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 (M.I.M.)

Bruno Claveri

▶ **To cite this version:**

Bruno Claveri. 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 (M.I.M.). Toxicologie. Université Paul Verlaine - Metz, 1995. Français. NNT : 1995METZ040S . tel-01777095

HAL Id: tel-01777095
https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01777095

Submitted on 24 Apr 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

AVERTISSEMENT

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

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

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

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

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

VB 101968

Université de Metz
UFR Sci.FA

Centre de Recherches Ecologiques
Equipe d'Ecotoxicologie

THESE

Présentée à l'Université de Metz en vue de l'obtention du grade de :

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE METZ

Mention : Sciences de la vie

Spécialité : Toxicologie de l'environnement

BIBLIOTHEQUE UNIVERSITAIRE - METZ
N° inv 19950775
Cote S/M3 95/40
Loc Magasin

par

Bruno CLAVERI

Titre

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 (M.I.M.)

Soutenue le 5 décembre 1995 devant la commission d'examen

Jean-Claude PIHAN	Professeur à l'Université de Metz	Directeur de Thèse
Michèle TREMOLIERES	Professeur à l'Université de Strasbourg	Rapporteur
Guy VAILLANCOURT	Professeur à l'Université du Québec à Trois-Rivières	Rapporteur
Christophe MOUVET	Chef de projet au BRGM	Co-directeur de thèse
Serge MULLER	Professeur à l'Université de Metz	Examinateur
Didier VAZELLE	Ingénieur à la Direction des Etudes et Recherches de EDF	Examinateur
Xavier BOURRAIN	Ingénieur à l'Agence de l'Eau Loire-Bretagne	Examinateur

REMERCIEMENTS

A l'issue de ce travail, effectué au Centre de Recherches Ecologiques de l'Université de Metz, je tiens à remercier en premier lieu Monsieur le professeur J.C. PIHAN, directeur du Centre et de ma thèse et Monsieur C. MOUVET, chef de projet au Bureau de Recherches Géologiques et Minières, co-directeur de la thèse.

J'adresse mes remerciements à Messieurs MIQUEL et GOSSE, chefs successifs du Département Environnement à Electricité de France pour la confiance qu'ils m'ont accordée.

Je suis très sensible à l'honneur que me font Madame M. TREMOLIERES, professeur à l'Université de Strasbourg et Monsieur G. VAILLANCOURT, professeur à l'Université du Québec à Trois-Rivières en acceptant de juger ce travail.

Mes sincères remerciements à Monsieur S. MULLER, professeur à l'Université de Metz, à Monsieur X. BOURRAIN, ingénieur à l'Agence de l'Eau Loire-Bretagne pour avoir accepté de participer au jury

Je remercie également Monsieur D. VAZELLE, ingénieur à EDF, pour sa collaboration aux travaux exposés et pour sa participation au jury.

Tous mes remerciements à E. MORHAIN pour sa collaboration permanente à l'ensemble des travaux.

Mes plus sincères remerciements à M. OLLIVIER pour son aide efficace, ses conseils et la correction du manuscrit, à P. WAGNER pour le travail de terrain et P. ROUSSELLE.

Mes plus vifs remerciements à M.N. BEAUVAIS et A. MEYER pour leur aide précieuse en histologie.

Merci à D. BEAUFILS, N. KLEINEN et M.C. MICHEL.

Je remercie également les personnes de EDF qui ont collaboré aux expériences, en particulier P. CIFFROY et V. MATHAIX.

D'une manière générale, je tiens à remercier toutes les personnes que j'ai rencontrées, avec qui, mes rapports furent aussi divers qu'enrichissants.

SOMMAIRE

PAGES

Introduction 17

Chapitre I: Analyse bibliographique

I-1 LES METAUX DANS L'ECOSYSTEME AQUATIQUE 21

I-1-1 ORIGINE ET DISSEMINATION DANS LA BIOSPHERE 21

I-1-2 DEVENIR ET REPARTITION DES METAUX DANS LES ECOSYSTEMES AQUATIQUES CONTINENTAUX 25

I-1-3 IMPLICATION DE LA SPECIATION DES METAUX DANS L'EVALUATION DE LA CONTAMINATION DU MILIEU ET DE SES EFFETS SUR LES BIOCENOSES 25

I-2 LES METHODES D'EVALUATION DE LA CONTAMINATION METALLIQUE 27

I-2-1 INTERET DE L'UTILISATION DES VARIABLES BIOLOGIQUES: NOTION D'INDICATEUR BIOLOGIQUE 27

I-2-2 LE *MONITORING BIOLOGIQUE* 28

I-2-3 LE *MONITORING CHIMIQUE* 29

I-2-4 LA PLACE DES MOUSSES AQUATIQUES AU SEIN DES METHODES D'EVALUATION DE LA CONTAMINATION DES ECOSYSTEMES 30

I-3 LES MOUSSES AQUATIQUES COMME TRACEURS DE LA MICROPOLLUTION METALLIQUE 31

I-3-1 BIOLOGIE DES BRYOPHYTES AQUATIQUES EN GENERAL 31
Systématique
Physiologie
Ecologie

I-3-2 ...ET DE L'ESPECE *RHYNCHOSTEGIUM RIPARIOIDES* EN PARTICULIER 33
Structure et organisation de la plante
Physiologie de la plante
Répartition géographique

I-3-3 ASSIMILATION DES ELEMENTS NUTRITIFS PAR LES BRYOPHYTES 37
Accumulation et localisation extracellulaire des éléments
Accumulation intracellulaire des éléments
Mouvement des élément au sein de l'organisme

I-3-4 ACCUMULATION PREFERENTIELLE DES METAUX 40

I-3-5 PENETRATION INTRACELLULAIRE DES METAUX 41

I-3-6 CINETIQUES D'ACCUMULATION ET DE RELARGAGE DES METAUX PAR LES BRYOPHYTES AQUATIQUES 43

I-3-7 FACTEURS DU MILIEU INFLUENCANT L'ACCUMULATION ET LE RELARGAGE DES METAUX 45

I-3-8 CHAMP D'APPLICATION DES MOUSSES AQUATIQUES COMME TRACEURS DE LA CONTAMINATION METALLIQUE 48

Les avantages des mousses aquatiques
Les différentes méthodologies
Les différentes applications faisant appel aux mousses aquatiques

Chapitre II:
Materiel et méthodes

II-1 CHOIX DES SITES DE PRELEVEMENT 53

II-2 COLLECTE DES ORGANISMES 55

II-3 DISPOSITIF EXPERIMENTAL DE LABORATOIRE 57

II-4 DISPOSITIF EXPERIMENTAL *IN SITU* 58

II-5 SUIVI DE LA PHYSICO-CHIMIE DU MILIEU 59

II-5-1 EN LABORATOIRE 59
Echantillonnage
Les paramètres physico-chimiques
Les anions et cations majeurs
Les métaux

II-5-2 *IN SITU* 60
Echantillonnage
Les paramètres physico-chimiques
Les anions et cations majeurs
Les métaux

II-6 SUIVI DES CONCENTRATIONS EN METAUX DANS LES MOUSSES 61

II-6-1 ECHANTILLONNAGE ET CONDITIONNEMENT 61
Echantillonnage
Lavage des mousses en laboratoire
Séchage

II-6-2 PREPARATION DES ECHANTILLONS EN VUE DU DOSAGE 63
Partie de la mousse utilisée pour le dosage des métaux
Pesée
Minéralisation

II-6-3 DOSAGES ET EXPRESSION DES RESULTATS 65
Dosage des métaux en SAA
Détermination du pourcentage de résidu
Incertitudes sur la mesure

II-7 MESURE DE L'ACTIVITE PHOTOSYNTHETIQUE DES MOUSSES 69

II-7-1 PRINCIPE 69

II-7-2 DISPOSITIF EXPERIMENTAL 69

II-7-3 MESURE 69

II-7-4 CALCUL ET EXPRESSION DES RESULTATS 71

II-8 DETERMINATION DES CONCENTRATIONS METALLIQUES DANS LES MATIERES EN SUSPENSION 71

II-9 TECHNIQUES ET PREPARATIONS POUR L'OBSERVATION MICROSCOPIQUE 72

II-9-1 PREPARATIONS DES COUPES 72
Fixation
Déshydratation
Imprégnation et inclusion

II-9-2 OBSERVATIONS TOPOGRAPHIQUES 73

II-9-3 OBSERVATIONS HISTOCHIMIQUES 73

Chapitre III:
Effet de la température de l'eau sur l'accumulation du cuivre et l'assimilation de CO_2 par *Rhynchostegium riparioides*

III-1 INTRODUCTION 75

III-2 PROTOCOLE EXPERIMENTAL 77

III-2-1 DISPOSITIF EXPERIMENTAL 77
Modifications des unités expérimentales
Régulation du pH
Régulation de la température de l'eau

III-2-2 PROTOCOLE EXPERIMENTAL 78
Conditions d'exposition des mousses
Fréquence de prélèvement et de mesure
Prélèvement pour la mesure de l'activité photosynthétique
Statistiques

III-3 RESULTATS 79

Conditions d'exposition des mousses
Cinétiques d'accumulation et de relargage du cuivre

Evolution de l'activité photosynthétique des mousses

III-4 DISCUSSION 84

III-5 CONCLUSION 85

Chapitre IV:
Influence du régime d'écoulement des eaux sur l'accumulation des métaux par *Rhynchostegium riparioides*

IV-1 INTRODUCTION 87

IV-2 ETUDE EN LABORATOIRE 88

IV-2-1 PROTOCOLE EXPERIMENTAL 88
Dispositif expérimental
Conditions d'exposition des mousses
Fréquence d'échantillonnage et de mesure
Statistiques

IV-2-2 RESULTATS 90
Conditions d'exposition des mousses
Cinétiques d'accumulation de Cr, Cu et Zn
Cinétiques de relargage de Cr, Cu et Zn

IV-3 ETUDE *IN SITU* 97

IV-3-1 PROTOCOLE EXPERIMENTAL 97
Site d'étude
Dispositif expérimental
Fréquence d'échantillonnage et de mesure
Statistiques

IV-3-2 RESULTATS 98
Conditions d'exposition
Concentrations en Cr, Cu et Zn dans les mousses transplantées selon le régime d'écoulement des eaux
Concentrations en métaux dans les mousses autochtones en fonction du régime d'écoulement des eaux
Comparaison des concentrations en métaux entre les mousses autochtones et les mousses transplantées

IV-4 DISCUSSION 107

IV-5 CONCLUSION 112

Chapitre V:
Approche des mécanismes d'accumulation du cuivre par *Rhynchostegium riparioides*. Localisation cellulaire du métal

V-1 INTRODUCTION 115

V-2 MISE AU POINT D'UNE TECHNIQUE DE DESORPTION DES METAUX 117

V-2-1 INTRODUCTION 117

V-2-2 MATERIELS ET METHODES 118
Les paramètres testés
Préparation des solutions de désorption
Protocole expérimental
Expression des résultats

V-2-3 RESULTATS ET DISCUSSION 125
Choix du traitement optimum
Signification de l'information recueillie

V-3 LOCALISATION ET QUANTIFICATION DES DIFFERENTES FRACTIONS METALLIQUES ACCUMULEES PAR LES MOUSSES AQUATIQUES 129

V-3-1 PROTOCOLE EXPERIMENTAL 129
Déroulement de l'expérience
Dispositif expérimental
Conditions d'exposition des mousses
Fréquence d'échantillonnage et de mesure
Prélèvement pour l'étude de la répartition des métaux
Mesure de l'activité photosynthétique
Fréquence de prélèvement pour l'observation microscopique
Statistiques

V-3-2 RESULTATS 131
Conditions d'exposition des mousses
Evolution de la répartition du cuivre accumulé par les mousses
Evolution de l'activité photosynthétique

V-3-3 STRUCTURE PARIETALE D'UNE CELLULE DE BRYOPHYTE 137

V-3-4 LOCALISATION ET REPARTITION DU CUIVRE DANS LA PLANTE 140

V-3-5 DISCUSSION 147

V-3-6 CONCLUSION 149

Chapitre VI:
Optimisation de la méthode des bryophytes aquatiques pour l'évaluation de la micropollution métallique

VI-1 INTRODUCTION 151

VI-2 DEVELOPPEMENT D'UN MODELE MATHEMATIQUE DECRIVANT LES RELATIONS D'ECHANGES A L'INTERFACE EAU-BRYOPHYTES 152

VI-2-1 THEORIE DU MODELE 152

VI-2-2 DETERMINATION DES CONSTANTES CINETIQUES 154

Expérience de laboratoire
Principe de calcul des constantes k_1 , k_{-1} et k_2
Calcul des constantes cinétiques

VI-3 DEVELOPPEMENT D'UN MODULE EXPERIMENTAL 159

VI-3-1 INTRODUCTION 159

VI-3-2 PRINCIPE 161

VI-3-3 CARACTERISTIQUES TECHNIQUES 161
L'alimentation en eau
Le décanteur
Le bac d'immersion
L'alimentation électrique
Le coffre de protection

VI-4 EVALUATION DE LA CONTAMINATION METALLIQUE DE REJETS INDUSTRIELS 165

VI-4-1 INTRODUCTION 165

VI-4-2 PROTOCOLE EXPERIMENTAL 167
Sites et stations d'étude
Suivi des concentrations métalliques dans l'eau
Suivi des concentrations métalliques dans les mousses
Conditions d'utilisation du module expérimental
Suivi de la physico-chimie du milieu
Suivi des concentrations en métaux dans les matières en suspension
Statistiques

VI-4-3 RESULTATS 169
Physico-chimie des rejets
Concentrations en métal total et dissous dans les rejets
Concentrations en métaux dans les mousses aquatiques transplantées
Concentrations métalliques dans les matières en suspension centrifugées

VI-4-4 INFORMATIONS RECUEILLIES PAR L'INTERMEDIAIRE DU MODULE EXPERIMENTAL 173
Conditions d'utilisation du module
Conditions d'exposition des mousses
Rendement de décantation
Concentrations en métaux dans l'eau
Concentrations en métaux dans les mousses
Concentrations métalliques dans les matières en suspension décantées

VI-4-5 APPLICATION DU MODELE MATHEMATIQUE AUX DONNEES RECUEILLIES 177
Définition d'une stratégie d'échantillonnage
Application du modèle mathématique et de la stratégie d'échantillonnage

VI-5 DISCUSSION 183
Les bryophytes aquatiques et les matières en suspension comme traceurs complémentaires de la pollution par les métaux
Utilisation du module expérimental en parallèle avec la méthode des transferts
Utilisation du modèle mathématique

Chapitre VII: Discussion générale

VII-1 PROPOSITION D'UN SCHEMA DE PRINCIPE DECRIVANT L'ACCUMULATION ET LE RELARGAGE DES METAUX PAR LES BRYOPHYTES AQUATIQUES 191

VII-1-2 PRESENTATION 191

VII-1-2 LES POINTS NON ECLAIRCIS 196

VII-2 INTERETS ET LIMITES DE L'EMPLOI DE LA METHODE DES TRANSFERTS 197

VII-2-1 IMPORTANCE DES CARACTERISTIQUES PHYSIQUES ET CHIMIQUES DE LA STATION DE TRANSFERT 197

VII-2-2 AVANTAGES ET INCONVENIENTS DE L'EMPLOI DE LA METHODE DES TRANSFERTS 201

VII-3 INTERETS ET LIMITES ACTUELLES DE L'APPLICATION DU MODELE MATHEMATIQUE ET DE L'EMPLOI DU MODULE EXPERIMENTAL 202

Conclusion 207

Références bibliographiques 211

Annexes 223

LISTE DES FIGURES

PAGES

Figure 1-1: Voies par lesquelles les polluants sont transportés vers le milieu aquatique en zone urbanisée (Adapté de Berhendt et Boehme (1992) in Rautengarten, 1993). 22

Figure 1-2: Contribution des sources naturelles géochimiques et des sources d'origine anthropique à la contamination des sédiments du Rhin (D'après Förstner, 1980). 22

Figure 1-3: Principaux types de pyramides des concentrations selon le transfert des polluants dans la chaîne trophique (D'après Ramade, 1992). 24

Figure 1-4: Schéma général des modalités d'action d'un polluant sur un écosystème (Adapté de Ramade, 1992). 24

Figure 1-5a: Présentation de l'espèce *Rhynchostegium riparioides*. A: Rameau sur lequel a poussé plusieurs brins qui permet de distinguer l'imbrication des feuilles disposées de façon hélicoïdale autour de l'axe ; B: Différentes morphologies de l'espèce observées *in situ* (Adapté de Devantéry, 1987). C: Vue longitudinale d'une feuille constituée d'une couche unicellulaire permettant de voir les chloroplastes par transparence. 34

Figure 1-5b: Présentation de l'espèce *Rhynchostegium riparioides*. D: Coupe transversale d'un rameau montrant l'arrangement des feuilles autour de la tige (x 160) ; Faisceau de rhizoïdes ; F: Coupe transversale (x 5000) de feuille (1 cm = 2 µm). 35

Figure 1-6: Contributions relatives de l'adsorption et de l'absorption d'un élément (D'après Beaugelin-Seiller *et al*, 1995). 42

Figure 1-7: Evolution théorique des métaux dans les mousses pendant la phase d'exposition au métal et en absence de métal dans le milieu d'exposition. 42

Figure 1-8: Concentrations en Cu, Cd et Pb dans l'espèce *Rhynchostegium riparioides* en fonction de la teneur d'exposition dans le milieu (Adapté de Claveri *et al*, 1994 et Mouvet, 1984a) et en Zn dans l'espèce *Cinclidotus danubicus* (Adapté de Empain, 1977). 44

Figure 1-9: Relation entre les concentrations d'exposition en Cu dans l'eau et les quantités de métal accumulé par les mousses après (●) 24, (o) 72 et (■) 168 heures d'exposition. 46

Figure 1-10: Relation entre les quantités de métal relargué par les mousses après (●) 72 et (o) 240 heures dans un milieu exempt de métal et les concentrations préalables en Cu dans l'eau. 46

Figure 2-1: Evolution saisonnière des concentrations en métaux dans des mousses autochtones provenant du site de Commercy. Les concentrations sont exprimées en pourcentage de la concentration maximale observée. (-) correspond au pourcentage représentant la concentration de référence (Mouvet, 1986). Le pourcentage représentant la concentration de référence pour le Cd est de 120 %. 54

Figure 2-2: Schéma de principe d'une unité expérimentale. A: Arrivée d'eau de distribution; B: Cartouche filtrante; C: Cartouche de charbon actif; D: Eau déchlorée; E: Bac intermédiaire; F: Pompe péristaltique à débit réglable; G: Réservoir de mélange; H: Pompe centrifuge d'homogénéisation; I: Crépine de restitution; J: Pompes péristaltiques multicanaux; K: Apport d'EDTA; L: Apport de solutions métalliques; M: Prélèvement d'eau en continu; N: Bac PVC (18 litres). Les flèches représentent le sens d'écoulement de l'eau. 56

Figure 2-3: Evolution de l'erreur due aux sédiments en fonction du pourcentage de résidu (D'après Cardinal, 1992). 66

Figure 2-4: Coefficient de variation (%) sur la détermination des teneurs en métaux dans différents échantillons de mousses analysés par plusieurs laboratoires. Traitement 1: variation interlaboratoire (14 laboratoires) sur des échantillons fournis lavés et broyés; traitement 2: variation interlaboratoire (14 laboratoires) sur des échantillons fournis lavés, broyés et minéralisés; traitement 3: variation interlaboratoire (12 laboratoires) sur un échantillon brut de *Platyhypnidium riparioides*; traitement 4: variation intralaboratoire (12 laboratoires) sur l'échantillon du traitement 3 (D'après Agence de l'Eau, 1994). 68

Figure 2-5: Cellule de mesure de la photosynthèse. A: chambre noire; B: eau thermostatée (7, 17 ou 29 °C); C: source lumineuse; D: cellule de mesure étanche remplie d'eau reconstituée; E: électrode de pH; F: purge d'air en excès; G: agitateur magnétique; H: barreau aimanté. 70

Figure 3-1: Schéma de l'unité expérimentale à 7 °C. A: Pompe péristaltique pour l'apport d'eau de distribution; B: Charbon actif; C: Système de refroidissement de l'eau; D: Réservoirs de mélange; E: Pompe péristaltique pour l'apport d'EDTA; F: Pompe centrifuge d'homogénéisation du milieu; G: Régulateur de pH; H: Electrode de pH; I: Pompes péristaltiques contrôlées par le régulateur de pH pour la distribution d'acide et de base; J: Pompe péristaltique pour l'apport de cuivre; K: Trop-plein. Pour les unités expérimentales à 17 et 29 °C, le système de refroidissement de l'eau est remplacé par des résistances thermostatées immergées dans chacun des bacs. 76

Figure 3-2: Cinétiques d'accumulation et de relargage du Cu par les mousses immergées à 7, 17 et 29 °C. Les barres verticales représentent l'écart-type (n = 3). 80

Figure 3-3: Assimilation de CO_2 par *Rhynchostegium riparioides* selon la température de l'eau dans les bacs témoin (A) et contaminés par le cuivre (B). Les barres verticales représentent l'écart-type (n = 3). 82

Figure 4-1: Cinétiques d'accumulation du chrome par *Rhynchostegium riparioides* immergées dans les unités expérimentales dont le débit est de 2 (bac A), 0.5 (bac B) et 0.1 l min^{-1} (bac C). Les barres verticales représentent l'écart-type (n = 3). 92

Figure 4-2: Cinétiques d'accumulation du cuivre par *Rhynchostegium riparioides* immergées dans les unités expérimentales dont le débit est de 2 (bac A), 0.5 (bac B) et 0.1 l min^{-1} (bac C). Les barres verticales représentent l'écart-type (n = 3). 92

Figure 4-3: Cinétiques d'accumulation du zinc par *Rhynchostegium riparioides* immergées dans les unités expérimentales dont le débit est de 2 (bac A), 0.5 (bac B) et 0.1 l min^{-1} (bac C). Les barres verticales représentent l'écart-type (n = 3). 94

Figure 4-4: Localisation des stations d'étude sur l'Andlau. 96

Figure 4-5: Evolution du débit de l'Andlau au limnigraphe de Andlau entre le 22 juin et le 12 juillet 1994 (Source : SEMA DIREN Alsace). 100

Figure 4-6: Evolution de la vitesse du courant aux stations 3 (---) et 4 (–) entre le 22 juin et le 12 juillet 1994. 100

Figure 4-7: Evolution des concentrations en chrome dans l'eau aux stations 2 et 4 durant la période d'exposition des mousses. 102

Figure 4-8: Evolution des concentrations en chrome dans les mousses immergées aux stations 2, 3 et 4. Les barres verticales représentent l'écart-type (n = 3). 102

Figure 4-9: Evolution des concentrations en cuivre dans l'eau aux stations 2 et 4 durant la période d'exposition des mousses. 104

Figure 4-10: Evolution des concentrations en cuivre dans les mousses immergées aux stations 2, 3 et 4. Les barres verticales représentent l'écart-type (n = 3). 104

Figure 4-11: Evolution des concentrations en zinc dans l'eau aux stations 2 et 4 durant la période d'exposition des mousses. 106

Figure 4-12: Evolution des concentrations en zinc dans les mousses immergées aux stations 2, 3 et 4. Les barres verticales représentent l'écart-type (n = 3). 106

Figure 4-13: Concentrations en Cr, Cu et Zn dans les mousses autochtones et transplantées collectées aux stations 1, 2 et 4 le premier et dernier jour de l'expérience. Les barres verticales représentent l'écart-type (n =3). 108

Figure 4-14: Evolution saisonnière des concentrations en Cu dans les mousses autochtones provenant du site de Commercy en parallèle avec l'évolution du débit mensuel de la Meuse (Limnigraphe de Saint Mihiel). (—) représente la concentration de référence pour le Cu (19 $\mu g\ g^{-1}$ p.s.). 110

Figure 5-1: Mise en évidence du Cu par impact laser (LAMMS) sur des coupes d'échantillons de *Rhynchostegium riparioides* exposées à 340 $\mu g\ L^{-1}$ de Cu pendant 168 heures. 116

Figure 5-2: Protocole suivi pour chaque traitement de désorption envisagé. 120

Figure 5-3: Représentation graphique des trois fractions identifiées lors des différents traitements. 122

Figure 5-4: Contribution des 3 fractions métalliques évaluées selon différents traitements exprimées en pourcentage de la concentration totale en Cu déterminée dans l'échantillon peu contaminé (PC). 124

Figure 5-5: Contribution des 3 fractions métalliques évaluées selon différents traitements exprimées en pourcentage de la concentration totale en Cu déterminée dans l'échantillon contaminé (FC). 124

Figure 5-6: Contribution en pourcentage de la concentration initiale en Cu dans les mousses des 4 trempages successifs des échantillons peu et fortement contaminés dans les solutions sans et avec EDTA du traitement F. 128

Figure 5-7: Evolution des concentrations moyennes en cuivre dans les mousses immergées dans le bac témoin pendant 35 jours et dans le bac contaminé par 188 µg L^{-1} de Cu pendant les 21 premiers jours de l'immersion. Les barres verticales représentent l'écart-type (n =3). 132

Figure 5-8: Evolution de la contribution des 3 fractions métalliques exprimées en µg g^{-1} et en pourcentage de la quantité totale de Cu déterminée dans l'échantillon immergé pendant 35 jours dans le bac témoin. 134

Figure 5-9: Evolution de la contribution des 3 fractions métalliques exprimées en µg g^{-1} et en pourcentage de la quantité totale de Cu déterminée dans l'échantillon exposé au métal pendant 21 jours. 134

Figure 5-10: Evolution des concentrations moyennes en cuivre dans les mousses immergées dans le bac témoin pendant 21 jours et dans le bac contaminé par 188 µg L^{-1} de Cu pendant les 7 premiers jours de l'immersion. Les barres verticales représentent l'écart-type (n =3). 136

Figure 5-11: Evolution de la contribution des 3 fractions métalliques exprimées en µg g^{-1} et en pourcentage de la quantité totale de Cu déterminée dans l'échantillon immergé pendant 21 jours dans le bac témoin. 138

Figure 5-12: Evolution de la contribution des 3 fractions métalliques exprimées en µg g^{-1} et en pourcentage de la quantité totale de Cu déterminée dans l'échantillon exposé au métal pendant 7 jours. 138

Figure 5-13: Evolution de l'activité photosynthétique des lots de mousses immergés pendant 35 jours dans les bacs témoin et contaminé. Les barres verticales représentent l'écart-type (n = 3). 139

Figure 5-14: Evolution de l'activité photosynthétique des lots de mousses immergés pendant 21 jours dans les bacs témoin et contaminé. Les barres verticales représentent l'écart-type (n = 3). 139

Figure 5-15: Révélation au rouge de ruthénium de la composition chimique majeure de la paroi cellulaire sur une coupe de tige (A; x 400) et de feuille (B ; x 1000) de *Rhynchostegium riparioides*. 141

Figure 5-16: Ultrastructure de *Rhynchostegium riparioides*. Coupe transversale de feuille (A; 20000), de tige (B; 20000) et visualisation des espaces intercellulaires (méats) dans la tige (C; 10000) (trait = 1 µm). 143

Figure 5-17: Coupe transversale d'un rameau traité à l'acide rubéanique. Le cuivre se révèle par des grains noirâtres, (A) x 400 ; (B) x 1000. 145

Figure 5-18: Attache d'une feuille sur un rameau de *Rhynchostegium riparioides* séché en microscopie électronique à balayage (surface analysée pour l'image X). 147

Figure 5-19: Images X représentant la répartition de deux éléments caractéristiques, le cuivre et l'aluminium, dans le volume analysé représenté à la figure 5-18. 148

Figure 6-1: Evolution théorique des concentrations en métaux dans les mousses lors d'une phase d'exposition au métal suivi d'une phase de relargage. 156

Figure 6-2: Cinétiques d'accumulation du Cu par *Rhynchostegium riparioides* selon la concentration d'exposition. Les barres verticales représentent l'écart-type (n =3). 158

Figure 6-3: Cinétiques de relargage du Cu par *Rhynchostegium riparioides* selon la concentration préalable d'exposition. Les barres verticales représentent l'écart-type (n = 3). 158

Figure 6-4: Pourcentage de résidu en fonction de la vitesse du courant des stations dans lesquelles les mousses ont été transplantées pendant 9 jours. 162

Figure 6-5: Schéma du module expérimental. ❶: arrivée d'eau; ❷:décanteur lamellaire; ❸: bac d'immersion; ❹:fenêtre; ❺: débitmètre; ❻: pompe péristaltique; ❼: pompe centrifuge d'homogénéisation; ❽: trop-plein; ❾: lames; ❿: grillage. 164

Figure 6-6: Module expérimental. Vue d'ensemble et détail du nouveau décanteur (version 1995) constitué de lames et d'une structure en nid d'abeilles. 166

Figure 6-7: Répartition du cuivre présent dans les rejets de Cattenom, Dampierre et Nogent entre les formes particulaires et dissoutes. 178

Figure 6-8: Répartition du zinc présent dans les rejets de Cattenom, Dampierre et Nogent entre les formes particulaires et dissoutes. 178

Figure 6-9: Evolution des concentrations en Cu dans les mousses immergées dans le module et les rejets. Les concentrations décrites pour Nogent doivent être multipliées par 10. 180

Figure 6-10: Evolution des concentrations en Cu dans les mousses immergées dans le module et les rejets. 181

Figure 6-11: Facteurs de pollution (concentration métallique observée dans le support analytique / concentration de référence) calculés pour les mousses et les matières en suspension collectées dans les rejets et le module dans chacun des 3 sites d'étude. 186

Figure 7-1: Schéma décrivant les différentes étapes de l'accumulation d'un métal par les bryophytes aquatiques. C_m représente la concentration d'exposition en métal dans le milieu qui se décompose en fraction disponible (C_{md}) et non disponible (C_{mn}). C_a est la concentration de métal accumulable regroupant C_{md}, une partie de C_{mn} qui devient disponible par le contact avec le pH_c de l'environnement cellulaire différent du pH_m du milieu environnant. C_p est la fraction métallique présente sous forme de précipité. 192

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1-1: Contribution des apports anthropiques à la mobilisation des métaux dans la biosphère. Deux estimations sont données pour l'apport des sources anthropiques (D'après Phillips et Rainbow, 1993). 23

Tableau 1-2: Moyennes et $IC_{50\%}$ du nombre de touffes de rhizoides par grappe de 10 rameaux de *Fontinales* immergées dans des conditions hydrodynamiques et à des températures (temp.; °C) différentes (D'après Glime, 1980). 36

Tableau 1-3: Chimie de 105 sites où a été prélevée l'espèce *Rhynchostegium riparioides* (D'après Wehr et Whitton, 1986). 38

Tableau 1-4: Exemples de valeurs extrêmes de concentrations en métaux dans les mousses ($\mu g g^{-1}$ p.s.) prélevées lors de travaux *in situ*. 40

Tableau 1-5: Facteurs de pollution maximum (FP = concentration observée / concentration de référence) dans les bryophytes et les sédiments du bassin Rhône-Méditerranée (D'après André et Lascombe, 1987). 48

Tableau 1-6: Concentrations de référence standard pour les métaux dans les mousses aquatiques (D'après Mouvet, 1986). 50

Tableau 1-7: Grille de qualité basée sur le dosage des métaux dans les mousses aquatiques (D'après Mouvet, 1986). 51

Tableau 2-1: Valeurs guides ou minimales en métaux rencontrées dans les mousses aquatiques non soumises à des pollutions anthropiques. 55

Tableau 2-2: Limites de détection des métaux dans l'eau selon le mode d'utilisation du SAA. 60

Tableau 2-3: Limites de détection des métaux dosés en flamme (SAA) dans les minéralisats de mousses selon le protocole appliqué, laboratoire ou terrain. 65

Tableau 3-1: Valeurs des températures, du pH et des concentrations en Cu dans l'eau (moyenne ± écart-type) dans les bacs témoins et contaminés de chaque unité expérimentale. 81

Tableau 3-2: Caractéristiques physico-chimiques (moyenne ± écart-type du milieu d'exposition (n =11). 83

Tableau 4-1: Caractéristiques physico-chimiques du milieu d'exposition. Toutes les valeurs sont en mg L^{-1} sauf la température (°C) et le pH (n = 12). 90

Tableau 4-2: Concentrations d'exposition (moyenne ± écart-type ; $\mu g\ L^{-1}$) en Cr, Cu et Zn durant la phase d'exposition (n = 9). 91

Tableau 4-3: Différences entre les concentrations en métaux (Cr, Cu, Zn) dans les mousses en début (C_1; $\mu g\ g^{-1}$) et en fin de relargage (C_2; $\mu g\ g^{-1}$). Nombre de jour (J; jour) au bout desquels 50 % de la fraction désorbée [C_1 - C_2] est relarguée. 95

Tableau 4-4: Classement des échantillons (pour les codes, voir texte) selon les concentrations métalliques observées après 10 jours de relargage (test de comparaison multiple de Tukey, p = 0.05). 97

Tableau 4-5: Caractéristiques physico-chimiques (moyenne ± écart-type; n = 6) des stations étudiées. 99

Tableau 4-6: Concentrations (moyenne ± écart-type; n = 5) en anions et cations (mg L^{-1}) à l'amont (station 1) et à l'aval du village de Andlau (stations 2, 3 et 4). 99

Tableau 4-7: Concentrations moyennes ± écart-type (µg L^{-1}; n = 20) en métaux totaux et dissous aux stations 2 et 4 (*Minimum / Maximum*). 101

Tableau 4-8: Facteurs de pollution (FP) calculés à partir des concentrations en métaux dans les mousses transplantées collectées après 20 jours d'exposition dans les stations 2, 3 et 4. 111

Tableau 5-1: Caractéristiques des différents traitements testés. Chaque traitement est doublé par un second différent par la concentration en désorbant égale à 0 mM L^{-1}. 119

Tableau 5-2: Différences entre les concentrations en potassium désorbées des mousses par les traitements avec ou sans EDTA. 126

Tableau 5-3: Caractéristiques physico-chimiques du milieu d'exposition (n = 15). 133

Tableau 6-1: Principales caractéristiques physico-chimiques du milieu d'exposition. 159

Tableau 6-2: Valeurs des constantes cinétiques pour chacune des 4 cinétiques d'accumulation. Corrélation (r) entre les concentrations d'exposition en cuivre durant la phase d'exposition et les valeurs des constantes cinétiques. 159

Tableau 6-3: Principales caractéristiques physico-chimiques (moyennes ± écart-type ; n = 10) des eaux de Cattenom, Dampierre et Nogent. 169

Tableau 6-4: Concentrations d'exposition (moyenne ± écart-type) en métal total et dissous (µgL^{-1}, n = 10) dans les trois rejets (*Minimum / Maximum*). 170

Tableau 6-5: Concentrations en Cu et Zn dans les mousses transplantées (µg g^{-1} p.s.) pendant 240 heures dans les rejets des 3 centrales. 171

Tableau 6-6: Teneurs métalliques des matières en suspension (MES) échantillonnées dans les 3 rejets. 172

Tableau 6-7: Principales caractéristiques physico-chimiques des eaux de rejet de Cattenom, Dampierre et Nogent échantillonnées dans le bac d'immersion (n = 10). 174

Tableau 6-8: Pourcentage d'abattement des matières en suspension dans le décanteur du module expérimental (en %). 174

Tableau 6-9: Différences entre les concentrations moyennes en métal (n = 10) déterminées dans les échantillons provenant du module et ceux provenant directement des rejets. 175

Tableau 6-10: Teneurs métalliques des matières en suspension (MES) échantillonnées dans le module après 10 jours de décantation. 177

Tableau 6-11: Différences entre les concentrations en Cu dissous observées dans les rejets de Cattenom (11.8 ± 2.7 µg L^{-1}) et de Dampierre (55.0 ± 4.1 µg L^{-1}) et les valeurs correspondantes calculées ($Cu_{calc.}$; µg L^{-1}), obtenues en appliquant les 7 simulations. 179

Tableau 6-12: Application à différentes expériences de la stratégie d'échantillonnage choisie pour le calcul des concentrations en Cu dans l'eau (µg L^{-1}). 182

Tableau 6-13: Concentrations de référence (µg g^{-1}) et facteurs limites de pollution pour les mousses et le sédiment (Source: Agence de l'Eau). 184

Tableau 6-14: Concentrations en Cu et Zn dans le même lot de mousses ayant subi différents protocoles de lavage. 187

Tableau 7-1: Concentrations en métaux (µg g^{-1}) dans l'hépatique autochtone *Pellia epiphylla* et la mousse transplantée *Hygrohypnum ochraceum* dans 3 cours d'eau de pH différent dans le massif vosgien. 199

Introduction

Les problèmes de pollution engendrés par le bouleversement des cycles géochimiques et le développement industriel sont aujourd'hui, pour la plupart, connus et identifiés. De part la circulation et les flux d'éléments dans la biosphère, les émissions de polluants, qu'elles soient solides, liquides ou gazeuses ont souvent comme milieu récepteur final le milieu aquatique, sujet à une forte pression anthropique. Les métaux, éléments constitutifs du tableau périodique sont employés dans une large gamme de procédés industriels et sont omniprésents dans notre vie quotidienne. Notre civilisation générant des masses considérables de déchets, il résulte une large dissémination de ces éléments dans la biosphère. Si tous ces éléments sont naturels, leur présence au sein des écosystèmes aquatiques l'est beaucoup moins lorsque, aux apports géochimiques, s'ajoutent les sources d'origine anthropique. De part leur propriété à s'accumuler dans un grand nombre d'organismes et surtout à se concentrer au fur à et mesure que l'on progresse dans la pyramide biologique, les métaux, qui pour certains sont des oligo-éléments, deviennent alors indésirables, voire toxiques. Cette toxicité s'exprime souvent, du fait de leur capacité à se concentrer dans la chaîne trophique, pour de très faibles concentrations dans l'eau, d'où le terme de micropollution parfois donné à ce type de nuisance.

