodes d'émersion) ou située dans un habitat avec un faible renouvellement d'eau, comme par exemple les bras morts ou les vasques. Les endroits soumis à un courant continu sont à privilégier.

Le prélèvement s'effectue en tirant délicatement sur quelques brins de mousse afin de les extraire de la touffe sans la détruire entièrement. Cette précaution permet à la colonie de se reconstituer rapidement. L'opération est répétée à **plusieurs points de prélèvement** préalablement sélectionnés. Il n'est pas inutile de préciser que tout prélèvement dans le milieu naturel doit se faire avec le souci d'infliger une perturbation aussi faible que possible à l'écosystème.

3.3.7. Taille de l'échantillon

Le prélèvement se poursuit jusqu'à obtention d'un échantillon brut de mousses légèrement tassé de la **taille d'une orange**. Par expérience, ce volume correspond environ à 20-30 g de poids frais essoré.

3.3.8. Nettoyage des mousses *in situ*

Sur le terrain, la profusion d'eau est mise à profit pour effectuer un premier nettoyage de l'échantillon. Dans un tamis (par exemple passoire ménagère en plastique) maintenu à la surface de l'eau, les brins de mousse sont délicatement écartés entre les doigts et soigneusement agités afin d'en **extraire** un maximum de **corps étrangers** (sédiment, invertébrés, débris organiques, détritiques). Pendant cette opération, il faut veiller à ne pas endommager les mousses, c'est-à-dire à ne pas déchirer les brins ni arracher les feuilles. Après un lavage grossier, les mousses sont transférées dans une bassine remplie d'eau de rivière. Le lavage se poursuit jusqu'à ce que l'**eau renouvelée reste claire**. Le soin apporté à cette première étape de lavage a d'autant plus d'intérêt que la seconde étape de nettoyage constitue un travail fastidieux pour l'opérateur et traumatisant pour la plante.

L'échantillon est ensuite comprimé manuellement et essoré dans un panier à salade. Il est minutieusement **inspecté** afin d'en extraire les parties basales des tiges portant des rhizoïdes (système d'ancrage des mousses) et un maximum de brins morts dénudés de feuilles. Une pesée peut être effectuée pour s'assurer que la biomasse requise (20 à 30 g de poids frais essoré) a bien été récoltée.

3.3.9. Conditionnement et transport

L'échantillon nettoyé et essoré est placé dans un sachet en papier ou dans un flacon en polyéthylène soigneusement étiqueté. Le transport des mousses s'effectue à l'**état frais** dans une **glacière** réfrigérée. Un temps de transport ne dépassant pas 48 heures entre la fin du prélèvement et le retour au laboratoire (voir 3.4.1) est recommandé.

3.3.10. Caractérisation du prélèvement et de l'échantillon

Les modalités et les conditions du prélèvement ainsi que les principales caractéristiques de l'échantillon sont notées sur une **fiche de terrain**. Un modèle inspiré de la « fiche prélèvement bryophytes » des DIREN est proposé en **annexe 2**.

Ces informations de terrain sont essentielles pour deux raisons principales. D'une part, elles permettent de répéter un prélèvement de manière rigoureuse, même à moyenne ou longue échéance. D'autre part, il sera possible de se reporter sur ces données en cas de difficultés au niveau de l'interprétation des résultats d'analyse. A ce titre, il est judicieux de noter toute observation ou tout détail supplémentaire qui ne fait pas l'objet d'un relevé systématique sur la fiche de terrain.

3.3.11. Matériel nécessaire

Le matériel nécessaire au prélèvement de mousses est constitué des articles suivants :

- une paire de cuissardes
- une paire de gants pour prélever dans des eaux très froides ou fortement polluées
- un panier à salade et une bassine en plastique alimentaire pour le lavage *in situ*
- une balance (précision ± 1 g) pour peser les échantillons récoltés (facultatif)
- des sachets en papier ou flacons en polyéthylène pour le conditionnement des mousses
- un marqueur pour l'étiquetage
- une glacière réfrigérée pour le transport

3.4. Traitement de l'échantillon brut

3.4.1. Réception des échantillons

Option 1

Si l'organisme qui a effectué les prélèvements est également chargé de la préparation des échantillons, les mousses encore humides sont immédiatement soumises à un **second nettoyage**. Ce lavage doit être réalisé dans les 24 heures après le retour du terrain. Au besoin, les mousses sont humectées avec de l'eau déminéralisée et un nouveau bloc de glace est placé dans la glacière en évitant un contact direct avec les échantillons. Cette première **option** est à **privilégier**, car le lavage immédiat avant séchage est plus facile et surtout plus complet [15].

Option 2

Si l'organisme chargé du prélèvement est différent de celui chargé de la préparation des échantillons ou si le lavage ne peut pas être effectué immédiatement, les **mousses sont séchées** dans une étuve à 60 ± 10 °C dès le retour du terrain. Le séchage pendant le transport à l'intérieur du véhicule est à proscrire strictement.

Les échantillons sont ensuite conservés au sec et à l'abri de la poussière. A l'état sec, ils peuvent être transportés ou expédiés par la poste à l'organisme qui s'occupe de leur préparation et de l'analyse. Cette seconde option a l'avantage de ne pas imposer un travail fastidieux dès le retour du terrain. Elle a toutefois l'inconvénient de rendre le lavage ultérieur plus difficile et surtout moins complet. Il est probable que certaines concrétions une fois séchées ne puissent plus être délogées sous l'effet du lavage [15]. Le **séchage intermédiaire** doit donc **être évité** autant que possible, car il y a un risque de surestimer la contamination par rapport à un nettoyage immédiat.

3.4.2. Technique du lavage

Avant le lavage, les mousses séchées (option 2) sont réhydratées pendant 5 à 10 minutes dans une bassine remplie de quelques cm d'eau déminéralisée. Les échantillons frais (option 1) ne subissent aucun prétraitement.

Le nettoyage s'effectue en balayant les mousses d'un **jet d'eau déminéralisée sous pression** (1,2 à 1,5 bar) dans une bassine préalablement remplie de 1 à 2 cm d'eau déminéralisée. Pendant le lavage, la touffe est fréquemment retournée et les brins sont écartés entre les doigts. Au bout d'environ 30 à 45 secondes, l'échantillon est récupéré dans un tamis et l'eau de lavage est inspectée. L'opération est renouvelée jusqu'à ce que l'eau reste claire. L'expérience montre que ceci est le cas après **2 à 3**, plus rarement après **4 à 5 passages**. Le critère «eau claire» peut sembler quelque peu subjectif, mais dans la pratique, il est aisé de constater qu'un passage supplémentaire n'apporte plus de gain significatif dans le processus de lavage. La progression peut être aisément appréciée en conservant un échantillon d'eau des passages successifs dans une éprouvette en verre ou des piluliers en matière plastique transparente.

Remarque : Pour plus d'objectivité lors du lavage, la turbidité de l'eau obtenue en comprimant manuellement la touffe de mousse peut être mesurée par comparaison à un **disque Hazen**. L'eau est alors considérée comme claire entre 5 et 10 unités Hazen. Toutefois, cette technique connaît des limites, car la turbidité peut être due non pas uniquement à des matières en suspension provenant du dépôt sur les mousses mais également à des fragments de feuilles arrachés lors d'un lavage trop agressif. A cet égard, il faut noter que les espèces à grandes feuilles, et notamment les fontinales, sont particulièrement sensibles au lavage. En conséquence, l'utilisation de ce dispositif est utile, mais pas indispensable.

L'étape de lavage est également l'occasion d'éliminer toutes les matières étrangères, les rhizoïdes et les brins morts ou défeuillés. Par expérience, cette étape de préparation des mousses provoque une diminution d'environ un tiers du poids de l'échantillon autant par le lavage et l'arrachage de feuilles que par l'élimination de matériel non désirable.

3.4.3. Essorage et séchage

Les échantillons nettoyés sont essorés dans un **panier à salade** et placés dans un sachet en papier propre convenablement étiqueté. Le séchage s'effectue dans une **étuve à 60 ± 10 °C** pendant 24 heures.

3.4.4. Sélection des brins

A partir de l'échantillon séché, les segments des brins portant des feuilles vertes sont détachés en les pinçant entre les doigts ou en les coupant à l'aide d'une paire de ciseaux en inox. Ces **parties vertes** représentent généralement au moins :

- 10 cm chez *Fontinalis antipyretica* et
- 3 à 6 cm chez *Rhynchostegium riparioides*, *Cinclidotus nigricans* et *C. danubicus*.

L'opération se poursuit jusqu'à obtention d'une masse d'environ **2 g de poids sec**. Cette biomasse, prête à subir les étapes de la préparation au dosage, est placée dans un sachet de format plus petit qui est glissé dans le premier.

Dans le cas de la surveillance passive, l'analyse de toute la partie vivante du brin de mousse présente un avantage, car elle garantit une intégration temporelle maximale de la contamination. En effet, les segments les plus âgés ont connu des durées de contact les plus longues possibles avec leur milieu, favorables à une accumulation cumulée (voir 2.2.3 et 2.4.2).

3.4.5. Conservation

Avant l'analyse

Les échantillons de mousse peuvent être conservés au sec, à température ambiante et à l'abri de la poussière. Il est souhaitable d'effectuer l'analyse dans un délai de **quatre mois** après le prélèvement.

Après l'analyse

La partie des échantillons non utilisée est conservée dans les conditions énoncées ci-dessus jusqu'à la validation définitive des résultats. En cas de contestation, une analyse complémentaire est alors possible à tout moment.

3.5. Synthèse

Une vue synoptique des protocoles d'étude est présentée dans la **figure 2**. La partie de gauche du schéma retrace les étapes successives relatives à la surveillance passive avec des renvois aux chapitres correspondants. La partie de droite présente les étapes d'études à réaliser dans le cadre de la surveillance active (voir chapitre 4).

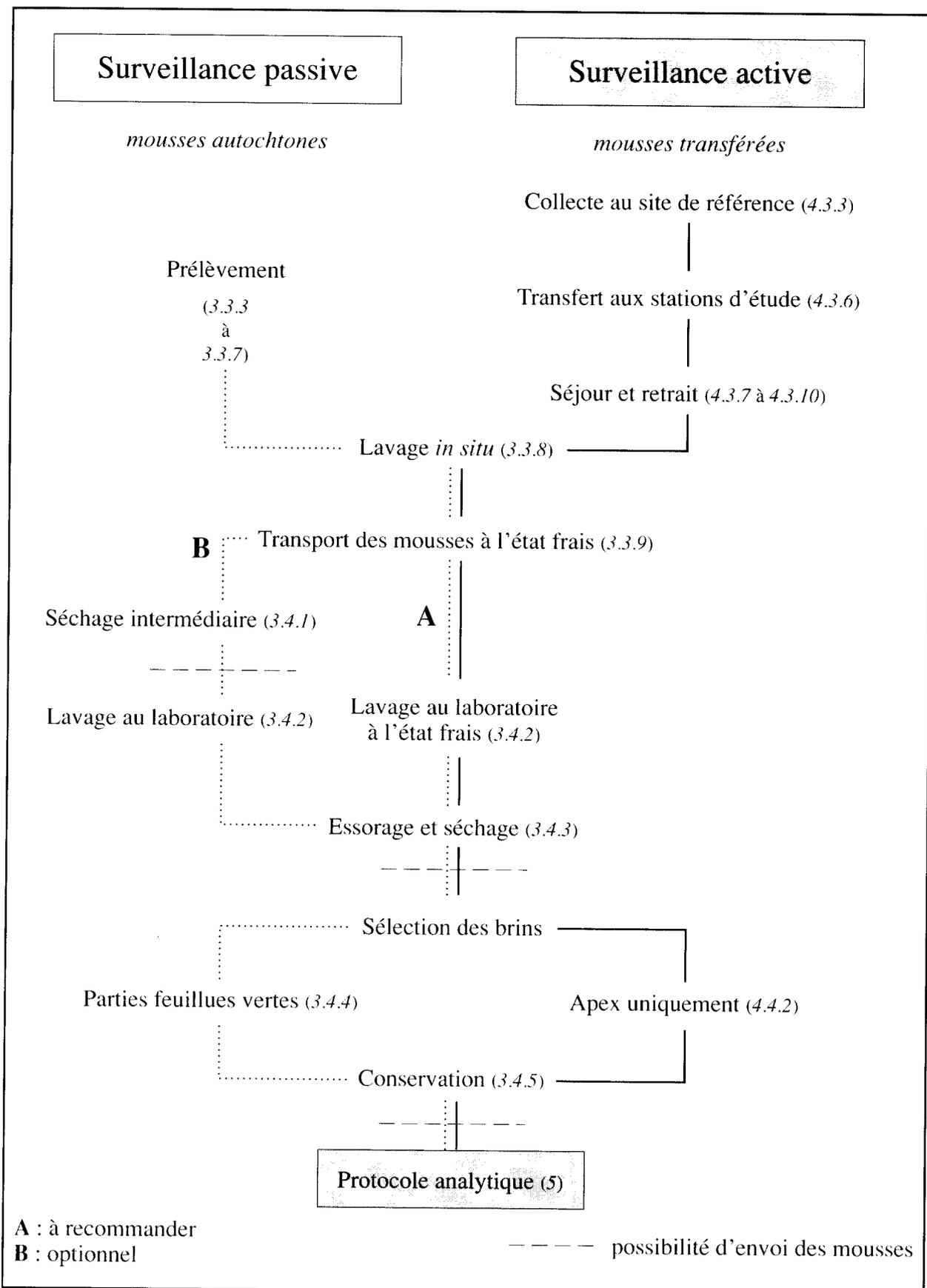


Figure 2. Organigramme des protocoles d'étude (*paragraphe correspondant*)

CHAPITRE 4

TECHNIQUE DES TRANSFERTS OU SURVEILLANCE ACTIVE

4.1. Concept et intérêts

La surveillance active consiste à introduire des organismes biomoniteurs aux différentes stations d'étude à partir d'un site de référence dépourvu de pollution. Tout comme pour la surveillance passive, un suivi peut être réalisé dans l'espace et/ou dans le temps. De même, il peut être orienté ou non par rapport aux influences majeures sur le cours d'eau étudié (voir 3.1).

Les intérêts de la surveillance active sont essentiellement de quatre ordres :

- (1) La méthode des transferts offre la possibilité d'étudier des sites dépourvus de populations de mousses, que ce soit pour des raisons naturelles (substrat meuble, eau fortement échauffée en été) ou à cause d'influences anthropiques (forte pollution, forte turbidité).
- (2) Dans le cas d'une étude orientée, les stations d'étude peuvent être choisies localement par rapport aux influences à évaluer (rejet, confluence) sans la contrainte géographique liée à la présence de populations exploitables d'une espèce de mousses donnée.
- (3) La surveillance active est strictement limitée dans le temps, ce qui permet d'obtenir une information de la qualité actuelle d'un site sur une durée d'intégration parfaitement connue.
- (4) L'utilisation d'un matériel biologique homogène issu d'une station de référence unique élimine l'influence liée aux caractéristiques de différentes populations locales. Les indications obtenues seront donc strictement comparables, aussi bien dans l'espace que dans le temps.

Comme la surveillance active a pour objectif essentiel de diagnostiquer la contamination récente, il faut s'employer à exploiter au maximum la capacité échangeuse d'ions des mousses en faisant le plus possible abstraction des phénomènes d'accumulation plus durables. Ceci implique certaines précautions méthodologiques, notamment au niveau du séchage des mousses (voir 4.4.1) et de la sélection des brins à soumettre à l'analyse (voir 4.4.2). Ces différences méthodo-

logiques par rapport à la surveillance passive sont précisées dans la partie droite de la **figure 2**. Par ailleurs, la surveillance active introduit une nouvelle variable : la durée d'exposition des mousses (voir 4.3.7).

4.2. Domaines d'application

4.2.1. Réseau de surveillance active

Ce type de réseau est organisé sur le même principe qu'un réseau de surveillance passive (voir 3.2.1). La méthode des transferts a l'avantage de fournir les données strictement comparables qui permettent d'établir un diagnostic particulièrement fiable de l'état de contamination récent d'un bassin.

4.2.2. Etude d'incidence de rejets et localisation de sources de pollution

La méthode des mousses transférées est spécialement indiquée pour localiser des sources de pollution et d'en évaluer l'incidence sur le milieu [22, 23, 25, 33, 35-37]. La démarche la plus adaptée consiste à exposer des échantillons de mousses à plusieurs stations de manière à encadrer les influences à étudier. Un choix judicieux des stations sur un tronçon longitudinal est primordial, car il conditionne l'interprétation des résultats. Il est important de respecter une distance suffisante entre les points d'exposition et les rejets ou confluences, de manière à garantir un mélange intégral des eaux. Cette distance minimale varie fortement selon les conditions locales, mais se situe généralement entre 50 et 500 m. Cette application est illustrée par un exemple en **figure 3**.

4.2.3. Rejets industriels

La forte résistance des mousses vis-à-vis de divers types de pollution [14, 29, 32, 38] rend ce support analytique très attrayant pour évaluer la disponibilité des micropolluants métalliques à proximité immédiate ou même dans les rejets industriels [20, 34, 35]. Dans ce cas, on exploite de façon optimale les caractéristiques fondamentales des mousses, à savoir des cinétiques d'échange rapides et des capacités d'accumulation importantes (**figure 4**).

4.2.4. Acidification de cours d'eau

L'acidification des cours d'eau a comme conséquence la mobilisation et l'augmentation de la biodisponibilité de certains métaux. Les mousses peuvent rendre compte de ces modifications en raison de leur forte capacité d'échange cationique. Ce potentiel des bryophytes a pu être vérifié dans les Vosges avec, en particulier, une forte accumulation de plomb aux stations les plus acidifiées [39, 40] (**figure 5**).

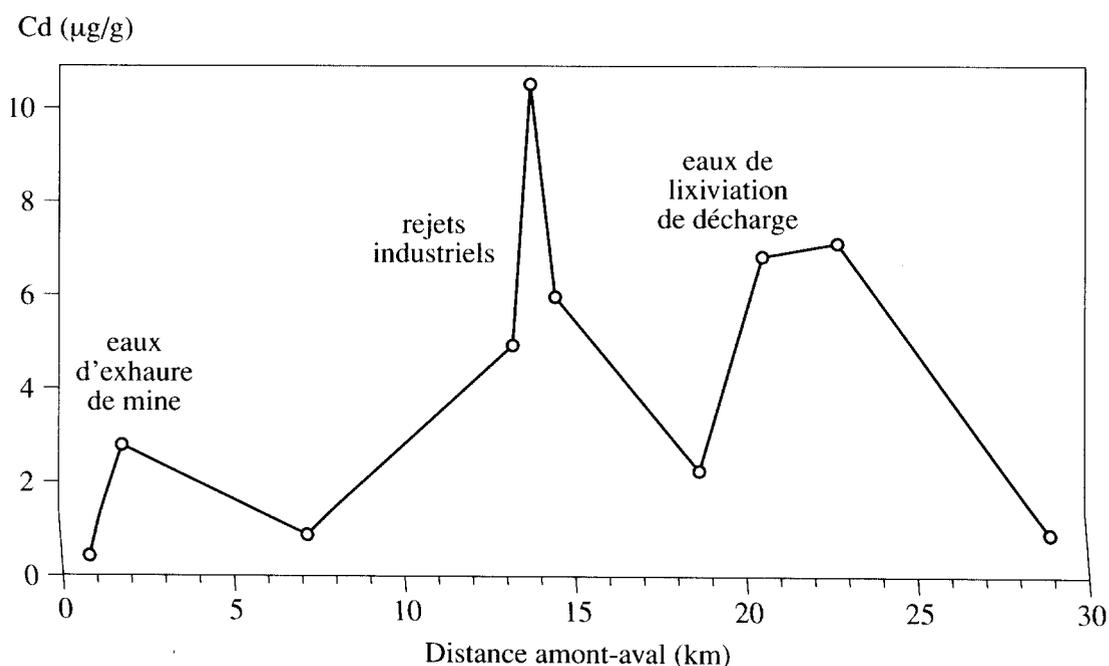


Figure 3. Profil en long avec localisation des sources de contamination de la rivière Wiltz (G.D. de Luxembourg) par le cadmium à l'aide de mousses aquatiques *Fontinalis anti-pyretica* introduites à dix stations (adapté de Mersch & Pihan, 1993 [25]).

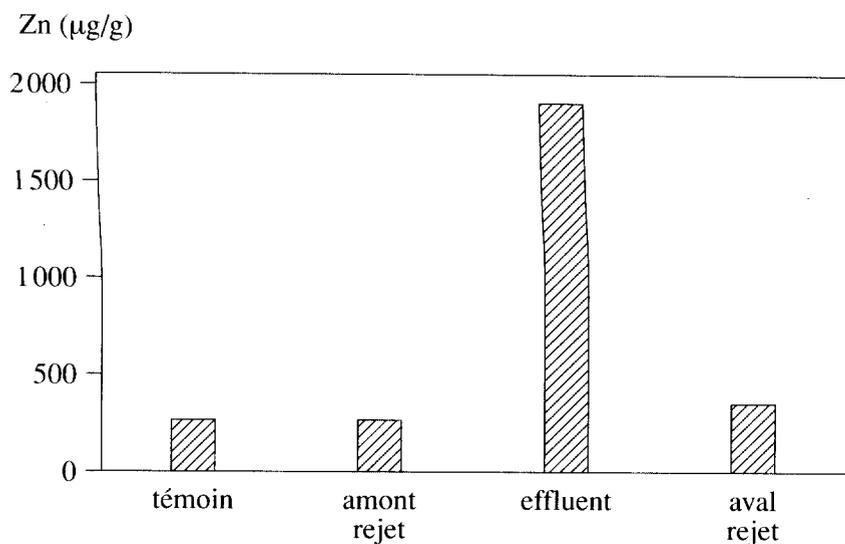


Figure 4. Accumulation de zinc dans des mousses *Rhynchoszegium riparioides* immergées pendant 10 jours dans un effluent industriel et dans le milieu récepteur en amont et aval du rejet (adapté de Claveri, 1995 [20]).

4.2.5. Pollution radioactive

Les principes de surveillance (active ou passive) à l'aide des mousses sont autant valables pour les métaux stables (traités ici) que pour les métaux radioactifs comme par exemple le ^{58}Co , le ^{137}Cs ou l' $^{110\text{m}}\text{Ag}$. La technique de détection des radioéléments à l'aide de mousses aquatiques a été abondamment utilisée, notamment en Belgique et en France [41-43] (**figure 6**).

4.2.6. Réseau d'assainissement

Des tentatives ont été entreprises pour appliquer la méthode des transferts de mousses à des réseaux d'assainissement. L'objectif consiste à localiser dans les embranchements du réseau l'origine de pollutions qui nuisent au bon fonctionnement des stations d'épuration et s'opposent à la valorisation ultérieure des boues. Cette voie n'a toutefois pas encore été réellement explorée.

4.2.7. « Module d'Intégration de la Micropollution »

Le « Module d'Intégration de la Micropollution » (MIM) est un dispositif destiné à standardiser davantage les modalités d'exposition des organismes [20]. Son principe consiste à prélever de l'eau à un débit régulier dans le milieu à étudier et de la mettre en contact avec les organismes après passage dans un premier compartiment conçu pour éliminer une partie des matières en suspension dans l'eau. L'analyse peut alors porter à la fois sur un compartiment inerte représenté par les matières décantées et sur un (des) biomoniteur(s) introduit(s) dans le dispositif. Le MIM a été breveté par EDF et testé avec succès au niveau des eaux de refroidissement de centrales nucléaires enrichies en métaux par suite de phénomènes de corrosion. Il s'applique en priorité à des situations où un dispositif lourd peut être mis en place dans le but d'effectuer un suivi à long terme.

4.3. Méthode

4.3.1. Critères de sélection d'un site de référence

La surveillance active nécessite l'utilisation de mousses de bonne qualité, exemptes de contamination métallique préalable. Le site de référence doit répondre à cinq **exigences** essentielles :

- il doit être situé en **amont** d'activités anthropiques polluantes,
- il doit être facilement **accessible** à toute saison,
- une ou plusieurs **espèces** de mousses doivent être présentes en **abondance** durant toute l'année,
- l'absence de toute **contamination** métallique doit être vérifiée régulièrement,
- sa **typologie** physico-chimique et écologique doit être similaire à celle des stations d'étude.

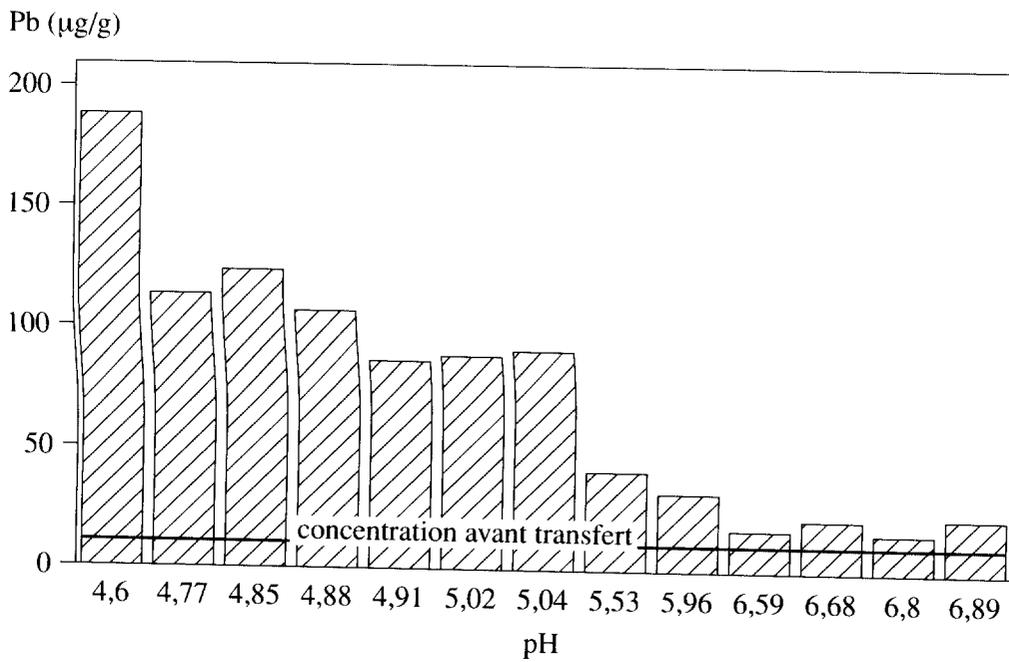


Figure 5. Accumulation de plomb dans des mousses aquatiques transférées *Hygrohypnum ochraceum* en fonction des pH moyens mesurés dans les cours d'eau acidifiés des Vosges (adapté de Claveri et al., 1995 [40]).

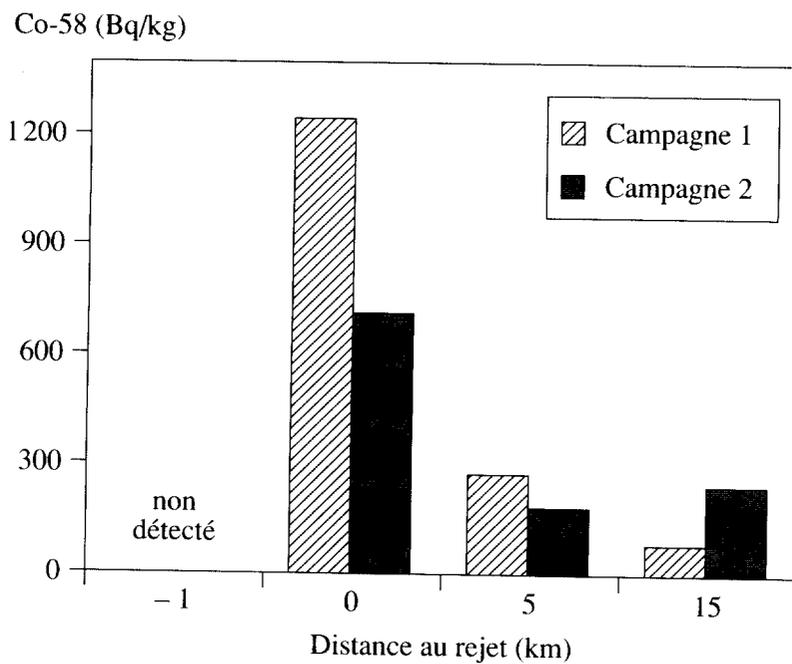


Figure 6. Accumulation de ^{58}Co dans *Fontinalis antipyretica* transférées dans la Moselle aux abords de la centrale nucléaire de Cattenom (adapté de Mersch & Kass, 1994 [43]).

4.3.2. Epoque des transferts

Des études de surveillance active peuvent être réalisées pendant **toute l'année**. Les seules époques à éviter sont les périodes de crue et d'étiage prononcé en raison respectivement de l'inaccessibilité des sites et de la mauvaise qualité des mousses. Ces restrictions sont similaires à celles énoncées pour l'échantillonnage de mousses autochtones (voir 3.3.4).

4.3.3. Récolte des mousses

Les mousses destinées au transfert sont **prélevées** et **nettoyées** sur le site de référence suivant le protocole décrit pour les mousses autochtones (voir 3.3.6 et 3.3.8). Lors de la récolte, il faut particulièrement veiller à ne pas endommager les touffes afin de ne pas gêner leur repousse.

Lors d'une campagne de surveillance active, **une seule espèce** de mousse doit être utilisée avec une très légère préférence pour

1. *Rhynchostegium riparioides* du fait de la plus grande fragilité de
2. *Fontinalis antipyretica*.