La particularité des métaux à exercer des effets néfastes sur la biocénose à de très faibles doses rend difficile l'estimation fiable de la contamination du milieu et de ses conséquences sur les organismes vivants. Le développement des méthodes analytiques, toujours plus performantes, a permis d'affiner les limites de détection, d'identifier et de quantifier certaines formes chimiques du métal dans l'eau, y compris des formes potentiellement toxiques. Cependant, la démarche strictement analytique ne peut intégrer deux phénomènes de première importance. Le premier est la grande variabilité spatiale et temporelle du niveau de contamination du milieu rendant difficile une estimation représentative de la situation réelle. Le second découle de la propriété des métaux à s'accumuler au sein de la chaîne trophique, propriété qu'il est difficile de prendre en compte par une simple approche analytique.

C'est ainsi que ce sont développées des méthodes basées sur la détermination des teneurs en métaux directement dans les organismes. Le premier avantage d'une telle approche est de mesurer directement sur la biocénose la résultante d'une contamination de l'écosystème. Le

second est de pouvoir sélectionner certains organismes qui présentent une très forte capacité d'accumulation, facilitant ainsi la mise en évidence d'une contamination du milieu, aussi faible soit elle. D'autres méthodes faisant appel à des organismes sensibles à ce type de pollution ont aussi permis, non pas de quantifier le niveau d'une contamination métallique, mais d'en évaluer les effets toxiques.

Parmi les organismes employés pour la mise en évidence d'une contamination, les bryophytes aquatiques, végétaux présents dans la majorité des cours d'eau, sont largement utilisées depuis le début des années 1980. A l'origine, cette méthode s'inspire de l'emploi de bryophytes terrestres pour détecter les retombées atmosphériques d'éléments radioactifs. Transposé au milieu aquatique, l'emploi des mousses aquatiques comme support analytique s'est avéré une méthode efficace donnant à la fois une indication fiable du niveau de contamination métallique du milieu dans lequel elles sont immergées et une évaluation de la fraction du métal présent dans l'eau potentiellement accumulable dans la chaîne trophique. Les nombreuses recherches consacrées à cet indicateur de pollution ont abouti en 1986 à l'élaboration d'une méthodologie, mise au point par C. Mouvet au Laboratoire d'Ecologie de l'Université de Metz (actuellement CREUM) avec l'appui des Agences de l'Eau, permettant de classer les cours d'eau selon une grille de qualité traduisant le niveau de pollution métallique.

Depuis 1988, Electricité de France (EDF) s'intéresse à cette méthode pour la caractérisation et l'évaluation des rejets métalliques et radioactifs imputables aux centres de production nucléaire. Le Département Environnement de la Direction des Etudes et Recherches de EDF (EDF-DER) a donc développé un programme de recherche sur plusieurs années. L'objectif est le suivi et l'évaluation des rejets métalliques et radioactifs des centrales nucléaires, et leur contribution à la contamination du milieu récepteur. Ce programme est basé en partie sur l'emploi des mousses aquatiques comme traceur de la contamination métallique. La partie concernant les radioéléments a été confiée au Commissariat à l'Energie Atomique (CEA) de Cadarache et a fait l'objet d'une thèse (Beaugelin-Seiller, 1994). La partie portant sur la méthodologie et les métaux fait l'objet de cette thèse. Elle a été menée au Centre de Recherches Ecologiques, Université de Metz (CREUM) en collaboration avec le Département Géochimie du Bureau de Recherches Géologiques et Minières d'Orléans (BRGM) et le Département Environnement de EDF-DER à Chatou.

Le premier objectif de ce travail est d'adapter la méthode mise au point en 1986 aux spécificités et aux contraintes liées au contexte particulier des rejets d'eaux échauffées d'une centrale nucléaire. Ceux-ci se caractérisent par des températures inhabituelles pour les mousses

aquatiques et par des régimes d'écoulement très différents d'un site à l'autre. Or l'incidence de ces deux paramètres sur l'ampleur des phénomènes d'accumulation des métaux par ces organismes n'a jamais été étudiée.

Le deuxième objectif est de mieux comprendre les mécanismes d'accumulation des métaux par ces organismes. En effet, si la résultante d'une exposition de l'organisme à un métal est aujourd'hui bien connue, les principes qui gouvernent les cinétiques d'accumulation et de relargage des métaux par les mousses le sont, eux, beaucoup moins. Une meilleure compréhension de ces phénomènes consiste alors à subdiviser la quantité globale de métal accumulée en différentes fractions, à suivre leur évolution quantitative dans le temps et à étudier la répartition du métal accumulé dans la plante.

Le troisième objectif est d'optimiser une méthode qui, jusqu'à présent, ne donne qu'une interprétation qualitative basée sur une grille de qualité, et d'aboutir à une description quantitative des relations d'échanges des métaux entre le milieu et la mousse. Le lien, souvent observé au laboratoire mais aussi *in situ*, entre le niveau de contamination métallique du milieu et les concentrations déterminées dans les mousses mérite que soit tentée la mise en relation quantitative de ces deux facteurs. Ainsi, une meilleure connaissance des mécanismes d'accumulation doit permettre de mieux décrire les relations d'échanges de métaux à l'interface eau-bryophytes. Il s'agit aussi d'identifier et, dans la mesure du possible, quantifier la contribution de facteurs physiques et chimiques du milieu à l'ampleur des phénomènes d'accumulation. Ces facteurs, sujets à d'éventuelles variations dans le milieu peuvent affecter de façon significative la relation quantitative qui relie les concentrations métalliques dans le milieu et celles dans les mousses aquatiques. Ainsi, le dernier objectif consiste à mettre au point un support, utilisable *in situ*, permettant de placer les mousses dans un environnement physique contrôlé et d'intervenir, en les régulant, sur les facteurs du milieu susceptibles d'affecter l'accumulation des métaux par ces organismes.

Chapitre I: Analyse bibliographique

I-1 LES METAUX DANS L'ECOSYSTEME AQUATIQUE

I-1-1 ORIGINE ET DISSEMINATION DANS LA BIOSPHERE

L'intervention humaine sur les cycles géochimiques modifie la distribution des éléments et leur abondance dans les trois compartiments air, sol et eau. Aux sources naturelles que sont l'érosion des roches et des sols et les émissions volcaniques se sont ajoutées l'extraction minière, l'utilisation des combustibles fossiles et l'emploi industriel des métaux. L'accélération des cycles géochimiques a provoqué non seulement une augmentation des teneurs en métaux dans la biosphère mais aussi la dissémination de ces éléments du fait de la multitude des applications techniques dans lesquels ils interviennent (métallurgie, électronique, industrie plastique, chimie des polymères, chimie des pesticides et des colorants). Ainsi le cuivre, qui entre dans la composition d'au moins 160 minéraux, est présent naturellement dans les sols à une concentration moyenne de 20 mg kg^{-1} et dans les eaux de surface à des concentrations inférieures à 10 µg L^{-1}. Ces concentrations peuvent être multipliées par un facteur 100 ou 1000 lorsque l'écosystème est soumis à une pression anthropique (Demayo *et al.*, 1982).

Ce constat effectué pour le cuivre peut être généralisé aux autres métaux lorsque l'on compare les estimations des apports respectifs des émissions naturelles et anthropiques (Tableau 1-1). Les émissions de métaux, naturelles ou d'origine anthropique, qu'elles soient de nature solide, liquide ou gazeuse, se retrouvent souvent dans l'écosystème aquatique, suivant ainsi principalement le cycle de l'eau. Les émissions atmosphériques de métaux se déposent au sol par l'intermédiaire des précipitations ou des dépôts secs. On peut ainsi observer des teneurs en métaux anormalement élevées dans des régions non industrielles (Markert et Weckert, 1989; Foster *et al.*, 1991; Van Daalen, 1991; Steinnes *et al.*, 1994), parfois très éloignées des zones urbanisées comme le sont les zones arctiques (Savarino *et al.*, 1994). La très large dissémination des métaux à partir de zones d'émissions qui peuvent être très localisées est illustrée par les études portant sur le suivi dans la biosphère de radioéléments émis dans l'atmosphère (Steinnes et Njastad, 1993; Gerdol *et al.*, 1994). Outre les rejets directs dans le milieu aquatique, l'érosion et le lessivage des sols, contaminés ou non, contribuent aussi à la présence des métaux dans le milieu aquatique. On peut ainsi arriver à des situations où les boues issues du traitement des eaux

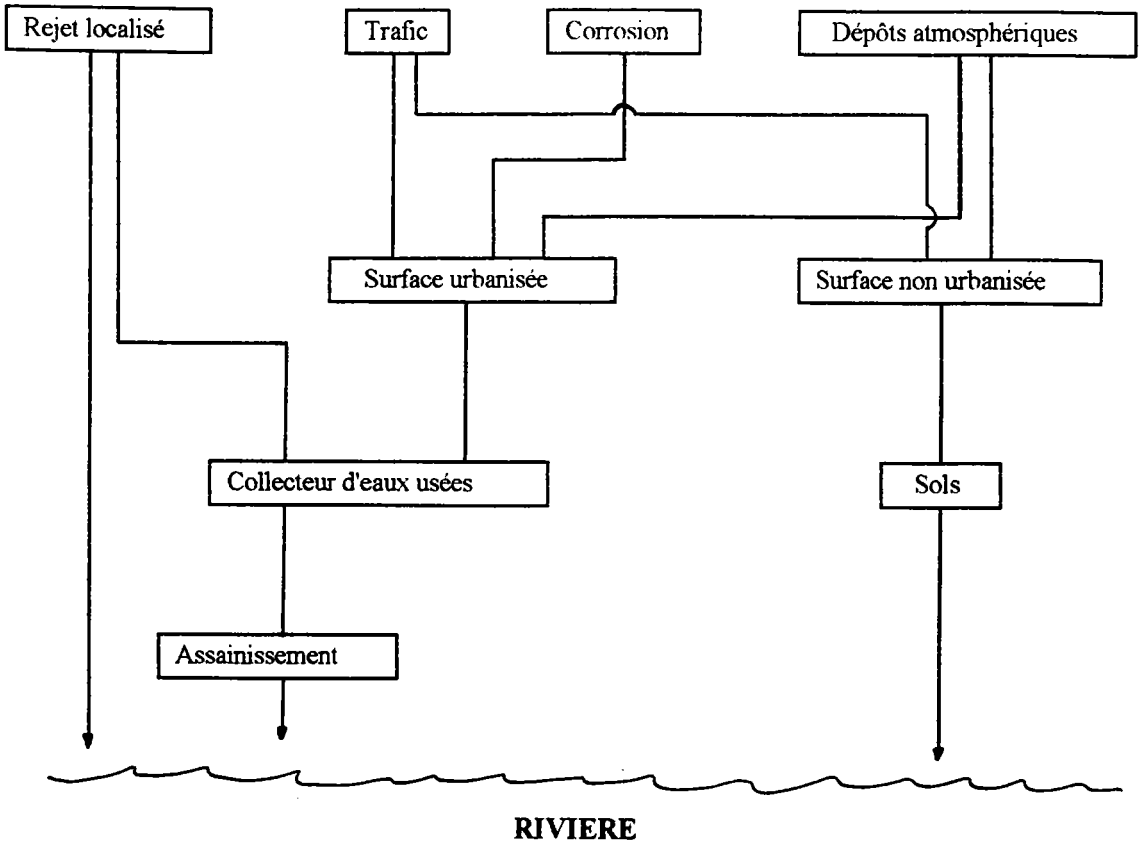


Figure 1-1: Voies par lesquelles les polluants sont transportés vers le milieu aquatique en zone urbanisée. (Adapté de Behrendt et Boehme (1992) in Rautengarten, 1993).

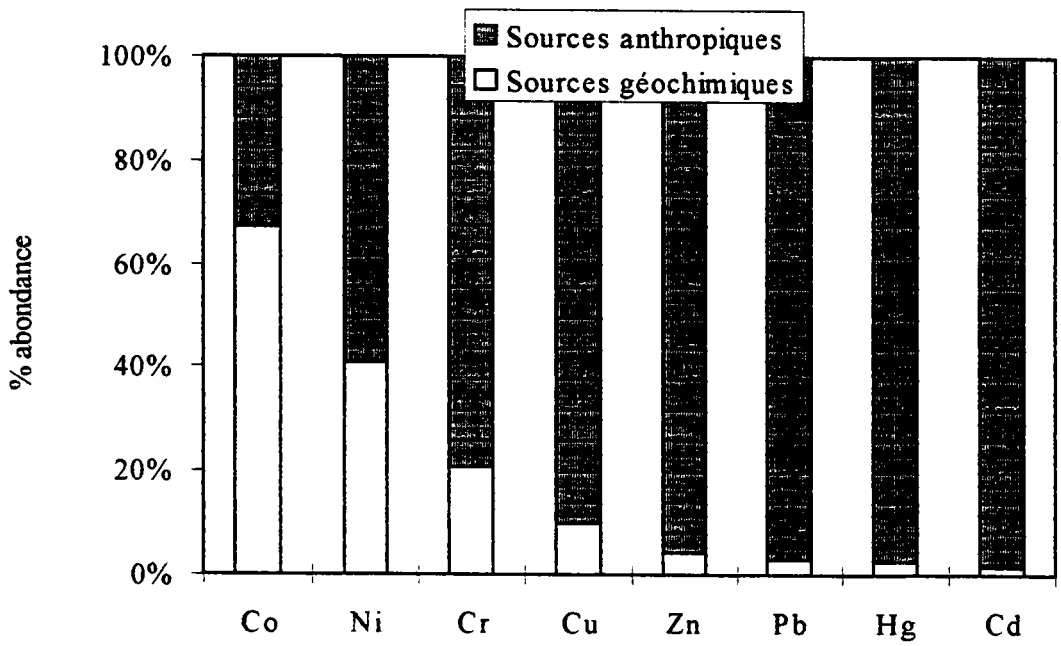


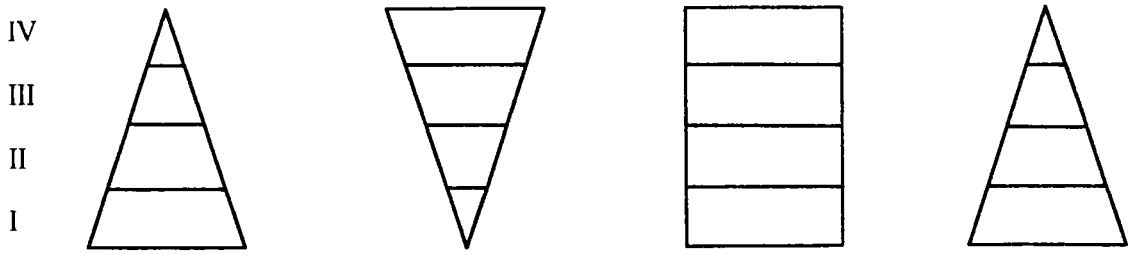
Figure 1-2: Contribution des sources naturelles géochimiques et des sources d'origine anthropique à la contamination des sédiments du Rhin (D'après Förstner, 1980).

ou du curage des lits de cours d'eau, valorisées pour l'amendement des sols agricoles, génèrent de nouveau une pollution métallique des eaux préalablement traitées (Gandais et Marchandise, 1992).

Tableau 1-1: Contribution des apports anthropiques à la mobilisation des métaux dans la biosphère. Deux estimations sont données pour l'apport des sources anthropiques (d'après Phillips et Rainbow, 1993).

Eléments	Sources géologiques (10^3 t/an)	Sources anthropiques (10^3 t/an)		Total dans les océans (10^6 t)
Fer	25000	319000	395000	4110
Manganèse	440	1600	8150	2740
Cuivre	375	4460	6000	4110
Zinc	370	3930	5320	6850
Nickel	300	358	481	2740
Plomb	180	2330	3200	41
Molybdenium	13	57	74	13700
Argent	5	7	9	137
Mercure	3	7	10.5	68
Etain	1.5	166	227	14
Antimoine	1.3	40	65	274
Cadmium	-	-	17	68

Les sols urbains, imperméabilisés, sont facilement contaminés par les métaux issus des activités urbaines, notamment par le Cd, Pb, Zn. Ce stock de polluant est ensuite entraîné par lessivage, générant ainsi une pollution qui gagne les cours d'eau par ruissellement (Legret *et al.*, 1994). La figure 1-1 donne un exemple des voies de transfert des polluants du sol vers le milieu aquatique dans une zone urbanisée. La somme de ces différentes sources de contamination métallique des cours d'eau peut alors aboutir à une contamination globale importante. Ainsi, pour le Rhin, fleuve soumis à une très forte pression anthropique par collecte et concentration de toutes sortes de pollution, les métaux d'origine anthropique ont une part prépondérante, jusqu'à 98 % pour le Cd, dans la composition de ses sédiments (Figure 1-2).



Pyramides des concentrations

Pyramide des biomasse	Effet de bioamplification	Simple transfert	Diminution des concentrations

Figure 1-3: Principaux types de pyramides des concentrations selon le transfert des polluants dans la chaîne trophique (d'après Ramade, 1992).

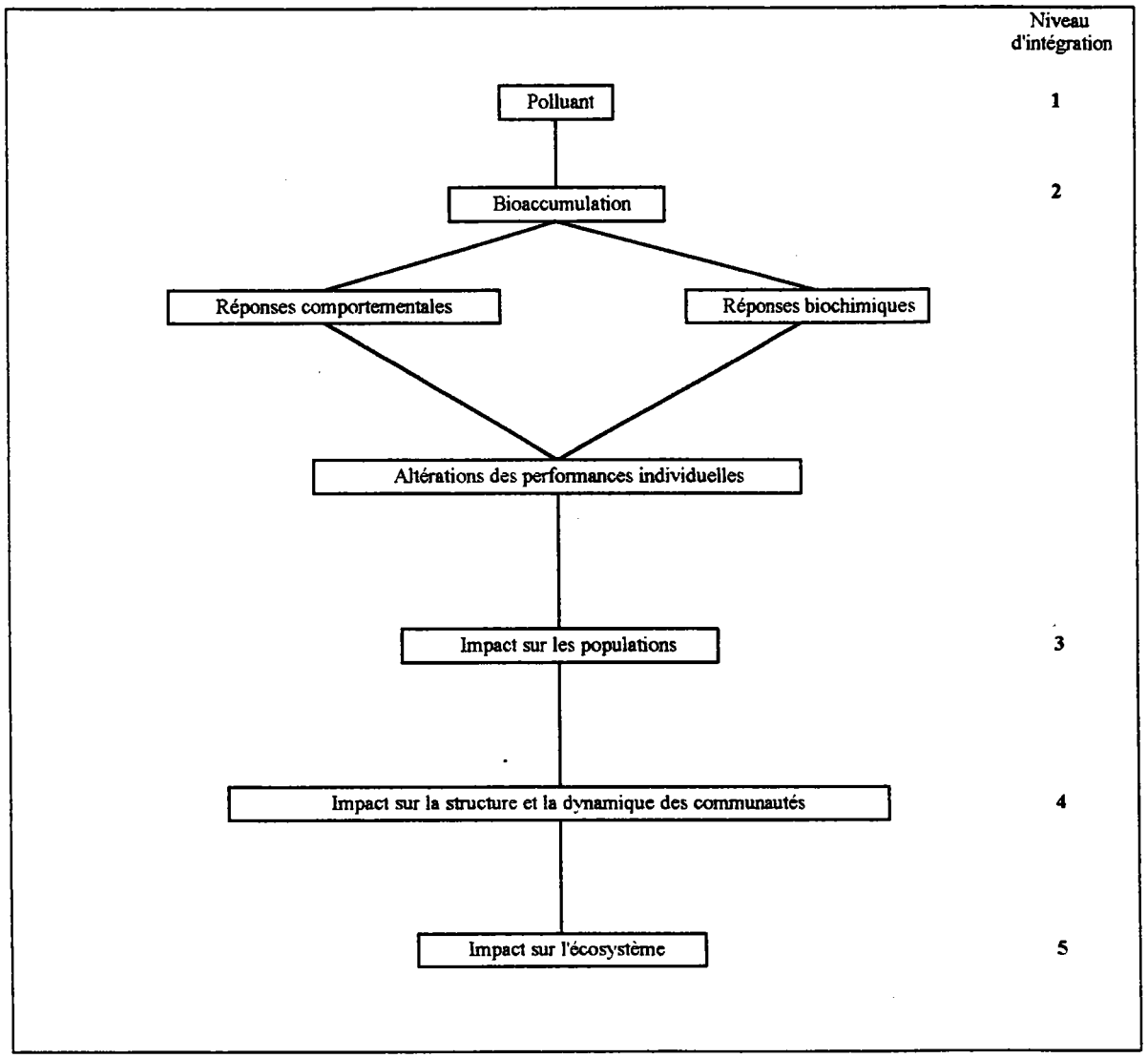


Figure 1-4: Schéma général des modalités d'action d'un polluant sur un écosystème (Adapté de Ramade, 1992).

I-1-2 DEVENIR ET REPARTITION DES METAUX DANS LES ECOSYSTEMES AQUATIQUES CONTINENTAUX

Le devenir des métaux dans l'eau est tributaire de leur nature et de leurs propriétés mais aussi des paramètres physiques et chimiques du milieu qui conditionnent leur répartition sous différentes formes chimiques. De ces dernières, c'est-à-dire de la spéciation du métal, va dépendre la répartition dans les divers compartiments de l'écosystème (Florence *et al.*, 1992). Ceux-ci peuvent être, en simplifiant, divisés entre le compartiment dit stationnaire, le sédiment, et le compartiment circulant comprenant les fractions particulaires et dissoutes du métal. Cette dernière est généralement définie comme la fraction de métal restant dans l'eau après filtration à 0.45 µm, même si elle n'est pas forcément représentative de la fraction métallique disponible pour la biomasse (Förstner et Wittman, 1981). Le transfert des métaux entre ces trois principaux compartiments est un phénomène dynamique, jamais à l'équilibre car influencé par les facteurs du milieu toujours variables. Pettine *et al.* (1994) ont suivi pendant deux années l'évolution des concentrations métalliques, particulaires et dissoutes dans le Pô et montrent l'importance du débit, plus que la teneur en matière en suspension (M.E.S.) sur la partition des métaux entre phase particulaire et dissoute. La répartition multiphasique des métaux dans le milieu aquatique peut aussi être influencée par le pH (O'Shea et Mancy, 1978; Campbell et Evans, 1987; Puls *et al.*, 1991; Kooner, 1992), la présence de ligands organiques et inorganiques (Livens, 1991), la teneur en cations, notamment Ca et Mg (O'Shea et Mancy, 1978; Stadler et Schindler, 1993) ou la salinité du milieu dans les zones estuariennes (Ouddane *et al.*, 1992; Van den Berg, 1991). Chaque métal se distribue ainsi au sein de l'écosystème en fonction de ses propriétés propres et de la manière dont jouent les facteurs du milieu.

I-1-3 IMPLICATION DE LA SPECIATION DES METAUX DANS L'EVALUATION DE LA CONTAMINATION METALLIQUE DU MILIEU AQUATIQUE ET DE SES EFFETS SUR LES BIOCENOSES

Les mêmes facteurs qui contribuent à la répartition des métaux dans les différents compartiments physiques ont également une influence sur le devenir des métaux dans le compartiment biologique et sur leurs effets potentiellement toxiques. En effet, de la spéciation des métaux va dépendre leur accumulation dans la chaîne trophique et leur toxicité potentielle (Florence, 1977). Les principaux types de transfert des métaux au sein de l'édifice biologique sont résumés dans la figure 1-3. L'accumulation s'effectue selon différents processus principalement tributaires du mode d'ingestion de l'organisme considéré. De la simple accumulation dans un organisme, on peut aboutir à la contamination de l'ensemble de l'édifice biologique par le phénomène de biomagnification. Celui-ci est défini par Ramade (1992) comme le transfert et l'accroissement de la concentration en toxique au fur et à mesure que l'on progresse dans les différents niveaux de la pyramide écologique.

Outre le fait que les métaux peuvent être accumulés et biomagnifiés au sein des chaînes trophiques, l'expression biologique de l'accumulation des métaux ou du simple contact avec les métaux est la toxicité. Celle-ci peut s'exprimer de différentes manières, du comportement de fuite à la mort de l'organisme, et à différents niveaux d'intégration comme le montre la figure 1-4. Là aussi, les facteurs du milieu jouent un rôle important en influençant, de manière positive ou négative, le degré de toxicité d'un ou plusieurs éléments.

La revue bibliographique de Spry et Wiener (1991) relative aux effets des métaux sur les poissons peut être pris comme illustration de l'implication de la physico-chimie du milieu dans les mécanismes d'accumulation et de toxicité des métaux. Ces auteurs notent l'influence d' une diminution du pH dans un environnement peu minéralisé qui entraîne une accumulation plus importante des métaux par les poissons. La diminution du pH, en entraînant la mobilisation des métaux complexés, augmente alors la fraction de métal disponible pour la biomasse. Les auteurs évoquent aussi l'influence d'un milieu peu minéralisé sur la physiologie de l'organisme, qui, en absence d'une quantité suffisante en calcium, accroît sa perméabilité membranaire facilitant ainsi l'accumulation des éléments. Meador (1991) met en évidence les effets simultanés du pH, de la teneur en carbone organique dissous (COD) et des concentrations en cuivre sur *Daphnia magna*. L'auteur montre ainsi que la toxicité (CL_{50}-24h) du cuivre total mesuré est d'autant plus importante, d'une part lorsque la teneur en COD est faible (< 2 mg L^{-1}), et d'autre part quand le pH passe de 8.0 à 7.0. Par contre, l'augmentation des teneurs en COD (> 3.8 mg L^{-1}) se traduit par une absence de toxicité et ce, quelle que soit la concentration en Cu (de 0 à 75 µg L^{-1}), mettant ainsi en évidence le rôle de piège ou le rôle tampon joué par la présence dans l'eau de complexants naturels tels les acides humiques (Winner, 1985; Pommery *et al*, 1985 ; Campbell et Evans, 1987).

La toxicité ne s'exprime pas forcément par la mort, mais lors d'intoxication chronique, par des effets plus insidieux et moins spectaculaires sur certaines fonctions physiologiques comme la croissance, la reproduction, la photosynthèse. La recherche de ce type d'effet est rendue nécessaire par l'évolution spatio-temporelle des pollutions, qui, provenant à l'origine de sources très localisées comme un rejet industriel, deviennent de plus en plus diffuses, moins prononcées dans leur ampleur mais persistantes. De plus, l'expression d'une toxicité chez l'organisme ne nécessite pas forcément des teneurs importantes dans le milieu, justifiant ainsi le terme souvent employé de micropollution.

I-2 LES METHODES D'EVALUATION DE LA CONTAMINATION METALLIQUE

I-2-1 INTERET DE L'UTILISATION DES VARIABLES BIOLOGIQUES: NOTION D'INDICATEUR BIOLOGIQUE

L'évaluation du niveau de contamination du milieu aquatique n'est pas simple lorsque les teneurs dans le milieu sont faibles et que l'on veut prendre en compte les effets potentiellement toxiques des métaux ainsi que les phénomènes de transfert au sein des chaînes trophiques. Certes, l'analyse des formes chimiques des métaux dans l'eau, vecteur primaire de la contamination, permet, grâce aux techniques analytiques actuelles (ultrafiltration, dialyse, chromatographie sur gel, polarographie, résine échangeuse d'ions), d'évaluer la toxicité potentielle et les possibilités de transfert. Cependant, ces méthodes n'impliquent pas toujours une relation fiable entre les concentrations d'exposition en métaux, ou certaines formes métalliques, et les phénomènes de toxicité ou d'accumulation (Neubecker et Allen, 1983; Florence *et al.*, 1992). On peut aussi observer des effets constatés sur l'écosystème sans pour autant que l'analyse chimique révèle quelque chose, soit parce que l'incident est fugace, soit parce que le ou les paramètres responsables de l'effet n'ont pas été identifiés et suivis, ou encore parce que l'effet résulte de la combinaison de plusieurs paramètres (Whitton, 1991).

Le devenir et l'action d'un micropolluant métallique sont à la fois conditionnés par l'interaction du métal avec son environnement abiotique et biotique, et tributaires des variations de ces paramètres qui entraînent des concentrations fluctuantes dans l'espace et le temps. Seule, l'analyse de l'eau ne suffit donc pas à une estimation fiable à la fois du niveau des concentrations, des phénomènes de transfert et de la perturbation des organismes ou de l'ensemble de l'écosystème. Pour appréhender les phénomènes d'accumulation et de toxicité des métaux vis-à-vis de l'ensemble des organismes composant la chaîne trophique, des méthodes indirectes d'évaluation ont été développées faisant appel directement aux communautés ou aux organismes que l'on appelle alors indicateurs. Blandin (1986) en donne la définition suivante " organismes ou ensemble d'organismes qui, par référence à des variables biochimiques, cytologiques, physiologiques, éthologiques ou écologiques, permettent de façon pratique et sûre, de caractériser l'état d'un écosystème ou d'un écocomplexe et de mettre en évidence aussi précocement que possible leurs modifications naturelles ou provoquées ". Les variables utilisées peuvent faire appel à tous les niveaux d'organisation de l'édifice biologique. De la concentration d'une enzyme spécifique à un indice décrivant la richesse et la diversité taxonomique d'un écosystème, le choix de ces variables est lié aux types de réponse qu'elles sont susceptibles de fournir qui doivent être précises et graduées en fonction du degré d'altération du système. L'emploi de ces variables biologiques se traduit dans les faits par l'existence d'une multitude de méthodes d'évaluation

(Lange et Lambert, 1994) des altérations des systèmes, de la toxicité potentielle et des voies de transfert des polluants.

Le terme de *monitoring* est souvent employé lors de l'emploi d'une de ces méthodes. Le *monitoring*, sans équivalent en français, a l'avantage de regrouper en un seul mot les notions de surveillance, de continuité et d'évaluation. Phillips et Rainbow (1993) le définissent comme la collection répétée de données afin de déterminer les tendances de paramètres environnementaux qui peuvent donner deux types d'évaluations : d'une part une indication *a priori* sur un problème en développement, d'autre part, une évaluation *a posteriori* de la variation temporelle des paramètres mesurés.

Les méthodes permettant de répondre aux objectifs décrits ci-dessus peuvent être séparées en deux groupes selon que l'objectif est de mesurer les effets d'une altération du système sur un organisme cible ou sur l'écosystème, ou d'identifier et de suivre un polluant dans l'écosystème. Ramade (1992) dans son précis d'écotoxicologie regroupe ces deux types de méthodes sous les termes de *monitoring biologique* et *monitoring chimique*. Ces deux approches sont complémentaires car la première permet d'évaluer des effets sans pouvoir toujours en déterminer la cause, la seconde permettant d'identifier des causes possibles sans systématiquement pouvoir les relier à un effet.

I-2-2 *LE MONITORING BIOLOGIQUE*

Parallèlement aux modalités d'action d'un polluant (Figure 1-4), on peut décliner les différentes méthodes de *monitoring biologique*. Celles-ci ont pour objectif d'évaluer l'impact de la pollution à un instant t ou en fonction du temps à l'un des niveaux de l'édifice biologique. La première difficulté est de sélectionner les variables biologiques susceptibles d'être représentatives, à leur niveau, des effets des polluants sur l'ensemble des organismes. La seconde difficulté est de prendre en compte toutes les interactions physiques, chimiques et biologiques susceptibles d'influencer au sein de l'écosystème la toxicité du polluant. Le meilleur moyen, mais le plus complexe, est de prendre en compte et de recréer l'ensemble d'un écosystème, appelé alors mésocosme, ou microcosme lorsqu'une partie seulement de l'écosystème est prise en compte (Ramade, 1992). Dans ce cadre, on peut citer les travaux de Ribeyre et Boudou (1994) sur le transfert des différentes formes mercurielles au sein d'un écosystème aquatique recréé en laboratoire, ou les travaux de Meador *et al.* (1993) sur les effets de variations simultanées de différents facteurs du milieu sur le transfert du cuivre au sein d'une mini chaîne trophique comprenant du phyto et du zooplancton. L'avantage de ce type d'étude est de pouvoir simuler les variations de différents facteurs et étudier leurs effets combinés (Meador *et al.*, 1993).