La **biomasse** nécessaire est fonction du nombre de stations d'étude. Le risque de perdre une partie des brins pendant la période d'exposition (maximum 30%) est compensé de manière préventive en augmentant la masse à environ 30 à 35 g de poids frais essoré par station d'étude. A ceci s'ajoutent deux témoins (le témoin d'analyse et le témoin d'exposition; voir 4.3.11) équivalents à deux stations supplémentaires. D'où :

Biomasse totale à récolter : **(nombre de stations d'étude + 2) x 30 à 35 g** de poids frais essoré.

Après la collecte et le nettoyage, les mousses sont placées dans un récipient rempli d'eau du site de référence pour le transport.

4.3.4. Conditionnement des mousses avant le transfert

Une **qualité optimale** des mousses est assurée en procédant à la récolte le matin même ou le jour précédant le transfert. A défaut, les mousses peuvent être conservées pendant un maximum de 4 jours dans une salle éclairée et climatisée à une température voisine de celle de l'eau de la station de référence. Une aération permanente doit être assurée par bullage d'air.

4.3.5. Corbeilles d'exposition

Les mousses sont exposées dans des paniers en grillage plastifié d'une **maille** comprise entre 5 et 8 mm de côté. Le grillage en matière plastique ou en métal plastifié se trouve sans difficulté dans le commerce spécialisé dans le jardinage.

Le grillage est découpé et replié de façon à former une corbeille délimitant un **volume interne** d'environ **0,5 à 1 L** permettant aux mousses de flotter librement. Les différents volets sont assemblés à l'aide d'un fil de fer plastifié ou d'un cordon en nylon en aménageant une ouverture pour l'introduction de l'échantillon. La forme des corbeilles importe peu ; un cylindre comprimé à un bout offre toutefois l'avantage d'une faible prise vis-à-vis des solides dans l'eau responsables du colmatage (**Annexe 4 planche 2**).

4.3.6. Technique de transfert

A chacune des stations d'étude, un échantillon de mousses (30 à 35 g de poids frais essoré) est introduit dans un panier d'exposition. Un caillou, ajouté comme lest, assure une bonne immersion de l'ensemble. A des profondeurs inférieures à 50 cm, le dispositif est placé près du **fond de rivière** dans une position qui assure un contact permanent avec l'eau. Si besoin, la corbeille est stabilisée à l'aide de matériel se trouvant sur place. Le choix de l'endroit précis d'immersion s'effectue selon les recommandations relatives aux critères de prélèvement de mousses autochtones (voir 3.3.6). Lorsque la profondeur de l'eau dépasse 50 cm, la corbeille est placée à 20-30 cm sous la surface de façon qu'elle puisse **flotter librement** dans la colonne d'eau.

Dans les deux cas, le dispositif est fixé à un point **ancrage** naturel (racine, bloc) ou artificiel (barre de fer enfoncée dans la berge) avec un fil de fer plastifié. L'expérience montre qu'il est avantageux de dessiner un croquis de la station avec plusieurs points de repère afin de retrouver facilement le dispositif.

4.3.7. Durée d'exposition

La durée d'exposition des mousses s'échelonne entre un minimum de **8 jours** et un maximum de **4 à 6 semaines**. Le choix précis dépend de l'objectif de l'étude et les conditions environnementales.

Ainsi, pour localiser des sources de pollution, le temps d'exposition devra être compris entre 15 et 21 jours. La durée peut être portée à un mois ou plus pour étudier l'incidence d'une contamination si les conditions environnementales sont favorables [12, 43, 44]. En revanche, en situation défavorable, par exemple à proximité d'un rejet ou dans le réseau d'assainissement, le temps d'immersion peut être diminué jusqu'à une durée de 8 à 14 jours [12, 19, 26, 34].

Une solution efficace pour prolonger une étude de surveillance active consiste à **répéter l'expérience** de transfert plusieurs fois de suite (2 à 5) en introduisant un nouvel échantillon de mousses au moment du retrait du précédent. Cette démarche permet d'obtenir plusieurs indications successives dans le temps, indépendantes les unes des autres. Les données recueillies fournissent des

informations plus complètes et réalistes d'une situation de pollution et, en complément, des renseignements sur les modalités de contamination [25, 43, 44].

4.3.8. Entretien et surveillance

Le dispositif expérimental nécessite un entretien régulier afin de le débarrasser de dépôt de tout genre tels que sédiment, détritiques, débris végétaux (feuilles mortes, plantes arrachées), invertébrés qui colmatent peu à peu le grillage et risquent de gêner la circulation de l'eau au contact des mousses. Le **nettoyage** s'effectue par une agitation dans le courant et, au besoin, sous un jet de pissette remplie avec de l'eau de la station. La fréquence des inspections dépend des caractéristiques du site d'étude; elle est en général de une à deux fois par semaine. Il est particulièrement important d'intervenir après des précipitations importantes et/ou isolées (type orage d'été) qui remobilisent de grandes quantités de matériel susceptible de colmater les paniers de mousses.

4.3.9. Précautions particulières

Sur le terrain, la mise en oeuvre de la technique des transferts exige une **discrétion** maximale pour prévenir tout acte de vandalisme. Dans la mesure du possible, il faut rechercher des endroits situés à l'écart d'habitations ou de voies fortement fréquentées. Le dispositif d'exposition lui-même doit s'intégrer au mieux dans le paysage. Les éléments facilement repérables depuis la berge doivent être cachés par du matériel se trouvant sur place (blocs, bois, feuilles, etc.). Par ailleurs, il faut éviter de créer des couloirs d'accès à la station en piétinant à répétition la végétation. Dans la pratique, des précautions de discrétion se sont avérées plus efficaces que tout panneau apposé demandant aux visiteurs et autres curieux de ne pas déranger le dispositif d'étude.

4.3.10. Retrait des échantillons

Après l'exposition, les mousses sont lavées *in situ*, conditionnées et transportées à l'état frais selon un protocole identique à celui décrit pour les échantillons autochtones (voir 3.3.8 et 3.3.9).

4.3.11. Aspect particulier des témoins

Dans le cadre de la biosurveillance active, il est **essentiel** de disposer d'un **témoin d'analyse**. Il s'agit d'un échantillon retenu dans la masse de mousse récoltée juste avant l'étape de transfert. Cet échantillon est lavé dans les 24 heures, séché et conservé au sec conformément au protocole défini pour les mousses autochtones (voir respectivement 3.4.2, 3.4.3 et 3.4.5). Il permet de connaître les concentrations métalliques dans les mousses avant leur transfert aux différentes stations d'étude.

Il peut également être utile d'introduire dans le protocole un **témoin d'exposition**. Ce témoin correspond à un échantillon équivalent à ceux exposés aux différentes stations d'étude, à la seule différence qu'il est réintroduit à la station d'origine, c'est-à-dire aux côtés des mousses autochtones du site de référence. Cet échantillon subit exactement le même traitement que les autres lots. Il permet donc de connaître l'influence des procédures de transfert et de préparation sur les niveaux métalliques dans les mousses. Ce second type de témoin est recommandé, mais pas indispensable. Dans le deuxième cas, la masse de mousse à récolter peut être diminuée en conséquence (voir 4.3.3).

4.3.12. Matériel nécessaire

Au matériel nécessaire au prélèvement (voir 3.3.11), il faut ajouter le matériel d'exposition des mousses, à savoir :

- grillage et outils de confection des paniers d'exposition
- piquets, marteau, fil de fer, pince

4.3.13. Méthode alternative de transfert de mousses

Une méthode alternative à l'exposition de mousses à l'intérieur de corbeilles consiste à déplacer les touffes de mousse ensemble avec leur **support naturel**. Cette technique est acceptable d'un point de vue scientifique [26]. Ses limites sont essentiellement d'ordre pratique. D'abord, il faut rechercher des pierres d'une taille convenable portant une touffe de mousse suffisamment fournie d'une espèce donnée. Ensuite, en prélevant à répétition des colonies entières de mousses, on risque à terme d'épuiser la station de référence. Enfin, il est difficile d'exposer les mousses à des profondeurs dépassant 50 cm d'eau, car les pierres sont obligatoirement placées sur le fond de la rivière (voir 4.3.6).

4.4. Traitement de l'échantillon brut

4.4.1. Réception des échantillons et lavage

Au retour du terrain, les échantillons transportés à l'état frais sont nettoyés **sans étape de séchage intermédiaire** avec l'objectif d'effectuer un lavage aussi efficace que possible (voir 3.4.1). Si le lavage ne peut pas être effectué le jour même, il est possible d'humecter les mousses avec de l'eau déminéralisée pour les traiter dans les 24 heures. Le protocole de lavage, d'essorage et de séchage sont les mêmes que pour les mousses autochtones (voir 3.4.2 et 3.4.3).

Dans le cas des études de surveillance active, le fait d'imposer un lavage immédiat des mousses ne peut pas être considéré comme trop pénalisant, car, généralement, le même organisme est chargé d'effectuer les transferts de mousses et la préparation des échantillons.

4.4.2. Sélection des brins

Dans le cas des mousses transférées, uniquement les **parties apicales** des mousses représentant les pousses récentes sont soumises à l'analyse. Les apex sont coupés à partir de l'échantillon brut à l'aide d'une paire de ciseaux en inox. Les fragments retenus correspondent à :

- 4 à 6 cm pour *Fontinalis antipyretica* et
- 2 à 4 cm pour *Rhynchostegium riparioides*, *Cinclidotus nigricans* et *C. danubicus*.

Une biomasse d'environ **2 g de poids sec** est préparée et placée dans un sachet de format plus petit qui est glissé dans le premier.

La sélection des apex et non pas des brins entiers permet de n'analyser que l'accumulation causée par des épisodes récents de contamination. Ceci constitue une différence notable par rapport aux mousses autochtones pour lesquelles la prise en compte des parties basales permet d'intégrer l'indication sur une période plus longue (voir 3.4.4).

4.4.3. Conservation

Les conditions et modalités de conservation des échantillons sont les mêmes que pour les mousses autochtones (voir 3.4.5).

CHAPITRE 5

PROCEDURES ANALYTIQUES

5.1. Sous-échantillonnage

Chaque échantillon de mousses (non broyées) est subdivisé en un **minimum de deux sous-échantillons** qui subissent indépendamment l'ensemble de la procédure analytique. Un ou deux sous-échantillons supplémentaires représentent un avantage considérable, car ils augmentent la sécurité de l'analyse et fournissent une meilleure estimation de la variabilité de l'analyse.

5.2. Extraction des métaux et analyse

Le protocole préconisé pour l'analyse des métaux consiste en une **minéralisation acide** suivie d'un **dosage en spectrophotométrie d'absorption atomique**. Le détail des procédures figure en **annexe 3**. Le protocole en question, à quelques modifications pratiques près, est utilisé en France depuis plusieurs années [1, 45]. Il est maintenu consciemment à un niveau de sophistication raisonnable et ne fait pas appel à des techniques, en particulier de minéralisation, qui requièrent un équipement coûteux.

Pour des raisons d'homogénéité méthodologique, la **minéralisation** doit obligatoirement être effectuée avec de l'**acide nitrique 8 N**. Des attaques acides plus violentes sont à proscrire. En revanche, en ce qui concerne l'aspect purement analytique, des différences d'ordre matériel sont tolérées, d'une part en raison des équipements techniques spécifiques à chaque laboratoire d'analyse, et d'autre part dans un souci de ne pas rejeter d'office les évolutions techniques, notamment en matière de minéralisation de matrices biologiques et de procédés d'analyse.

5.3. Résidu de minéralisation

Après l'analyse des métaux, le culot de minéralisation resté au fond des tubes est utilisé comme critère de qualité pour évaluer l'**efficacité de la procédure de lavage** des mousses. Il s'agit de

quantifier le matériel minéral qui n'a pas pu être délogé de la structure de la mousse au cours de ce traitement. Il est évident que cette technique ne prend pas en compte la totalité de la matière exogène associée aux mousses, car une grande partie (bactéries, diatomées et autres algues, détritiques, dépôts minéraux, concrétions calcaires) a été détruite lors de la phase de minéralisation.

Par filtration sous-vide, le **culot de minéralisation** est récupéré sur un filtre sans cendre de 1,2 µm de diamètre de pore. Après séchage d'une heure à 110 ± 5 °C, le filtre est calciné pendant deux heures à 525 ± 25 °C. L'augmentation de poids par rapport à la tare (boîte de Pétri, creuset, etc.) représente le résidu minéral. L'expression en pourcentage est obtenue par la formule suivante :

$$\text{Résidu minéral (\%)} = \frac{\text{résidu minéral pesé (mg)}}{\text{masse de mousse initiale pesée (mg)}} \times 100$$

5.4. Echantillon certifié

Le contrôle de la **qualité de l'analyse** peut être réalisé à l'aide d'un échantillon de mousse dont les concentrations métalliques sont certifiées. L'échantillon certifié est intégré dans la série d'analyse et subit exactement le même protocole que tous les autres échantillons. La prise en compte de l'assurance qualité doit conduire les laboratoires d'analyse à vérifier l'exactitude de leurs dosages par comparaison à un échantillon certifié.

L'Institut des Mesures et Matériaux de Référence* (anciennement : Bureau Communautaire des Références) dépendant de la Commission des Communautés Européennes commercialise un échantillon de mousse aquatique *Platyhypnidium riparioides* (syn. *Rhynchostegium riparioides*) codé **CRM 061** (25 g). Ce matériel biologique est certifié pour les concentrations en cadmium, cuivre, mercure, plomb et zinc. Des teneurs de référence non certifiées sont proposées pour l'arsenic, le chrome et le nickel.

Cet échantillon peut également être utilisé pour vérifier la qualité de la mesure du **résidu minéral** (voir 5.3). D'après les résultats d'une étude d'intercalibration à laquelle 14 laboratoires ont participé, celui-ci s'élève à **16,5 ± 3,0 %** [45].

* Institut des Mesures et Matériaux de Référence, Commission des Communautés Européennes, Retieseweg, B-2440 Geel, Belgique. Tél. : 00 32 14 571 211, Fax : 00 32 14 590 406

CHAPITRE 6

PRESENTATION ET VALIDATION DES RESULTATS

6.1. Expression des données

Les concentrations de micropolluants métalliques dans les mousses aquatiques sont exprimées en $\mu\text{g/g}$ ou en **mg/kg de poids sec** initialement pesé.

Comme l'analyse est effectuée sur plusieurs (minimum deux) sous-échantillons d'un même échantillon de départ, le **résultat complet** pour chaque métal comprend les données suivantes :

- concentrations observées
- moyenne \pm écart-type ($x \pm s$)
- coefficient de variation (C.V.)
- nombre de sous-échantillons (n)

$$\text{avec : coefficient de variation (\%)} = \frac{\text{écart-type}}{\text{moyenne}} \times 100$$

En toute rigueur, le coefficient de variation (C.V.) n'a de signification statistique que si le nombre de sous-échantillons est supérieur à deux. Pour éviter de trop compliquer la présentation, l'abus qui consiste à assimiler l'écart entre deux sous-échantillons à un écart-type est toléré. La fonction écart-type est donc appliquée dans tous les cas. Il faut préciser que la variabilité entre plusieurs sous-échantillons exprime exclusivement l'**incertitude sur l'analyse** de l'échantillon, puisque tout le traitement en amont du dosage a été réalisé sur l'échantillon pris dans sa globalité.