L'évaluation des modifications occasionnées par l'homme qui détourne l'écosystème de son évolution naturelle se mesure plus facilement à des niveaux inférieurs à celui pris en compte lors de travaux sur les mésocosmes (niveaux 3 et 4, figure 1-4). Les indicateurs biocénotiques comme les indices macrophytiques (Grasmück *et al*, 1993), saprobiques (Sladecek, 1973), diatomiques (Descy, 1979; Prygiel et Coste, 1992) ou basés sur l'étude des macroinvertébrés (Verneaux et Tuffery, 1967; AFNOR, 1992) donnent une évaluation globale de l'état du système, sans toutefois fournir une information évidente sur la toxicité du milieu ou donner une évaluation prédictive. A l'échelle des organismes, (niveau 2, figure 1-3) s'est développée toute une série de méthodes d'évaluation de stress occasionné par un toxique, méthodes regroupant les tests de toxicité (bio-essais) basés sur la détermination des toxicités létales, sub-létales et chroniques, les tests comportementaux (bio-capteurs) basés sur une réponse comportementale ou physiologique de l'organisme test face à un polluant et les tests basés sur l'induction d'un dysfonctionnement métabolique (bio-marqueurs).

I-2-3 *LE MONITORING CHIMIQUE*

Contrairement aux méthodes biologiques d'évaluation, l'objectif du *monitoring chimique* est d'estimer les quantités de polluant accumulées ou accumulables dans la chaîne trophique. Il s'agit dans un premier temps de suivre le transfert des polluants au sein d'une chaîne alimentaire mais aussi d' évaluer le risque potentiel de transfert d'un élément au sein de l'écosystème. On utilise alors des organismes sentinelles ou indicateurs de pollution, organismes tests représentatifs d'un des niveaux de l'édifice biologique. Les qualités requises pour ces organismes sont inspirées de celles énoncées par Phillips (1977). L'organisme choisi comme indicateur doit pouvoir supporter une pollution sans être tué, être sédentaire, abondant, avoir une durée de vie suffisamment longue, être aisé à échantillonner, supporter des expériences de laboratoire et présenter une relation simple entre les teneurs du polluant dans le milieu et les quantités accumulées dans l'organisme. Wachs (1985) passe en revue les principaux compartiments biologiques mais aussi physiques qui sont, ou ont été, couramment utilisés comme indicateurs du niveau de contamination du milieu aquatique. La détermination des teneurs métalliques dans les sédiments est une méthode largement répandue car le sédiment, par sa capacité de stockage et de concentration, donne une image de la contamination moyenne du cours d'eau en tenant compte d'événements de pollution antérieurs à la collecte de l'échantillon (Vogel et Chovanec, 1992). Les macrophytes aquatiques, incluant les bryophytes, ainsi que les algues, sont également largement utilisées lors d'études portant sur la répartition des métaux dans l'écosystème (Whitton *et al*, 1981; Lethonen, 1989; Jackson et Kalff, 1993). Dans le règne animal, si les poissons (Spry et Wiener, 1991) et les invertébrés benthiques (Dallinger, 1994) sont parfois utilisés, la majorité des méthodes fait appel aux mollusques, *Mytilus edulis* en milieu marin (Goldberg *et al.*, 1978), *Dreissena polymorpha* en milieu continental (Mersch, 1993).

1-2-4 LA PLACE DES MOUSSES AQUATIQUES AU SEIN DES METHODES D'EVALUATION DE LA CONTAMINATION DES ECOSYSTEMES

Les bryophytes aquatiques sont des indicateurs qui, selon leur utilisation, peuvent être classées à la fois au sein des méthodes de *monitoring biologique* et des méthodes de *monitoring chimique*. Empain (1977) a développé une méthode d'évaluation globale de la qualité du milieu basée sur l'abondance et la richesse spécifique, méthode appelée indice bryophytique. L'activité métabolique de cet organisme a aussi été employée comme indicateur de la pollution métallique en suivant la photosynthèse et la respiration (McLean et Jones, 1975) tandis que la composition en pigments chlorophylliens a été utilisée comme indicateur de la pollution organique et métallique (Peñuelas, 1984; Lopez et Carballeira, 1991). Martinez-Abaigar *et al.* (1993) estiment les effets de la pollution organique sur la composition en pigments, les teneurs en N et P et les taux de photosynthèse et de respiration des mousses aquatiques.

Outre ces méthodes d'évaluation que l'on peut classer dans les méthodes de *monitoring biologique*, les mousses aquatiques font aussi partie des méthodes de *monitoring chimique* lorsqu'elles sont utilisées comme support analytique, concentrateur et intégrateur de la contamination métallique du milieu. Benson-Evans et Williams (1976) utilisent le degré d'altération de mousses transplantées d'un site non pollué vers des stations soumises à des rejets anthropiques. Outre ce paramètre, les auteurs suggèrent que les bryophytes aquatiques, à l'instar des espèces terrestres (*e.g.* Ward *et al.*, 1977), pourraient être utilisées pour l'évaluation de la contamination métallique. D'une méthode globale d'évaluation de la qualité du milieu, les mousses aquatiques se sont avérées, en répondant à la plupart des exigences énoncées par Phillips (1977), être des indicateurs particulièrement intéressants de la contamination métallique. En définissant des concentrations métalliques de référence dans les mousses, Mouvet (1986) a établi une grille de qualité à 5 niveaux permettant d'estimer le degré de pollution métallique du milieu. Cette grille est aujourd'hui utilisée en France dans le Réseau National de Bassin par les Agences de l'Eau. Si ces organismes sont avant tout employés comme indicateurs de la pollution métallique, ils sont aussi parfois utilisés pour l'évaluation de la contamination radioactive (Beaugelin-Seiller *et al*, 1994; Mersch et Kass, 1994) ou de la contamination par les molécules organiques (Samecka-Cymmerman, 1983; Gallissot, 1988).

I-3 LES MOUSSES AQUATIQUES COMME TRACEURS DE LA MICROPOLLUTION METALLIQUE

I-3-1 BIOLOGIE DES MOUSSES AQUATIQUES EN GENERAL

Systématique

Les bryophytes se divisent en trois classes: *Hepaticae*, *Anthoceratae* et *Musci*. Les *Musci* représentent la classe la plus importante, puisque l'on recense environ 15000 espèces (Richardson, 1981), dont une partie est considérée comme aquatique. Il existe des clés de détermination spécifiques aux bryophytes (Augier, 1966; Smith, 1978) mais la difficulté d'y retrouver les mousses aquatiques, beaucoup moins nombreuses que les mousses terrestres, a motivé l'élaboration d'un fichier descriptif recensant les mousses aquatiques les plus fréquentes (Mouvet, 1986).

Physiologie

Les mousses possèdent des tiges à faisceau axial. Leurs feuilles, constituées le plus souvent d'une couche unicellulaire, peuvent présenter des nervures différenciées. Selon l'espèce, la taille de la plante varie de moins de 1 mm jusqu'à plus de 70 cm. Ces organismes végétaux se distinguent des plantes supérieures par l'absence d'appareil vasculaire différencié. Il peut exister néanmoins un tissu conductif développé à la périphérie de la tige permettant le transport de l'eau et des nutriments (mousse endohydrique). Certaines espèces ne présentent pas ce tissu conductif mais seulement des jonctions protoplasmiques entre les cellules (mousse ectohydrique) qui permettent une circulation très localisée des nutriments (Richardson, 1981; Tyler, 1990).

De nombreux travaux portent sur les besoins et l'adaptation physiologique des mousses à leur environnement. Ils ont fait l'objet notamment d'un ouvrage traitant de l'ensemble des bryophytes (Proctor, 1981). La littérature concernant plus spécifiquement les mousses aquatiques est beaucoup plus restreinte. Une revue bibliographique (Glime et Vitt, 1984) reprise en partie par Mouvet (1986) met en évidence la grande capacité d'adaptation des mousses aquatiques à des conditions très contrastées de température, de lumière, d'immersion et de concentrations en nutriments.

Une autre étude (Empain, 1977) sur la relation entre 22 paramètres caractérisant la qualité du milieu et la répartition des mousses aquatiques a montré la grande résistance des mousses à des conditions environnementales très différentes. Cependant, l'auteur constate, en étudiant la Meuse, la disparition de toutes les espèces à hauteur de Givet (frontière franco-belge),

station soumise à un échauffement des eaux provoqué par la centrale nucléaire de Chooz. Il remarque également que la présence des bryophytes est souvent associée à une rupture brutale du régime d'écoulement de l'eau, au niveau de piles de pont, de biefs et de barrages. Ces observations tendent à montrer que, malgré leur grande capacité d'adaptation, les bryophytes ont un habitat préférentiel.

Ecologie

Parmi les paramètres physico-chimiques du milieu, la température de l'eau est probablement le paramètre qui a le plus d'influence sur la distribution géographique des espèces. Glime et Vitt (1984) expliquent l'incapacité des mousses aquatiques à vivre à des températures excédant 20 - 30 °C par leur difficulté à faire prévaloir la photosynthèse sur la photorespiration, expliquant ainsi leur présence limitée aux zones tempérées.

En fait, les facteurs qui restreignent de façon significative la distribution des mousses aquatiques dans un cours d'eau sont avant tout d'ordre physique. Suren (1991) définit de façon relativement précise le biotope dans lequel les mousses sont observées dans des cours d'eau en Nouvelle-Zélande. Les mousses sont présentes essentiellement dans des faciès lotiques (courant de 0.21 - 0.30 m s^{-1}), sur des substrats pérennes, surtout des rochers, et à une profondeur n'excédant pas 10 cm en dessous de la zone de battement entre les niveaux d'étiage et de crue. En effet, même si les bryophytes peuvent tolérer une période d'émersion, leur difficulté voire l'impossibilité, notamment pour les mousses ectohydriques, de se nourrir à partir du substrat sont des contraintes majeures expliquant la répartition de ces végétaux dans des milieux humides et aquatiques (Richardson, 1981) et dans des cours d'eau où le marnage est limité.

Une étude menée sur la biomasse bryophytique dans une rivière du Tennessee montre la répartition privilégiée des mousses sur des substrats stables avec, dans l'ordre décroissant de quantité de biomasse au mètre carré, les rochers, le lit rocheux du cours d'eau, les galets, le bois et les graviers (Steinman et Boston, 1993). Si les mousses sont observées majoritairement sur des substrats fixes, leur présence est souvent associée à des faciès lotiques même si la vitesse du courant ne semble pas être un facteur limitant leur répartition puisqu'elles sont signalées dans certains lacs (Light et Lewis-Smith, 1976). Ainsi, sur les 46 stations prospectées par Empain (1977), la majorité se situe au niveau de barrages ou autres installations provoquant une rupture brutale du régime d'écoulement favorisant une augmentation de la vitesse du courant. Cette préférence pour des courants rapides pourrait être expliquée, comme le suggère Proctor (1990), par l'apport de nutriments par l'eau de rivière beaucoup plus important pour un temps donné que dans une eau stagnante. La répartition des mousses en fonction de la profondeur est assez large puisqu'elles sont observées jusqu'à 12 m dans les lacs (Light et Lewis-Smith, 1976) et, cas le plus

fréquent, dans la zone de battement entre les niveaux d'étiage et de crue (Empain, 1977; Slack, 1990). Ces organismes sont en effet capables de résister à de longue période d'émersion sans effet sur leur survie à long terme rendant parfois difficile le classement de certaines espèces dans la catégorie des mousses aquatiques.

I-3-2 ...ET DE L'ESPECE *RHYNCHOSTEGIUM RIPARIOIDES* EN PARTICULIER

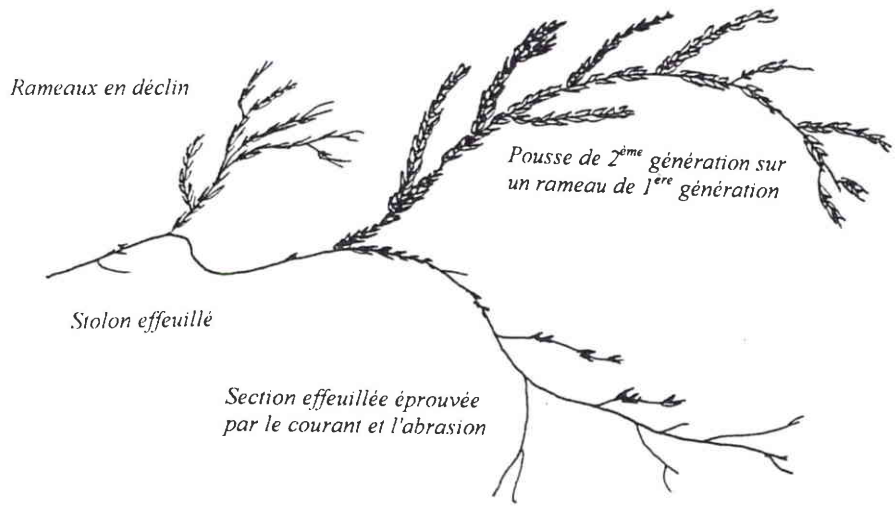
L'espèce *Rhynchostegium riparioides* (Hedw.) C. Jens. (syn.: *Eurhynchium riparioides* (Hedw.) Rich.; *Eurhynchium rusciforme* (Br; Eur.) Milde.; *Platyhypnidium riparioides* (Hedw.) Dix.) utilisée dans ce travail appartient à l'ordre des hypnobryales, au groupe des *hypnum* et à la famille des amblystegaciées.

Structure et organisation de la plante

La plante, assez robuste, d'une longueur pouvant atteindre 22 cm, est constituée d'une tige souvent dénudée à la base, le stolon, et de ramifications irrégulières (Figure 1-5). Au cours de sa croissance, le stolon, tout en se fixant au substrat par l'intermédiaire de rhizoides, développe des amorces de ramifications de première génération, lesquelles produisent à leur tour des rameaux de seconde puis de troisième génération. Selon Devantery (1987), il n'y a pas de réelle organisation des ramifications qui se développent en fonction de leur environnement, essentiellement en fonction du courant et de la lumière. Les rhizoides, présents chez l'ensemble des espèces de bryophytes (Odu, 1978) sont des filaments monocellulaires d'un diamètre d'environ 10 µm et d'une longueur très variable, de 200 à 500 voire 3000 µm et dont le développement dépend d'une fonction, assurer à la plante un ancrage optimal. La présence et l'abondance de ces rhizoides, communs à l'ensemble des bryophytes (Englund, 1991), sont liées dans le milieu aquatique à la fois au régime d'écoulement et à la température (Glime, 1980). Le tableau 1-2 illustre l'effet du régime d'écoulement sur la production de rhyzoides par deux espèces de *Fontinales*.

Les feuilles imbriquées en quinconce le long des ramifications, sont concaves, ovales, aiguës à obtuses et présentent une marge plane denticulée. Ces dents ne sont parfois présentes que dans le 1/5 supérieur de la feuille et même parfois absentes. Les feuilles sont constituées d'une couche unicellulaire (Figure 1-5). La feuille présente une nervure forte partant de la base jusqu'au 3/4 de la longueur (Mouvet, 1986). Il peut exister des différences morphologiques, notamment au niveau de la marge denticulée, pouvant entraîner une confusion avec d'autres espèces semblables, notamment *Hygrohypnum ochraceum* et *Amblystegium riparium* (Wehr et Whitton, 1986).

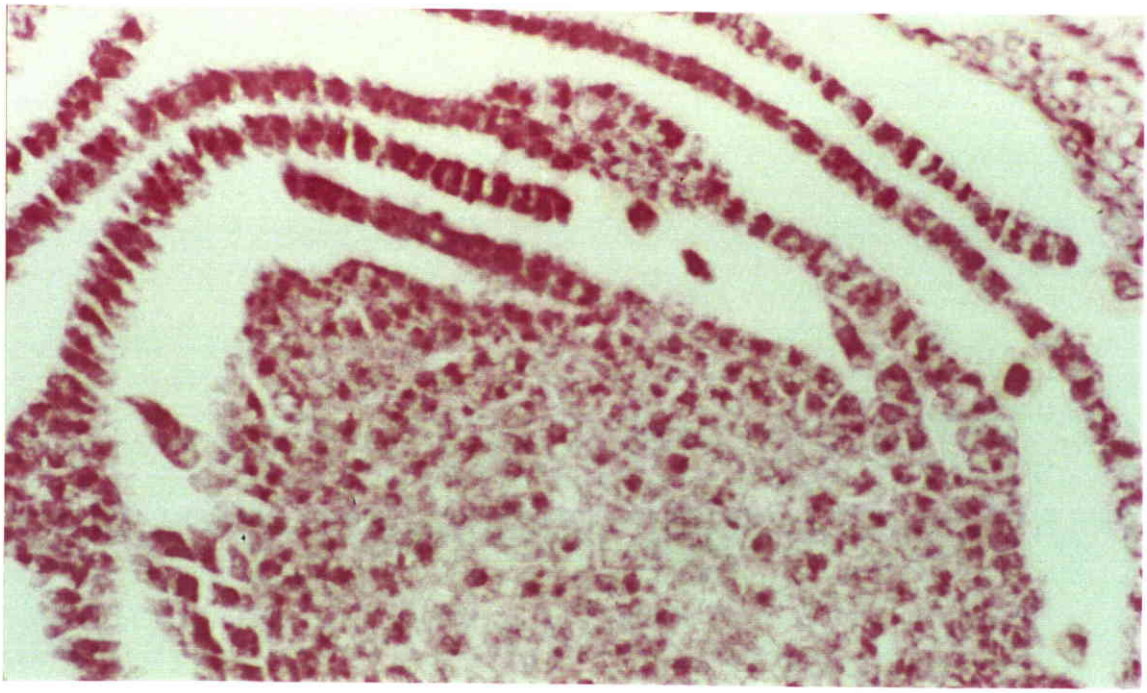
A



B

C

Figure 1-5a: Présentation de l'espèce *Rhynchostegium riparioides*. A: Rameau sur lequel a poussé plusieurs brins qui permet de distinguer l'imbrication des feuilles disposées de façon hélicoidales autour de l'axe ; B: Différentes morphologies de l'espèce observées in situ (Adapté de Devantery, 1987) ; C: Vue longitudinale d'une feuille constituée d'une couche unicellulaire permettant de voir les chloroplastes par transparence.



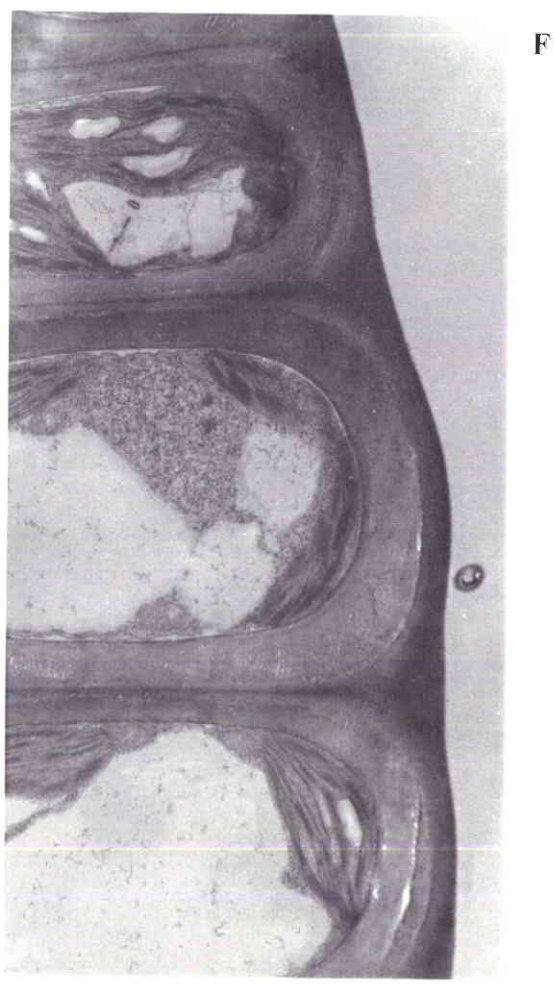


Figure 1-5b: Présentation de l'espèce *Rhynchostegium riparioides*. D: Coupe transversale d'un rameau montrant l'arrangement des feuilles autour de la tige (x 160) ; E: Faisceau de rhizoides ; F: Coupe transversale (x 5000) de feuille (1 cm = 2 µm).

Tableau 1-2: Moyenne et $IC_{95\%}$ du nombre de touffes de rhizoides par grappe de 10 rameaux de *Fontinales* immergées dans des conditions hydrodynamiques et à des températures (Temp.; °C) différentes (d'après Glime, 1980).

Temp.	Régime turbulent		Régime stagnant	
	F. hypnoides [1]	*F. novae-angliae* [2,3]	*F. hypnoides* [1]	*F. novae-angliae* [1,2]
1	6.2 ± 4.8	0.0 ± 0.0	3.2 ± 1.8	0.0 ± 0.0
5	14.7 ± 7.4	0.4 ± 0.6	6.5 ± 3.8	0.0 ± 0.0
10	46.9 ± 8.1	2.9 ± 1.7	27.3 ± 5.6	0.1 ± 0.3
15	65.6 ± 19.0	8.5 ± 4.1	30.9 ± 4.4	1.9 ± 1.8
20	178.6 ± 47.8	0.8 ± 0.7	35.4 ± 8.6	7.9 ± 5.6

[1] mesures après 9 semaines
[2] mesures après 11 semaines
[3] rhizoides présent uniquement sur le stolon

Physiologie de la plante

Lors du suivi d'une année sur 4 sites (Kelly et Whitton, 1987), la croissance de *Rhynchostegium riparioides* est apparue continue durant l'année, avec deux pics de croissance à la fin du printemps - début de l'été et à l'automne. La croissance maximale, enregistrée pendant le premier pic de croissance, est de 2.31 mm par semaine, chiffre largement inférieur à ce qu'a pu observer Empain (1977) en laboratoire (7 mm par semaine). Une légère chute du taux de croissance est observée durant l'été. La croissance minimum est observée en hiver (minimum observé = 0.15 mm par semaine). Le calcul de la croissance potentielle d'une touffe en tenant compte des variations saisonnières donne un taux de croissance variant de 43 à 73 mm par an. Ce résultat corrobore les observations de Pentecost (1987) qui note pour la même espèce un taux de croissance annuel de 30 mm. Lors de leur étude *in situ*, Kelly et Whitton (1987) relèvent une corrélation positive entre la température de l'eau et le taux de croissance, sans pouvoir toutefois identifier qui, de la température de l'eau ou de l'ensoleillement, est le facteur prépondérant dans la diminution de la croissance en hiver. Les résultats de Empain (1977) sur l'effet de la température et de la lumière sur la croissance de la même espèce en laboratoire ne permettent pas non plus de conclure quant à la contribution de chacun de ces 2 paramètres à la croissance de la plante. Un paramètre qui n'a pas été étudié par ces auteurs malgré son rôle potentiel important est le régime d'écoulement de l'eau. On peut en effet penser qu'en hiver, l'augmentation des débits et des teneurs en matières en suspension (MES) provoquées par le lessivage des sols a un effet sur le taux de croissance. Cet effet pourrait être dû à l'abrasion provoquée par les MES et/ou à la diminution de la pénétration de la lumière entraînée par la charge en MES. Cet effet des MES est avancé par Lewis (1973 a, b) qui, constatant une diminution de la densité de mousses à l'aval d'un rejet

fortement chargé en MES, met en évidence au laboratoire leur effet abrasif. Ces matières en suspension provoquent une destruction des cellules latérales avec disparition de la dentelure, une diminution du taux de chlorophylle *a* et surtout une diminution de la production de branches latérales.

Répartition géographique

A l'instar de bon nombre d'espèces aquatiques, la faible exigence de *Rhynchostegium riparioides* vis-à-vis des conditions du milieu se traduit par une large répartition géographique. Ainsi, l'espèce est relevée en Grande-Bretagne, dans les Appalaches, dans le bassin du Rhin (Wehr et Whitton, 1983a), en Yougoslavie (Vrhovsek *et al.*, 1984), dans la péninsule ibérique (Lopez et Carballeira, 1991; Gonçalves *et al.*, 1992), en Belgique et en France (Empain, 1977).

L'espèce, présente sur l'ensemble du réseau hydrographique français, à l'instar des genres *Fontinalis* et *Cinclidotus*, est utilisée par les Agences de l'Eau dans le cadre des suivis annuels de la contamination métallique des eaux. L'espèce est localisée en général dans les faciès lotiques sur des substrats solides et stables dans un environnement géologique siliceux ou calcaire avec une préférence pour ce dernier (Wehr et Whitton, 1983a; Devantery, 1987).

Sa présence est souvent associée à celle du genre *Cinclidotus*. Les touffes de *Rhynchostegium riparioides* sont facilement reconnaissables par rapport à d'autres espèces communes comme les *Fontinalis* et les *Cinclidotus*, de part leur couleur vert pâle et leur préférence pour les zones les moins ensoleillées. Enfin, cette espèce semble tolérer des conditions physico-chimiques très contrastées (Tableau 1-3).

I-3-3 ACCUMULATION DES ELEMENTS PAR LES BRYOPHYTES

Accumulation et localisation extracellulaire des éléments

L'assimilation des éléments par les bryophytes est mal connue par rapport à d'autres organismes végétaux, sachant que les processus physiologiques et métaboliques essentiels sont considérés comme similaires à ceux observés chez les plantes vasculaires (Proctor, 1990). On sait notamment peu de chose sur l'accumulation des anions par les bryophytes, mis à part le fait que les capacités d'échanges anioniques de la paroi cellulaire sont moins importantes que ses capacités d'échanges cationiques (Brown et Bates, 1990). Il semble que les nutriments azotés et phosphorés ne constituent pas un facteur limitant le développement des bryophytes aquatiques (Kelly et Whitton, 1987; Steinman, 1994).

Tableau 1-3: Chimie de 105 sites où a été prélevée l'espèce *Rhynchostegium riparioides* (d'après Wehr et Whitton, 1986)

Paramètres	Unité	Minimum	Moyenne	Maximum
pH		6.8	7.8	8.7
Alcalinité total	meq L^{-1}	0.10	1.42	7.12
Na	mg L^{-1}	2.6	12.4	87.8
K	mg L^{-1}	0.08	2.04	14.8
Mg	mg L^{-1}	0.72	6.29	60.0
Ca	mg L^{-1}	3.72	32.4	90.4
Mn	mg L^{-1}	< 0.004	0.049	0.75
Fe	mg L^{-1}	< 0.002	0.14	0.58
Zn	mg L^{-1}	< 0.006	0.122	1.62
Cd	µg L^{-1}	0.06	0.47	3.32
Ba	mg L^{-1}	< 0.02	0.17	0.74
Pb	mg L^{-1}	0.001	0.011	0.178
NH_4-N	µg L^{-1}	< 5.0	96.4	1990
NO_3-N	µg L^{-1}	7.5	1360	31900
PO_4-P	µg L^{-1}	< 1.5	72.9	3180
SO_4-S	mg L^{-1}	1.3	12.1	80
Si	mg L^{-1}	0.64	2.42	9.9
F	mg L^{-1}	0.025	0.26	1.30
Cl	mg L^{-1}	5.2	18.1	155

L'accumulation des cations a fait l'objet, quant à elle, de beaucoup plus d'études, motivées notamment par l'utilisation de ces organismes comme indicateurs de la pollution métallique. La propriété qu'ont les bryophytes d'accumuler les cations est attribuée aux capacités d'échanges cationiques de leur paroi cellulaire. Celle-ci est composée de groupements carboxyles, phénols, peptidiques qui sont autant de sites d'échange (Breuer et Melzer, 1990; Tyler, 1990). Clymo (1963) a mis en évidence une corrélation entre la teneur en acide polyuronique de la paroi et la capacité d'échange cationique (CEC) de la paroi. Les sites de fixation des cations, chargés négativement, sont situés au niveau des espaces intercellulaires (apoplasme), zones où les cations présents dans la solution qui baigne ces espaces, se fixent électrostatiquement aux sites d'échange. Ce processus est l'étape préalable à la pénétration intracellulaire de l'élément (Haynes, 1980). Les éléments associés aux bryophytes peuvent être divisés en 4 groupes selon leur localisation dans la plante (Brown et Bates, 1990). Ils peuvent être soit, i) piégés dans les matières particulaires déposées sur la feuille, ii) piégés dans les espaces intercellulaires, iii) fixés aux structures surfaciques de la paroi cellulaire, iv) présents dans la

cellule sous forme soluble ou insoluble. L'accumulation des cations dans la paroi cellulaire peut être décrite selon une équation simple proposée par Richardson (1981) :

$$(M)^{2+} + 2(AH) \quad \Leftrightarrow \quad (MA)^{+} + (A)^{-} + 2(H)^{+}$$

où $(M)^{2+}$, est l'ion métallique, $(H)^{+}$, le proton relargué, (AH), le site d'échange anionique. L'immobilisation dans la paroi ne peut pas cependant être réduite à un échange cationique entre l'élément et les protons. D'autres cations peuvent être mis en jeu, et la fixation de l'élément dépendra à la fois de son affinité intrinsèque pour le site d'échange, de sa concentration ainsi que de celle des autres cations dans la solution (Brown et Bates, 1990). Selon ces mêmes auteurs, les cations monovalents sont retenus de façon moins efficace que les cations divalents et l'accumulation des éléments varie en fonction à la fois, de leur affinité pour les sites d'échange, de leur concentration dans le milieu et de la présence d'autres ions compétiteurs. Par ses propriétés, la paroi cellulaire a donc un rôle de concentration des éléments présents parfois dans le milieu à de faibles concentrations, afin d'assurer les besoins en cations de la plante (Proctor, 1981).

Accumulation intracellulaire des éléments

L'accumulation intracellulaire des éléments nécessite leur passage au travers de la membrane plasmique par l'intermédiaire de sites de transport. L'entrée de l'élément est déterminée par son affinité pour le site de transport, par la présence éventuelle d'autres éléments qui entrent en compétition pour le même site, et par le taux de *turn-over* du site (Brown et Bates, 1990; Tyler, 1990). L'accumulation intracellulaire d'un élément est plus lente que son accumulation extracellulaire et peut être régulée à la fois par un transport actif, dépensant de l'énergie, et probablement par la concentration intracellulaire de l'élément (Brown et Bates, 1990). Pickering et Puia (1969) évoquent aussi l'existence d'un transport actif en décomposant l'accumulation du zinc par *Fontinalis antipyretica* en 3 phases, la dernière étant influencée par des facteurs environnementaux ayant une influence sur la physiologie de l'organisme, la lumière et la température.

Mouvement des éléments au sein de l'organisme

L'une des différences essentielles entre les plantes supérieures et les bryophytes est que les tissus de ces dernières sont peu différenciés et que l'on ne distingue pas toujours de système vasculaire différencié. Les bryophytes ne possèdent pas de réelles racines, souvent confondues avec le stolon effeuillé et les rhizoides qui les fixent au substrat. Cette caractéristique les oblige à se nourrir presque exclusivement par l'ensemble de leur surface dans l'environnement. De

nombreuses espèces, dites endohydriques, possèdent néanmoins un tissu conductif développé qui permet la circulation des éléments le long des tiges et des rameaux. Les mousses aquatiques sont par contre ectohydriques car elles ne possèdent pas de tissu conductif mis à part des jonctions protoplasmiques entre les cellules (Richardson, 1981). Les éléments sont alors directement accumulés par les feuilles en contact avec l'eau, seule source de nutrition.

I-3-4 ACCUMULATION PREFERENTIELLE DES METAUX

Le rôle de concentration des éléments de la paroi cellulaire est nécessaire pour les besoins de la plante en oligo-éléments tels que le cuivre, le cobalt, le fer, le manganèse, le molybdène ou le zinc, présents en faibles quantités dans le milieu (Proctor, 1981). L'accumulation passive et non sélective des métaux (Tyler, 1990) dans la paroi cellulaire peut aboutir à des concentrations très élevées lorsque le cours d'eau est soumis à une contamination d'origine anthropique (Tableau 1-4).

Tableau 1-4: Exemples de valeurs extrêmes de concentrations en métaux dans les mousses ($\mu g\ g^{-1}$ p.s.) prélevées lors de travaux *in situ*.

Cd	Cr	Cu	Fe	Hg	Mn	Ni	Pb	Zn	Références
23	8	113	143000	-	143000	694	120	2730	Wehr, 1983
14	62	78	7640	-	-	-	960	11800	Mouvet, 1984a
37	-	622	32300	-	-	-	359	1510	Mouvet, 1985
-	15000	3700	98300	-	-	-	2900	27700	Mouvet, 1985
78	-	119	13280	-	-	-	381	25	Say et Whitton, 1983
433	-	41	-	-	30010	-	110	-	Say *et al.*, 1981
225	-	59	-	0.88	-	-	-	27000	Mouvet *et al.*, 1993

C'est ainsi que l'on trouve dans les bryophytes des concentrations importantes d'éléments qui n'ont aucun rôle physiologique pour l'organisme comme le Cd ou le Pb. Si les cations divalents sont accumulés préférentiellement aux cations monovalents, les métaux, de part leur affinité supérieure aux autres cations pour les sites de surface, et de part la plus grande stabilité des complexes ainsi formés, font qu'ils sont, à concentrations équivalentes dans l'eau, accumulés préférentiellement aux autres cations (Breuer et Melzer, 1990). Ainsi, dans un cours d'eau non contaminé, la forte prédominance des alcalins et alcalino-terreux par rapport aux métaux compense leur plus faible affinité pour les sites de surface et permet leur accumulation. En cas de pollution métallique, l'augmentation des teneurs en métaux dans le milieu, ajoutée à l'affinité plus

grande des métaux pour les structures surfaciques, se traduit par l'accumulation des métaux au détriment des autres cations.

I-3-5 PENETRATION INTRACELLULAIRE DES METAUX

Le piège que constitue la paroi cellulaire ne semble pas être suffisant pour prévenir la pénétration de certains éléments indésirables à travers la membrane plasmique. Plusieurs travaux font état de l'action inhibitrice de certains métaux, le cuivre notamment, sur des fonctions cellulaires comme la croissance ou la photosynthèse chez l'espèce *Fontinalis antipyretica* (Haseloff et Winkler, 1980; Mouvet, 1984a). Brown et Whitehead (1986) observent la chute de la photosynthèse et des teneurs en chlorophylle *a* et *b* ainsi qu'une perte de potassium chez *Rhytidiadelphus squarrosus* exposée au mercure. Des effets similaires sont observés pour la même espèce exposée au Cd, Cu et Pb (Brown et Wells, 1990). En déterminant la fraction extracellulaire par une succession d'extraction par une solution de $NiCl_2$, et en obtenant par différence la fraction intracellulaire, les auteurs observent une relation approximativement linéaire entre la concentration estimée en métal intracellulaire et la chute de la photosynthèse. Skaar *et al.* (1974) ont mis en évidence par microanalyse X la présence de plomb intracellulaire chez *Rhytidiadelphus squarrosus*, espèce terrestre récoltée à proximité d'un axe routier très fréquenté. De même, des corps électroniques denses sont observés dans le cytoplasme de *Fontinalis antipyretica* préalablement exposée au chrome (Mouvet, 1984b). Satake et Miyisaka (1984) identifient des complexes de Hg-S à l'intérieur des cellules de *Jungermannia vulcanicola*. Cependant, ces d'observations ne sont pas systématiques chez toutes les espèces puisque Gullvåg *et al.* (1974) n'observent des inclusions intracellulaires de plomb que chez la première de deux espèces exposées à ce métal, *Rhytidiadelphus squarrosus* et *Hylocomium splendens*. De même, Satake *et al.* (1988) n'observent pas de cuivre localisé à l'intérieur des cellules de *Scopelophila cataractae*, espèce pourtant souvent associée aux substrats riches en cuivre.

La pénétration intracellulaire des métaux est aussi évoquée indirectement par Pickering et Puia (1969) pour l'accumulation du Zn par *Fontinalis antipyretica* et par Vray *et al.* (1992) pour les cinétiques d'accumulation du ^{106}Ru par *Rhynchostegium riparioides*. Ces auteurs considèrent qu'à une phase d'adsorption rapide succède une phase d'absorption plus lente à travers la membrane plasmique avec une dépense d'énergie. Beaugelin-Seiller *et al.* (1995) proposent un modèle d'accumulation qui, comme l'ont fait les auteurs précédemment cités, considère 2 phases successives (Figure 1-6). Cependant, aucun de ces travaux ne fournit d'indication chiffrée sur l'importance de cette fraction intracellulaire qui permettrait de savoir si sa contribution à la quantité totale de métal accumulée par la mousse est significative. Burton et Peterson (1979) observe la distribution du ^{65}Zn adsorbé dans la paroi de *Fontinalis antipyretica* en suivant les concentrations en métal d'une part dans les fractions solubles et insolubles dans

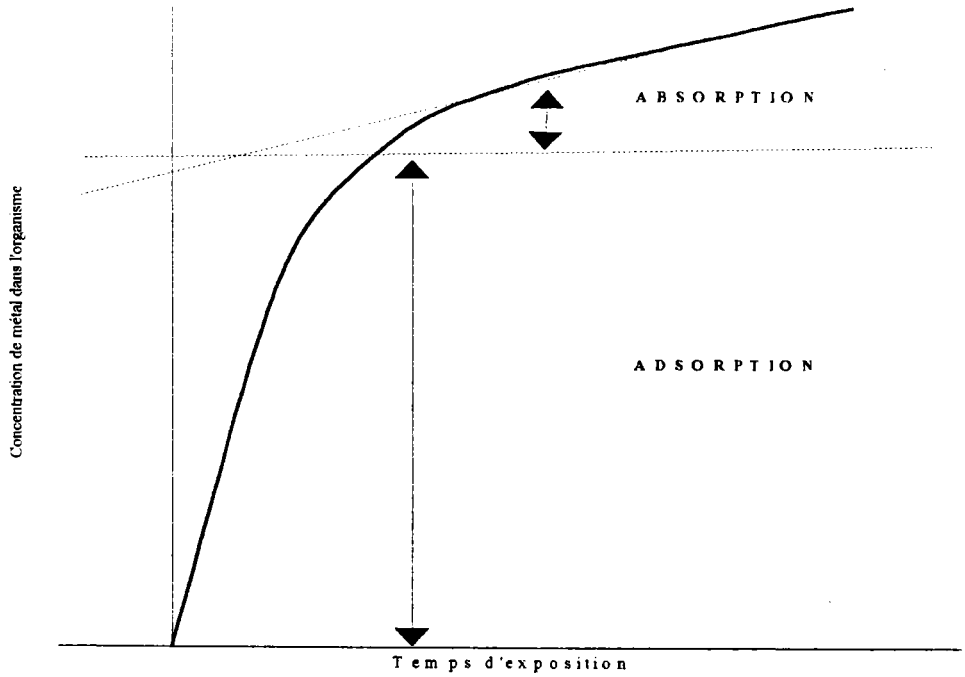


Figure 1-6: Contributions relatives de l'adsorption et de l'absorption d'un élément (d'après Beaugelin-Seiller *et al.*, 1995).

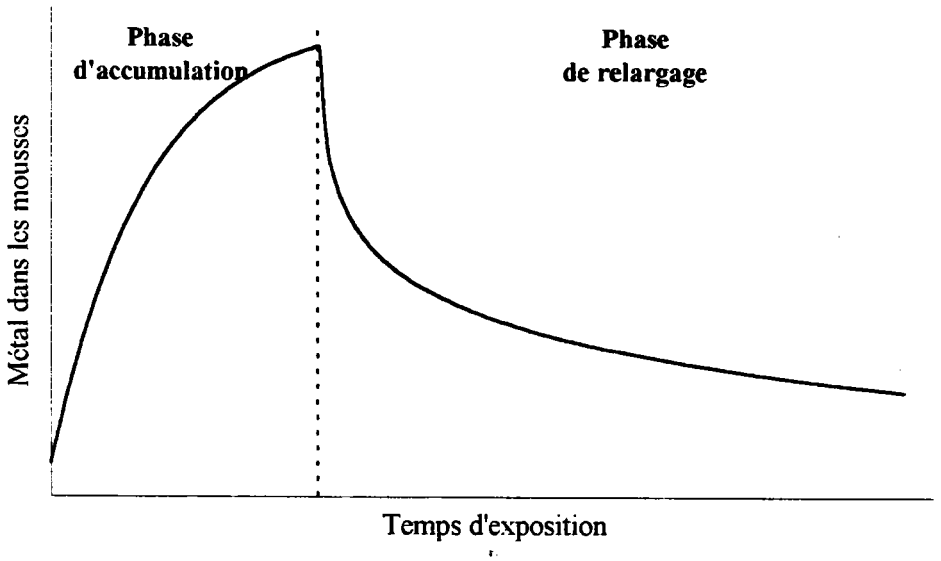


Figure 1-7: Evolution théorique des métaux dans les mousses pendant la phase d'exposition au métal et en absence de métal dans le milieu d'exposition.

l'alcool, et d'autre part après fractionnement des cellules par une centrifugation différentielle. Il résulte du premier traitement qu'au moins 90% du Zn est sous forme insoluble, piégé dans les structures surfaciques de la paroi. La centrifugation différentielle permet d'observer que 80% du Zn est présent dans les débris organiques de la paroi mais aussi que 7% sont localisés dans les mitochondries. Wells et Brown (1987 et 1990) observent notamment l'effet inhibiteur de la présence croissante de Ca, Mg, Na, K sur l'accumulation extra- et intracellulaire du Cd chez *Rhytidiadelphus squarrosus* démontrant ainsi l'effet régulateur de l'environnement ionique de la paroi sur l'accumulation de ce métal. Le fait que le calcium inhibe l'accumulation intracellulaire du Cd suggère que ces deux éléments utilisent les mêmes sites de transport. Ainsi, les éléments non physiologiques profiteraient, d'une part, de leur forte capacité de complexation avec les sites de surface de la paroi, et d'autre part, de certaines de leurs propriétés chimiques semblables à d'autres éléments physiologiques, pour passer la membrane plasmique.

I-3-6 CINETIQUES D'ACCUMULATION ET DE RELARGAGE DES METAUX PAR LES BRYOPHYTES AQUATIQUES

La résultante de l'accumulation extra- et intracellulaire des métaux est une cinétique qui peut être scindée en deux phases (Figure 1-7).

Face à une augmentation de la teneur en métal dans le milieu, les mousses accumulent rapidement le métal durant une période variant de quelques heures à quelques jours selon les conditions expérimentales. La vitesse d'accumulation durant cette phase est interprétée comme la résultante d'un mécanisme physico-chimique d'adsorption au niveau des sites de fixation de la paroi cellulaire. Cette première phase est suivie d'une accumulation plus lente qui tend vers un plateau d'équilibre (Figure 1-7). C'est durant cette phase que certains auteurs (Pickering et Puia, 1969; Vray *et al.*, 1992; Beaugelin-Seiller, 1994) considèrent qu'une fraction du métal adsorbée traverse la membrane plasmique en engageant des fonctions physiologiques dépensant de l'énergie. Ce passage du métal à travers la membrane aurait pour conséquence une diminution de la concentration en métal localisé dans la paroi, qui, se trouvant alors en déséquilibre avec le milieu extérieur, accumule de nouveau pour combler le déficit de métal. Le plateau d'équilibre vers lequel tendent les concentrations en métal dans la mousse est fonction principalement de la teneur d'exposition comme le montrent plusieurs études de cinétique menées en laboratoire (Figure 1-8 et 1-9). *In vitro*, la relation entre les teneurs d'exposition en métal et les concentrations accumulées par les mousses est quasi linéaire, du moins pour une gamme de concentration similaire à ce que l'on est susceptible d'observer dans la nature. En effet, l'exemple du Zn (Figure 1-8) montre, qu'au delà d'une certaine concentration dans l'eau, supérieure à 1000 $\mu g\ L^{-1}$, l'accumulation du métal par les mousses n'est plus proportionnelle à la concentration

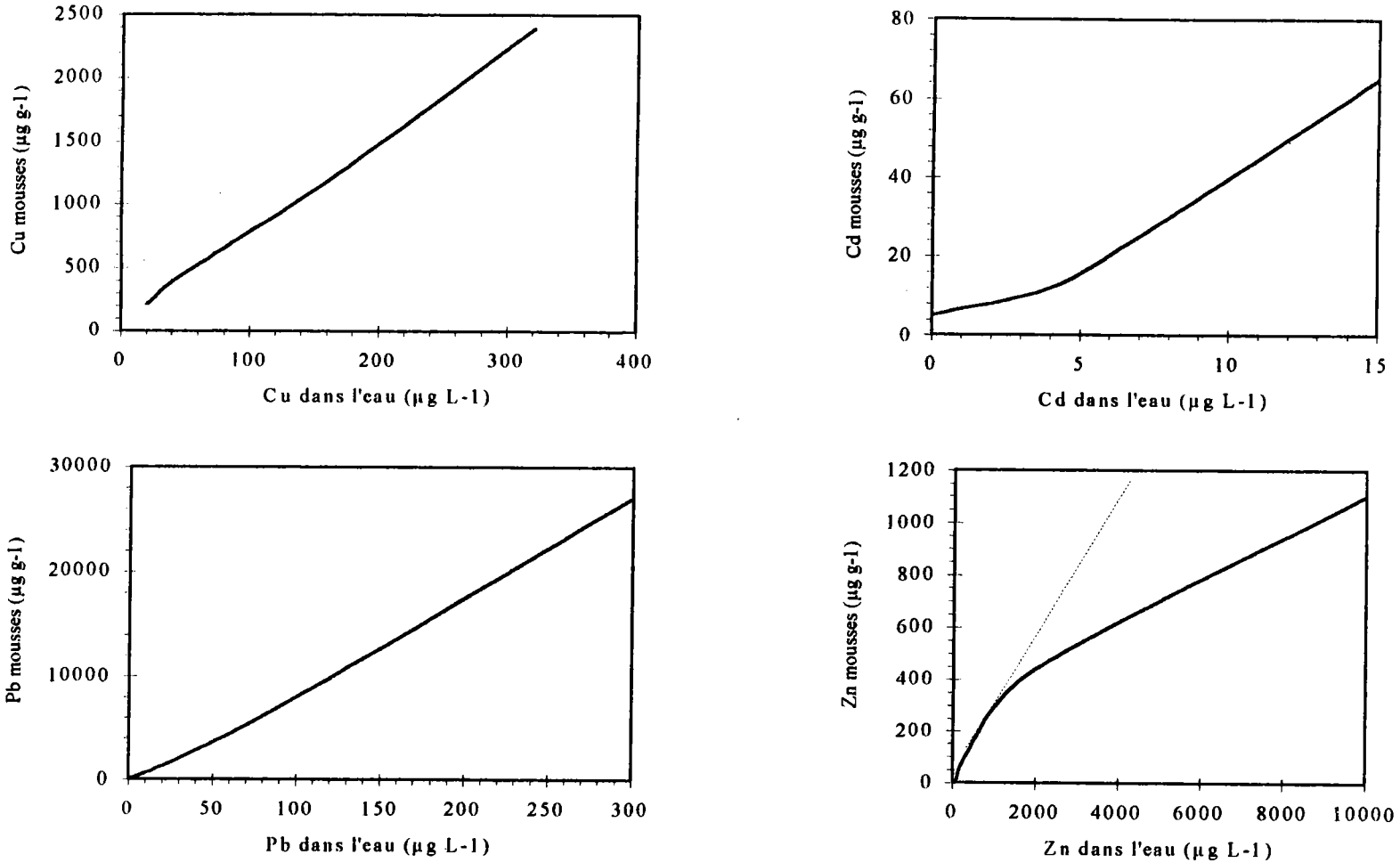


Figure 1-8: Concentrations en Cu, Cd et Pb dans l'espèce *Rhynchostegium riparioides* en fonction de la teneur d'exposition dans le milieu (adapté de Claveri *et al.*, 1994 et Mouvet, 1987) et en Zn dans *l'espèce Clindotus danubicus* (adapté de Empain, 1977).

dans l'eau, ce qui se traduit par un fléchissement de la courbe. Ce fléchissement pourrait révéler un phénomène de saturation des sites de fixation de la paroi cellulaire.

Comme pour l'accumulation, les cinétiques de relargage des métaux par les mousses aquatiques peuvent se décomposer en deux phases (Figure 1-7). La première se traduit par une désorption rapide du métal correspondant probablement à la fraction extracellulaire du métal préalablement accumulé. La seconde plus lente tend vers un pseudo-équilibre. Il semble en effet qu'une fraction non négligeable, dont l'importance dépend de la quantité accumulée au préalable, ne soit pas relarguée. En effet, on peut mettre en relation, comme pour l'accumulation, la quantité de métal résiduelle dans la mousse après plusieurs jours de relargage et la teneur préalable d'exposition (Figure 1-10).

I-3-7 FACTEURS DU MILIEU INFLUENCANT L'ACCUMULATION ET LE RELARGAGE DES METAUX

Les facteurs du milieu susceptibles d'avoir des conséquences sur les cinétiques d'accumulation sont essentiellement les paramètres dits de spéciation, c'est à dire les facteurs qui régissent la répartition du métal total présent dans le milieu sous ces différentes formes chimiques, y compris celles accumulables par les mousses aquatiques. Si plusieurs travaux ont été consacrés à l'influence du pH, des matières organiques et inorganiques, à l'interaction entre les cations majeurs et les autres métaux sur la spéciation des métaux dans l'eau, plus rares sont les études portant sur l'influence de tels paramètres sur les cinétiques d'accumulation par les bryophytes aquatiques. Cela peut s'expliquer par le fait que ces paramètres de spéciation ont un rôle complexe en amont des phénomènes d'accumulation des métaux par les mousses. Les quantités de métal accumulées par ces organismes ne sont que la résultante des phénomènes complexes impliquant ces paramètres qui influent sur l'abondance de la fraction disponible pour la biomasse.

Le pH est probablement le paramètre qui a été le plus étudié, notamment par le biais des études sur les phénomènes d'acidification. Connaissant le processus d'échanges à l'interface eau-bryophytes, le rôle du pH est prépondérant. L'acidification du milieu entraîne une augmentation des teneurs en protons, qui deviennent compétiteurs des métaux pour les sites d'adsorption de la paroi cellulaire (Whitton *et al.*, 1982; Caines *et al.*, 1985). En suivant les concentrations en métaux dans l'eau en parallèle avec les concentrations dans les mousses prélevées dans 21 étangs dont le pH varie de 2.7 à 8.6, Havas et Hutchinson (1987) distinguent trois réponses des mousses différentes selon les métaux. La première réponse est une corrélation positive entre les concentrations en Al et Fe dans l'eau et les concentrations dans les mousses, et une corrélation négative entre les teneurs dans l'eau et le pH. La seconde, concernant Ca, Mg, Mn et Ni, est une corrélation négative entre les teneurs en métal dans l'eau et les quantités accumulées par les

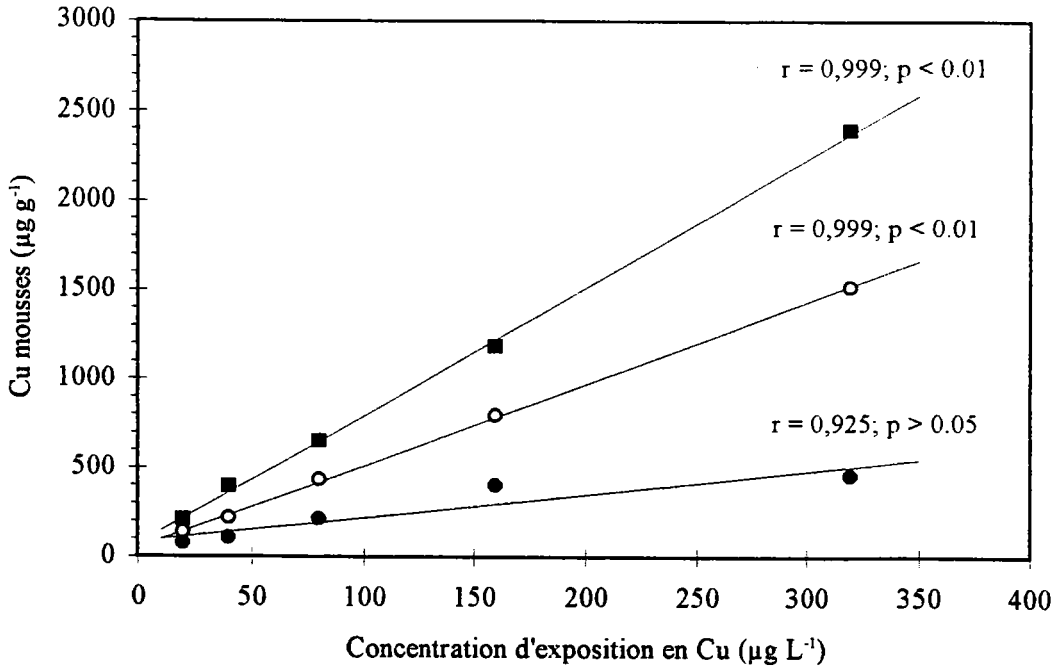


Figure 1-9: Relation entre les concentrations d'exposition en Cu dans l'eau et les quantités de métal accumulées par les mousses après (•) 24, (o) 72 et (■) 168 heures d'exposition.

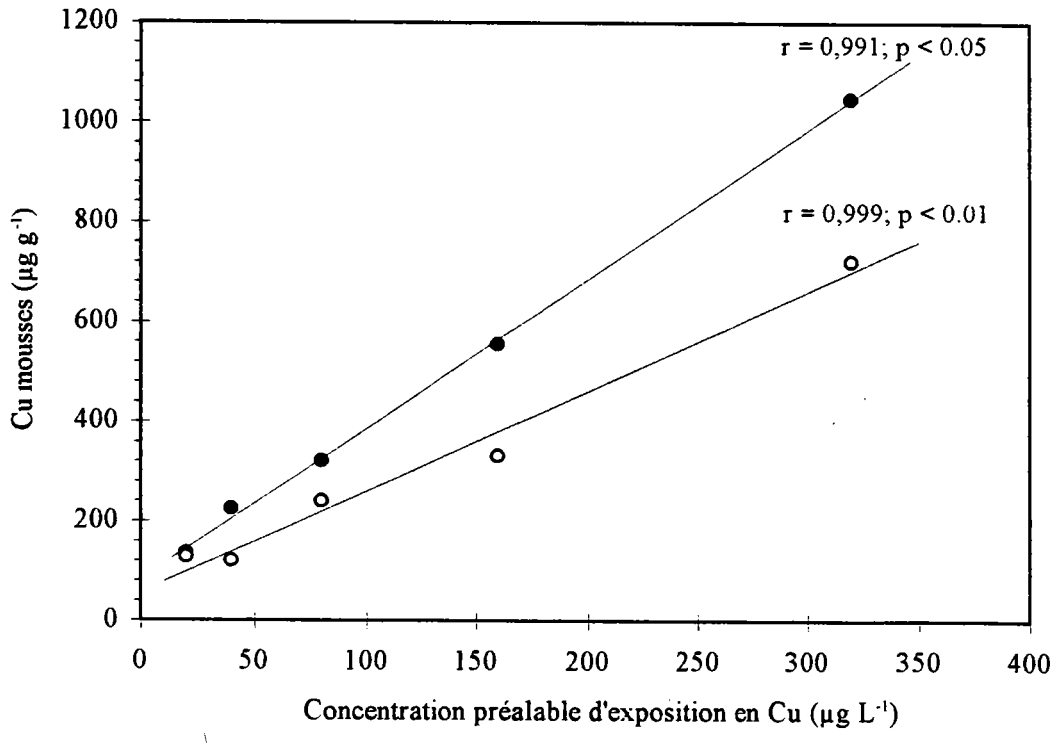


Figure 1-10: Relation entre les quantités de métal relarguées par les mousses après (•) 72 et (o) 240 heures dans un milieu exempt de métal et les concentrations préalables en Cu dans l'eau.

bryophytes alors que les teneurs dans l'eau sont positivement corrélées au pH. Enfin, la troisième réponse que distinguent ces auteurs est l'absence de corrélation entre ces trois variables pour Ba et Zn. L'emploi de mousses transplantées dans des ruisseaux acides du massif vosgien tend à confirmer ces observations pour Al, Fe et Mn (Mersch *et al.*, 1993). Ces expériences, effectuées dans des conditions extrêmes de pH et de faible minéralisation, montrent quelle peut être l'influence du pH sur l'accumulation des métaux par les mousses. Elles révèlent, entre autres, les réponses très différentes selon le métal considéré. Cependant, dans des conditions que l'on peut qualifier d'habituelles, où le pH oscille entre 6.5 et 9.0, les perturbations liées aux pH sont limitées du fait du pouvoir tampon des eaux minéralisées. Ainsi, le suivi en laboratoire des concentrations en Zn dans les mousses en fonction du pH ne révèle pas de grandes variations de concentration dans les organismes dans une gamme de pH susceptible d'être rencontrée *in situ*, entre 6.5 et 8.2 (Wehr *et al.*, 1987).

Outre le pH, *i.e.* la concentration en protons, les cations majeurs du milieu aquatique que sont Ca, Mg, Na et K peuvent devenir compétiteurs des métaux pour les sites d'échanges surfacique de la paroi cellulaire. Breuer et Melzer (1990) déterminent l'accumulation préférentielle des éléments par des sphaignes et donnent le classement décroissant suivant: Pb > Cd ≥ Ca > Mg > K > Na > NH_4. Ce classement suit la règle physico-chimique postulant que les cations divalent sont accumulés préférentiellement aux cations monovalents (Brown et Bates, 1990). Parmi ces éléments, l'accumulation du Cd semble être en compétition avec Ca. Cette observation est corroborée par Brown et Beckett (1985) qui remarquent la diminution de l'accumulation du Cd par des mousses terrestres lorsque les concentrations en Ca et Mg augmentent dans le milieu d'exposition. Sommer et Winkler (1982) constatent que l'effet inhibiteur du Cd sur la photosynthèse de *Fontinalis antipyretica* se fait d'autant moins ressentir que la concentration en Ca dans le milieu est importante. Cet effet inhibiteur de Ca sur l'accumulation des métaux est aussi évoqué par Pickering et Puia (1969) et Say et Whitton (1983) sur *Fontinalis antipyretica*, et par Wehr et Whitton (1983a) sur *Rhynchostegium riparioides*.

Comme pour les autres paramètres, la présence de matières organiques (acides humiques et fulviques), inorganiques (chlorures, sulfates, carbonates) et des matières en suspension influent sur les quantités de métal accumulables par les mousses en amont des phénomènes étudiés, en intervenant sur la répartition du métal en différentes formes chimiques, disponibles ou pas pour les organismes (Livens , 1991).

I-3-8 CHAMP D'APPLICATION DES MOUSSES AQUATIQUES COMME TRACEURS DE LA CONTAMINATION METALLIQUE

Les avantages des mousses aquatiques

Leur large répartition géographique et leur résistance élevée à la pollution comparés à d'autres organismes sont les premiers avantages qui font des mousses aquatiques des indicateurs de pollution métallique largement employés. A ces premiers avantages, on peut y ajouter leur échantillonnage simple et facile, leur ubiquité, leur pérennité, le conditionnement et le traitement simple de l'échantillon ainsi que leur manipulation aisée en laboratoire. Leur grande capacité d'accumulation (Tableau 1-5) les mets souvent en concurrence avec un autre indicateur souvent utilisé, le sédiment (André et Lascombe, 1987; Gonçalves *et al.*, 1992).

Tableau 1-5: Facteurs de pollution maximum (FP = concentration observée / concentration de référence) dans les bryophytes et les sédiments du bassin Rhône-Méditerranée (d'après André et Lascombe, 1987)

Eléments	FP Maximum	
	Bryophytes	Sédiments
Cr	1378	30
Mn	26	6
Cu	34	17
Zn	59	23
Cd	19	19
Fe	4	3
Pb	24	22
Hg	130	123

André et Lascombe (1987) ont utilisé ces deux indicateurs sur l'ensemble du réseau hydrographique du bassin Rhône-Méditerrannée et concluent à l'avantage des bryophytes comme traceurs de la micropollution métallique, conclusion corroborée par Baudin *et al.* (1992) qui utilisaient en parallèle plusieurs indicateurs de la contamination radioactive tels les poissons, le sédiment et les mousses aquatiques.

Les différentes méthodologies

A l'instar des méthodes d'évaluation des retombées atmosphériques d'aérosols par l'intermédiaire des mousses terrestres et des lichens (Burton, 1990; Lawrey, 1993; Sloof et Wolterbeck, 1993; Loppi *et al.*, 1994; Steinnes *et al*, 1994), les mousses aquatiques sont employées pour l'évaluation de la contamination métallique selon deux stratégies. La première fait appel aux mousses autochtones, la seconde a recours à des organismes transplantés (ou allochtones) provenant d'un site exempt de contamination et transférés sur le(s) site(s) d'étude. Mersch (1993) définit respectivement ces deux stratégies comme méthode de surveillance passive et méthode de surveillance biologique active de la contamination métallique du milieu.

La première d'entre elles est la plus simple à mettre en oeuvre puisqu'elle consiste simplement à collecter des organismes autochtones. Cette méthode permet ainsi d'obtenir une estimation de la fraction métallique présente dans le milieu susceptible d'être transférée dans les organismes végétaux vivants dans le milieu prospecté. Mouvet (1986) considère en effet qu'il existe des similitudes entre les mécanismes d'accumulation des bryophytes et du phytoplancton, les premières, plus facile à manipuler, offrent une image fiable des possibilités de transfert des métaux dans la chaîne trophique même si les mousses aquatiques n'ont pas *a priori* un rôle fondamental dans cette chaîne trophique. Cette méthode souffre néanmoins de quelques inconvénients liés en premier lieu à leur répartition très hétérogène le long d'un même cours d'eau ou d'un bassin. L'exploitation des données peut être aussi altérée par les variations inter-spécifiques et par l'historique de la contamination du cours d'eau prospecté. Selon le type de contamination du cours d'eau, chronique ou intermittent, selon le régime d'écoulement (crue, étiage), les mousses aquatiques, par leur réponse rapide aux fluctuations de concentrations dans l'eau, ne peuvent donner à coup sûr une estimation très précise du niveau moyen de contamination sur une longue période. Se basant sur ce constat, Mersch (1993) et Mersch et Johansson (1993) proposent d'utiliser la mousse aquatique parallèlement à l'emploi d'un autre indicateur complémentaire, la moule zébrée, *Dreissena polymorpha*, la première servant d'indicateurs de la contamination récente, la seconde, d'indicateur de la contamination à long terme. Dans cet optique, certains auteurs (e.g. Say *et al.*, 1981) n'utilisent que les deux derniers centimètres des apex de mousse. Il s'avère en effet qu'il existe un gradient de concentration en métal croissant des parties les plus jeunes de la plante vers les parties les plus âgées, gradient observé chez l'hépatique *Scapania undulata* (Whitton *et al.*, 1982) et chez les mousses *Fontinalis antipyretica* et *Rhynchostegium riparioides* (Wehr *et al.*, 1983). Ce gradient de concentration est expliqué à la fois par la durée d'immersion plus longue des parties âgées de la plante et par le dépôt de calcaire, d'oxyde de manganèse et de fer, offrant ainsi plus de site de fixation pour les métaux (Wehr *et al.*, 1987). Cependant, le choix des apex terminaux modifie la signification de l'information recueillie et la stratégie d'échantillonnage. Les jeunes pousses donnant une

représentation de la contamination récente, la fréquence d'échantillonnage doit être augmentée si l'objectif est d'obtenir une estimation de la contamination sur de longue période (Wehr et Whitton, 1983a).

L'utilisation de mousses allochtones permet de pallier l'absence de mousses autochtones sur des stations jugées intéressantes par l'expérimentateur et de s'affranchir de la variabilité inter-spécifique en n'utilisant qu'une seule espèce provenant d'un même site de collecte. Outre l'avantage de travailler avec un lot homogène, il ne peut y avoir d'ambiguïté sur l'origine des métaux accumulés par la mousse transplantée, collectée à l'origine sur un site non contaminé, appelé site de référence. A l'instar des apex terminaux, l'emploi des mousses transplantées donne une estimation de la contamination métallique récente du site étudié, valable pour la durée de l'immersion.

Les différentes applications faisant appel aux mousses aquatiques

En constituant l'un des compartiments du milieu capable d'accumuler les métaux à des concentrations très élevés, les bryophytes aquatiques se trouvent être l'un des organismes les plus souvent employés dans les études concernant l'évaluation de la micropollution métallique, et ce, dans de nombreux pays. Ces organismes sont utilisés en France (André et Lascombe, 1987; Mouvet *et al.*, 1993), dans la péninsule ibérique (Gonçalves *et al.*, 1992; Lopez *et al.*, 1994), en Grande Bretagne (Say *et al.*, 1981; Wehr et Whitton, 1983a; Say et Whitton, 1983; Caines *et al.*, 1985), au Bénélux (Samecka-Cymerman *et al.*, 1991, Mersch et Pihan, 1993) ,en Finlande et en Suède (Lehtonen, 1989; Swedish Protection Agency, 1991). En France, ces organismes ont surtout fait l'objet du développement d'un programme de surveillance du réseau hydrographique géré par les Agences de l'Eau. Ce programme est basé sur l'établissement d'une grille de qualité à 5 niveaux qui permet, en se référant à des valeurs de référence (Tableau 1-6) d'obtenir une estimation semi-quantitative de la contamination métallique par le dosage des métaux dans les mousses.

Tableau 1-6: Concentrations de référence standard pour les métaux dans les mousses aquatiques (d'après Mouvet, 1986)

Concentrations dans les mousses $\mu g\ g^{-1}$ p.s.									
As	Cd	Cr	Cu	Hg	Ni	Pb	Zn	Fe	Mn
3	1	7	19	0.08	20	19	200	3000	600

Pour chaque métal, le Facteur de Pollution (FP), défini comme le rapport entre la concentration observée dans l'organisme prélevé et la concentration de référence, peut être calculé. La grille de qualité a été établie à partir de ce facteur. Les limites de classe, établies selon une progression géométrique de raison 3, permettent de distinguer 5 niveaux (Tableau 1-7).

Tableau 1-7: Grille de qualité basée sur le dosage des métaux dans les mousses aquatiques (d'après Mouvet, 1986).

Classe	FP	Interprétation
M0	$FP \leq 2$	Situation normale
M1	$2 < FP \leq 6$	Situation suspecte
M2	$6 < FP \leq 18$	Pollution certaine
M3	$18 < FP \leq 54$	Pollution importante
M4	$54 < FP$	Pollution exceptionnelle

En utilisant le principe de la grille de qualité, les mousses aquatiques deviennent un outil d'aide à la décision pour le gestionnaire permettant à celui-ci le repérage et l'évaluation semi-quantitative des sites soumis à une contamination métallique. Il est à noter que, dans ce cadre, les mousses transplantées sont aussi employées selon le même principe lorsque les sites prospectés ne comportent pas de mousses autochtones. En général, le programme de surveillance du réseau hydrographique fait appel en majorité (89 %) à deux espèces, *Fontinalis antipyretica* et *Rhynchostegium riparioides* et au genre *Clinclidotus*, les 11 % restant étant majoritaire constitués de l'espèce *Amblystegium riparium* .

Une seconde application, directement dérivée de la première, consiste à utiliser les mousses aquatiques pour la localisation fine de source de pollution le long d'un même cours d'eau (Mouvet *et al*, 1986). Cette méthode est facilement applicable grâce notamment à l'emploi d'échantillons transplantés, qui permet de choisir sans grande restriction, les sites d'études en fonction des rejets suspectés. Une application originale a consisté à utiliser les mousses aquatiques comme support analytique permettant de mettre en évidence la présence de Hg, métal choisi comme traceur des échanges d'eau entre la nappe phréatique et le Rhin (Roeck *et al*, 1991).

La rapidité des cinétiques d'accumulation des métaux par les mousses associée à leur capacité à garder une trace d'une contamination passée permet aussi d'envisager l'utilisation des mousses aquatiques pour la détection de pollution accidentelle. Mouvet *et al.* (1993) fournissent un exemple *in situ* en suivant en particulier les concentrations en mercure dans des mousses

prélevées dans le Rhin 13 jours après l'accident de Sandoz. La détermination des concentrations en Hg dans l'eau a révélé la fugacité de la pollution puisque le pic de pollution n'a été décelé que dans un seul échantillon journalier. Les auteurs montrent que, 13 jours après l'accident, la détermination des concentrations métalliques dans les mousses révèlent des concentrations en Hg qui sont encore jusqu'à 5 fois supérieures à la valeur de référence. L'intérêt de cet effet mémoire est aussi mis en évidence par ces mêmes auteurs en étudiant la contamination métallique du Lot à hauteur de Cahors. L'analyse de l'eau révèle un pic de pollution en Cd et Zn qui s'étale sur environ 3 jours. Cela se traduit par l'accumulation de ces métaux par les mousses aquatiques puis par un relargage des métaux lorsque la situation redevient normale. Ce relargage n'est cependant pas suffisant pour empêcher, 3 jours après la pollution, l'observation de concentrations résiduelles élevées en Cd et Zn dans les mousses.

Chapitre II
Matériels et méthodes

II-1 CHOIX DES SITES DE PRELEVEMENT

La plupart des expériences décrites ultérieurement font appel à la méthode des transplants de mousses aquatiques. Pour les expériences de laboratoire ou de terrain, il est nécessaire que le matériel biologique ne soit pas à l'origine soumis à une pollution métallique. Le site de prélèvement approprié doit pouvoir fournir tout au long de l'année des mousses en abondance pour lesquelles les concentrations en métaux ne dépassent pas une valeur de référence. Cette valeur guide est censée correspondre à une situation où le cours d'eau n'est pas soumis à une contamination métallique. En France, ces valeurs ont été définies par Mouvet (1986) à partir de données obtenues dans des mousses théoriquement non soumises à une contamination métallique. Elles ont ensuite servi à l'établissement des grilles de qualité utilisées par les Agences de l'Eau. Un des critères de sélection des sites de collecte des mousses nécessaires aux expériences de laboratoire et de terrain est basé sur ces valeurs de référence. Deux sites de prélèvement ont été utilisés dans ce travail, Commercy sur la Meuse fournissant le matériel biologique pour les expériences menées sur les sites nucléaires, Hatrize sur l'Orne pour les autres expériences.