6.2. Contrôle de qualité et validation des résultats

Des contrôles de qualité sont effectués à **deux étapes** du protocole d'étude. La détermination du résidu de minéralisation permet d'évaluer la qualité des procédures de lavage des mousses (voir 5.3). La répétabilité de l'analyse entre les différents sous-échantillons est utilisée pour

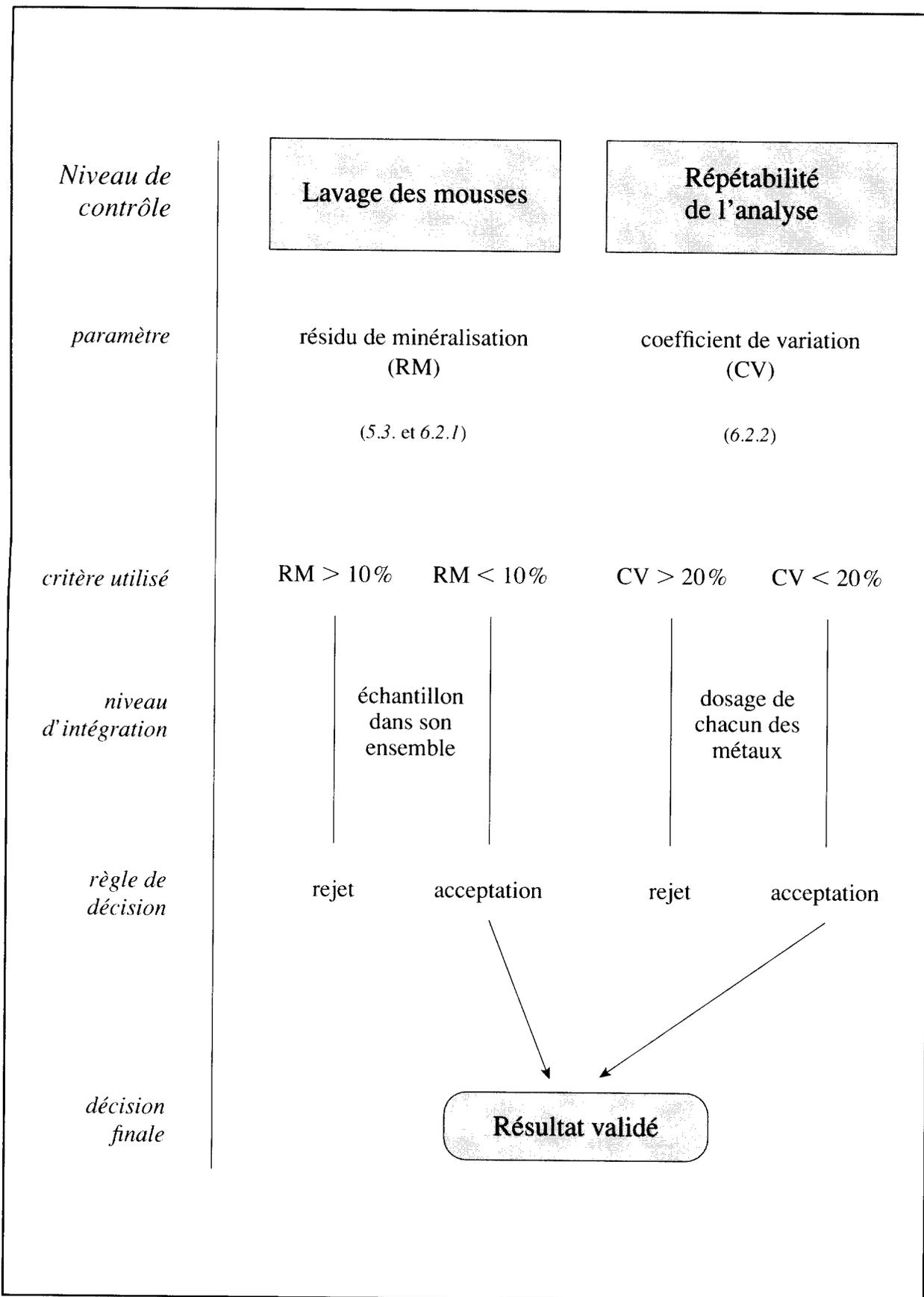


Figure 7. Organigramme de la procédure de validation des données

apprécier l'homogénéité de la biomasse ainsi que la qualité de la préparation et de la minéralisation. Pour un maximum de clarté, la procédure de validation des résultats est présentée sous forme d'un **organigramme** (figure 7).

6.2.1. Qualité du traitement des mousses

Les procédures de lavage des mousses peuvent être considérées comme efficaces lorsque le **résidu minéral** se situe en-dessous de 5%. Au delà de 10%, le lavage est contestable et son efficacité doit être vérifiée. On aura par conséquent :

- *résidu minéral < 10% : acceptation*
- *résidu minéral ≥ 10% : rejet*

Les **règles de décisions** suivantes s'appliquent pour **chaque échantillon** pris dans sa globalité :

- les résidus de tous les sous-échantillons sont inférieurs à 10% : l'échantillon est accepté
- tous les résidus sont supérieurs à 10% : l'échantillon est rejeté
- l'un des sous-échantillons présente un résidu supérieur à 10% : l'échantillon est rejeté

Le rejet d'un échantillon implique que toute la procédure reprenne depuis l'étape du lavage. En cas d'acceptation d'un échantillon, le **résultat complet** comprend les informations suivantes :

- résidus minéraux observés
- moyenne ± écart-type ($x \pm s$)
- coefficient de variation (C.V.)
- nombre de sous-échantillons (n)

Cette étape de contrôle présente l'avantage indéniable de fournir une appréciation de la qualité des étapes les plus subjectives du protocole de préparation des échantillons. Par ailleurs, elle peut fournir des renseignements très précieux au moment de l'exploitation des données. Ainsi, par exemple, un résidu particulièrement élevé dans l'un des sous-échantillons peut expliquer des concentrations métalliques plus faibles (présence de minéraux sans apport de micropolluants métalliques) ou plus élevées (présence de minéraux avec apport de micropolluants métalliques).

6.2.2. Répétabilité de l'analyse

La répétabilité d'un dosage est jugée satisfaisante, si le **coefficient de variation** (C.V.) associé à la concentration moyenne d'un métal dans un échantillon ne dépasse pas 20%. Dans le cas contraire, le résultat d'analyse est invalidé.

Pour **chaque métal** dosé, on aura donc pour **règle de décision** :

- *C.V. < 20% : dosage valable*
- *C.V. > 20% : dosage non valable*

Le choix de ce **seuil** est fondé sur les données d'une étude d'intercalibration des procédures analytiques qui a montré que les C.V. entre sous-échantillons d'un même lot se situent pour la plupart entre 2 et 10 % et dépassent très rarement 20 % [45].

Une répétabilité moins bonne est considérée comme liée à des problèmes méthodologiques, comme par exemple : une mauvaise préparation de l'échantillon (dont le lavage), une contamination extérieure lors des manipulations, une inversion de tubes, une erreur de calcul ou de transcription, etc. Il incombe alors au laboratoire d'analyse de rechercher et d'éliminer les causes de ces difficultés. Lorsque les vérifications ne donnent pas de résultat, l'analyse doit être répétée, et au besoin, toute la procédure est recommencée à partir de l'étape de minéralisation.

6.3. Bordereau d'analyse

6.3.1. Données générales

Dans un premier volet du bordereau figurent les renseignements d'ordre général. Un aperçu des informations à fournir est donné dans la liste ci-dessous :

- Description des échantillons
 - code ou numéro
 - espèce de mousse
 - état général de l'échantillon et autres observations (couleur, propreté, etc.)
- Méthodologie
 - mousses autochtones ou transférées
 - lavage immédiat ou séchage intermédiaire
 - brins entiers ou apex

Cette liste devra être complétée par toute observation qui pourrait avoir une répercussion sur les critères de validité et sur les résultats d'analyse, par exemple : «échantillon fortement colmaté difficile à nettoyer» ou bien « forte proportion de brins âgés partiellement dénudés de feuilles » ou bien « mélange de plusieurs espèces » ou bien « feutrage algal visible ».

A ces données générales seront annexés ultérieurement les relevés de terrain (fiches de prélèvement, voir 3.3.10 et 4.3.6) afin de disposer de l'ensemble des informations recueillies (terrain et laboratoire) avant l'interprétation des résultats de l'analyse des métaux.

6.3.2. Résultats d'analyse et critères de validité

Les résultats de l'analyse des micropolluants métalliques dans les mousses et les pourcentages des résidus de minéralisation sont présentés sous forme d'un tableau unique ou de deux tableaux séparés comprenant l'ensemble des informations requises (voir 6.1 et 6.2.1).

Si les critères de qualité sont remplis (voir 6.2. et figure 7), les **résultats** obtenus sont considérés comme **validés**. Dans le cas contraire et après répétition des étapes incriminées, l'expérimentateur doit fournir les raisons de non conformité. La **décision finale** de maintenir ou d'exclure l'échantillon ou la mesure (et le cas échéant de procéder à un nouveau prélèvement) incombe au(x) responsable(s) du programme d'étude en question.

CHAPITRE 7

EXPLOITATION ET INTERPRETATION DES RESULTATS

7.1. Mousses autochtones

Les résultats d'analyse des micropolluants métalliques dans les mousses sont interprétés à l'aide de deux outils : une grille de qualité et un indice polymétallique. Les deux méthodes d'exploitation ont été mises au point sur la base des données du Réseau National de Bassin (RNB) fournies par les Agences de l'Eau. Les procédures techniques utilisées sont détaillées dans un document à part [46].

7.1.1. Grille de qualité

La grille de qualité (**tableau 1**) est organisée en 5 niveaux séparés par 4 seuils de classe pour chacun des **8 métaux pris séparément**. La hiérarchisation des données, métal par métal, s'effectue en attribuant une classe de qualité (entre 1 et 5) à la valeur moyenne de chaque résultat d'analyse. Les différentes classes sont interprétées en adoptant une **terminologie** et des **codes couleur** conventionnels (**tableau 1**).

La **gamme de référence** (classe 1) qui rend compte de l'étendue des concentrations métalliques dans les mousses en cas d'absence de contamination métallique comporte, pour chaque métal, une valeur pivot appelée **concentration repère** (**tableau 2**). Il s'agit de la concentration métallique la plus fréquemment rencontrée aux stations du RNB exemptes de contamination métallique [46]. La concentration repère est l'équivalent de l'ancienne concentration de référence standard [1].

La **gamme de sécurité** (classe 2) regroupe un ensemble de situations suspectes sans pouvoir affirmer qu'il s'agit encore d'une absence de contamination (avec concours de circonstances défavorables) ou déjà d'une pollution avérée, mais de faible ampleur. La borne supérieure de cette classe qualifie une situation de pollution certaine.

Métal	Classe 1 ≤	< Classe 2 ≤	< Classe 3 ≤	< Classe 4 ≤	< Classe 5
Arsenic (As)	4,5	9	27	54	
Cadmium (Cd)	1,2	2,5	7	14	
Chrome (Cr)	11	22	65	130	
Cuivre (Cu)	33	66	200	400	
Mercure (Hg)	0,15	0,30	0,85	1,70	
Nickel (Ni)	22	45	135	270	
Plomb (Pb)	27	55	165	330	
Zinc (Zn)	175	350	1050	2100	

Dénomination	Gamme de référence	Gamme de sécurité	Pollution certaine	Pollution forte	Pollution très forte
Code couleur	Bleu	Vert	Jaune	Orange	Rouge

Tableau 1. Grille de qualité et d'interprétation des concentrations métalliques dans les bryophytes.

Les valeurs sont exprimées en µg/g de poids sec.

Métal	Concentrations
Arsenic (As)	1,5
Cadmium (Cd)	0,4
Chrome (Cr)	5
Cuivre (Cu)	18
Mercure (Hg)	0,06
Nickel (Ni)	9
Plomb (Pb)	9
Zinc (Zn)	75

Tableau 2. Concentrations métalliques repère dans les bryophytes
(exprimées en $\mu\text{g/g}$ de poids sec).

Les classes 3, 4 et 5 permettent d'apprécier l'importance d'une pollution en leur attribuant, en fonction de la gravité de la situation, respectivement les qualificatifs de **pollution certaine**, **pollution forte** et **pollution très forte**.

7.1.2. Indice polymétallique

L'indice polymétallique (IP) a été développé pour pouvoir juger la situation de **contamination métallique globale d'une station**, c'est-à-dire en prenant en compte l'ensemble des métaux analysés. Pour ce faire, une cote de qualité est attribuée à chacune des classes de qualité de la grille (**tableau 3**). L'IP est calculé en reportant les cotes de qualité obtenues pour les différents métaux dans la formule suivante :

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

avec n : le nombre de métaux pris en considération

q_i : la cote de qualité du $i^{\text{ème}}$ métal

Ce calcul fournit un chiffre compris entre 0 et 100. L'indice ainsi obtenu est exploité à l'aide d'une **grille d'interprétation** présentée dans le **tableau 4**.

L'IP se caractérise par deux propriétés importantes. D'une part, il est directement rattaché à la grille de qualité par l'intermédiaire de cotes de qualité déterminés sur une base empirique. L'indice fournit donc une vue synthétique de l'information tout en respectant une certaine homogénéité dans l'exploitation des données. D'autre part, l'indice étant formulé sur la base d'un produit et non pas d'une somme, son calcul reste possible même si l'on ne dispose pas des résultats pour l'ensemble des 8 métaux.

7.2. Mousses transférées

Les deux outils d'interprétation présentés ci-dessus ont été développés sur la base des données du RNB en sélectionnant *exclusivement* les indications relatives aux échantillons de mousses autochtones. Actuellement, il n'est pas possible de dire si ces méthodes d'interprétation sont également applicables aux informations obtenues avec des mousses transférées. De ce fait, toute utilisation de ces outils en dehors de leur champ d'application n'engage que la responsabilité de l'opérateur.

En l'**absence de tout système d'exploitation spécifique** aux données obtenues à l'aide de la méthode des transferts, il est possible d'avoir recours à la notion de **facteurs de pollution**. Il en existe de deux types : le facteur de pollution ajoutée (FPA) et le facteur de pollution standard (FPS). Le FPA compare un échantillon soumis à une pollution avec un témoin placé en amont.