On notera cependant que ces valeurs de référence ne doivent pas être prises comme des valeurs absolues mais plutôt comme des valeurs guides. En effet, une intercomparaison des valeurs proposées dans d'autres pays, obtenues par simple observation ou par calcul statistique, révèle la disparité de ces valeurs entre les différents auteurs (Tableau 2-1).

De plus, les concentrations en métaux dans les mousses montrent des variations saisonnières. Wehr et Whitton (1983b) remarquent de telles variations sur des échantillons collectés mensuellement. Ils estiment cependant que ces variations temporelles n'affectent pas de façon significative l'évaluation de la contamination métallique. Le suivi bimensuel du site de Commercy, utilisé comme site de référence depuis plusieurs années dans le cadre du suivi des concentrations métalliques au droit de la centrale nucléaire de Cattenom, ne corrobore pas la conclusion de ces auteurs. Ainsi, on peut noter une variation importante des concentrations en métal dans les mousses. Exprimées en pourcentage de la valeur maximale mesurée, on peut observer l'évolution au cours de l'année des concentrations métalliques dans les mousses avec un

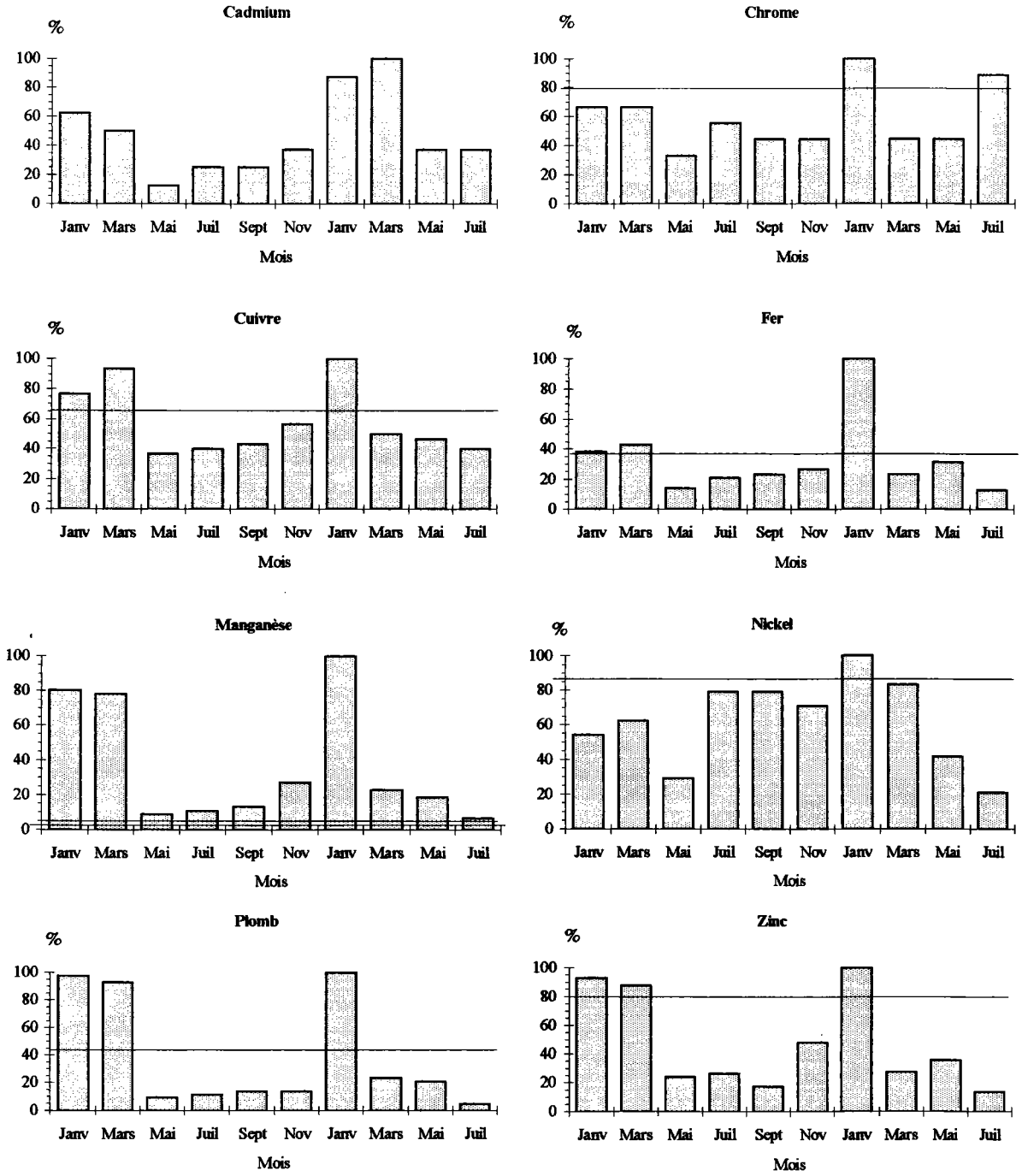


Figure 2-1: Evolution saisonnière des concentrations en métaux dans des mousses autochtones provenant du site de Commercy. Les concentrations sont exprimées en pourcentage de la concentration maximale observée. (-) correspond au pourcentage représentant la concentration de référence (Mouvet, 1986). Le pourcentage représentant la concentration de référence pour le Cd est 120 %.

maximum en hiver (Figure 2-1). En plus des différences observées entre les auteurs, l'évolution dans le temps des concentrations dans les sites de référence rend encore plus délicate la définition de concentrations de références standards.

Tableau 2-1: Valeurs guides ou minimales en métaux rencontrées dans les mousses aquatiques non soumises à des pollutions anthropiques.

Concentrations en métaux dans les mousses (µg g^{-1} p.s.)										Références
As	Cd	Cr	Cu	Fe	Hg	Mn	Ni	Pb	Zn	
-	0.5	2.3	5.4	1810	-	280	13.8	30.9	128	Wehr et Whitton, 1983a
-	1 à 5	2 à 10	-	-	-	-	-	25 à 100	100 à 250	Wehr, 1983
3	1	7	19	3000	0.08	0.6	20	19	200	Mouvet, 1986
-	1	5	10	-	0.05	-	10	3	100	Swedish Agency, 1991
-	0.4	5	35	-	-	-	-	23	69	Gonçalves *et al*, 1992
-	1	4	36	-	-	-	8	13	217	Gonçalves *et al*, 1994

Dans la majorité des cas, les variations saisonnières des concentrations en métaux dans les mousses ne dépassent pas les valeurs des concentrations de références, excepté pour le plomb (3 fois sur 10) et le manganèse (8 fois sur 10). Pour ces deux métaux, le site ne répond donc pas totalement aux exigences requises pour un site de référence. Ce problème de variation saisonnière des concentrations métalliques mis en évidence sur ce site serait probablement observé sur d'autres sites.

II-2 COLLECTE DES ORGANISMES

Toutes les expériences décrites ultérieurement font appel exclusivement à l'espèce *Rhynchostegium riparioides*. Même si en théorie, les mousses aquatiques peuvent être prélevées toute l'année (Wehr et Whitton, 1983b), les meilleures époques pour une récolte abondante et de qualité sont la fin du printemps et l'automne, c'est-à-dire avant et après les proliférations algales qui gênent considérablement la croissance des mousses.

L'échantillon est collecté par touffe entière en évitant autant que possible d'arracher la base fixée au substrat. Le prélèvement est effectué dans une zone où l'on est sûr que les mousses sont constamment immergées (en profondeur ou dans la veine principale du courant). Profitant du courant et de l'abondance de l'eau, les mousses récoltées sont placées dans un grand tamis en PVC et subissent un premier lavage avant d'être ramenées au laboratoire dans une glacière

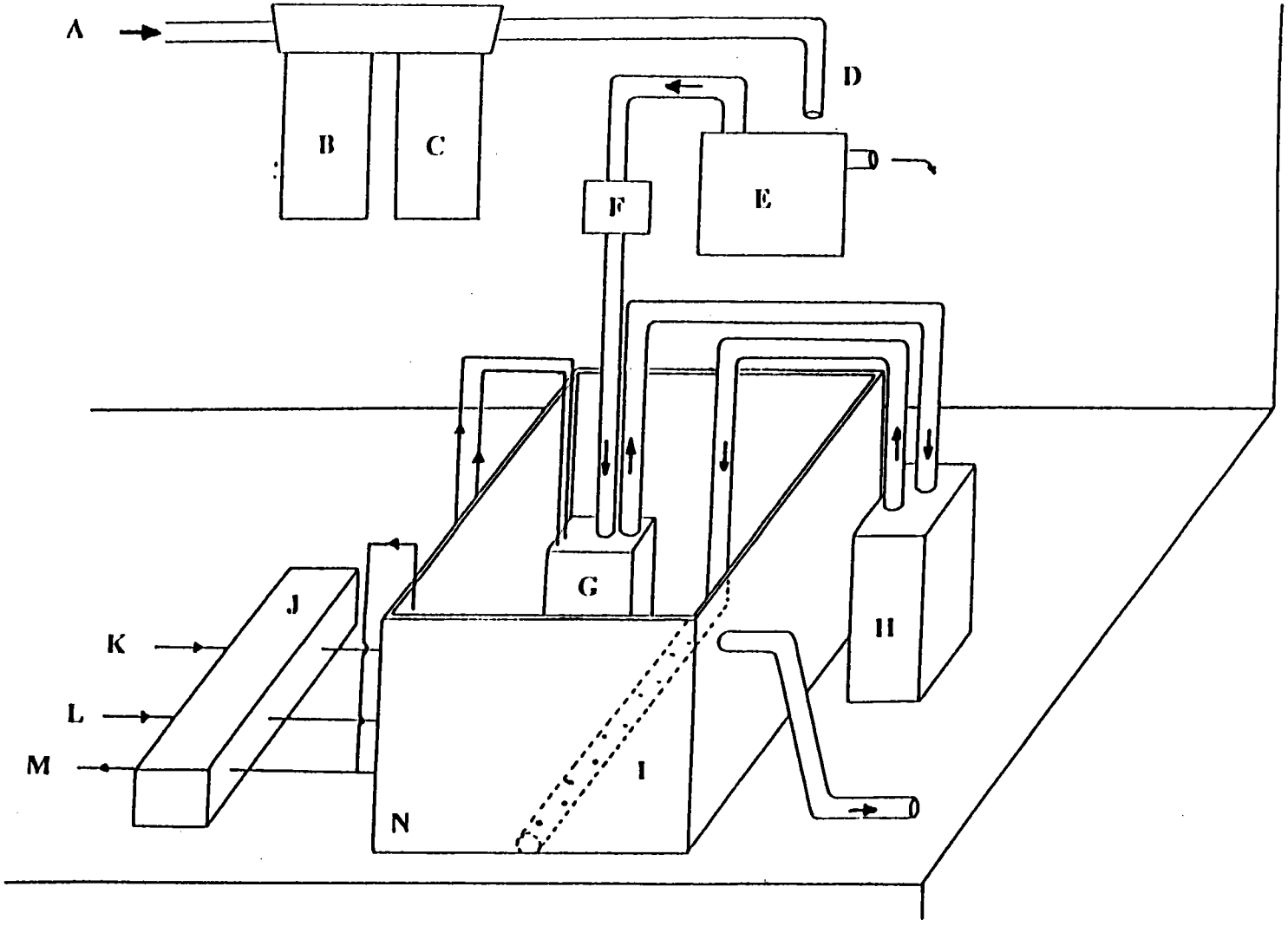


Figure 2-2: Schéma de principe d'une unité expérimental. A: arrivée d'eau de distribution; B: Cartouche filtrante; C: Cartouche de charbon actif; D: Eau déchlorée; E: Bac intermédiaire; F: Pompe péristaltique à débit réglable; G: réservoir de mélange; H: Pompe centrifuge d'homogénéisation; I: crépine de restitution; J: pompes péristaltiques multicanaux; K: apport d'EDTA; L: apport de solution métalliques; M: prélèvement d'eau en continu; N: bac PVC (18 litres). Les flèches représentent le sens d'écoulement de l'eau.

remplie d'eau de rivière. L'échantillon ainsi récolté peut être conservé frais au laboratoire pendant quelques jours dans une eau déchlorée, oxygénée et renouvelée quotidiennement.

II-3 DISPOSITIF EXPERIMENTAL DE LABORATOIRE

Le dispositif expérimental de laboratoire est largement inspiré du dispositif précédemment utilisé au CREUM (Mouvet, 1987). Un tel dispositif vise à s'écarter le moins possible des conditions physiques dans lesquelles se trouvent les mousses *in situ*. Pour cette raison, le choix s'est porté sur un système alimenté en continu par l'eau de distribution de la ville préalablement déchlorée sur charbon actif.

Les expériences sont menées dans une salle climatisée (15 °C) dont la photopériode peut être contrôlée (16/8). Le dispositif est constitué d'un nombre d'unités expérimentales variable selon l'étude. Une unité expérimentale est constituée d'un bac PVC d'un volume de 18 litres (Figure 2-2). La circulation et l'homogénéisation du milieu dans le bac sont assurées par une pompe centrifuge (EHEIM, type 1026) d'un débit de 6 l min^{-1} prélevant l'eau par l'intermédiaire d'un tuyau plongeant dans le réservoir de mélange, le retour d'eau se faisant par une crépine plaquée au fond du bac.

Le dispositif est alimenté par l'eau de distribution préalablement déchlorée sur du charbon actif. Une pompe péristaltique (Masterflex) munie d'un régulateur de débit (Cole Parmer) alimente l'unité expérimentale par l'intermédiaire du réservoir de mélange. Un trop plein permet l'évacuation en continu de milieu en excès. Le débit est réglé pour l'ensemble des expériences à 0.5 l min^{-1}, ce qui assure un temps de renouvellement du milieu de 35 minutes.

L'apport continu des diverses solutions de contaminants et de complexant est assuré par une pompe péristaltique multicanaux (Ismatec IPN 16 et IPS 16). Ces solutions sont amenées dans le réservoir de mélange par des tuyaux capillaires. Les solutions de métaux sont préparées à partir de leur sels (chlorure ou nitrate) dilués dans de l'eau distillée à des concentrations qui fournissent, après dilution avec l'eau de distribution, la concentration d'exposition désirée. L'étude des cinétiques de relargage s'effectue sans interruption de l'expérience, simplement par l'arrêt de l'apport de solutions métalliques.

Pour toutes les expériences de laboratoire, l'EDTA est utilisé comme complexant à une concentration dans le milieu d'exposition de 2 mg L^{-1}, qui, contrairement aux solutions métalliques, est injecté dans le milieu d'exposition pendant la phase d'exposition aux métaux et pendant la phase de relargage. L'EDTA permet de simuler les capacités complexantes des eaux de

rivière. La concentration de 2 mg L^{-1} a été choisie car elle entraîne un taux d'accumulation des métaux dans les mousses du même ordre de grandeur que ce qui peut être observé *in situ* (Mouvet, 1987).

Pour toutes les expériences de laboratoire, la masse de mousse introduite en début d'expérience dans le milieu est d'environ 70 g frais offrant ainsi un rapport volume de biomasse/ volume d'eau identique dans toutes les unités expérimentales.

II-4 DISPOSITIF EXPERIMENTAL *IN SITU*

Les expériences menées *in situ* font toutes appel à la technique des transferts de mousse (surveillance biologique active). Les mousses, provenant d'un site exempt de contamination métallique, sont immergées aux stations que l'on souhaite étudier dans des paniers fabriqués à partir de grillage plastique de 5 x 5 mm. Trois types de paniers ont été utilisés. A l'usage, il s'est avéré que les paniers de forme rectangulaire ou conique offrent l'avantage de ne pas comprimer les mousses qui peuvent être alors plus facilement brassées par le courant, évitant un colmatage trop rapide par les M.E.S. Ces deux types de paniers sont préférés au précédent (grillage sandwich) pour les expériences *in situ*. Environ 20 g de mousses fraîches sont introduites dans le panier en même temps qu'un lest, avant que ne soit fermé le grillage à l'aide de fil de fer plastifié. Les paniers sont ensuite ancrés aux différents points d'étude, soit à un support naturel, soit à un piquet planté dans le lit du cours d'eau. Une attention particulière est portée au choix du point d'ancrage qui doit assurer une immersion complète et constante des paniers. Des inspections régulières pendant la période d'exposition permettent de vérifier l'état du dispositif et de nettoyer les paniers qui peuvent être encrassés par des M.E.S. réduisant le contact entre l'eau et les mousses.

Dans la mesure du possible, des préleveurs automatiques d'eau sont placés à proximité des stations où sont immergées les mousses, la crépine de prélèvement étant généralement fixée sur le piquet d'ancrage des paniers.

II-5 SUIVI DE LA PHYSICO-CHIMIE DU MILIEU

II-5-1 EN LABORATOIRE

Echantillonnage

Dans chaque unité expérimentale plonge un capillaire relié à une pompe péristaltique multicanaux (Figure 2-2) permettant l'échantillonnage en continu d'un aliquot de milieu (débit = 0.1 ml min^{-1}). Celui-ci est récupéré dans un flacon dont la fréquence d'analyse, variable d'une expérience à l'autre, est comprise entre 2 et 4 jours. Les échantillons d'eau sont conservés en chambre froide (+4 °C) avant le dosage.

Les paramètres physico-chimiques

La température ainsi que le pH de l'eau (Knick 646) sont mesurés quotidiennement dans toutes les unités expérimentales. La photopériode est fixée à 16 heures de jour avec une intensité lumineuse de 25 $\mu E\ m^{-2}\ s^{-1}$ pour 8 heures de nuit.

Les anions et cations majeurs

Les anions et cations majeurs du milieu d'exposition sont analysés à partir des prélèvements effectués en continu. Les cations Ca, Mg, Na et K sont dosés en spectrophotométrie d'absorption atomique (SAA, Perkin Elmer modèle 2380). Les anions NO_3, SO_4, Cl et PO_4 sont dosés par chromatographie ionique (Dionex 4500i). Les concentrations en CO_3 et HCO_3 sont obtenues par potentiométrie.

Les métaux

Un aliquot (10 ml) du prélèvement en continu est acidifié par HNO_3 à un pH < 2 puis conservé à +4 °C. La concentration en métal de l'échantillon est ensuite déterminé par SAA en flamme (Perkin-Elmer 2380) ou en four graphite (Varian SpectrAA-300/400), selon la concentration théorique et les limites de détection des appareils pour les divers métaux dosés (Tableau 2-2).

Si l'on observe lors du dosage des interférences avec la matrice, la technique des ajouts dosés est employée.

Tableau 2-2: Limites de détection des métaux dans l'eau selon le mode d'utilisation du SAA.

Métal	Limite de détection ($\mu g\ L^{-1}$)	
	Four	Flamme
Cr	0.2	20
Cu	0.1	10
Pb	0.3	100
Zn	-	20

II-5-2 *IN SITU*

Echantillonnage

L'échantillonnage de l'eau sur le terrain s'est fait de deux façons. La première consiste à collecter des échantillons ponctuels d'eau dans des flacons PVC préalablement lavés à l'acide nitrique et rincés plusieurs fois à l'eau déminéralisée. Dans la mesure du possible, l'utilisation de préleveurs automatiques (ISCO 1680 ou SIGMA 800 SL) a été privilégiée. Ceux-ci permettent, grâce à la programmation, à l'autonomie suffisante et à l'utilisation d'un grand nombre de flacons (24 ou 28) d'obtenir la fréquence de prélèvement souhaitée. Une crépine fixée à un piquet planté dans le lit du cours d'eau échantillonne le milieu selon la séquence programmée. L'échantillon est récolté dans un flacon qui a subi le protocole de lavage précédemment décrit. La fréquence de prélèvement choisie est, sauf indication contraire, un flacon de 500 ml par 24 heures rempli par 4 pompages successifs espacés de 6 heures.

Les paramètres physico-chimiques

Le pH, la température, l'oxygène dissous et la conductivité de l'eau sont mesurés ponctuellement (appareillage WTW). Lorsque le régime des eaux le permet, la vitesse du courant est mesurée à l'aide d'un moulinet (A. OTT). L'axe supportant l'hélice est positionné verticalement, soit parallèle au sens d'écoulement de l'eau. L'hélice est placée immédiatement en amont et à hauteur du panier contenant les mousses aquatiques. La mesure est effectuée sur une minute et répétée 3 fois.

Les anions et cations majeurs

Les anions et cations majeurs sont analysés dans les échantillons d'eau de la même manière que celle décrite précédemment (Chapitre II-5-1).

Les métaux

Les échantillons d'eau prévus pour la détermination des concentrations métalliques sont préparés selon la norme ISO 8288. Avant que l'échantillon ne soit acidifié à un pH < 2 (HNO_3, 0.5 % v/v environ), une fraction est filtrée à 0.45 µm (filtre Sartorius) puis récupérée dans des tubes en polyéthylène à usage unique et acidifiée à un pH < 2. Le reste de l'échantillon est acidifié à pH < 2 puis, après homogénéisation, récupéré dans des tubes en polyéthylène. Ce protocole permet ainsi d'obtenir la concentration en métal total de l'échantillon et la fraction dite "dissoute". La définition de la fraction dissoute, filtrée sur 0.45 µm, ne correspond pas forcément à la fraction disponible du métal pour les mousses, le métal pouvant être associé à des formes colloïdales et à des complexes de faible taille moléculaire (Förstner et Wittman, 1981). Cependant, connaissant le mode de fixation des métaux sur la paroi des mousses, la fraction filtrée sur 0.45 µm est probablement un meilleur descripteur de la relation entre les métaux dans l'eau et dans les mousses. Certains auteurs vont même jusqu'à utiliser des filtres 0.2 µm, estimant obtenir une meilleure représentation de la phase réellement dissoute du métal (*e.g.* Kelly *et al.*, 1987).

Les échantillons ainsi traités sont stockés en chambre froide (+ 4 °C) avant le dosage en SAA (cf chapitre II-5-1).

II-6 SUIVI DES CONCENTRATIONS EN METAUX DANS LES MOUSSES

II-6-1 ECHANTILLONNAGE ET CONDITIONNEMENT

Echantillonnage

La collection et le lavage succinct des organismes sur le site de référence est suivi au laboratoire d'une étape de lavage et ce, quelle que soit la destination de l'échantillon, expérience de laboratoire ou transfert *in situ*. Lors des expériences de laboratoire, le suivi des concentrations en métaux dans les mousses est effectué à partir d'échantillons collectés dans les bacs expérimentaux et dont les prélèvements sont répartis tout au long des phases d'exposition au métal et des phases de relargage. Chaque échantillon d'environ 2 g frais est placé dans un sachet

en papier avant d'être séché. Dans le cas d'une étude *in situ*, les échantillons de mousse, préalablement collectés sur le site de référence, lavés au laboratoire et transplantés *in situ*, sont prélevés dans les panier en plastique avec une fréquence de prélèvement propre à chaque expérience. Placés dans des sachets en papier (entre 5 et 10 g frais), les échantillons collectés *in situ* sont à nouveau lavés au laboratoire puis placés dans de nouveaux sachets avant d'être séchés.

Lavage des mousses en laboratoire

Dans la mesure du possible, les échantillons de mousse collectés *in situ* sont lavés immédiatement avant qu'ils ne se dessèchent, l'efficacité du lavage des mousses préalablement séchées pouvant être moindre (Wehr *et al.*, 1983). Selon ces auteurs, il devient plus difficile d'éliminer, après séchage, certains précipités (carbonates, oxyde de Fe et Mn) qui se forment à la surface des feuilles et qui sont autant de surface d'échange pour les métaux et qui ne représentent pas un phénomène biologique d'accumulation. L'expérience a également montré que les mousses préalablement séchées perdent plus facilement leurs feuilles pendant la phase de lavage. C'est le cas notamment pour *Fontinalis antipyretica*.

La méthode de lavage utilisée est inspirée de celle développée par Empain (1977) reprise par Wehr *et al.* (1983). L'échantillon frais[1] est placé sur un tamis en plastique de maille 1 mm. Après avoir pris soin de dissocier les brins et d'éliminer les brins morts ou défeuillés, l'échantillon est lavé à l'aide d'un jet d'eau déminéralisée sous pression (1.5 bars). L'eau de lavage est récupérée dans un cristallisoir (1 litre maximum). L'opération est répétée plusieurs fois jusqu'à l'obtention d'une eau claire. Ce critère d'efficacité du lavage, quelque peu subjectif, peut être remplacé par l'utilisation de disque HAZEN chiffrant la turbidité des eaux de lavage de façon plus objective (Agence de l'Eau, 1994).

L'expérience montre qu'entre la quantité de mousse prélevée et lavée *in situ* et la quantité réellement utilisable après élimination des matières exogènes, la perte en poids frais est d'environ 30 %. On considère également que le rapport poids frais/poids sec est compris entre 5 et 6. Beaugelin-Seiller (1994) donne un rapport de 4.07 ($IC_{95\%}$: 3.95 - 4.20) établi à partir de 1350 mesures sur *Platyhypnidium riparioides* (syn.: *Rhynchostegium r.*). La différence entre les deux rapports peut s'expliquer par le fait que la méthode utilisée par l'auteur précédemment cité ne comprend pas d'étape de lavage en laboratoire. Ces quelques données permettent d'ajuster les masses prélevées *in situ* aux besoins expérimentaux tout en préservant le stock de mousse présent sur le terrain.

[1] si l'échantillon n'a pas pu être conservé frais, une étape préalable au lavage consiste à le réhumidifier pendant quelques minutes dans un cristallisoir rempli d'eau déminéralisée.

Séchage

La température de séchage varie d'un auteur à l'autre, de 30 °C (*e.g.* Steinnes et Njåstad, 1993) à 105 °C (*e.g.* Say *et al.*, 1981). Azxue et Mudroch (1994) ont testé l'influence de plusieurs températures de séchage sur les concentrations en métal dans la plante *Equisetum variegatum* sans détecter d'effet significatif entre 40 et 105 °C. Les travaux de Wehr *et al.* (1983), relatifs aux diverses étapes du traitement des mousses aquatiques, comprennent un test de deux températures de séchage, 40 et 105 °C. Constatant que le rapport entre les concentrations en métaux dans l'espèce *Rhynchostegium riparioides* séchées à 105 °C et celles séchées à 40 °C n'excède pas 1.1, les auteurs estiment que cette étape du protocole expérimental n'affecte pas de façon significative les résultats. Cependant, afin d'éviter le cumul de sources de variation, il semble préférable d'harmoniser certains aspects du protocole, surtout lorsqu'il s'agit d'une étape aussi facile à mettre en oeuvre. La température de séchage choisie dans ce travail, 60 °C pendant 24 heures, est la plus communément utilisée et correspond notamment à celle du protocole proposé par Mouvet (1986), repris dans les travaux de calibration analytique inter- et intralaboratoire menés sur les bryophytes aquatiques (Agence de l'Eau, 1994).

II-6-2 PREPARATION DES ECHANTILLONS EN VUE DU DOSAGE

Partie de la mousse utilisée pour le dosage des métaux

Les protocoles peuvent différer selon la partie de la plante utilisée pour la minéralisation (chapitre I-3-8). La méthode développée en France fait appel à l'utilisation de la plante entière (Mouvet, 1986). Utilisée en routine, elle offre l'avantage d'être moins lourde à mettre en oeuvre que l'emploi des 2 derniers centimètres terminaux de chaque brin. De plus, il est prévu de ne faire appel qu'à la technique des transferts permettant ainsi de s'affranchir des problèmes de contamination historique des mousses autochtones. Les mousses transférées sont en effet collectées sur des sites de référence et donc théoriquement exemptes de toute contamination. Les concentrations en métaux déterminées dans ces échantillons après exposition peuvent donc être attribuées à la contamination du milieu dans lequel ils sont immergés et non pas, à un résidu provenant d'une pollution passée et retenue dans les parties âgées de la plante.

Le choix qui consiste à prendre la plante entière pour la détermination des concentrations en métaux est aussi motivé par le souci d'homogénéité avec ce qui a pu être fait précédemment en France, notamment à l'Université de Metz.

L'utilisation de la plante entière ne signifie toutefois pas que toutes les parties sont effectivement sélectionnées pour la détermination des métaux. Les différentes étapes du protocole

sont autant d'occasions de supprimer les brins morts ou dépourvus de feuilles. Après ce tri, il ne reste finalement qu'une majorité de brins et rameaux dont l'état physiologique semble correct mais dont la longueur n'est pas restreinte aux deux derniers centimètres des apex.

Pesée

Chaque échantillon sec est subdivisé en 3 sous-échantillons de 100 mg (échantillon prélevé au laboratoire) ou 300 mg (échantillon prélevé *in situ*) pesés exactement (± 1 mg).

Minéralisation

La majorité des protocoles utilisés pour la minéralisation des mousses sont basés sur une attaque par voie acide, le plus souvent par l'acide nitrique. Ces protocoles diffèrent par la concentration en acide, le temps et la température de minéralisation (*e.g.* Say *et al.*, 1981; Gonçalves *et al.*, 1992; Lopez et Carballeira, 1993; Mouvet *et al.*, 1993). Seulement deux travaux font l'objet de comparaisons entre différents protocoles de minéralisation des bryophytes. Le premier, qui avait pour objet la comparaison de deux attaques acides (HNO_3 ou $HNO_3/HClO_4$), n'a pas révélé de différence quant aux concentrations en métaux dosées dans les mousses (Pensel, 1984; non publié). La seconde étude, regroupant deux laboratoires, met en évidence la bonne corrélation entre les résultats obtenus dans deux lots de mousses, l'un minéralisé par HNO_3 (7.2 M) à 140 °C pendant 4 heures, l'autre par HNO_3 (3.6 M) à 65 °C pendant 18 heures (Gonçalves *et al.*, 1992).

Le protocole de minéralisation choisi dans ce travail est basé sur celui proposé par Mouvet (1986). Les mousses sont minéralisées par l'acide nitrique (Normapur 69 %) dilué au quart par de l'eau distillée. Les échantillons secs, pesés, sont introduits dans des tubes en polyéthylène dans lesquels est ajouté l'acide dilué (HNO_3, 4M). Les échantillons prélevés en laboratoire (3 répétition de 100 mg) sont minéralisés dans des tubes de 10 ml auxquels sont ajoutés 4 ml d'HNO_3. Ceux provenant du terrain (3 répétition de 300 mg) sont minéralisés dans des tubes de 20 ml auxquels sont ajoutés 9 ml d'acide. Les échantillons sont ensuite minéralisés à 70 °C pendant 24 heures sous pression. Durant ces 24 heures, les tubes sont régulièrement agités afin de maintenir les mousses dans l'acide car elles ont tendance à flotter. Après avoir laissé les tubes refroidir, permettant ainsi la condensation des vapeurs d'acide, le minéralisat est dilué par un ajout de 5 (tube de 10 ml) ou de 10 ml (tube de 20 ml) d'eau distillée. Après avoir assuré le mélange de l'eau avec l'acide, la solution ainsi homogénéisée est centrifugée pendant 15 minutes à 1500 - 2000 t.p.m. afin d'obtenir un surnageant clair pour le dosage. Des blancs de minéralisation (sans mousse) sont préparés selon le même protocole afin de pouvoir évaluer d'éventuelles contaminations.

II-6-3 DOSAGES ET EXPRESSION DES RESULTATS

Dosage des métaux en SAA

Le dosage des métaux dans les minéralisats est effectué par Spectrophotométrie d'Absorption Atomique (SAA) en mode flamme (Perkin-Elmer 2380). Les limites de détection des métaux dans la matrice sont données dans le tableau 2-3. Les résultats d'analyse (C_e), exprimés en µg L^{-1}, sont convertis en µg de métal par gramme sec de mousse (C_m) selon l'équation :

$$C_m = \frac{C_e.V}{M} \qquad (2\text{-}1)$$

avec V, le volume de minéralisat en litre et M, le poids sec de mousse minéralisé en gramme.

Tableau 2-3: Limites de détection des métaux dosés en flamme (SAA) dans les minéralisats de mousses selon le protocole appliqué en laboratoire ou sur le terrain.

Métal	Limite de détection (µg g^{-1} p.s.)	
	pour 100 mg	pour 300 mg
Cr	1.5	1.0
Cu	1.0	0.6
Pb	9.0	6.0
Zn	1.5	1.0

Le résultat final est exprimé par la moyenne des concentrations en métal obtenues dans les 3 sous-échantillons et de son écart-type. Ce dernier représente l'incertitude attribuée aux variations analytiques plutôt qu'à l'hétérogénéité de la population, la notion d'individu chez les mousses étant difficile à définir.

Détermination du pourcentage de résidu

L'attaque acide ne suffit pas à oxyder complètement les mousses mais permet une libération quantitative des métaux (Wehr *et al.*, 1983). Le culot décanté comprend les résidus organiques et les corps étrangers qui n'ont pas été éliminés lors du lavage. Lorsque les dosages sont terminés, le minéralisat est filtré sur filtre sans cendre (Watman GF/F), préalablement taré, en rinçant soigneusement le fond du tube. Le filtre est ensuite séché à 110 °C pendant 30 minutes pour être ensuite calciné (525 ± 25 °C pendant 2 heures). Après retour à la température ambiante,

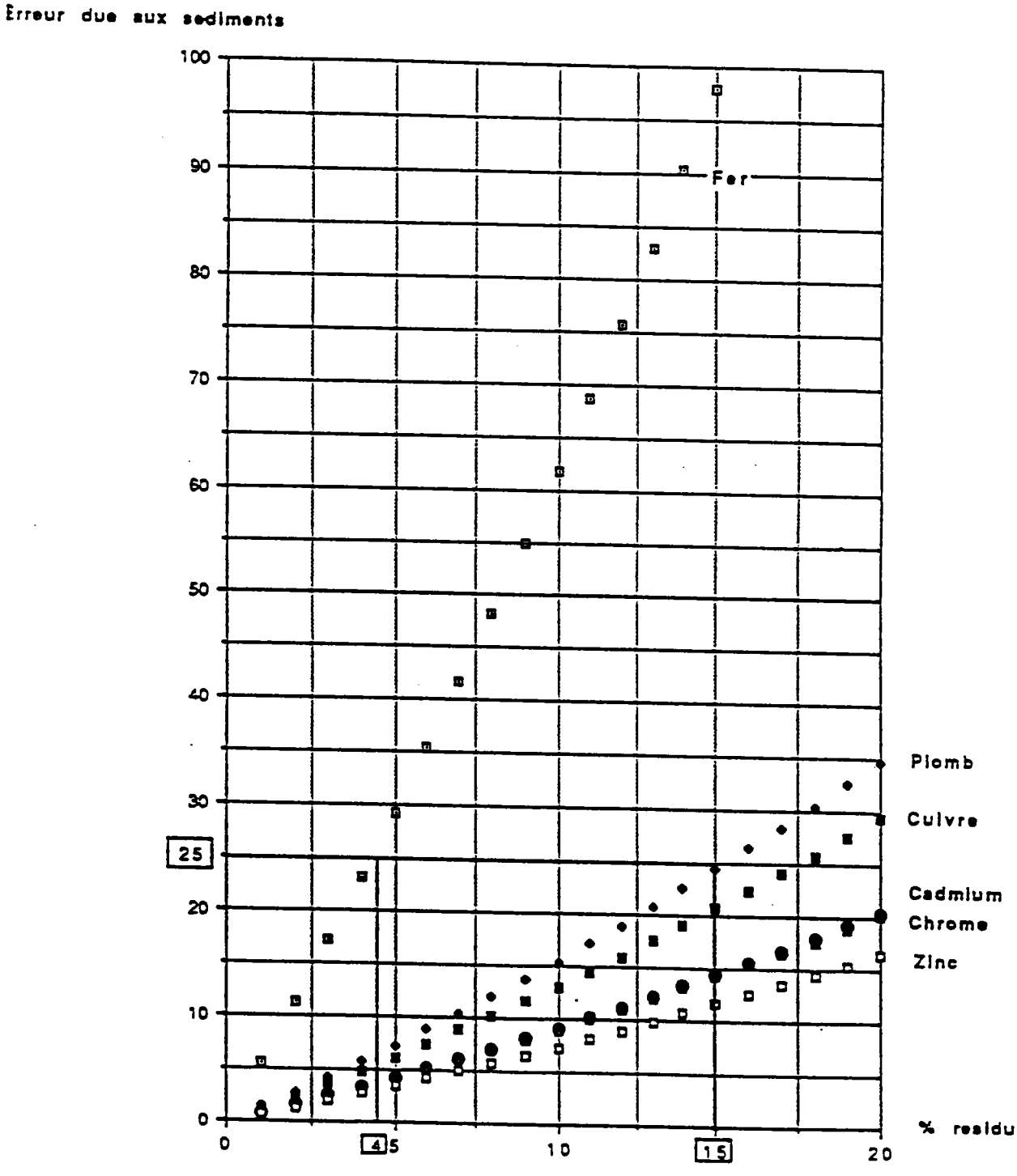


Figure 2-3: Evolution de l'erreur due aux sédiments en fonction du pourcentage de résidu (Daprès Cardinal, 1992).

le poids sec de résidu est obtenu par la différence entre le poids du filtre avant et après calcination en tenant compte de la perte au feu de celui-ci. Dans le cas où le pourcentage de résidu constitue au moins 5 % de la masse minéralisée, l'échantillon est considéré comme trop chargé en corps étrangers et le résultat obtenu après analyse n'est pas pris en compte. Ce pourcentage est choisi à partir du suivi de l'évolution de l'erreur due aux sédiments en fonction du pourcentage de résidu (Figure 2-3). Cette étude révèle que l'erreur due aux sédiments est d'autant plus importante que le pourcentage de résidu est élevé. Un seuil de 5 % s'avère être un bon compromis entre un lavage efficace sans être destructeur du matériel biologique et l'erreur que ce seuil peut générer, inférieur à 10 % pour la majorité des métaux, excepté le fer et probablement le manganèse.

Incertitudes sur la mesure

Lorsqu'une seule espèce est employée, comme c'est le cas dans ce travail, les incertitudes sur la détermination des concentrations métalliques dans les organismes proviennent des différentes étapes du protocole et non des variations interspécifiques des métaux accumulées par les mousses. La contribution de ces différentes étapes à la variabilité de la mesure a pu être quantifiée grâce à une étude d'intercalibration coordonnée par le BRGM pour le compte des Agences de l'Eau (Agence de l'Eau, 1994). Cette étude a porté sur l'influence de la minéralisation, du lavage et du dosage et concernait entre 8 et 14 laboratoires selon la phase des travaux. Chaque laboratoire recevait soit des échantillons bruts, soit des échantillons déjà lavés et broyés, soit des échantillons déjà minéralisés. Les laboratoires effectuant au moins 5 répétitions, le coefficient de variabilité intralaboratoire a pu être calculé. En faisant la moyenne de ces coefficients, on obtient ainsi pour chaque métal la répétabilité de la mesure. Chaque résultat fourni par les différents laboratoires a également permis en les moyennant de calculer le coefficient de variabilité inter-laboratoires donnant ainsi une idée pour chaque métal de la reproductibilité de la mesure.

La figure 2-4 résume, pour les 4 métaux suivis dans ce travail, la reproductibilité de la détermination des concentrations dans les mousses selon les étapes prises en compte par les laboratoires. Quel que soit le métal, la reproductibilité de la mesure est d'autant moins bonne que le nombre d'étapes pris en compte par les laboratoires est grand puisque c'est en considérant le traitement 3 (échantillon brut) que l'on observe les coefficients de variation les plus importants.. La figure 2-4 révèle aussi l'influence négative de la phase de lavage, étape la moins contrôlée du protocole, et qui, incluse dans le protocole des différents laboratoires (traitement 3), contribue de façon très significative à augmenter la variabilité interlaboratoires. Par contre, la répétabilité de la mesure reste toujours bonne puisque l'on observe un coefficient de variation intralaboratoire toujours inférieur à 10 %, révélant ainsi que le protocole d'analyse des métaux dans les mousses est facilement reproductible dans un même laboratoire.

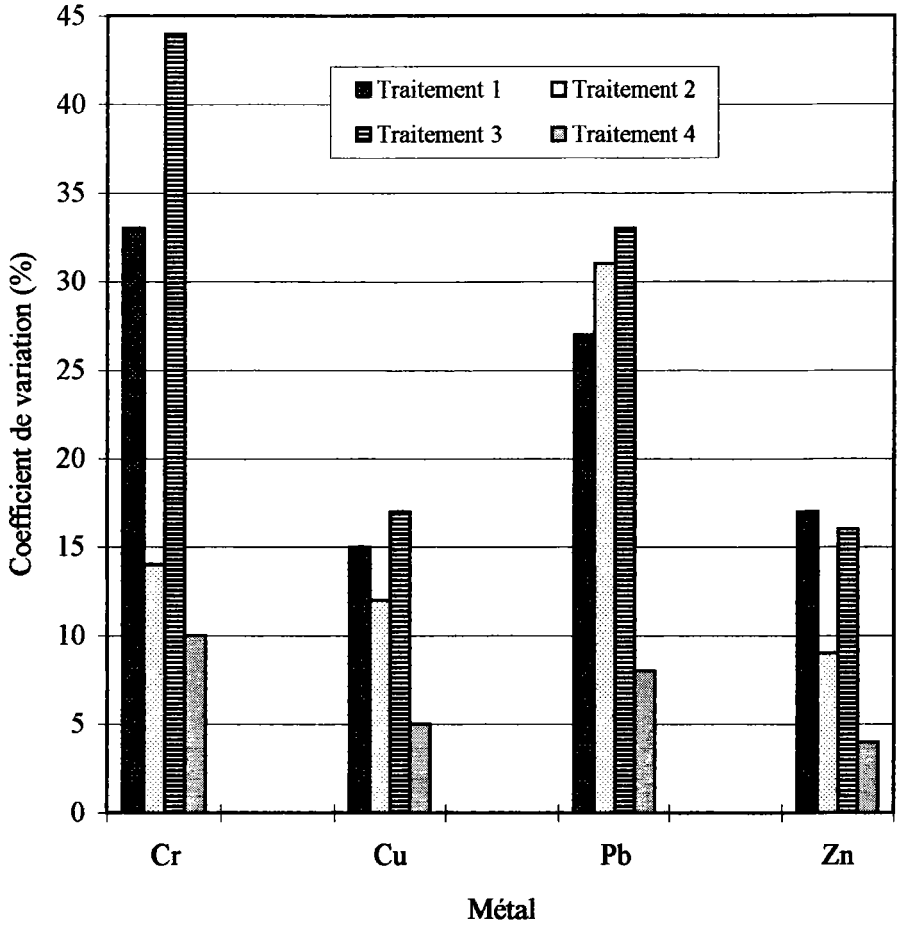


Figure 2-4: Coefficient de variation (%) sur la détermination des teneurs en métaux dans différents échantillons de mousses analysés par plusieurs laboratoires. Traitement 1: variation interlaboratoire (14 laboratoires) sur des échantillons fournis lavés et broyés; traitement 2: variation interlaboratoire (14 laboratoires) sur des échantillons fournis lavés, broyés et minéralisés; traitement 3: variation interlaboratoire (12 laboratoires) sur un échantillon brut de *Platyhypnidium riparioides*; traitement 4: variation intralaboratoire (12 laboratoires) sur l'échantillon du traitement 3 (D'après Agence de l'Eau, 1994).

II-7 MESURE DE L'ACTIVITE PHOTOSYNTHETIQUE DES MOUSSES

II-7-1 PRINCIPE

L'objectif est d'avoir un critère quantitatif de l'état physiologique des mousses. Il est difficile de constater la mort cellulaire, le potentiel de survie et de régénération de ces organismes étant particulièrement remarquable (Glime et Vitt, 1984; Mouvet, 1984a). L'activité photosynthétique, mesurable sur les organismes sans les détruire et intégrant les dommages de plusieurs groupes d'enzymes (Haseloff et Winkler, 1980), peut être utilisée comme un indicateur des dommages intracellulaires (Empain, 1977; Sommer et Winkler, 1982; Axelsson, 1988). Le principe de l'évaluation de l'activité photosynthétique est la mesure, effectuée dans un système clos sans échange gazeux avec l'extérieur, de l'évolution dans le temps du pH du milieu dans lequel sont immergées les mousses et qui traduit l'assimilation ou le rejet de CO_2 par l'organisme. La méthode est basée sur le constat selon lequel les mousses, contrairement à d'autres macrophytes, sont incapables d'utiliser la source carbonatée que constituent les carbonates (Glime et Vitt, 1984).

II-7-2 DISPOSITIF EXPERIMENTAL

Le dispositif est constitué d'une cellule de mesure étanche dans laquelle plonge une électrode de pH (Figure 2-5). Un enregistreur branché sur le pH-mètre permet une lecture en continu du pH. La cellule de mesure, plongée dans une chambre noire remplie d'eau thermostatée, est illuminée par une source halogène d'une intensité de 88 $\mu E\ m^{-2}\ s^{-1}$. La mesure s'effectue dans une eau contenant environ 200 mg L^{-1} de bicarbonates, cette concentration offrant un bon compromis entre la stabilité du pH en l'absence de mousse et une variation significative en leur présence.

II-7-3 MESURE

Environ 200 mg d'apex provenant d'un rameau sont introduits dans la cellule de mesure. Cette eau présente un pH compris entre 7.2 et 7.4 afin que la mesure proprement dite commence toujours à un pH égal à 7.5. En effet, Empain (1977) a montré que l'activité photosynthétique des mousses dépend du pH initial de la mesure. L'électrode est ensuite introduite dans la cellule, chassant par la même occasion les bulles d'air par le système de dégazage (Figure 2-5). Le robinet de purge fermé, l'évolution du pH est suivie pendant 10 minutes à partir de l'instant t_0 où le pH passe 7.5 (pH_0). La valeur de pH après 10 minutes (t_1) est alors relevée (pH_1). La température du bain thermostaté ainsi que celle de la cellule de mesure à t_0 et t_1 est relevée. L'échantillon est alors entièrement récupéré pour être séché (60 °C pendant 24 heures) et pesé.

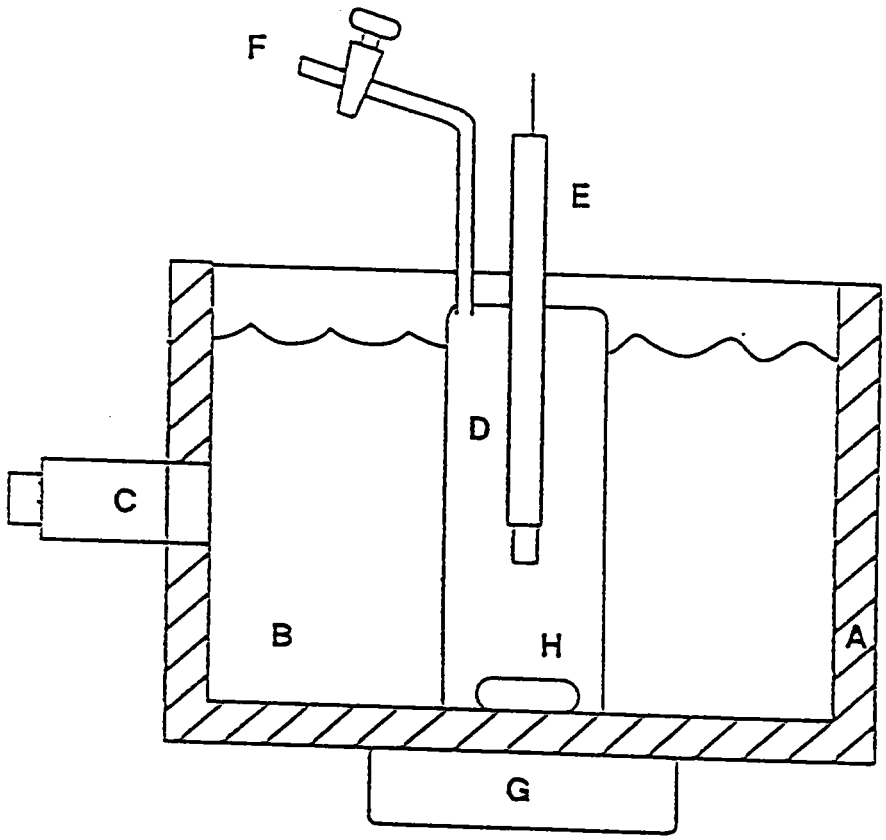


Figure 2-5: Cellule de mesure de la photosynthèse. A: chambre moire; B: eau thermostatée (7, 17 ou 29 °C); C: source lumineuse; D: cellule de mesure étanche remplie d'eau reconstituée; E: électrode de pH; F: purge d'air en excès; G: agitateur magnétique; H: barreau aimanté.

La mesure est répétée 3 fois, chaque fois avec un nouvel échantillon et après avoir renouvelé l'eau. Lors de chaque série de mesures à une température donnée, le protocole décrit ci-dessus est appliqué sans ajout d'échantillon de mousse afin de s'assurer qu'une augmentation de pH ne peut être attribuée qu'à une diminution de la concentration en CO_2 dans le milieu.

II-7-4 CALCUL ET EXPRESSION DES RESULTATS

La relation entre le pH et la concentration en CO_2 libre est donnée par la réaction:

$$H_2O,CO_2 \leftrightarrow H^+ + HCO_3^- \qquad (2\text{-}2)$$

La quantité de CO_2 libre présent dans le milieu se calcule par la formule de Legrand et Poirier connaissant le pH de l'eau, la température, la teneur en anions et cations et le pK de la réaction (2-2). Cette dernière permet le calcul du CO_2 libre:

$$(CO_2)_{Libre} = \frac{10^{-pH} \cdot HCO_3^-}{10^{-pK'}} \qquad (2\text{-}3)$$

avec CO_2 et HCO_3 exprimés en mole L^{-1}, pK', la correction du pK théorique (*e.g.* Golterman, 1969) donné pour une force ionique nulle et fonction de la température. La différence entre le pH mesuré à t_0 (pH_0) et le pH mesuré à t_1 (pH_1) correspond au CO_2 libre assimilé par la mousse. L'activité photosynthétique est alors évaluée par la détermination de la concentration de CO_2 libre assimilée pendant les 10 minutes de mesure et exprimée en µg L^{-1} mg^{-1} min^{-1}:

$$(CO_2)_{assimilé} = \frac{(HCO_3)\cdot\left(10^{-pH_0} - 10^{-pH_1}\right)\cdot 44 \cdot 10^6}{10^{-pK'} \cdot M \cdot 10} \qquad (2\text{-}4)$$

avec M (mg p.s.), la quantité de mousse utilisée pour la mesure.

II-8 DETERMINATION DES CONCENTRATIONS METALLIQUES DANS LES MATIERES EN SUSPENSION (PROTOCOLE IPL).

Les matières en suspension récoltées *in situ* sont séchées à 105 °C pendant 24 heures. La teneur en matières organiques est déterminée après calcination d'un aliquot préalablement pesé à 525 °C pendant 2 heures.

Environ 1 g de matières sèches pesé avec précision est introduit dans un bécher de 250 ml dans lequel sont ajoutés successivement 5 ml d'acide perchlorique ($HClO_4$, 70%) et 20 ml

d'acide fluorhydrique (HF, 40 %). Le mélange est bouché par un verre de montre puis laissé une nuit à température ambiante. Le bécher est ensuite placé sur un bain de sable (maxi 6-7) pendant 2 heures avant de retirer le verre de montre permettant ainsi une évaporation qui doit cependant rester incomplète. Après avoir retiré le bécher du bain de sable, 5 ml d'acide chlorhydrique (HCl, 30 %) puis 15 ml d'eau déminéralisée sont ajoutés au résidu humide. Le bécher est alors replacé sur le bain de sable afin de dissoudre le résidu. Après avoir laissé refroidir, le minéralisat est filtré sur filtre Whatman 2V 15 cm et complété à 100 ml permettant alors la détermination des concentrations métalliques.

II-9 TECHNIQUES ET PREPARATIONS POUR L'OBSERVATION MICOSCOPIQUE

II-9-1 PREPARATION DES COUPES

Fixation

Les coupes sont préparées à partir d'échantillons de mousses constitués d'apex d'environ 2 cm de longueur. Selon la recherche désirée, l'échantillon est fixé au Carnoy pendant 24 heures (étude topographique) ou au formol 10 % pendant 24 heures (révélation histochimique du cuivre).

Déshydratation

L'échantillon fixé au Carnoy est ensuite déshydraté par deux bains successifs, dans l'alcool à 95 % puis dans l'alcool absolu. L'échantillon fixé au formol 10 % est d'abord rincé à l'eau courante puis à l'eau distillée avant d'être déshydraté dans les alcools de degré croissants (10, 30 et 50 %) pendant 1 heure. La déshydratation se poursuit ensuite par trois étapes constituées chacune de trois bains successifs de 12 heures. Ces trois étapes successives sont constituées de bains dans l'alcool à 70 %, à 95 % et dans l'alcool absolu.

Imprégnation et inclusion

L'échantillon préalablement fixé au Carnoy est imprégné par le xylène, un solvant de la paraffine, pour être ensuite inclus à chaud (50 °C pendant 24 heures) dans la paraffine. Pour l'échantillon fixé au formol 10 %, l'échantillon est d'abord imprégné dans un bain constitué d'un mélange alcool absolue - xylène (v/v) pendant 12 heures suivi de trois bains d'une heure dans le xylène. L'inclusion se fait aussi en deux étapes, la première pendant 24 heures à 40 °C dans un bain constitué d'un mélange xylène - paraffine (v/v), la seconde dans de la paraffine liquide pendant 24 heures à 56 °C.

Les coupes sont effectuées au microtome avec une épaisseur d'environ 7 µm.

II-9-2 OBSERVATIONS TOPOGRAPHIQUES

La coloration au bleu de méthylène et rouge de ruthénium permet de mettre en évidence les composés pectiques. Le bleu de toluidine colore la chromatine et les chromosomes.

II-9-3 OBSERVATIONS HISTOCHIMIQUES

La présence de cuivre est révélé par la méthode à l'acide rubéanique. Cet acide forme, en fixant les sels de cuivre, un composé insoluble noirâtre. La lame est contrastée par une coloration légère à l'éosine.

Chapitre III:
Effet de la température de l'eau sur l'accumulation du cuivre et l'assimilation de CO_2 par *Rhynchostegium riparioides*

III-1 INTRODUCTION

En dépit de leur tolérance à de larges conditions physiques et chimiques, le développement des bryophytes aquatiques est restreint aux climats froids et tempérés (Glime et Vitt, 1984). Ces auteurs expliquent ce phénomène par la prédominance de la respiration sur l'assimilation lors d'une élévation de la température de l'eau. C'est ainsi que Empain (1977) constate une diminution de la croissance des mousses en relation avec l'augmentation de ce paramètre.

Glime et Acton (1979) considèrent que l'effet de la température sur la physiologie de l'organisme peut avoir des conséquences sur ses capacités à accumuler les métaux. Selon Pickering et Puia (1969), l'accumulation du zinc par *Fontinalis antipyretica* est en partie influencée par la température. Or, les bryophytes aquatiques autochtones et transplantées sont employées comme traceurs de la contamination métallique indépendamment de la saison et des différences de climats. De plus, le recours aux transferts est souvent nécessaire en l'absence d'échantillons autochtones, absence dont une température élevée de l'eau peut être la raison. C'est le cas notamment près des rejets d'eaux échauffées des centrales nucléaires qui peuvent causer la disparition des bryophytes, comme l'a constaté Empain (1977) sur la Meuse en aval de la centrale de Chooz. La technique des transferts n'inclut pas d'étape d'acclimatation entre la collecte de l'échantillon sur un site de référence et son transfert sur un site d'étude pouvant présenter des caractéristiques physiques et chimiques différentes.

Dans le cadre du suivi de la contamination métallique des rejets des centrales EDF, il est prévu de faire appel à la technique des transferts. Or, les eaux de rejet se caractérisent par une température supérieure de plusieurs degrés à celle du milieu récepteur. Comme l'estimation de la contribution des rejets à la contamination du milieu s'effectue en comparant les données fournies par des bryophytes transplantées en amont du rejet, dans le rejet et en aval de ce dernier, il est

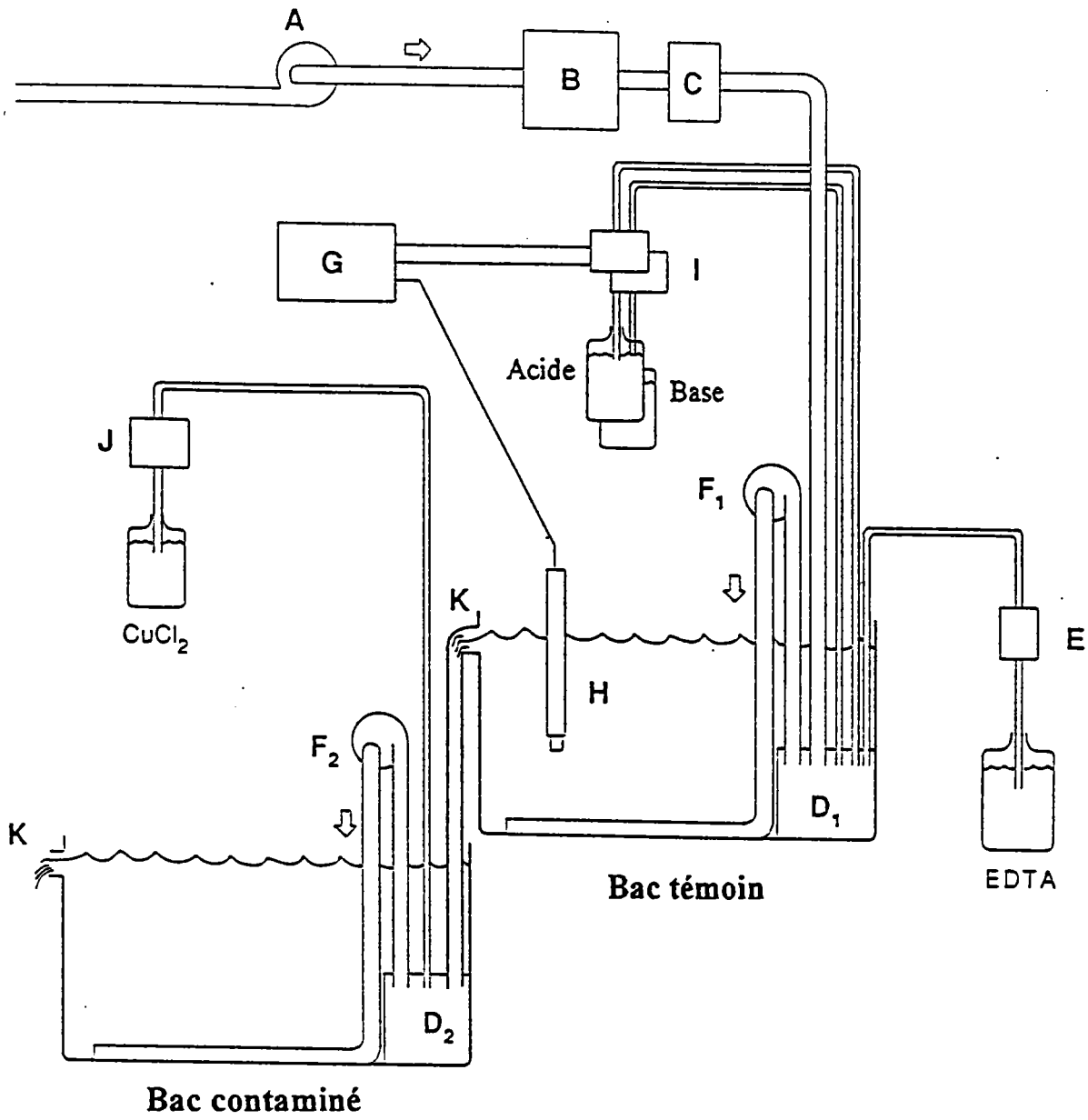


Figure 3-1: Schéma de l'unité expérimental à 7 °C. A: pompe péristaltique pour l'apport d'eau de distribution; B: charbon actif; C: système de refroidissement de l'eau; D: réservoirs de mélange; E: pompe péristaltique pour l'apport d'EDTA; F: pompe centrifuge d'homogénéisation du milieu; G: régulateur de pH; H: électrode de pH; I: pompes péristaltiques contrôlées par le égulateur de pH pour la distribution d'acide et de base; J: pompe péristaltique pour l'apport de cuivre; K: trop-plein. Pour les unités expérimentales à 17 et 29 °C, le système de refroidissement de l'eau est remplacé par des résistances thermostatées immergées dans chacun des bacs.

nécessaire d'évaluer l'effet de la température de l'eau sur l'ampleur des cinétiques d'accumulation des métaux par les mousses aquatiques.

L'expérience est menée en laboratoire sur l'espèce *Rhynchostegium riparioides*, préalablement collectée à Hatrize, et contaminée par le cuivre, polluant majeur rejeté par les centrales nucléaires. Une attention particulière est portée à la physiologie de l'organisme en mesurant son activité photosynthétique. Celle-ci, qui peut être mesurée sur les organismes vivants sans les endommager et dont la mesure intègre les effets de plusieurs groupes d'enzymes (Haseloff et Winkler, 1980), est employée comme indicateur de dommages intracellulaires (Empain, 1977; Sommer et Winkler, 1982; Axelsson, 1988). Une attention particulière est également portée à la stabilité du pH des différents milieux d'exposition afin d'éviter l'influence de ce paramètre à la fois sur la biodisponibilité du cuivre et sur l'assimilation du CO_2 par les mousses. En effet, une augmentation du pH entraîne la disparition progressive du CO_2 au profit des bicarbonates qui ne peuvent alors être utilisés par les mousses comme source de carbone (Glime et Vitt, 1984).

III-2 PROTOCOLE EXPERIMENTAL

III-2-1 DISPOSITIF EXPERIMENTAL

Modification des unités expérimentales

Le dispositif expérimental est identique dans son principe à celui décrit au chapitre II-3 mais a dû cependant être adapté pour obtenir un pH stable et homogène entre les différentes unités expérimentales. Les expériences sont menées dans trois unités expérimentales avec différentes températures: 7, 17 et 29 °C. Ces trois températures sont choisies en accord avec les variations de température observables en différents points d'une centrale nucléaire et des variations saisonnières. Chaque unité est constituée de deux bacs (Figure 3-1). Le premier bac (bac témoin) est alimenté en continu par de l'eau déchlorée, à un débit de 0.3 l min^{-1} , à laquelle est ajoutée en continu de l'EDTA pour d'obtenir une concentration dans le milieu de 2 mg L^{-1}. Le milieu en excès se déverse ensuite par gravité dans le second bac dans lequel est ajouté le cuivre pour obtenir une concentration dans l'eau de 80 µg L^{-1}.

Régulation du pH

Le système de régulation du pH est installé sur le premier bac. Le pH initial de l'eau déchlorée égal à 7.8 est ajusté à 7.4 par l'ajout de HNO_3 (1.6 M) ou NaOH (1 M) dont la distribution dans l'eau est assurée par une pompe péristaltique contrôlée par un régulateur de pH (HEITO). En fixant des valeurs limites de pH, minimales et maximales, le régulateur déclenche automatiquement l'ajout d'acide ou de base si le pH de l'eau, suivi en continu, franchit l'une ou l'autre de ces limites.

Régulation de la température de l'eau

La température initiale de l'eau (13 °C) est abaissée à 7 °C en transitant dans un système de réfrigération. Pour obtenir les températures de 17 et 29 °C, des résistances régulées par des thermostats sont placées au fond de chacun des bacs concernés.

III-2-2 PROTOCOLE EXPERIMENTAL

Conditions d'exposition des mousses

Les mousses aquatiques de l'espèce *Rhynchostegium riparioides* sont collectées en avril à Hatrize sur l'Orne (température de l'eau = 12 °C) puis lavées au laboratoire. Environ 80 g frais sont placés dans chacun des six bacs sans étape préalable d'acclimatation comme cela est pratiqué lors de l'emploi de la méthode des transferts (Kelly *et al,* 1987; Mouvet, 1985; Wehr *et al,* 1987).

L'expérience dure 22 jours avec une phase d'exposition à 80 µg L^{-1} de cuivre de 12 jours suivie d'une phase de relargage de 10 jours.

Fréquence d'échantillonnage et de mesure

Des échantillons de mousses sont prélevés après 0, 1, 2, 4, 6, 9, 12, 15 et 22 jours. Le pH et la température sont relevés quotidiennement tandis que des pompes péristaltiques permettent, par prélèvement continu, d'obtenir des échantillons d'eau pour les analyses physico-chimiques et la détermination des concentrations en Cu dans l'eau.

Prélèvement pour la mesure de l'activité photosynthétique

En début d'expérience, environ 40 touffes de mousse comportant entre 15 et 20 apex sont introduites dans des sachets maillés installés dans les 6 bacs. Des échantillons sont prélevés pour la mesure de la photosynthèse après 0, 3, 6, 9, 12, 15 et 22 jours. La mesure de l'activité photosynthétique des mousses est détaillée dans le chapitre II-7.

Statistiques

La différence entre les températures moyennes de chaque paire de bac (témoin et contaminé) est testée par le test *t* de Student. L'analyse de variance est utilisée pour comparer les pH moyens mesurés dans les différents bacs. Les différences de concentrations en cuivre dans les mousses et d'assimilation de CO_2 à un temps donné sont comparées par un test *t* de Student.

III-3 RESULTATS

Conditions d'exposition des mousses

La température moyenne mesurée durant l'expérience n'est pas significativement différente entre le bac témoin et le bac contaminé de chaque unité expérimentale ($p > 0.05$) (Tableau 3-1).

De la régulation du pH dans les trois bacs témoins résultent des pH moyens similaires ($p > 0.01$) avec une faible variation dans le temps (CV < 1 %). Les concentrations en Cu dans l'eau des trois bacs témoins ne sont pas significativement différentes ($p > 0.01$). Le déversement de l'eau en excès du bac témoin dans le bac contaminé provoque systématiquement une légère augmentation du pH. Cependant, cette augmentation est la même dans chaque unité expérimentale et de ce fait, les pH moyens d'exposition dans les enceintes contaminés ne sont pas significativement différents ($p > 0.01$).

Dans ces 3 bacs, les mousses sont exposées à des concentrations en Cu dans l'eau similaires d'un bac à l'autre ($p > 0.01$). Pour les autres paramètres, la composition de l'eau est homogène entre les différents bacs et reste stable durant l'expérience (Tableau 3-2).

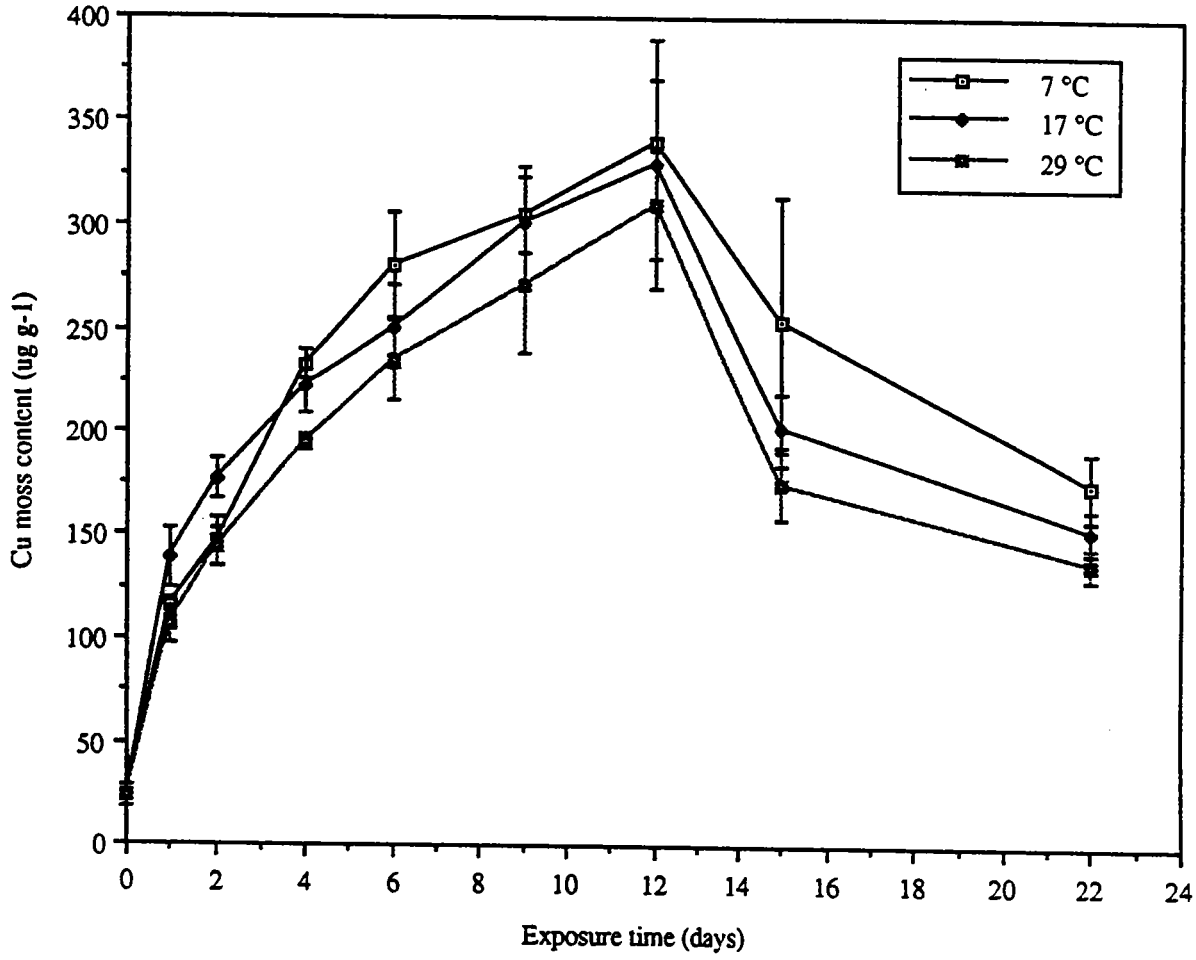


Figure 3-2: Cinétiques d'accumulation et de relargage du Cu par les mousses immergées à 7, 17 et 29°C. Les barres verticales représentent l'écart-type (n = 3).