Classe de qualité	Cote de qualité (q_i)
Classe 1	1,00
Classe 2	0,90
Classe 3	0,45
Classe 4	0,10
Classe 5	0,01

Tableau 3. Correspondance entre les cinq classes de la grille de qualité et les cotes de qualité définies pour l'indice polymétallique.

IP (%)	
100	Pollution multiple forte à très forte
100	Pollution multiple certaine à forte ou Pollution unique très forte
100	Pollution multiple certaine ou Pollution unique forte
100	Pollution unique ou multiple certaine
100	Absence de pollution

Tableau 4. Grille d'interprétation de l'indice polymétallique IP.

Le FPS est exprimé par le rapport entre la concentration observée et une valeur de référence standard pour le métal considéré. Dans ce cas, les concentrations repères pourraient jouer le rôle de teneurs métalliques de référence (**tableau 2**). La manipulation des deux types de facteurs de pollution exige la plus grande prudence, car les modalités standard d'interprétation restent à définir.

CHAPITRE 8

REFLEXIONS ET AIDE A L'INTERPRETATION DES DONNEES

Ce dernier chapitre a pour objet de fournir un certain nombre d'éléments explicatifs et justificatifs concernant des points particuliers des procédures méthodologiques. Ces informations complémentaires pourront être utiles à l'occasion de l'interprétation des résultats.

8.1. Analyse des sources de variabilité et d'erreur

L'identification des sources possibles de variabilité et d'erreur est indispensable pour prendre les dispositions méthodologiques nécessaires à minimiser l'incertitude sur l'indication. C'est également un élément important pour prendre conscience des étapes les plus délicates et pour interpréter correctement l'information recueillie.

8.1.1. Variabilité liée à l'environnement de la mousse

Les mousses accumulent les métaux traces en fonction de leurs propriétés biologiques intrinsèques, mais également en fonction des caractéristiques de l'environnement physico-chimique (voir 2.4.3). La variabilité de la réponse réside dans le fait que, pour une concentration métallique identique dans l'eau, la fraction disponible vis-à-vis des mousses peut fluctuer à l'intérieur d'une certaine gamme. Cette réponse modulée en fonction du contexte environnemental constitue l'un des intérêts majeurs de l'utilisation de biomoniteurs.

Ce premier type de variabilité est inhérent au système. Il constitue une **donnée de terrain** intégrée à l'indication elle-même qui **ne peut être influencée** par l'expérimentateur.

8.1.2. Variabilité liée à la mousse

Il y a deux types de sources de variabilité liées à la nature du biomoniteur, à savoir la variabilité interspécifique et la partie du brin considérée. Les **différences interspécifiques** sont en relation

avec la capacité de biosorption propre à chaque espèce, essentiellement due à la composition chimique de sa paroi cellulaire [2-4]. Le **gradient de concentrations** métalliques croissantes depuis les parties les plus jeunes (apex) vers les parties basales **des brins** de mousses s'explique par des phénomènes de précipitation et de sorption chimique (voir 2.2.3). Ces deux sources de variabilité peuvent chacune atteindre des facteurs supérieurs à 2.

Dans un programme de surveillance, la variabilité inhérente au matériel biologique ne peut pas être entièrement maîtrisée, mais aisément **minimisée** en adoptant un **protocole rigoureusement homogène** concernant :

- le choix de l'espèce de mousse (voir 3.3.3 et 4.3.3) et
- la sélection des brins à soumettre à l'analyse (voir 3.4.4 et 4.4.2).

Il faut noter que la rigueur méthodologique constitue la seule stratégie efficace pour contrôler la variabilité biologique, et notamment interspécifique. Il n'est pas possible, par exemple, de proposer un facteur de correction ou de conversion d'une espèce de mousses à l'autre, car les rapports de concentration peuvent varier fortement en fonction du métal considéré et des conditions physico-chimiques.

8.1.3. Variabilité liée à l'expérimentation *in situ*

A une station donnée, les concentrations métalliques dans les mousses varient aussi bien dans le temps que dans l'espace. En l'absence de rejet, des variations observées au cours de l'année sont attribuées à des **facteurs saisonniers** physico-chimiques et biologiques [20, 47]. Des **variations spatiales** au niveau de la station sont essentiellement liées aux caractéristiques des microhabitats. Ainsi, l'hétérogénéité selon la position verticale des touffes dans la colonne d'eau a été expliquée par un risque d'émergence des échantillons prélevés à faible profondeur [33]. Des variations transversales pourraient être liées à des différences de vitesse de courant. Des études récentes ont montré qu'une augmentation du courant et des flux de polluant exerce un effet amplificateur sur l'accumulation.

A l'heure actuelle, on ne dispose d'aucune donnée chiffrée concernant la variabilité imputable aux procédures de prélèvement (surveillance passive) ou d'exposition (surveillance active) de mousses. Tout comme pour la catégorie précédente, cette variabilité spatio-temporelle peut être **minimisée** par une **application stricte des protocoles** en ce qui concerne :

- l'intervalle de temps des collectes et la durée d'exposition des échantillons (voir 3.3.4 et 4.3.7) et
- la prise en compte de l'hétérogénéité du milieu lors des prélèvements et expositions (voir 3.3.5 et 4.3.6).

8.1.4. Variations et erreurs au niveau de la procédure analytique

Une étude d'intercalibration réalisée avec 14 laboratoires d'analyse a permis d'évaluer les difficultés liées à la procédure analytique et d'estimer la **contribution des différentes étapes** du protocole à la variabilité totale sur la mesure [45].

Les métaux qui posent le plus de problème sont l'arsenic, le cadmium et le mercure avec une forte dispersion des résultats surtout pour les faibles concentrations. Les autres éléments (chrome, cuivre, nickel, plomb et zinc) présentent une meilleure similitude, notamment en raison de plus fortes concentrations naturelles dans les mousses. Pour tous les éléments, on observe une diminution dans l'hétérogénéité avec l'augmentation des concentrations.

Etapes de traitement de l'échantillon

Quelque soit le métal considéré, les différences entre laboratoires augmentent avec le nombre croissant d'étapes à effectuer, c'est-à-dire avec l'intégration, par rapport à l'analyse seule, des phases de minéralisation et ensuite de lavage des mousses. Cette constatation justifie et impose la définition et le respect des **contrôles de qualité** qui s'exercent au niveau :

- du lavage de l'échantillon (6.2.1) et
- de la répétabilité de l'analyse (6.2.2)

Tout comme pour les précautions de terrain en amont, un respect rigoureux des critères de qualité permet de **minimiser la variabilité** liée au traitement de l'échantillon au laboratoire sans pour autant pouvoir l'éliminer.

Analyse

La dernière source de variabilité est l'erreur d'ordre analytique. Les différences analytiques inter-laboratoires importantes observées lors de l'étude d'intercalibration [45] sont d'autant plus surprenantes qu'il s'agit de la seule étape de tout le protocole qui ne soit pas soumise à une quelconque subjectivité de la part de l'expérimentateur.

Les techniques analytiques utilisées n'étant pas spécifiques à la matrice des mousses, la responsabilité de l'exactitude de la mesure incombe aux laboratoires chargés d'effectuer les dosages. A cet égard, des précautions visant à effectuer une analyse d'une qualité irréprochable, notamment par l'utilisation d'**échantillons certifiés**, sont fortement recommandées (voir 5.4).

Ces dispositions sont d'autant plus importants que l'erreur sur la mesure analytique constitue la seule **source de variation** qui puisse être réellement **maîtrisée** à l'aide d'un contrôle de qualité.

8.1.5. Variabilité acceptable

La définition d'une variabilité acceptable implique la connaissance de la variabilité totale d'un système. Or, actuellement, on dispose uniquement de données relatives à une ou plusieurs étapes, mais pas de la procédure entière. Additionner les différentes sources de variabilité identifiées et quantifiées semble peu raisonnable, car il n'est pas probable que toutes les sources s'expriment en même temps et à leur taux moyen ou maximal. Faute de pouvoir donner une vue intégrée, il faut s'employer à **minimiser chacune des sources de variation** identifiées.

L'objectif à atteindre concernant la réduction de la variabilité doit se définir par rapport au système d'interprétation des résultats (voir 7.1). Par rapport à la grille de qualité à 5 niveaux, on peut tolérer que la variabilité soit responsable d'un passage d'une classe vers la classe voisine. Ce qu'il s'agit d'exclure, ou au moins de réduire à une fréquence aussi faible que possible, est le saut de deux seuils de classe. Vu la configuration de la grille de qualité, une **variabilité acceptable** serait celle d'un **facteur 2**, c'est-à-dire soit une concentration de moitié, soit le double de la concentration réelle inconnue.

8.2. Qualité du travail de terrain

Actuellement, le contrôle de qualité reste limité aux procédures de laboratoire, faute de données suffisantes sur la méthodologie de terrain. Néanmoins, la qualité du prélèvement et la variabilité liée à l'hétérogénéité des conditions de terrain peut être évaluée à l'aide de la **répétabilité de l'échantillonnage**. La démarche à adopter consiste à répéter le prélèvement 2, 3, 4 voire 5 fois afin de constituer autant d'échantillons indépendants provenant de la même station. Dans le cadre de la surveillance active, on peut procéder à l'exposition de plusieurs échantillons indépendants.

Cette démarche peut être particulièrement intéressante pour procéder à l'harmonisation ou la **calibration** des démarches de terrain, dans le cas où plusieurs organismes ou opérateurs interviennent dans un même programme de surveillance. Trois situations différentes peuvent être distinguées :

- (1) Si tous les lots de mousses sont prélevés par la même personne, traités et analysés de façon homogène mais indépendante, le résultat fournit une estimation de l'hétérogénéité des procédures de terrain.
- (2) Si les différents lots de mousses sont collectés par des personnes différentes, mais traités et analysés de façon homogène mais indépendante, on obtient une estimation de l'hétérogénéité des conditions de terrain et de la composante humaine.
- (3) Si les différents lots de mousses sont collectés par des personnes différentes, traités et analysés par des organismes différents, on obtient une estimation de l'hétérogénéité de l'ensemble de la procédure expérimentale.

8.3. Quelques difficultés spécifiques à l'interprétation des données

8.3.1. Fond métallique géochimique

Les mousses aquatiques sont utilisées comme support analytique pour détecter et quantifier la micropollution métallique d'origines diverses. Mais la technique ne permet pas d'apprécier la **nature d'une contamination** et notamment de faire la différence entre une pollution d'origine **anthropique** et une contamination d'origine **géochimique**.

La grille de qualité et l'indice polymétallique fournissent une interprétation des données, mais non pas une explication concernant la nature d'une situation de contamination. Celle-ci ne peut être apportée que par une bonne **connaissance du terrain**, notamment des fonds géochimiques et de tous les rejets polluants d'un bassin.

8.3.2. Cas des métaux non cationiques et des conditions environnementales particulières

La biosorption des métaux est essentiellement fondée sur des mécanismes d'échange cationique (voir 2.2). Or, certains **métaux** possèdent des **formes non cationiques**. Il est donc probable que certaines formes métalliques ne soient pas ou moins bien accumulées par les mousses. A cet égard, il faut citer prioritairement le chrome (VI) anionique et les formes organiques du mercure et de l'arsenic.

Dans certaines **conditions environnementales**, il est possible que les mousses n'accumulent pas ou peu des micropolluants pourtant présents à des concentrations élevées dans l'eau. Ceci est le cas notamment pour les effluents riches en minéraux lorsqu'il y a une forte compétition avec des cations majeurs (Na, K, Ca et Mg). De même, en aval de rejets de stations d'épuration, les fortes charges de matières organiques et/ou de matières en suspension rendent les métaux traces très peu disponibles pour une accumulation par les mousses.

8.4. Physiologie des mousses

A aucun moment de la procédure expérimentale, la physiologie des mousses n'est prise en compte. Ceci peut sembler surprenant pour une méthode mettant en oeuvre des organismes vivants. Cet **aspect** a réellement été **négligé**, sans doute parce que les mousses se sont révélées résistantes, même lorsqu'elles sont placées dans des conditions défavorables. Des travaux récents suggèrent qu'une certaine dégradation de la physiologie des mousses n'altère pas de façon substantielle leur capacité biomonitrice [12, 34, 48].

CONCLUSION

Ce cahier technique constitue un **guide pratique** pour l'utilisation des mousses aquatiques en tant qu'outil de surveillance de la contamination des eaux courantes par les micropolluants métalliques. Il présente en détail l'ensemble des procédures méthodologiques depuis les étapes de préparation d'un travail (choix de la stratégie d'étude en fonction du type d'information recherchée), sa réalisation pratique sur le terrain, le protocole analytique jusqu'à l'interprétation des résultats. L'harmonisation de la démarche expérimentale et des procédures d'exploitation des données a pour but de fournir une base méthodologique homogène permettant de **hiérarchiser** de la façon la plus objective possible les situations de pollution et de constituer ainsi un outil d'**aide à la décision** destiné à définir les priorités au niveau des actions concrètes à mettre en oeuvre.

La proposition d'une méthodologie applicable par un large éventail de spécialistes n'est pas sans exiger un certain nombre de **choix et de compromis**. Autant que cela était possible, l'option technique retenue est celle qui va dans le sens d'une perte minimale de rigueur scientifique pour un gain maximal en simplicité et en **convivialité**. Ceci est une condition préalable pour maintenir une attractivité suffisante de la méthode autant pour les utilisateurs réguliers que pour les utilisateurs occasionnels ou même potentiels. L'instauration de **contrôles de qualité** des procédures de laboratoire est motivé par un souci analogue : accepter une complication minimale en échange d'une efficacité accrue en terme de baisse de la variabilité et des erreurs possibles.

Parmi les avantages essentiels des mousses aquatiques, la **simplicité de la méthode**, à la fois de la démarche sur le terrain et des procédures analytiques, a plusieurs fois été mise en avant. Cependant, cette simplicité technique apparente ne doit pas occulter les **difficultés réelles** inhérentes à toute analyse de matrice biologique. En effet, dans le cas présent, on cumule des sources de variabilité et d'erreur de plusieurs origines qui ont toutes une incidence potentielle sur le résultat final. Dans le but de minimiser cette variabilité, il est nécessaire d'appliquer une **rigueur méthodologique** sans faille, en particulier au niveau du protocole de terrain et de la gestion des critères de qualité lors du travail de laboratoire.

L'utilisation de supports biologiques intégrateurs de la micropollution métallique constitue une avancée considérable par rapport à l'analyse dans les compartiments inertes de l'environnement. Malgré les avantages des biomoniteurs, il faut **se garder de surinterpréter l'information** recueillie. Il est important de bien se rendre compte que cette information constitue une **indication** et non pas une mesure absolue de la pollution. La réponse est intégrée dans le temps

selon des modalités complexes qui dépendent de mécanismes et de cinétiques d'échange bien spécifiques. Cette spécificité confère à l'indication fournie par chaque biomoniteur une **signification écotoxicologique** particulière, qui, dans le cas des mousses aquatiques, a été définie avec autant de précision que les connaissances actuelles le permettent. La spécificité de la réponse implique également qu'une indication obtenue avec les mousses n'est **pas** forcément **extrapolable** à d'autres êtres vivants colonisant le même milieu.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] Mouvet C., 1986. Métaux lourds et mousses aquatiques ; Synthèse méthodologique. Rapport de contrat Laboratoire d'Ecologie, Université de Metz/Agence de l'Eau Rhin-Meuse/Agence de l'Eau Rhône-Méditerranée-Corse, 104 p.
- [2] Clymo R.S., 1963. Ion exchange in *Sphagnum* and its relation to bog ecology. *Ann. Bot.*, 27, 309-324.
- [3] Brown D.H. & Bates J.W., 1990. Bryophytes and nutrient cycling. *Bot. J. Linnean Soc.*, 104, 129-147.
- [4] Breuer K. & Melzer A., 1990. Heavy metal accumulation (lead and cadmium) and ion exchange in three species of *Sphagnaceae*. I. Main principles of heavy metal accumulation in *Sphagnaceae*. *Oecologia*, 8, 461-467.
- [5] Pickering D.C. & Puia I.L., 1969. Mechanism for the uptake of zinc by *Fontinalis antipyretica*. *Physiol. Plant*, 22, 653-661.
- [6] Hébrard J.-P. & Foulquier L., 1975. Introduction à l'étude de la fixation du manganèse-54 par *Platyhypnidium riparioides* (Hedw.) Dix. *Rev. Bryol. Lichénol.*, 41, 35-53.
- [7] Mouvet C., 1987. Accumulation et relargage de plomb, zinc, cadmium, chrome et cuivre par des mousses aquatiques en milieu naturel et au laboratoire. Rapport de contrat Laboratoire d'Ecologie, Université de Metz/Agence de l'Eau Rhône-Méditerranée-Corse, 122 p.
- [8] Wehr J.-D., Kelly M.G. & Whitton B.A., 1987. Factors affecting accumulation and loss of zinc by the aquatic moss *Rhynchostegium riparioides*. *Aquat. Bot.*, 29, 261-274.
- [9] Mersch J., Morhain E. & Mouvet C., 1993. Laboratory accumulation and depuration of copper and cadmium in the freshwater mussel *Dreissena polymorpha* and the aquatic moss *Rhynchostegium riparioides*. *Chemosphere*, 27, 1475-1485.
- [10] Claveri B., Morhain E. & Mouvet C., 1994. A methodology for the assessment of accidental copper pollution using the aquatic moss *Rhynchostegium riparioides*. *Chemosphere*, 28, 2001-2010.
- [11] Vray F., Baudin J.-P. & Svadlenková M., 1992. Effects of some factors on uptake and release of ¹⁰⁶Ru by a freshwater moss, *Platyhypnidium riparioides*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 23, 190-197.

- [12] Lopez J., Vazquez M.D. & Carballeira A., 1994. Stress responses and metal exchange kinetics following transplant of the aquatic moss *Fontinalis antipyretica*. *Freshw. Biol.*, 32, 185-198.
- [13] Beaugelin-Seiller K., Baudin J.-P. & Casellas C., 1995. Experimental study of the effects of various factors on the uptake of ⁶⁰Co by freshwater mosses. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 28, 125-133.
- [14] Wehr J.-D. & Whitton B.A., 1983. Accumulation of heavy metals by aquatic mosses. 2 : *Rhynchostegium riparioides*. *Hydrobiologia*, 100, 261-284.
- [15] Wehr J.-D., Empain A., Mouvet C., Say P.J. & Whitton B.A., 1983. Methods for processing aquatic mosses used as monitors of heavy metals. *Water Res.*, 17, 985-992.
- [16] 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 J. Anal. Chem.*, 353, 101-104.
- [17] Siebert A., Bruns I., Krauss G.J., Miersch J. & Markert B., 1996. The use of the aquatic moss *Fontinalis antipyretica* L. ex Hedw. as a bioindicator for heavy metals. 1. Fundamental investigations into heavy metal accumulation in *Fontinalis antipyretica* L. ex Hedw. *Sci. Total Environ.*, 177, 137-144.
- [18] Gullvåg B.M., Skaar H & Ophus E.M., 1974. An ultrastructural study of lead accumulation within leaves of *Rhytidiadelphus squarrosus* (Hedw.) Warnst.; A comparison between experimental and environmental poisoning. *J. Bryol.*, 8, 117-122.
- [19] Mouvet C., 1984. Accumulation of chromium and copper by the aquatic moss *Fontinalis antipyretica* L. ex Hedw. transplanted in a metal-contaminated river. *Environ. Technol. Lett.*, 5, 541-548.
- [20] Claveri B., 1995. Les bryophytes aquatiques comme traceurs de la contamination métallique des eaux continentales ; Influence de différents paramètres sur l'accumulation des métaux et développement d'un Module d'Intégration de la Micropollution (MIM). Thèse de Doctorat en Toxicologie de l'Environnement, Université de Metz, 238 p.
- [21] Empain A., Lambinon J., Mouvet C. & Kirchmann R., 1980. Utilisation des bryophytes aquatiques et subaquatiques comme indicateurs biologiques de la qualité des eaux courantes. In : Pesson P. (éditeur), *La pollution des eaux continentales*. Gauthier-Villars, 2^{ème} édition, pp. 195-223.
- [22] Say P.J., Harding J.P.C & Whitton B.A., 1981. Aquatic mosses as monitors of heavy metal contamination in the river Etherow, Great Britain. *Environ. Pollut. (Ser. B)*, 2, 295-307.

- [23] Klein B., Meier P.F. & Aubort J.-D., 1991. A comparison of aquatic mosses, sediments and water as indicators of metallic pollution : the case of the Venoge River, Switzerland. *J. Trace Microprobe Tech.*, 9, 107-125.
- [24] Lopez J. & Carballeira A., 1993. Interspecific differences in metal bioaccumulation and plant-water concentration ratios in five aquatic bryophytes. *Hydrobiologia*, 263, 95-107.
- [25] Mersch J. & Pihan J.-C., 1993. Simultaneous assessment of environmental impact on condition and trace metal availability in zebra mussels *Dreissena polymorpha* transplanted into the Wiltz River, Luxembourg. Comparison with the aquatic moss *Fontinalis antipyretica*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 25, 353-364.
- [26] Kelly M.G., Girton C. & Whitton B.A., 1987. Use of moss-bags for monitoring heavy metals in rivers. *Water Res.*, 21, 1429-1435.
- [27] Mouvet C., Morhain E., Sutter C. & Couturieux N., 1993. Aquatic mosses for the detection and follow-up of accidental discharges in surface waters. *Water Air Soil Pollut.*, 66, 333-348.
- [28] Dilks T.J.K. & Proctor M.C.F., 1975. Comparative experiments on temperature responses of bryophytes : assimilation, respiration and freezing damage. *J. Bryol.*, 8, 317-336.
- [29] Empain A., 1978. Relations quantitatives entre les populations de bryophytes aquatiques et la pollution des eaux courantes. Définition d'un indice de qualité des eaux. *Hydrobiologia*, 60, 49-74.
- [30] Glime J.-M. & Vitt D.H., 1984. The physiological adaptations of aquatic musci. *Lindbergia*, 10, 41-52.
- [31] Wehr J.-D. & Whitton B.A., 1986. Ecological factors relating to morphological variation in the aquatic moss *Rhynchostegium riparioides* (Hedw.) C. Jens. *J. Bryol.*, 14, 269-280.
- [32] Lopez J. & Carballeira A., 1991. A comparative study of pigment contents and response to stress in five species of aquatic bryophytes. *Lindbergia*, 15, 188-194.
- [33] André B. & Lascombe C., 1987. Comparaison de deux traceurs de la pollution métallique des cours d'eau : les sédiments et les bryophytes. *Rev. Sci. Eau*, 6, 225-247.
- [34] Mersch J. & Reichard M. (soumis). *In situ* investigation of trace metal availability in industrial effluents using transplanted aquatic mosses.
- [35] Mouvet C., 1985. The use of aquatic bryophytes to monitor heavy metals pollution of freshwaters as illustrated by case studies. *Verh. int. Verein. Limnol.*, 22, 2420-2425.

- [36] Mouvet C., Pattée E. & Cordebar P., 1986. Utilisation des mousses aquatiques pour l'identification et la localisation précise de sources de pollution métallique multiforme. *Acta Oecol.*, 7, 77-91.
- [37] Gonçalves E.P.R., Boaventura R.A.R. & Mouvet C., 1992. Sediments and aquatic mosses as pollution indicators for heavy metals in the Ave river basin (Portugal). *Sci. Total Environ.*, 114, 7-24.
- [38] Martinez-Abaigar J., Nunez-Olivera E. & Sanchez-Diaz M., 1993. Effects of organic pollution on transplanted aquatic bryophytes. *J. Bryol.*, 17, 553-566.
- [39] Mersch J., Guérolde F., Rousselle P. & Pihan J.-C., 1993. Transplanted aquatic mosses for monitoring trace metal mobilization in acidified streams of the Vosges Mountains, France. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 51, 255-259.
- [40] Claveri B., Guérolde F. & Pihan J.-C., 1995. Use of transplanted mosses and autochthonous liverworts to monitor trace metals in acidic and non-acidic headwater streams (Vosges mountains, France). *Sci. Total Environ.*, 175, 235-244.
- [41] Kirchmann R. & Lambinon J., 1973. Bioindicateurs végétaux de la contamination d'un cours d'eau par des effluents d'une centrale nucléaire à eau pressurisée; Evaluation des rejets de la centrale de la SENA (Chooz, Ardennes françaises) au moyen des végétaux aquatiques et ripicoles de la Meuse. *Bull. Soc. Roy. Bot. Belg.*, 106, 187-201.
- [42] Baudin J.-P., Lambrechts A. & Pally M., 1991. Utilisation des mousses aquatiques comme bioindicateurs de contamination radioactive. *Hydroécol. Appl.*, 3, 209-240.
- [43] Mersch J. & Kass M., 1994. La mousse aquatique *Fontinalis antipyretica* comme traceur de la contamination radioactive de la Moselle en aval de la centrale nucléaire de Cattenom. *Bull. Soc. Nat. luxemb.*, 95, 109-117.
- [44] Mersch J. & Johansson L., 1993. Transplanted aquatic mosses and freshwater mussels to investigate the trace metal contamination in the rivers Meurthe and Plaine, France. *Environ. Technol.*, 14, 1027-1036.
- [45] Agences de l'Eau, 1994. Métaux lourds et mousses aquatiques; Standardisation des aspects analytiques; 2^{ème} phase : calibration multilaboratoires. Etude Inter-Agences N° 34, 72 p (auteur : C. Mouvet).
- [46] Agences de l'Eau, 1997. Les bryophytes aquatiques comme outil de surveillance de la contamination des eaux courantes par les micropolluants métalliques : modalités d'interprétation des données. Etude Inter-Agences (auteurs : B. Claveri & J. Mersch).

- [47] Wehr J.-D. & Whitton B.A., 1983. Accumulation of heavy metals by aquatic mosses. 3 : Seasonal changes. *Hydrobiologia*, 100, 285-291.
- [48] Claveri B. & Mouvet C., 1995. Temperature effects on copper uptake and CO₂ assimilation by the aquatic moss *Rhynchostegium riparioides*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 28, 314-320.

ANNEXES

- Annexe 1** Fiches signalétiques des espèces de mousses
- Annexe 2** Fiche de terrain
- Annexe 3** Protocole d'analyse des métaux traces dans les mousses aquatiques
- Annexe 4** Photos

ANNEXE 1

FICHES SIGNALÉTIQUES DES ESPÈCES DE MOUSSES

Les espèces de mousses préconisées pour réaliser des études de surveillance de la contamination des eaux courantes par les micropolluants métalliques sont au nombre de 4, à savoir *Fontinalis antipyretica*, *Rhynchostegium riparioides*, *Cinclidotus danubicus* et *Cinclidotus nigricans* (voir 3.3.3 et 4.3.3). Elles ont été choisies d'une part en raison de leur large répartition géographique et d'autre part en raison de leur capacité similaire à accumuler les micropolluants métalliques. *Rhynchostegium riparioides* et *Fontinalis antipyretica* seront présentées séparément; les espèces du genre *Cinclidotus* seront traitées conjointement pour mieux mettre en évidence leurs points communs et leurs différences.

Les fiches signalétiques sont destinées à caractériser les quatre espèces en ce qui concerne leur morphologie, leur écologie et le risque de confusion avec d'autres espèces. La description de leur biotope de prédilection ainsi que de leur port devrait faciliter la recherche de mousses sur le terrain. Les critères morphologiques devraient permettre une identification fiable des quatre espèces au cours ou après la récolte. Toutefois, il est utile de préciser que les mousses possèdent souvent une plasticité morphologique assez remarquable. Pour une étude plus approfondie, il faut se reporter à des flores, comme par exemple :

Augier J., 1966. Flore des bryophytes; morphologie, anatomie, biologie, écologie, distribution géographique. Editions Paul Lechevalier, Paris, 702 p.

Smith A.J.E., 1978. The moss flora of Britain and Ireland. Cambridge University Press, Cambridge, 506 p.

Fontinalis antipyretica

1. Principal synonyme

Fontinalis dolosa

2. Morphologie et critères d'identification

- tiges ramifiées de façon irrégulière pouvant dépasser une longueur de 100 cm
- feuilles implantées sur 3 rangs autour de la tige avec peu de recouvrement
- limbe long (3-8 mm), ovale et concave, fortement replié selon l'axe longitudinal pour former une profonde cannelure
- marge entière
- pas de nervure centrale
- cellules allongées angulaires carrées à hexagonales

3. Biotope et port de la plante

- espèce très répandue dans des biotopes très variés
- peu rhéophile, se rencontre en eau courante et en eau stagnante
- colonie souvent organisée en touffes bougeant avec les mouvements d'eau
- tige jeune dressée
- couleur verte généralement assez claire
- supporte des périodes d'émersion

4. Confusion possible et critères distinctifs

Fontinalis squamosa

- fortement limitée à des eaux à faible alcalinité
- plante d'aspect plus grêle
- tiges de 10 à 50 cm fortement ramifiées
- limbe concaves sans pliure médiane atteignant 4 à 5 cm
- couleur plus foncée tirant sur le brun

Rhynchostegium riparioides

1. Principaux synonymes

Platyhypnidium riparioides, *Eurhynchium riparioides*, *Oxyrrhynchium rusciforme*

2. Morphologie et critères d'identification

- tiges ramifiées de façon irrégulière dépassant rarement une longueur de 10 cm
- feuilles imbriquées autour de la tige (jamais sur 3 rangs) se recouvrant partiellement
- limbe large, ovale, concave, terminé en pointe obtuse
- marge du limbe souvent denticulée vers l'extrémité supérieure
- nervure centrale forte à la base s'avance au 3/4 de la feuille
- cellules rectangulaires environ 10 fois plus longues que larges au milieu du limbe

3. Biotope et port de la plante

- espèce très répandue dans des biotopes contrastés
- plutôt rhéophile et supporte un courant violent
- colonie souvent organisée en tapis ancré sur une surface solide rugueuse
- rameau primaire rampant
- ne « flotte » pas dans le courant
- couleur verte généralement assez claire par rapport aux autres espèces aquatiques
- rarement à l'état émergé

4. Confusion possible et critères distinctifs

Amblystegium riparium

- plante à aspect plus grêle jusqu'à 20 cm de long
- tiges peu ramifiées et aplaties
- feuilles lancéolées avec un apex filiforme
- marge non dentelée
- nervure relativement faible atteignant la moitié et jusqu'au 3/4 du limbe
- cellules du milieu du limbe peu allongées

Cinclidotus danubicus et *Cinclidotus nigricans*

1. Principal synonyme

Cinclidotus riparius pour *Cinclidotus nigricans*

2. Morphologie et critères d'identification

Cinclidotus sp.