Tableau 3-1: Valeurs des températures, du pH et des concentrations en Cu dans l'eau (moyenne ± écart-type) dans les bacs témoins et contaminés de chaque unité expérimentale.

Unité expérimentale	Bac	Température (°C) n = 22	pH n = 22	Cu ($\mu g\ L^{-1}$) [a]n = 11; [b]n = 6
7 °C	témoin	6.1 ± 0.7	7.41 ± 0.04	12.2 ± 3.5[a]
	contaminé	7.4 ± 0.6	7.51 ± 0.05	80.5 ± 8.7[b]
17°C	témoin	17.1 ± 0.3	7.38 ± 0.03	11.7 ± 2.6[a]
	contaminé	17.2 ± 0.3	7.50 ± 0.04	76.6 ± 6.0[b]
29 °C	témoin	28.5 ± 0.3	7.35 ± 0.04	11.9 ± 3.8[a]
	contaminé	29.0 ± 0.3	7.54 ± 0.05	80.5 ± 9.7[b]

[a] moyenne obtenue à partir de l'analyse de l'ensemble des échantillons collectés durant l'expérience
[b] moyenne obtenue à partir de l'analyse des échantillons collectés durant la phase d'exposition uniquement

Cinétiques d'accumulation et de relargage du Cu par les mousses en fonction de la température

Les concentrations en Cu dans les mousses exposées au métal diffèrent légèrement selon la température de l'eau ($p < 0.05$) dans les échantillons collectés après 1, 2 et 4 jours. Entre 6 et 12 jours d'exposition, les cinétiques d'accumulation du Cu sont similaires dans les 3 bacs indépendamment de la température. Les valeurs maximales après 12 jours d'exposition varient de 310 à 340 $\mu g\ g^{-1}$ (Figure 3-2). Les concentrations en Cu dans les mousses immergées dans les 3 bacs témoins varient de 18 à 24 $\mu g\ g^{-1}$, valeurs proches des concentrations observées dans des mousses non contaminées (Mouvet, 1986).

Au début de la phase de relargage, les teneurs en Cu dans l'eau des bacs contaminés descendent en 3 heures au niveau de la concentration en Cu de l'eau de distribution (10 ± 1 $\mu g\ L^{-1}$; n = 24). Le métal accumulé par les mousses est rapidement relargué durant les trois premiers jours pour ensuite tendre lentement vers un plateau d'équilibre. Après 10 jours de relargage, les mousses ont perdu entre 48 et 55 % du métal préalablement accumulé (Figure 3-2). Les concentrations en métal dans les mousses immergées dans les bacs témoins varient de 17 à 25 $\mu g\ g^{-1}$ durant la phase de relargage.

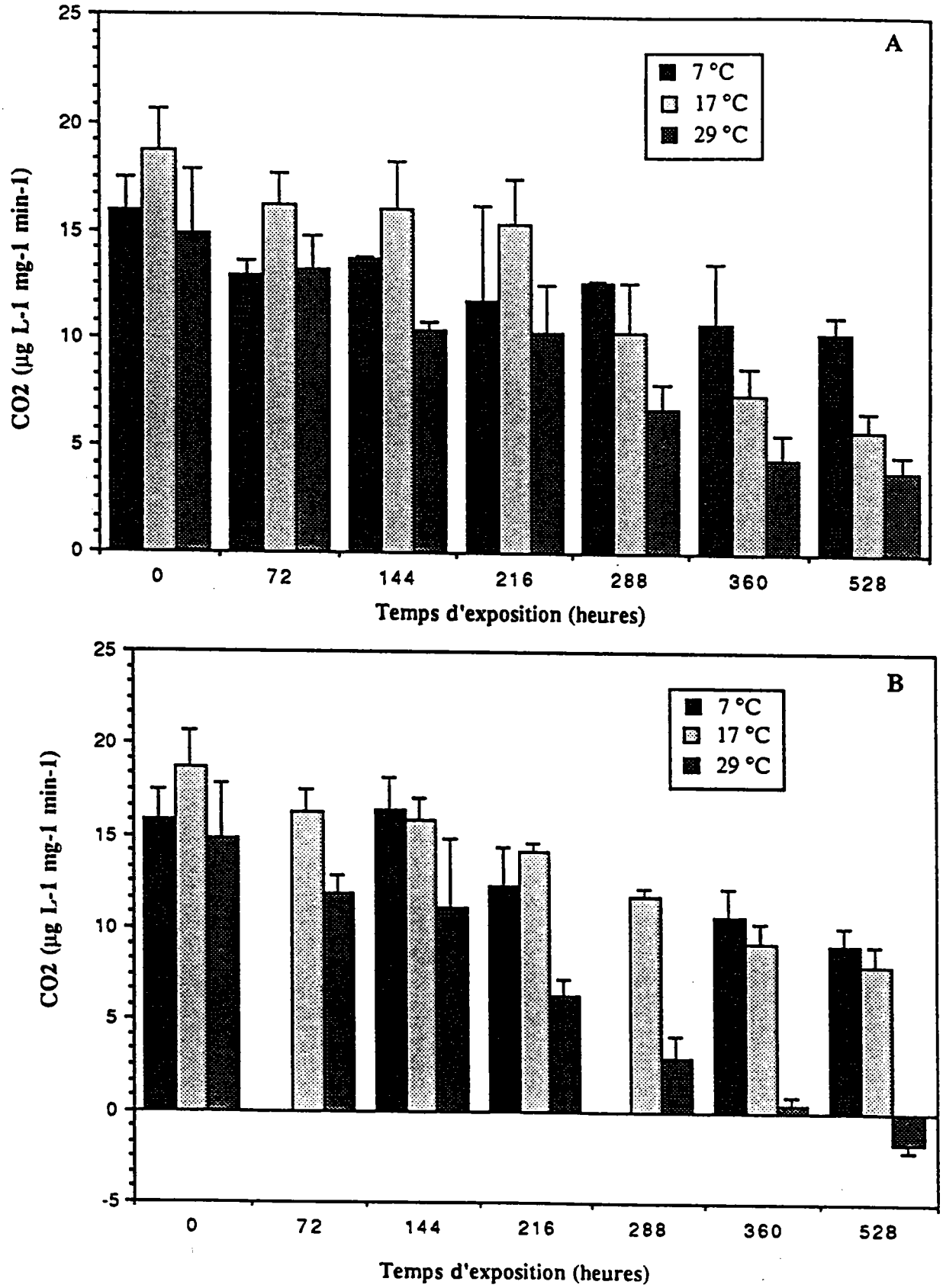


Figure 3-3: Assimilation de CO_2 par *Rhynchostegium riparioides* selon la température de l'eau dans les bacs témoin (A) et contaminés par le cuivre (B). Les barres verticals représentent l'écart-type (n = 3).

Tableau 3-2: Caractéristiques physico-chimiques (moyenne ± écart-type) du milieu d'exposition (n = 11).

Paramètre	Moyenne ± écart-type ($mg\ L^{-1}$)	Minimum - Maximum
HCO_3	265 ± 17	232 - 305
NO_3	56 ± 13	35 - 78
SO_4	36 ± 2	34 - 41
Cl	18 ± 2	15 - 22
Ca	100 ± 8	84 - 114
Mg	5.6 ± 0.1	5.6 - 6.1
Na	6.0 ± 0.2	4.8 - 8.0
K	1.0 ± 0.1	0.9 - 1.2

Evolution de l'activité photosynthétique des mousses

La consommation de CO_2 mesurée le premier jour de l'expérience n'est pas significativement différentes ($p > 0.05$) entre les lots de mousses exposées aux trois températures (Figure 3-3). Quelle que soit la température de l'eau, l'assimilation de CO_2 par les mousses des bacs témoins est moins importante qu'au premier jour ($p < 0.05$). A la fin de l'expérience, les valeurs d'assimilation de CO_2 par les mousses suivent l'ordre de température suivant: 29°C < 17°C < 7°C. A 7 °C, l'activité photosynthétique des mousses immergées dans le bac témoin décroît lentement au cours du temps, de 15.9 le premier jour à 10.3 $\mu g\ CO_2\ L^{-1}\ mg^{-1}\ min^{-1}$ après 22 jours (Figure 3-3). A 17 °C, la consommation de CO_2 reste stable pendant les 9 premiers jours pour ensuite chuter à 5.8 $\mu g\ CO_2\ L^{-1}\ mg^{-1}\ min^{-1}$ après 22 jours d'expérience. A 29 °C, l'assimilation de CO_2 décroît progressivement tout au long de l'exposition des mousses, de 14.9 le premier jour à 3.9 $\mu g\ CO_2\ L^{-1}\ mg^{-1}\ min^{-1}$ après 22 jours.

Pour les mousses exposées au Cu à 7 et 17 °C, la diminution de l'activité photosynthétique dans le temps est similaire ($p > 0.05$) à celle observée sur les lots témoins correspondants, excepté après 22 jours pour les mousses exposées à 17 °C. (Figure 3-4). Dans ce dernier cas, l'assimilation de CO_2 est plus importante pour l'échantillon qui a été préalablement exposé au métal ($p < 0.05$). Pour les mousses exposées au Cu à 29 °C, la diminution de la consommation de CO_2 est similaire à celle observée pour l'échantillon témoin durant les 6 premiers jours ($p > 0.05$)(Figure 3-4). Entre le $9^{ème}$ et le $22^{ème}$ jour, la chute de l'activité photosynthétique est plus importante pour les mousses immergées dans le bac contaminé que

pour leur équivalent du bac témoin ($p < 0.05$). Une valeur négative de l'assimilation est même constatée le dernier jour, indiquant que la respiration devient plus importante que l'assimilation. De plus, on observe un changement de couleur, du vert au marron, traduisant une dénaturation des pigments chlorophylliens uniquement sur les lots immergés à 29 °C après 15 jours d'exposition pour les mousses du bac témoin et seulement après 9 jours pour les échantillons contaminés par le cuivre.

III-4 DISCUSSION

Sans prendre en compte l'effet du cuivre, une nette diminution de la vitalité de la mousse et une dénaturation des pigments chlorophylliens est observée chez les échantillons immergés à 29 °C. Cette observation confirme le fait que l'espèce *Rhynchostegium riparioides*, à l'instar d'autres espèces de bryophytes, est incapable de vivre à des températures d'environ 30 °C (Dilks et Proctor, 1975; Glime et Vitt, 1984). La diminution de l'assimilation de CO_2 observée pendant 22 jours pour les mousses témoins immergées à 7 et 17 °C indique que les conditions expérimentales de laboratoire ne satisfont pas convenablement aux conditions naturelles dans lesquelles vivent les mousses, notamment pour les micronutriments et le spectre lumineux. Une diminution dans le temps de la concentration en chlorophylle a déjà été remarquée précédemment dans une expérience similaire (Mouvet, 1984a).

Entre 7 et 29 °C, la température de l'eau n'a pas d'effet sur les quantités de cuivre accumulées par les mousses durant la période d'exposition. Cette absence d'effet de la température est en contradiction avec les résultats concernant l'accumulation du ^{106}Ru par la même espèce qui est influencée par les changements de saison et la température de l'eau simulés en laboratoire (Vray *et al,* 1992). En constatant que cet élément est moins accumulé dans des conditions hivernales (4 °C, 13.5 $\mu E\ m^{-2}\ s^{-1}$ avec une fréquence jour/nuit de 8/16) que dans des conditions estivales (12 °C, 20 $\mu E\ m^{-2}\ s^{-1}$ avec une fréquence jour/nuit de 16/8), les auteurs suggèrent qu'il existe un mécanisme d'accumulation dépendant de la lumière et de la température de l'eau qui favorise l'accumulation en condition estivale. Pickering et Puia (1969) rapportent une augmentation de l'accumulation du zinc par *Fontinalis antipyretica* lorsque la température passe de 2 à 22 °C. Ils suggèrent qu'une partie de l'accumulation du zinc, correspondant à la pénétration intracellulaire de l'élément, dépend de la température de l'eau.

Dans la gamme de température testée dans la présente étude, la mesure de l'activité photosynthétique montre clairement la difficulté des mousses à survivre à la température la plus

élevée avec cependant aucun effet sur l'accumulation du Cu. Ce résultat suggère qu'aucun mécanisme actif lié à l'activité photosynthétique contribue de façon significative à l'accumulation de ce métal. Trop de différences existent entre cette étude et les travaux précédemment cités pour permettre de comparer de façon fiable et de conclure à un effet de la température sur l'accumulation intracellulaire des métaux par les mousses. Même s'il y a une contribution intracellulaire à l'accumulation du cuivre, elle n'apparaît pas significative comparée au mécanisme passif d'adsorption qui est le principal processus mis en jeu au niveau des sites d'échanges négativement chargés (Richardson, 1981; Breuer et Melzer, 1990; Tyler, 1990).

L'hypothèse de l'existence d'un processus intracellulaire d'accumulation du cuivre ne peut cependant être écartée. De précédentes études sur la localisation intracellulaire des métaux chez les bryophytes ont révélé leur présence dans la cellule (Mouvet, 1984; Jackson *et al,* 1991). La comparaison de l'activité photosynthétique entre les mousses exposées au cuivre à 29 °C et l'échantillon témoin correspondant montre un effet inhibiteur du métal, suggérant qu'une partie du Cu accumulé a pénétré dans la cellule. Pour les mousses exposées au cuivre à 29 °C, la consommation de CO_2 montre, qu'après 22 jours, devient négative alors qu'elle reste positive chez le lot témoin. Il est généralement reconnu qu'une quantité excessive de cuivre interfère avec le processus photosynthétique, la synthèse d'enzyme et le développement structurel de la plante (Lanaras *et al,* 1993; Meharg, 1993; Ouzounidou *et al,* 1993). Des travaux sur culture d'algues ont également révélé la phytotoxicité plus importante du cuivre par rapport à d'autres métaux (Poskuta, 1991; Starodub *et al,* 1987). L'inhibition de la photosynthèse chez *Fontinalis antipyretica* est observée pour des concentrations en cuivre dans l'eau allant de 6350 (Sommer et Winkler, 1982) à 63.5 $\mu g\ L^{-1}$ (Mouvet, 1984a). Le cuivre n'affectant la consommation de CO_2 qu'à 29 °C, il est possible que la température élevée de l'eau a une influence sur la capacité de la paroi cellulaire et/ou de la membrane plasmique à maintenir le métal hors de la cellule, augmentant ainsi l'accumulation intracellulaire de façon suffisante pour provoquer une diminution de l'activité photosynthétique et la dénaturation des pigments chlorophylliens.

III-5 CONCLUSION

La température de l'eau, variant de 7 à 29 °C, n'affecte pas les cinétiques d'accumulation du cuivre par *Rhynchostegium riparioides*. Ce résultat est d'autant plus important que les mousses aquatiques sont utilisées comme indicateurs de pollution dans plusieurs pays, à plusieurs saisons, et donc à des températures différentes. Les résultats de ces études deviennent alors comparables lorsque ce paramètre est le principal facteur fluctuant. Ce résultat est aussi

intéressant lorsqu'en absence de mousses autochtones, il est fait appel à la méthode des transferts (Kelly *et al*, 1987). L'emploi des mousses transférées n'aurait pas aussi à souffrir du manque d'acclimatation des échantillons avant leur exposition à leur nouveau milieu. Dans le cadre de la surveillance des rejets de centrale électronucléaire, où les températures de l'eau peuvent être très différentes entre le rejet et le milieu récepteur, ce paramètre ne devrait pas interférer avec les résultats.

Chapitre IV:
Influence des conditions hydrodynamiques du milieu sur l'accumulation des métaux par *Rhynchostegium riparioides*

IV-1 INTRODUCTION

Les mousses aquatiques et particulièrement l'espèce *Rhynchostegium riparioides* sont la plupart du temps associées à des régimes d'écoulement rapides, là où le flux de nutriments est conséquent (Proctor, 1990). Ainsi, lors de l'évaluation de la contamination métallique d'un cours d'eau à l'aide de mousses autochtones, ce sont majoritairement des faciès lotiques qui sont prospectés, bien que la présence de mousses dans des faciès lentiques soit reconnue. La situation est différente lorsque l'on fait appel à la technique des transferts. Mise au point afin de pallier l'absence d'espèces autochtones sur des stations jugées intéressantes à prospecter, la méthode, malgré ses nombreux avantages, peut néanmoins souffrir de quelques inconvénients dont la cause pourrait être le passage d'un milieu d'origine, avec ses caractéristiques physiques et chimiques propres, à un milieu qui peut présenter une composition de l'eau très différente. Si des conditions physico-chimiques contrastées du milieu ne semblent pas affecter l'espèce *Rhynchostegium riparioides* (Kelly et Whitton, 1987), la répartition géographique de cette dernière est influencée par des facteurs physiques tels que la nature du substrat et le régime d'écoulement (Empain, 1977; Suren, 1991). L'avantage de la méthode des transferts est de pouvoir choisir les stations d'étude sans avoir comme contrainte la présence de mousses autochtones. Or, si le régime d'écoulement est un facteur prépondérant dans la répartition des bryophytes, le transfert d'un échantillon d'un site de référence vers un site d'étude peut avoir des conséquences sur la physiologie de l'organisme et, potentiellement sur ses capacités à accumuler les métaux si les conditions hydrodynamiques sont différentes du site de prélèvement.

Le régime d'écoulement des stations prospectées est parfois mentionné dans la littérature sur le *monitoring* des métaux par les bryophytes aquatiques sans pour autant faire l'objet d'une attention particulière (Say *et al.*, 1981; Wehr et Whitton, 1983a et b). Par contre, ce paramètre a été étudié dans le cadre d'études sur la répartition de la végétation aquatique en fonction de la vitesse du courant (Madsen et Warncke, 1983; Chambers *et al.*, 1991) ou sur l'action du courant à la surface et dans les touffes de mousses en parallèle avec leur morphologie (Devantery, 1987).

Dans le cadre des études menées en collaboration avec EDF, où la méthode des transferts est systématiquement utilisée et où les conditions hydrodynamiques des stations peuvent être très contrastées, il est apparu nécessaire d'évaluer l'influence de ce paramètre. Cela est d'autant plus nécessaire qu'un premier essai en laboratoire a permis de mettre en évidence l'effet du temps de renouvellement du milieu sur les caractéristiques des cinétiques d'accumulation du cuivre. Cependant, la volonté d'obtenir en laboratoire des régimes d'écoulement similaires à ceux que l'on peut observer *in situ* s'est faite au détriment des conditions d'exposition et du respect du rapport volume de milieu sur volume de biomasse. Ces premiers résultats n'ont pas permis une exploitation fine, aussi, une seconde expérience dont le principal objectif n'est plus de s'approcher au plus près des conditions de terrain mais de respecter les mêmes conditions expérimentales entre les différentes unités expérimentales a pu être réalisée. Le paramètre testé n'est pas directement la vitesse du courant mais le temps de renouvellement du milieu. On peut en effet associer l'augmentation de la vitesse du courant à une augmentation du flux de polluant, augmentation qui peut être simulée en laboratoire par une diminution du temps de renouvellement, paramètre plus facilement reproductible au laboratoire.

Cette expérience de laboratoire a été ensuite confrontée à une étude menée *in situ*. L'étude a porté sur la contamination métallique, Cu et Cr essentiellement, d'un cours d'eau du massif vosgien, l'Andlau, qui se jette dans l'Ill en amont de Strasbourg. L'expérience a consisté à transplanter des mousses sur une station d'étude mais en différentes sous-stations du lit mineur choisies en fonction de la vitesse du courant, et d'y suivre les cinétiques d'accumulation des métaux.

IV-2 ETUDE EN LABORATOIRE

IV-2-1 PROTOCOLE EXPERIMENTAL

Dispositif expérimental

Le principe du dispositif expérimental de laboratoire est identique à celui décrit au chapitre II-3 à l'exception de la distribution du polluant et de l'EDTA. Afin de garantir une meilleure homogénéité des conditions d'exposition, notamment des concentrations d'exposition en métal et en complexant, les mélanges de l'eau déchlorée, du métal et de l'EDTA se font dans un bac tampon intermédiaire, placé entre les pompes de prise d'eau et les bacs expérimentaux. Le brassage est assuré par une pompe centrifuge d'un débit de 11 l min^{-1}. Le mélange est ensuite repris par des pompes péristaltiques et alimente en continu 3 bacs expérimentaux à 3 débits

différents. Un quatrième bac est alimenté directement par de l'eau déchlorée avec ajout d'EDTA (2 mg L^{-1}) mais sans apport de métal (bac témoin).

Conditions d'exposition des mousses

Le bac tampon permet le mélange de l'eau déchlorée, des solutions métalliques de Cr, Cu, Zn et du complexant dont les débits d'amenée respectifs permettent par dilution d'obtenir des concentrations d'exposition en chrome de 20 µg L^{-1}, en cuivre de 40 µg L^{-1}, en zinc de 100µg L^{-1} et en EDTA de 2 mg L^{-1}. A partir du bac tampon, trois bacs expérimentaux sont alimentés à trois débits différents: 2, 0.5 et 0.1 L min^{-1} correspondant à des temps de renouvellement de l'eau dans les bacs de 8.5 (bac A), 34 (bac B) et 170 minutes (bac C). Un bac témoin (bac T) est alimenté directement par de l'eau déchlorée avec ajout d'EDTA pour obtenir une concentration de 2 mg L^{-1} avec un temps de renouvellement du milieu de 34 minutes.

La phase d'exposition des mousses aux métaux dure 9 jours. Elle est suivie d'une phase de relargage de 10 jours débutant après l'arrêt de l'apport de solution métallique dans le milieu.

Afin de suivre l'influence du temps de renouvellement sur les cinétiques de relargage, deux échantillons du bac A, d'environ 20 g frais chacun, prélevés au début de la phase de relargage sont placés dans des paniers en plastique avant d'être immergés dans les bacs B et C dont les conditions de renouvellement sont différentes. De la même manière, des échantillons du bac B sont transférés dans les bacs A et C, et du bac C dans les bacs A et B. Ces différents échantillons ont été codés comme suit:
- en majuscule (A, B, C) le bac où l'échantillon a été intoxiqué;
- en minuscule (a, b, c) le bac où l'échantillon relargue.

Fréquence d'échantillonnage et de mesure

Le pH et la température sont mesurés journalièrement dans les 3 bacs expérimentaux. Les prélèvements en continu à l'aide de pompes péristaltiques permettent le dosage des anions et cations majeurs tous les deux jours. Une fraction de ces prélèvements est utilisée pour le dosage du chrome, du cuivre et du zinc. Les mousses sont prélevées toutes les 24 heures durant la phase d'exposition et après 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8 et 10 jours pendant la phase de relargage.

Statistiques

L'homogénéité des conditions d'exposition dans les 4 milieux expérimentaux est testée par une analyse de variance complétée par une comparaison multiple basée sur la méthode H.S.D. de

Tukey au seuil 0.05. Le même test est employé pour la mise en évidence des différences de métal accumulé par les mousses après 9 jours selon le temps de renouvellement et pour la mise en évidence de l'effet de ce même paramètre sur les concentrations en métaux après 10 jours de relargage. La mise en évidence du relargage des métaux par les mousses est effectuée par la comparaison des concentrations en début et fin de la phase de relargage (test *t* de Student).

IV-2-2 RESULTATS

Conditions d'exposition des mousses

Les caractéristiques physico-chimiques des 4 milieux d'exposition sont résumées dans le tableau 4-1. Les concentrations en anions et cations apparaissent homogènes tandis que l'on distingue une différence significative entre les 4 bacs pour ce qui concerne la température, plus faibles dans les bacs T et A, et le pH, significativement plus élevé dans le bac C.

Tableau 4-1: Caractéristiques physico-chimiques du milieu d'exposition. Toutes les valeurs sont en mg L^{-1} sauf la température (°C) et le pH (n = 12)

Paramètres	Bac				Signification
	Témoin	A	B	C	
pH	7.86 ± 0.01	7.75 ± 0.05	7.83 ± 0.06	8.07 ± 0.05	**
Température	13.3 ± 0.8	13.1 ± 0.8	13.7 ± 0.7	15.1 ± 0.2	**
HCO_3	209 ± 24	187 ± 16	192 ± 5	192 ± 5	n.s.
NO_3	9.6 ± 1.0	10.5 ± 1.1	10.4 ± 0.8	10.3 ± 1.1	n.s.
SO_4	89.6 ± 2.5	90.0 ± 3.2	91.7 ± 3.6	89.9 ± 3.4	n.s.
Cl	51.6 ± 2.1	51.8 ± 1.7	53.0 ± 3.0	52.3 ± 2.0	n.s.
Ca	93 ± 6	89 ± 5	95 ± 9	90 ± 5	n.s.
Mg	9.2 ± 0.9	8.5 ± 1.0	9.5 ± 0.6	9.5 ± 1.0	n.s.
Na	5.8 ± 0.2	5.8 ± 0.4	6.0 ± 0.3	6.1 ± 0.5	n.s.
K	2.2 ± 0.1	2.4 ± 0.2	2.1 ± 0.2	2.2 ± 0.2	n.s.

*: p = 0.05; **: p = 0.01; n.s.: non significatif

Les concentrations moyennes en Cr et Cu durant la phase d'exposition ne sont pas différentes entre les bacs A et B, mais sont plus fortes en Cu et plus faibles en Cr dans le bac C.

Après 9 jours d'exposition aux métaux, l'apport des solutions métalliques est stoppé. Les concentrations moyennes d'exposition durant la phase de relargage sont de 1.7 ± 1.3, 3.8 ± 1.6 et 45 ± 3 µg L^{-1} respectivement pour Cr, Cu et Zn.

Tableau 4-2: Concentrations d'exposition (moyenne ± écart-type; µg L^{-1}) en Cr, Cu et Zn durant la phase d'exposition (n = 9).

Paramètres	Bac				Signification
	Témoin	A	B	C	
Cr[a]	0.4 ± 0.1	24.5 ± 1.3	22.8 ± 0.8	15.7 ± 0.7	**
Cu[a]	8.5 ± 3.5	36.8 ± 1.3	37.0 ± 1.1	40.2 ± 1.9	**
Zn[a]	51 ± 6	118 ± 11	114 ± 6	107 ± 5	n.s.

[a]: La comparaison des concentrations d'exposition ne concerne pas le bac témoin;
**: $p < 0.01$; n.s. différence non significative

Cinétiques d'accumulation de Cr, Cu et Zn

Le suivi des concentrations en chrome dans les mousses exposées pendant 9 jours au métal permet de distinguer trois cinétiques d'accumulation selon que les mousses ont été immergées dans les bacs A, B ou C (Figure 4-1). Après 9 jours d'exposition, les mousses aquatiques ont significativement plus accumulé le chrome dans le bac A que dans le bac B et que dans le bac C ($p < 0.01$), révélant ainsi que plus le temps de renouvellement du milieu est court, plus les mousses accumulent. Les écarts de concentration sont importants puisque l'on observe un facteur 2 entre les lots issus des bacs B et C et un facteur 3.5 entre les lots provenant des bacs A et C. Durant cette même période de 9 jours, les concentrations en chrome dans les mousses immergées dans le bac témoin varient de 3 ± 0 à 6 ± 1 µg g^{-1}.

A l'instar de ce que l'on observe pour le chrome, l'exposition des mousses au cuivre dans les 3 bacs expérimentaux se traduit également par trois cinétiques d'accumulation différentes (Figure 4-2). Après 9 jours d'exposition, la comparaison multiple des concentrations en cuivre observées dans les mousses issues des 3 bacs montrent que l'organisme a d'autant plus accumulé que le temps de renouvellement est court ($p < 0.05$). Durant les 9 premiers jours de l'expérience, les concentrations en cuivre des échantillons collectés dans le bac témoin varient de 9 ± 0 à 25 ± 2 µg g^{-1}.

Le cas du zinc est moins évident (Figure 4-3). Les mousses collectées *in situ* sont déjà contaminées avec un niveau en zinc de 441 ± 25 µg g^{-1}. Ce niveau élevé pour des échantillons de

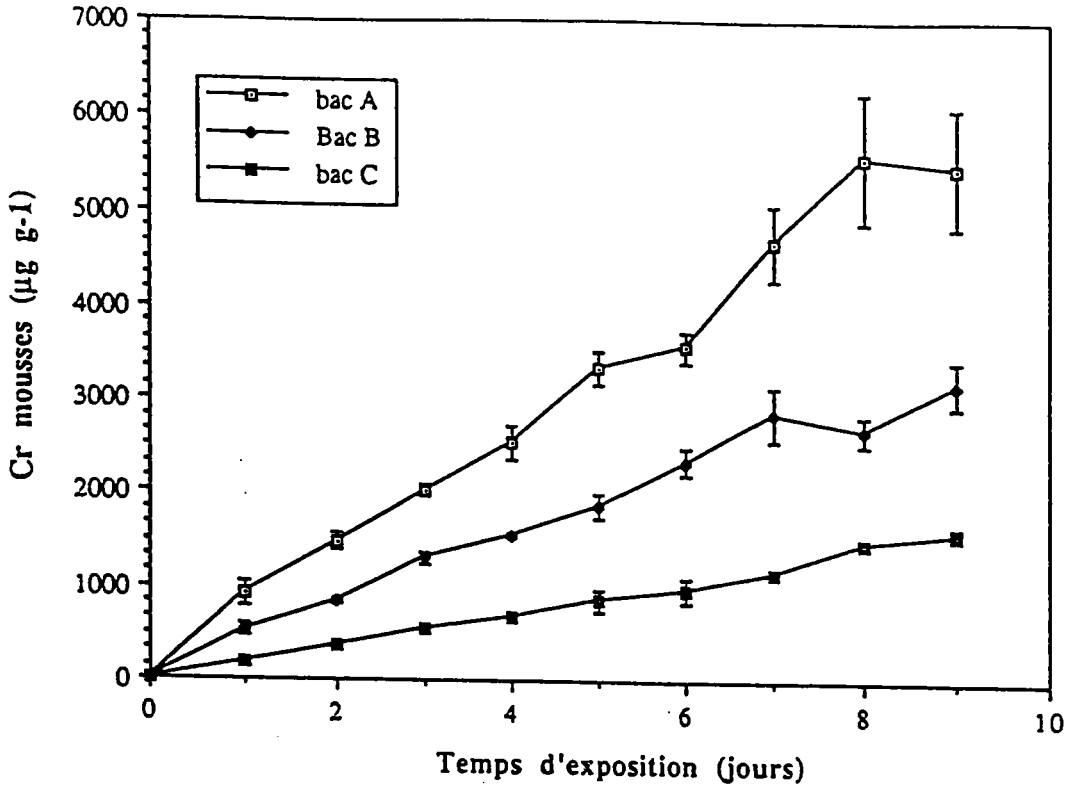


Figure 4-1: Cinétiques d'accumulation du chrome par *Rhynchostegium riparioides* immergées dans les unités expérimentales dont le débit est de 2 (bac A), 0.5 (bac B) et 0.1 l min-1 (bac C). Les barres verticales représentent l'écart-type (n = 3).

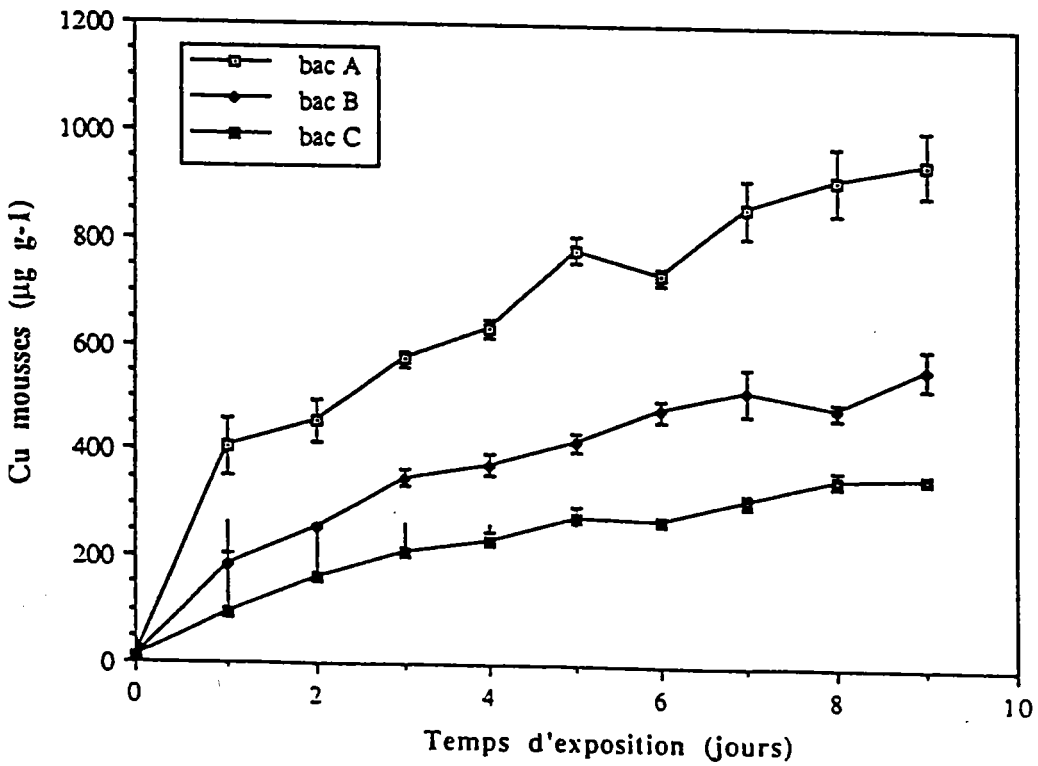


Figure 4-2: Cinétiques d'accumulation du cuivre par *Rhynchostegium riparioides* immergées dans les unités expérimentales dont le débit est de 2 (bac A), 0.5 (bac B) et 0.1 l min-1 (bac C). Les barres verticales représentent l'écart-type (n = 3).

référence a pour première conséquence un relargage du métal observé pour les mousses du bac témoin dont les concentrations chutent après 9 jours à 278 ± 45 μg g^{-1}. Par contre, cela n'empêche pas d'observer un léger effet du temps de renouvellement du milieu sur les cinétiques d'accumulation du zinc dans les mousses dont les concentrations après 9 jours varient significativement ($p < 0.05$) de 385 ± 35 (bac C) à 600 ± 66 μg g^{-1} (bac A). Cependant, la comparaison multiple montre que les concentrations en Zn dans les mousses du bac A ne sont pas significativement différentes des teneurs observées dans le lot issu du bac B ($p > 0.05$), teneurs elles-mêmes similaires aux concentrations observées dans l'échantillon du bac C ($p > 0.05$). Le faible taux d'accumulation observé pour le zinc, comparé au chrome et au cuivre, est dû à la fois au fait que les mousses étaient au préalable déjà contaminées et que les concentrations d'exposition dans les trois bacs contaminés par le Zn ne sont que deux fois supérieures à la concentration du bac témoin.