- tiges relativement courtes par rapport à d'autres espèces de mousses aquatiques
- feuilles implantées sur 3 rangs et plus autour de la tige avec recouvrement
- limbe lisse
- bord des feuilles formé d'un renforcement de plusieurs couches cellulaires
- nervure centrale atteignant l'apex de la feuille
- cellules peu allongées

Cinclidotus danubicus

- feuille allongée, très étroite et dressée, dépassant 3 mm avec terminaison en triangle
- largeur maximale du limbe au 1/5 inférieur
- bords parallèles à la nervure centrale sur les 3/4 supérieurs de la feuille
- limbe légèrement courbé à l'état sec
- nervure centrale dépasse nettement le bord de la feuille (nervure excurrente)
- connue qu'à l'état stérile

Cinclidotus nigricans

- feuille elliptique de 3 à 3,5 mm de longueur avec sommet nettement obtus-arrondi
- largeur maximale du limbe au milieu ou au-dessus du milieu
- marge des feuilles amincie à la base et au sommet de la feuille

3. Biotope et port de la plante

- large préférence pour les milieux bien minéralisés
- *C. danubicus* souvent inféodée aux grandes rivières de plaine
- *C. danubicus* plus rhéophile que *C. nigricans*
- colonies organisées en touffes ou tapis lâches
- tiges toujours dressées
- couleur verte assez foncée voire noire
- espèces amphibies, donc facultativement aquatiques

4. Confusion possible et critères distinctifs

Cinclidotus aquaticus

- espèce très rare
- tige peut atteindre 25 cm
- feuille triangulaire très allongée avec terminaison très étroite
- largeur maximale du limbe à sa base
- nervure centrale forte occupant un tiers de la base de la feuille

Cinclidotus fontinaloides

- espèce très facultativement aquatique, rarement immergée
- tiges de 4 à 12 cm avec de nombreux rameaux court
- feuilles ovales se terminant en triangle
- limbe se vrille à l'état sec
- largeur maximale du limbe vers le tiers inférieur de la feuille
- marge des feuilles épaisse à la base et au sommet
- nervure centrale ne dépasse pas l'apex de la feuille

ANNEXE 2

FICHE DE TERRAIN

Date :

Heure :

Cours d'eau :

Station :

Code :

Substrat géologique

siliceux argileux marnocalcaire carboné autres :

Régime hydrologique

tarissement étiage eaux moyennes crue décrue

Vitesse moyenne du courant

< 5 cm/s 5 à 25 cm/s 25 à 75 cm/s 75 à 150 cm/s 150 cm/s

Luminosité

très couvert assez couvert assez dégagé dégagé

Espèce de mousse échantillonnée

Fontinalis *Rhynchostegium* *Cinclidotus* *Cinclidotus* autre :
antipyretica *riparioides* *nigricans* *danubicus*

Support de fixation

cailloux dalles racines artificiel autre :

Abondance

très faible faible moyenne importante très importante

Etat physiologique

couleur verte pousses récentes tiges dénudées feuilles jaunies dépôt minéral visible

Présence significative d'autres espèces

Fontinalis *Rhynchostegium* *Cinclidotus* *Cinclidotus* autre :
antipyretica *riparioides* *nigricans* *danubicus*

Observations particulières et difficultés rencontrées :

Croquis de la station et points de prélèvement (au dos)

ANNEXE 3

PROTOCOLE D'ANALYSE DES METAUX TRACES DANS LES MOUSSES AQUATIQUES

1. Minéralisation

1.1. Tous les métaux à l'exception du mercure

- Pour chaque sous-échantillon, 300 ± 10 mg de matériel biologique sec sont pesés avec une précision de ± 1 mg dans un tube à essai de 30 ml à bouchon vissé. La qualité des tubes à usage unique importe peu, du moment qu'ils supportent sans dommage l'ensemble des étapes du protocole.
- Une fois les mousses légèrement tassées au fond du tube, 4 ml d'acide nitrique à 36 % (qualité normapur, environ 8 N) sont ajoutés. Les bouchons sont vissés et les tubes sont réunis dans un portoir.
- La minéralisation s'effectue dans une étuve à 65 ± 5 °C pendant 24 heures. Pour assurer un bon contact entre les mousses et l'acide, le portoir est agité à plusieurs reprises lors de la minéralisation. L'immersion permanente de tout l'échantillon n'est pas indispensable en raison de la présence de vapeurs acides dans tout le corps du tube. Au bout de 24 heures, le matériel biologique est détruit. Des fragments de parois végétales forment un culot amorphe dans le fond des tubes.
- Après refroidissement et condensation complète de l'acide, le volume est ajusté à 20 ml avec de l'eau distillée. Les tubes sont de nouveau fermés et soigneusement mélangés. L'acidité de la solution est alors d'environ 7%.
- Une centrifugation à 2.500 t.p.m. est effectuée pour obtenir une solution limpide à soumettre au dosage. Le culot tassé au fond du tube sera utilisé ultérieurement pour la détermination du résidu minéral (voir 5.3).
- Des essais à blanc (tubes sans mousses) sont inclus à chaque série d'analyse et subissent exactement le même traitement que les échantillons. Ces témoins servent à évaluer l'apport métallique du matériel et des produits chimiques ainsi que d'éventuelles contaminations survenues lors de la manipulation.
- L'ajout dans le dispositif d'un échantillon certifié constitue un acte volontaire destiné à contrôler l'exactitude des mesures (voir 5.4).
- Les minéralisats ainsi préparés peuvent être conservés à la chambre froide à 4 °C jusqu'au dosage. Des analyses répétées dans le temps ont montré que les durées de stockage de 2 mois n'ont pas d'influence sur la concentration des métaux.

1.2. Mercure

- L'analyse du mercure nécessite une préparation à part, car la matrice est dénaturée par l'ajout de réactifs lors du dosage. Le principe de minéralisation acide reste inchangé.
- Une masse de 500 ± 20 mg de poids sec de mousse est pesée avec une précision de ± 1 mg et introduite dans des tubes de 30 ml comme précédemment. Cette quantité plus élevée de matériel biologique est nécessaire pour assurer la détection du mercure dans les échantillons peu contaminés.
- La minéralisation s'effectue avec 7 ml d'un mélange d'acide nitrique (qualité normapur, 69%) et d'acide sulfurique (qualité normapur, 98%) dans des proportions 2:1 (v/v), le tout dilué au demi avec de l'eau distillée.
- Au terme de la minéralisation, le volume est ajusté à environ 20 ml. Dans le cas du mercure, le volume exact importe peu, puisque des quantités et non pas des concentrations sont mesurées. L'étape de centrifugation est superflue.
- Des tubes à blanc et les mousses à teneurs en mercure certifiées sont préparés de façon identique aux autres échantillons.
- Comme pour les autres minéralisats, la durée maximale de conservation ne doit pas dépasser deux mois.

2. Analyse des métaux

2.1. Cd, Cr, Cu, Ni, Pb, Zn

- Le dosage de ces 6 métaux est classiquement effectué par spectrophotométrie d'absorption atomique (SAA*). Dans la grande majorité des cas, l'analyse est suffisamment sensible en SAA de flamme. Seuls le cadmium et le plomb peuvent nécessiter un dosage par SAA en four graphite. Les minéralisats de mousses sont comparés à des solutions étalon de même acidité.
- Des ajouts dosés sont réalisés systématiquement sur environ 10% des échantillons. Ils consistent à additionner à la matrice une quantité connue de métal sans faire varier de façon significative le volume. La différence entre la réponse calculée et le résultat observé pour l'ajout définit l'effet de matrice. Les données sont corrigées par un facteur correcteur qui tient compte de l'influence de la constitution de la matrice sur l'analyse.
- Les résultats d'analyse, après correction par rapport au blanc et à l'effet de matrice, sont exprimés en $\mu\text{g/L}$. La concentration en μg de métal par g de poids sec est obtenue par :

$$\text{Concentration } (\mu\text{g/g}) = \frac{\text{concentration observée } (\mu\text{g/L}) \times \text{volume du tube (ml)}}{\text{masse sèche de mousses digérées (mg)}}$$

* Toute autre technique analytique peut être admise après sa validation

2.2. As et Hg

- Le mercure et l'arsenic sont dosés en SAA*, respectivement par la technique des vapeurs froides et par la méthode des hydrures. Ces métaux sont volatils sous forme réduite et peuvent être entraînés dans un flux gazeux. Contrairement au mercure, l'analyse de l'arsenic ne nécessite pas de préparation séparée, car les concentrations sont suffisamment élevées pour n'utiliser qu'un volume faible de minéralisat (moins de 1 ml).
- La réduction du mercure est réalisée avec 1 ml de SnCl₂ à 50 % préparé dans une solution d'acide chlorhydrique à 10 %. L'arsenic est volatilisé par ajout progressif d'une solution de 3 % de NaBH₄ et 1 % de NaOH dans de l'eau distillée. Les détails techniques sont fournis avec les notices des appareils.
- Comme pour les autres métaux, des ajouts dosés sont réalisés. Dans le cas du mercure, il faut penser à préparer suffisamment de matrices, sachant que celles-ci sont dénaturées lors de l'analyse.
- Les résultats de dosage sont obtenus en µg de métal. Pour exprimer la concentration en µg/g, il suffit de diviser la valeur obtenue par la masse de tissu (en g) contenue dans le volume soumis au dosage.

3. Seuils analytiques inférieurs

Les concentrations minimales à atteindre lors de l'analyse des métaux dans les mousses correspondent à la moitié de la valeur repère (voir **tableau 2**). Pour des analyses de routine, toute concentration en-deçà est identifiée en plaçant un signe « < » devant la limite inférieure.

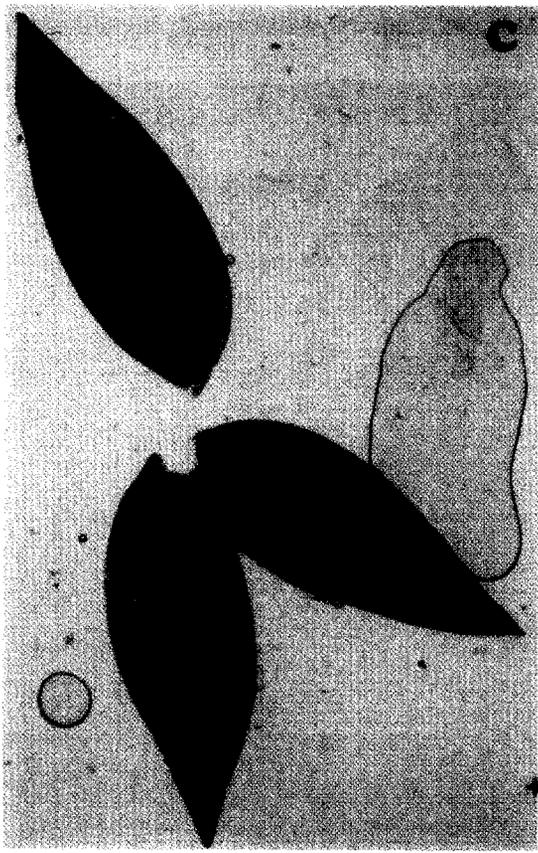
Métal	Seuil de mesure
As	0,7
Cd	0,2
Cr	2,5
Cu	9
Hg	0,03
Ni	4,5
Pb	4,5
Zn	40

Concentrations minimales (µg/g de poids sec) à atteindre lors de l'analyse des métaux dans les mousses aquatiques.

* Toute autre technique analytique peut être admise après sa validation

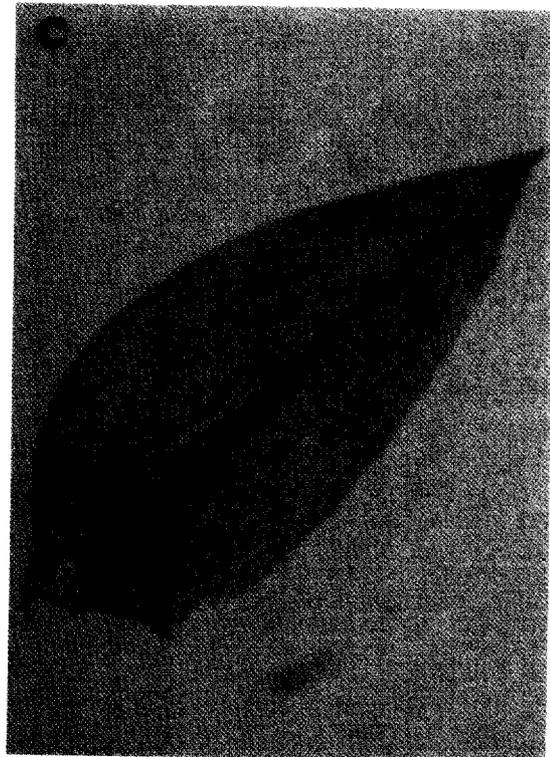
ANNEXE 4

PHOTOS



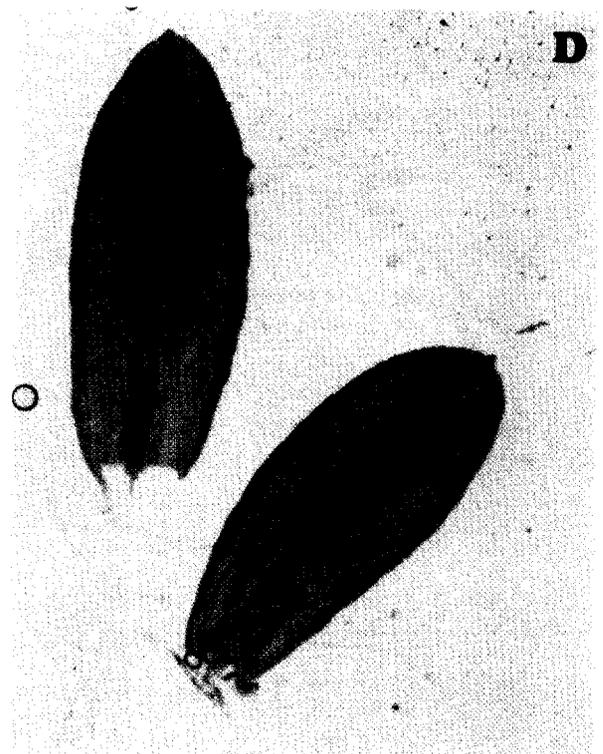
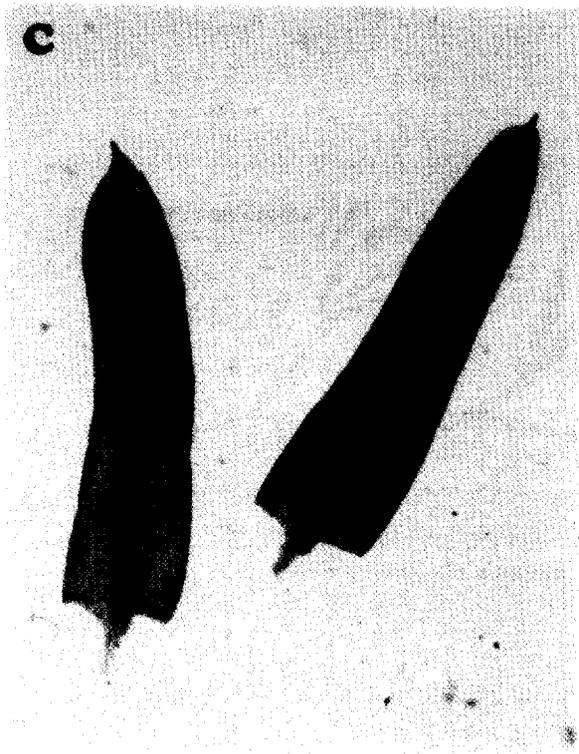
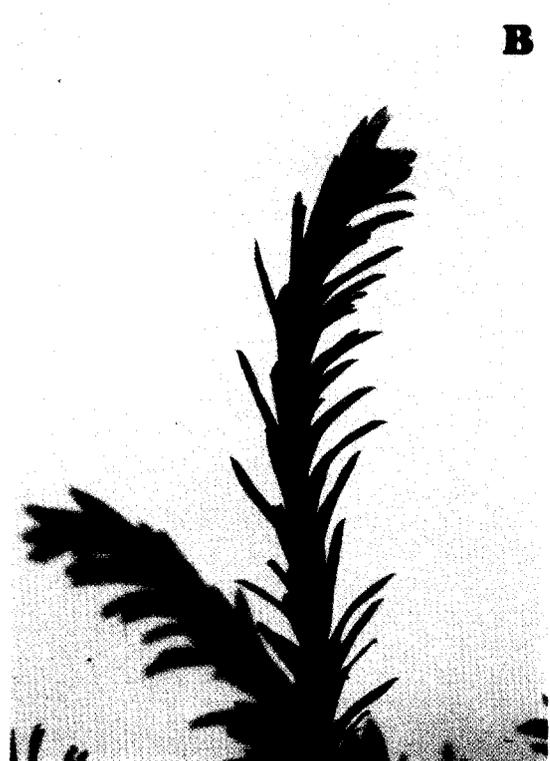
Fontinalis antipyretica

- A. Vue d'ensemble d'une touffe ancrée sur un support solide
- B. détail d'une tige portant des feuilles
- C. Feuille de profil (enhaut) et dépliée (enbas)



Rhynchostegium riparioides

- A. Vue d'ensemble d'une touffe ancrée sur un support solide
B. Rameau pourvu de rhizoïdes et portant des pousses
C. Détail d'une feuille



Cinclidotus danubicus et *Cinclidotus nigricans*

A. Touffe de *C. danubicus*
C. Feuille de *C. danubicus*

B. Détail d'un brin de *C. danubicus*
D. Feuille de *C. nigricans*

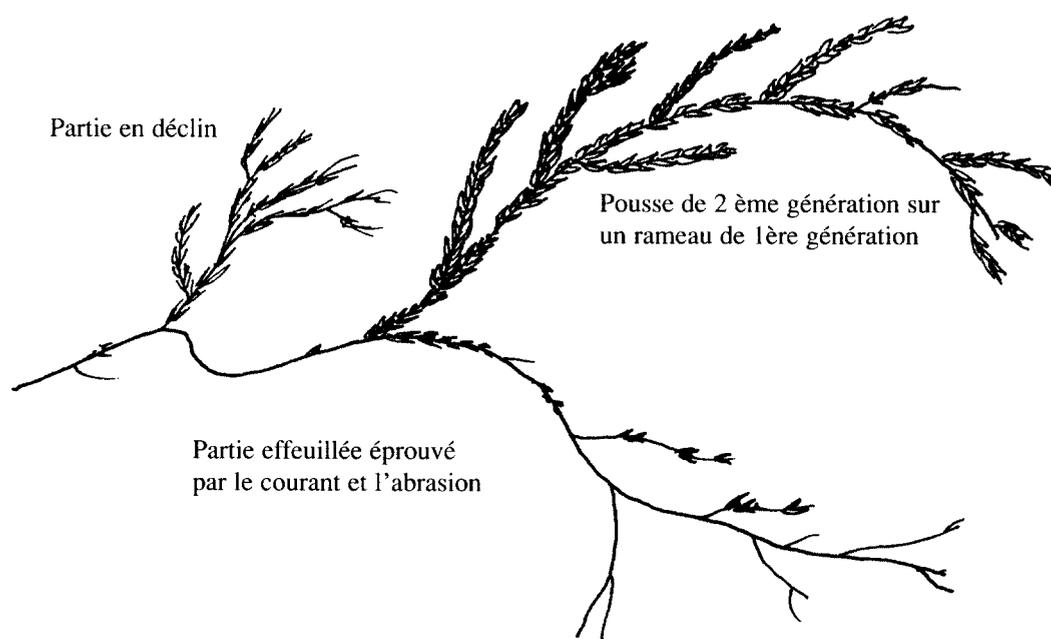
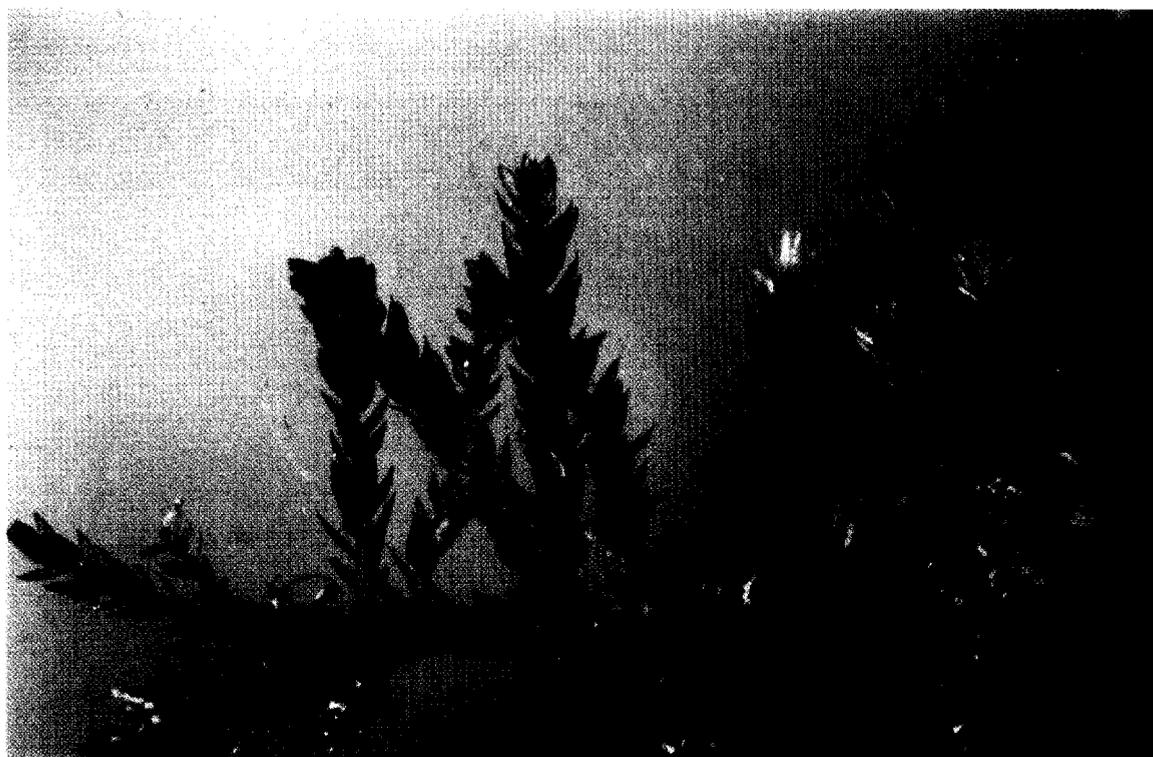


Planche 1.

En haut : Cliché d'un rameau de *Rhynchostegium riparioides* pourvu de rhizoïdes et portant plusieurs brins (gros environ 2,5 fois)

En bas : Représentation schématique d'une mousse avec distinction de plusieurs parties

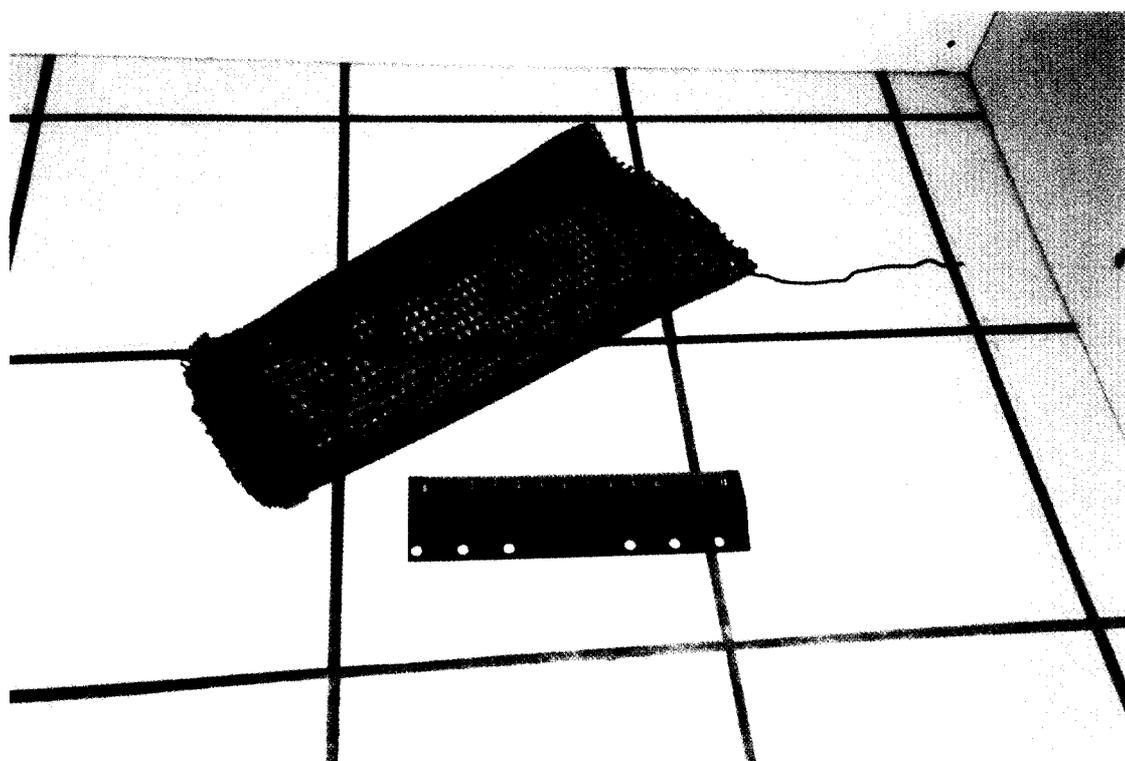
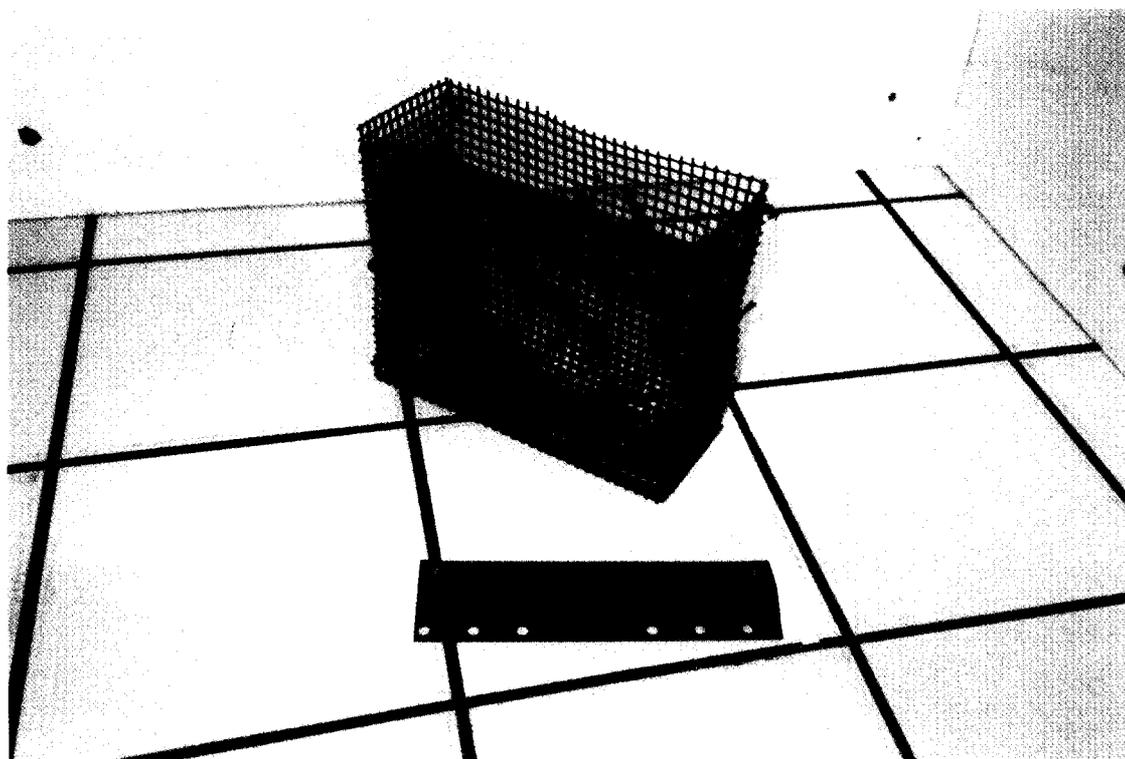


Planche 2. Corbeilles d'exposition de mousses utilisées lors de surveillance active