Cinétiques de relargage de Cr, Cu et Zn

Trois paramètres sont choisis pour décrire les cinétiques de relargage des 3 métaux. Le tableau 4-3 résume les concentrations en métal dans les mousses en début (C_1) et en fin de relargage (C_2). Afin de pouvoir estimer la vitesse à laquelle les métaux sont relargués, le nombre de jours ($J_{50\%}$) nécessaire au relargage de la moitié de la quantité désorbée en 10 jours ($C_1 - C_2$) est relevé. Les résultats complets des cinétiques de relargage sont donnés en annexe (Annexe B).

Les concentrations en chrome au début (C_1) et à la fin de la phase de relargage (C_2) ne sont pas significativement différentes dans 6 cas sur 9 (Tableau 4-3) révélant ainsi que le chrome n'est pas relargué par les mousses. Dans les 3 autres cas où l'on observe un relargage significatif, les quantités désorbées par les mousses n'excèdent jamais 25 % de la quantité accumulée.

Le relargage du cuivre par les mousses est, contrairement au chrome, toujours significatif quelles que soient les conditions de temps de renouvellement. Le relargage du métal est d'abord rapide (50 % du métal désorbé au bout de 10 jours l'est après seulement 2 ou 3 jours), pour ensuite tendre vers une valeur d'équilibre.

Le cas du zinc est comme pour l'accumulation moins évident puisque l'on observe un relargage du métal dans seulement 7 cas sur 9. Cependant, les quantités de Zn relarguées par les mousses sont relativement modestes et n'excèdent pas 38 % de la quantité maximale préalablement accumulée. Le cas du Zn reste particulier dans le sens où les concentrations dans l'eau durant la phase de relargage ne sont que deux fois inférieures à la concentration d'exposition et, avec une teneur moyenne de 45 ± 3 μg L^{-1} (teneur dans l'eau de distribution), ne sont pas le reflet d'un milieu non contaminé.

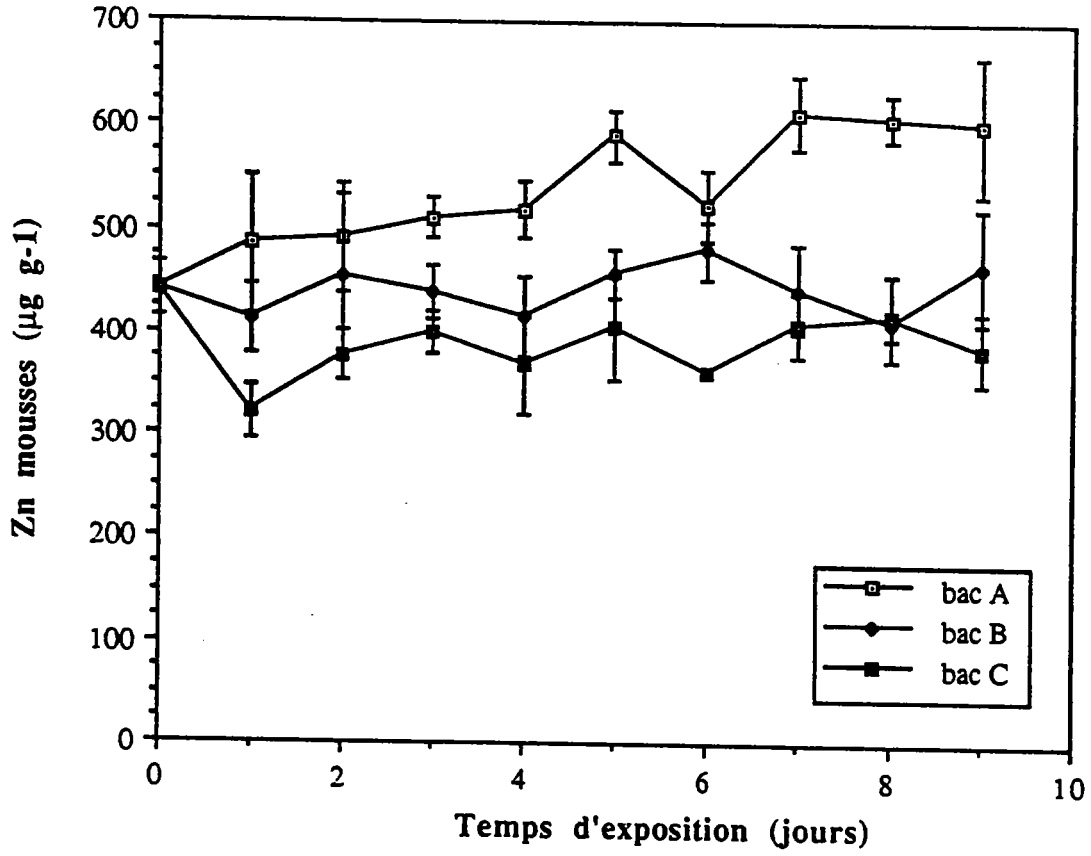


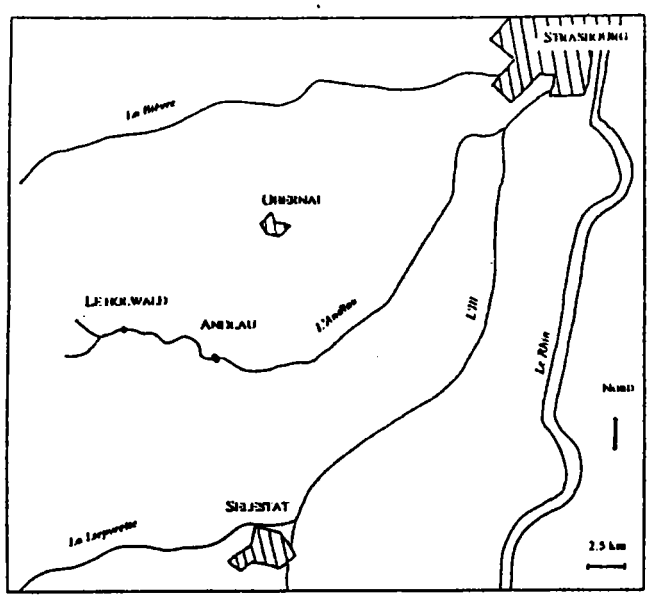
Figure 4-3: Cinétiques d'accumulation du zinc par *Rhynchostegium riparioides* immergées dans les unités expérimentales dont le débit est de 2 (bac A), 0.5 (bac B) et 0.1 l min-1 (bac C). Les barres verticales représentent l'écart-type (n = 3).

Tableau 4-3: Différences entre les concentrations en métaux (Cr, Cu, Zn) dans les mousses en début (C_1; µg g^{-1}) et en fin de relargage (C_2 ;µg g^{-1}). Nombre de jour (J; jour) au bout desquels 50 % de la fraction désorbée [C_1 - C_2] est relarguée.

Bac	Aa	Ab	Ac	Ba	Bb	Bc	Ca	Cb	Cc
Métal	Chrome								
C_1	5470	5470	5470	3171	3171	3171	1580	1580	1580
C_2	4003	5430	4785	2855	2405	2723	1397	1374	1246
Signif.	**	n.s.	n.s.	n.s.	**	n.s.	n.s.	n.s.	**
$J_{50\%}$	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10
Métal	Cuivre								
C_1	947	947	947	564	564	564	356	356	356
C_2	474	534	464	305	272	266	204	182	191
Signif.	**	**	**	**	**	**	**	**	**
$J_{50\%}$	2	2	3 - 4	3	3	2	2	3	3
Métal	Zinc								
C_1	600	600	600	466	466	466	385	385	385
C_2	442	422	371	335	387	270	276	361	295
Signif.	**	**	**	**	n.s.	**	**	n.s.	**
$J_{50\%}$	2	1 - 2	1 - 2	0 - 1	2	0 - 1	0 - 1	0 - 1	0 - 1

** : $p < 0.01$; * : $p < 0.05$; n.s. = non significatif

Le transfert à la fin de la phase d'exposition d'une partie des mousses d'un bac à l'autre permet de mettre en évidence l'effet éventuel du temps de renouvellement sur les cinétiques de relargage (Tableau 4-4). Dans le cas du chrome, quel que soit le temps de renouvellement du bac dans lequel les échantillons sont immergés, on n'observe aucun effet sur les quantités relarguées. Le temps de renouvellement du milieu a par contre un effet sur le relargage du cuivre mais seulement sur l'échantillon qui a été préalablement contaminé dans le bac B puis transféré dans les bacs A, B et C durant la phase de relargage. Le même phénomène est observé dans le cas du zinc pour tous les échantillons. Pour les cas où l'on observe un effet du temps de renouvellement du milieu sur le relargage des métaux, on remarque que ce sont toujours les échantillons immergés dans le bac dont le temps de renouvellement est le plus court (bac A) qui relarguent le moins.



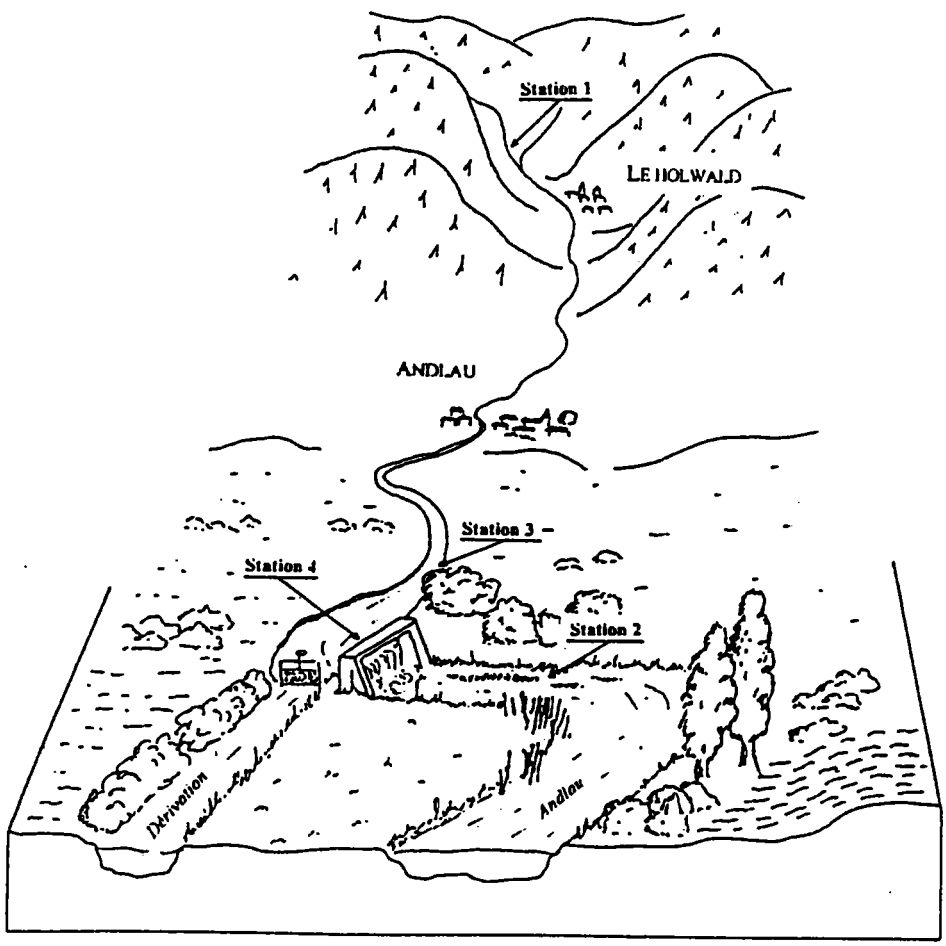


Figure 4-4: Localisation des stations d'étude sur l'Andlau

Tableau 4-4: Classement des échantillons (pour les codes, voir texte) selon les concentrations métalliques observées après 10 jours de relargage (test de comparaison multiple de Tukey, p = 0.05).

Métal	Bac d'exposition	Classement
Chrome	A	Aa = Ab = Ac
	B	Ba = Bb = Bc
	C	Ca = Cb = Cc
Cuivre	A	Aa = Ab = Ac
	B	Ba > Bb = Bc
	C	Ca = Cb = Cc
Zinc	A	Aa ≥ Ab ≥ Ac
	B	Ba > Bb > Bc
	C	Ca > Cb = Cc

IV-3 ETUDE *IN SITU*

IV-3-1 PROTOCOLE EXPERIMENTAL

Site d'étude

Le choix du site d'étude s'est porté sur l'Andlau en Alsace qui prend sa source dans les Vosges, en amont du village Le Holwald (station 1), et se jette dans l'Ill au sud de Strasbourg (Figure 4-4). D'après les relevés du Réseau National de Bassin, le cours d'eau est soumis à une pollution métallique (Cu, Cr) due à la présence de nombreuses petites industries implantées sur la commune de Andlau (tannerie, industrie mécanique et électronique). Le site présente également 5 km à l'aval du village de Andlau un radier offrant ainsi un gradient de vitesse suffisamment contrasté (stations 2, 3 et 4).

Dispositif expérimental

Un échantillon de l'espèce *Rhynchostegium riparioides* est prélevé dans l'Orne à Hatrize, puis, après avoir subi le protocole précédemment décrit (chapitre II-5), est réparti dans quatre paniers en plastique maillé (30 g frais environ par panier). Un lot est ensuite placé à la station 1 en amont du dernier village de la vallée (Le Holwald). Les trois autres sont répartis sur les stations 2, 3 et 4. Les paniers sont fixés à des piquets plantés dans le lit du cours d'eau. Les stations aval sont choisies en fonction de la vitesse du courant. La station 2 correspond à un

régime d'écoulement lent, la station 3, à un régime intermédiaire et la station 4, à un régime rapide. Trois préleveurs d'eau automatique (type ISCO) sont également installés à proximité des stations 2, 3 et 4. Les crépines de prélèvement sont fixées sur les piquets où sont attachés les paniers en plastique.

Fréquence d'échantillonnage et de mesure

Les préleveurs d'eau automatiques, installés aux stations 2, 3 et 4, permettent d'obtenir un échantillon d'eau moyen par 24 heures avec une fréquence de pompage de 6 heures. Une fraction de l'échantillon de mousse collecté à Hatrize, environ 2 g sec, est conservée au laboratoire afin de pouvoir déterminer les concentrations en métaux avant l'exposition. Les mousses sont échantillonnées sur les quatre stations après 5, 8, 13, 16 et 20 jours, moments où sont mesurés le pH, la température, l'oxygène dissous, la conductivité et la vitesse du courant. Un prélèvement ponctuel d'eau aux stations 1 et 3 est également effectué au moment des mesures pour la détermination des concentrations en Ca, Mg, Na, K, NO_3, SO_4, PO_4, Cl et HCO_3.

Le premier jour (jour 0) et le dernier jour (jour 20) de l'exposition, des échantillons de mousses autochtones de l'espèce *Rhynchostegium riparioides* sont collectés là où elles sont présentes naturellement, c'est-à-dire aux stations 1, 2 et 4.

Statistiques

L'homogénéité des conditions d'exposition dans les 3 stations aval est testée par analyse de variance tandis que les différences entre les concentrations en métaux dans les mousses transplantées aux stations 2, 3 et 4 sont testées par une analyse de variance accompagnée d'une comparaison multiple basée sur la méthode H.S.D. de Tukey ($p = 0.05$). Les différences entre les concentrations métalliques dans les mousses autochtones et transplantées sont mises en évidence par le test *t* de Student.

IV-3-2 RESULTATS

Conditions d'exposition

La vitesse du courant n'a été mesurée qu'aux stations 3 et 4, ce paramètre pouvant être considéré comme négligeable à la station 2 et impossible à mesurer à la station 1 où le régime turbulent des eaux empêche une mesure fiable. On peut néanmoins donner une estimation de la vitesse du courant comprise entre 0.5 et 1 m s^{-1}. Excepté la vitesse du courant, significativement

différente entre les stations où elle a pu être mesurée ($p < 0.01$), les conditions physico-chimiques d'exposition des mousses sont similaires aux stations 2, 3 et 4 (Tableau 4-5).

Tableau 4-5: Caractéristiques physico-chimiques (moyenne ± écart-type; n = 6) des stations étudiées.

Paramètres	Unités	Stations			
		1	2	3	4
pH		7.7 ± 0.4	7.8 ± 0.1	7.8 ± 0.1	7.8 ± 0.1
Température	°C	13.8 ± 2.1	18.5 ± 2.1	18.5 ± 2.2	18.4 ± 2.2
Conductivité	$\mu S\ cm^{-1}$	63 ± 4	153 ± 9	152 ± 9	152 ± 9
$O_{2\ dissous}$	$mg\ L^{-1}$	12.0 ± 2.2	10.2 ± 1.5	10.2 ± 1.2	10.4 ± 1.3
Courant	$m\ s^{-1}$	-	< 0.05	0.4 ± 0.1	0.8 ± 0.2

Le passage du cours d'eau d'un substrat granitique à la plaine d'Alsace entraîne un doublement de la conductivité et par voie de conséquence, une augmentation des anions et cations majeurs (Tableau 4-6).

Tableau 4-6: Concentrations (moyenne ± écart-type ; n = 5) en anions et cations ($mg\ L^{-1}$) à l'amont (station 1) et à l'aval du village de Andlau (stations 2, 3 et 4).

Paramètres	Station amont		Station aval	
	Moyenne	écart-type	Moyenne	écart-type
HCO_3	27.0	7.0	72.0	11.0
NO_3	4.8	0.7	6.5	0.4
SO_4	3.6	0.1	12.9	0.3
Cl	2.0	0.1	5.2	0.2
Ca	7.4	0.2	19.5	1.2
Mg	1.3	0.1	3.4	0.1
Na	3.1	0.1	6.7	0.8
K	2.7	0.1	6.2	0.7

La figure 4-5 illustre l'évolution du débit du cours d'eau mesuré à Andlau, 5 km en amont des stations 2, 3 et 4. Fluctuant de 0.6 à 1.1 $m^3\ s^{-1}$ durant les 8 premiers jours de

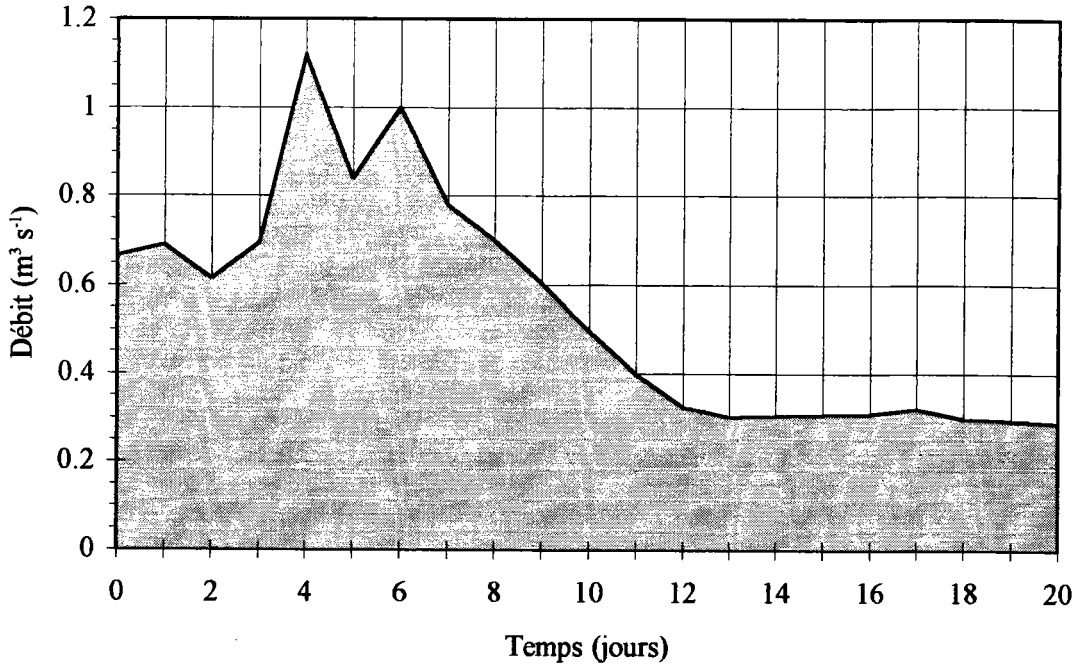


Figure 4-5: Evolution du débit de l'Andlau au limnigraphe de Andlau entre le 22 juin et le 12 juillet 1994 (Source: SEMA DIREN Alsace).

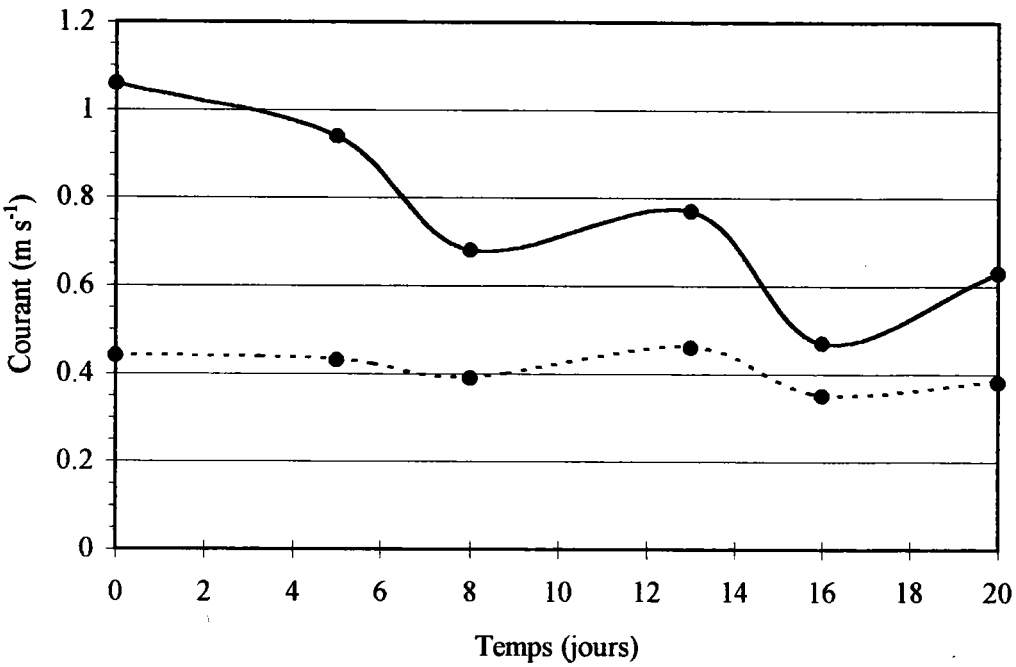


Figure 4-6: Evolution de la vitesse du courant aux stations 3 (----) et 4 (—) entre le 22 juin et le 12 juillet 1994.

l'expérience, le débit de l'Andlau diminue progressivement jusqu'au 12ème jour pour se stabiliser autour de 0.3 $m^3 s^{-1}$. Cette diminution du débit se ressent sur la vitesse du courant à la station 4, qui, contrairement au courant mesuré à la station 3, n'est pas stable durant la période d'immersion des mousses (Figure 4-6).

Les concentrations moyennes en Cr, Cu et Zn total obtenues par des prélèvements ponctuels au niveau de la station 1 sont respectivement inférieures à 0.1, 5 et 10 µg L^{-1}. La détermination des concentrations métalliques dans les échantillons d'eau prélevés aux stations 2 et 4[1]. montrent clairement la contamination du cours d'eau (Tableau 4-7). La distinction des formes dissoutes et particulaires montrent que ce sont essentiellement ces dernières qui contribuent à la contamination de l'eau. Le coefficient de partage entre les formes particulaires et dissoutes est de 6, 4 et 2 pour Cr, Cu et Zn à la station 2, et de 3, 0.8 et 1.4 à la station 4. La différence entre les coefficients de partage entre les deux stations n'a pas de conséquence sur les teneurs en métal dissous. On constate en effet que, pour les 3 métaux considérés, les concentrations moyennes d'exposition en métal dissous ne sont pas significativement différentes entre les stations 2 et 4 ($p < 0.01$). Par contre les écarts importants observés entre les minima et maxima suggèrent que l'on se trouve dans le cas d'une pollution intermittente.

Tableau 4-7: Concentrations moyennes ± écart-type (µg L^{-1}; n = 20) en métaux totaux et dissous aux stations 2 et 4 *(Minimum/Maximum)*.

Paramètres	Station 2		Station 4	
Cr_{total}	4.2 ± 2.4	*(1.7 / 9.2)*	1.6 ± 1.2	*(0.8 / 4.7)*
$Cr_{dissous}$	0.6 ± 0.2	*(0.3 / 0.9)*	0.4 ± 0.3	*(0.1 / 1.0)*
Cu_{total}	128 ± 87	*(32 / 397)*	44 ± 45	*(9 / 218)*
$Cu_{dissous}$	25 ± 13	*(4 / 61)*	25 ± 18	*(4 / 89)*
Zn_{total}	37 ± 29	*(17 / 140)*	24 ± 23	*(8 / 105)*
$Zn_{dissous}$	13 ± 5	*(6 / 22)*	10 ± 4	*(4 / 21)*

Les figures 4-7, 4-9 et 4-11 retracent l'évolution des teneurs en Cr, Cu et Zn sous leurs formes totales et dissoutes aux stations 2 et 4 durant les 20 jours d'expérience. On distingue sur chacune d'elles 2 phases successives lorsque l'on considère les concentrations en métal total. Les 8 premiers jours sont en effet marqués par une contamination intermittente avec notamment 2 pics de pollution après 2 et 4 jours. Les concentrations en métal total redeviennent ensuite plus

[1] Aucun résultat relatif aux concentrations dans l'eau au niveau de la station 3 ne peuvent être fournis suite à un acte de vandalisme sur l'appareil de prélèvement.

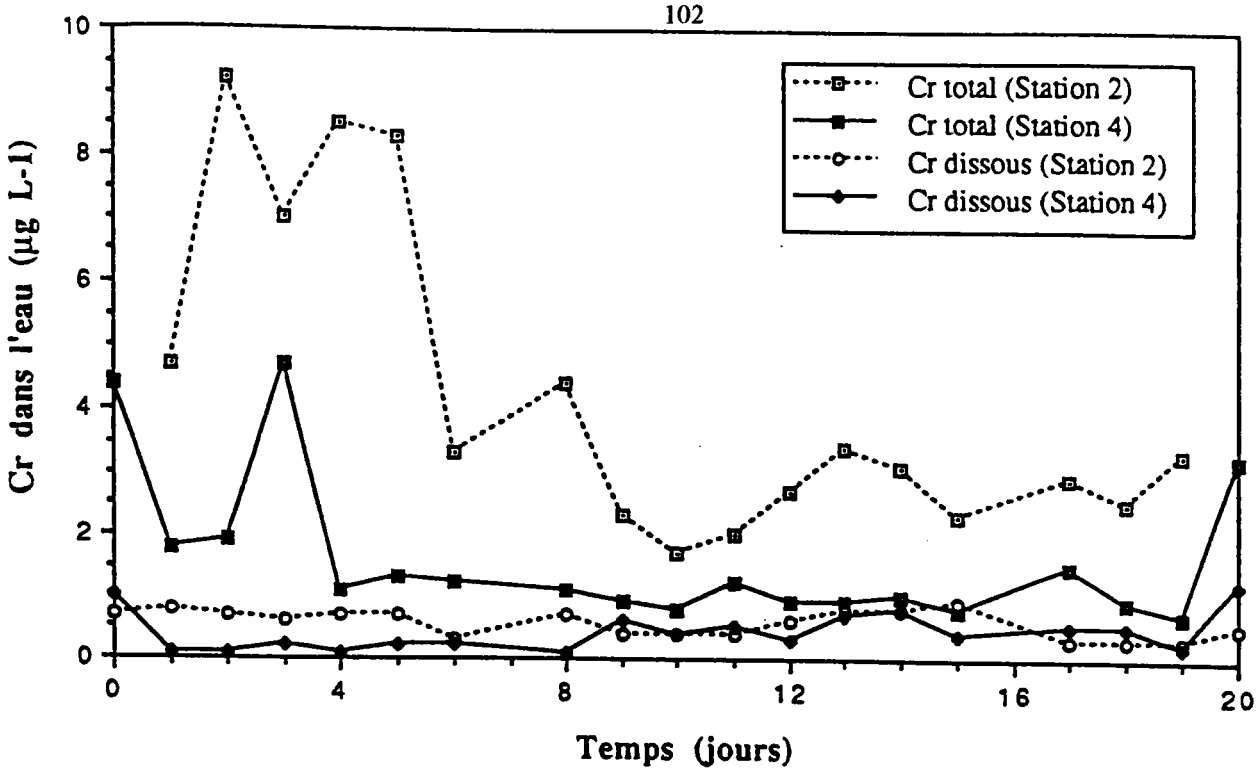


Figure 4-7: Evolution des concentrations en chrome dans l'eau aux stations 2 et 4 durant la période d'exposition des mousses.

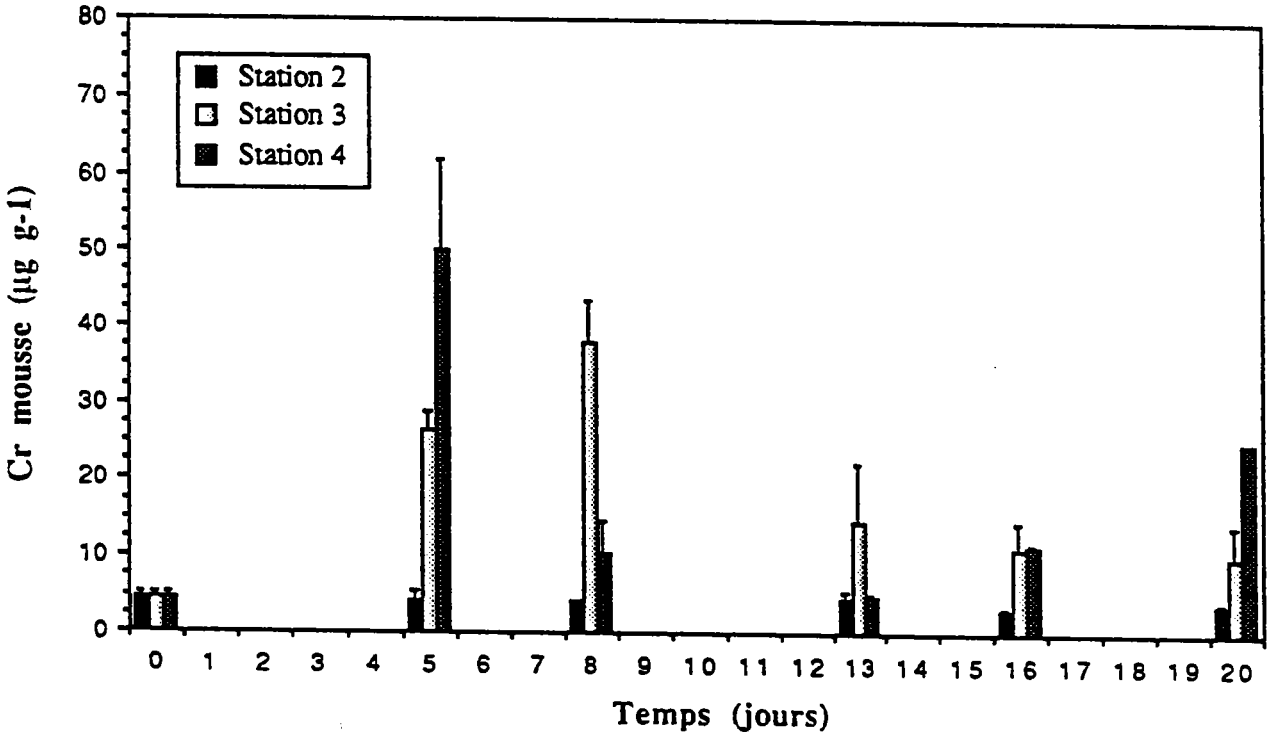


Figure 4-8: Evolution des concentrations en chrome dans les mousses immergées aux stations 2, 3 et 4. Les barres verticales représentent l'écart-type (n = 3).

stables. Il est à noter que ces pics de pollution ne se ressentent quasiment pas sur l'évolution des teneurs en métal dissous.

Concentrations en Cr, Cu et Zn dans les mousses transplantées selon le régime d'écoulement des eaux

La conséquence de l'exposition des mousses aux stations 2, 3 et 4 est l'accumulation des métaux par les organismes dans des proportions qui sont cependant variables selon la station considérée.

Dans le cas du chrome, on observe, dès le 5ème jour, des concentrations accumulées par les mousses significativement différentes selon la station dont elles sont issues ($p < 0.05$). Alors qu'elles n'ont pas accumulé à la station 2, les mousses concentrent le Cr jusqu'à 27 et 50 $\mu g\ g^{-1}$ respectivement aux stations 3 et 4 (Figure 4-8). Si les concentrations en Cr dans les échantillons collectés à la station 2 n'évoluent pratiquement pas durant l'ensemble de l'expérience, celles observées dans les échantillons issus des stations 3 et 4 sont sujettes à d'importantes variations qui ne vont pas dans le sens d'une accumulation progressive au cours du temps. Après avoir observé une accumulation du métal les premiers jours, les mousses en relarguent une partie pour ensuite accumuler à nouveau à partir du 13ème jour. On peut alors remarquer que l'évolution des concentrations en Cr dans les mousses suit celle des concentrations en métal total dans l'eau (Figure 4-7). Par contre, elles ne semblent pas être le reflet de la contamination en chrome dissous. De plus, après 20 jours d'exposition, les concentrations en Cr dans les mousses sont d'autant plus importantes que la vitesse du courant des stations dans lesquelles elles sont immergées est élevée ($p < 0.05$) alors que la concentration d'exposition en Cr dissous est similaire aux stations 2 et 4. Les concentrations en Cr dans les mousses transférées à la station 1 varient de 1.9 à 4.6 $\mu g\ g^{-1}$.

Les concentrations en cuivre des échantillons de la station 1 varient de 15 à 26 $\mu g\ g^{-1}$ durant les 20 jours d'expérience. Aux 3 stations aval, le cuivre est accumulé par les mousses jusqu'à une valeur maximale de 1313 $\mu g\ g^{-1}$. Contrairement à ce qui a été observé pour le chrome, les mousses accumulent le cuivre à toutes les stations (Figure 4-10). Cependant, si l'on n'observe pas ou peu de différence entre les quantités accumulées par les lots des stations 3 et 4 (courant moyen et rapide), les concentrations en Cu du lot immergé à la station 2 sont toujours inférieures aux deux autres ($p < 0.05$) d'au moins 25 % (maximum 78 %). Après 20 jours d'exposition, les concentrations en Cu dans les mousses de la station 2 sont encore de 31 % inférieures aux concentrations en Cu dans les mousses des deux autres stations. Selon la station dont sont issus les échantillons, les mousses n'accumulent pas les mêmes quantités de cuivre alors que la concentration moyenne d'exposition en Cu dissous dans l'eau n'est pas différente entre les

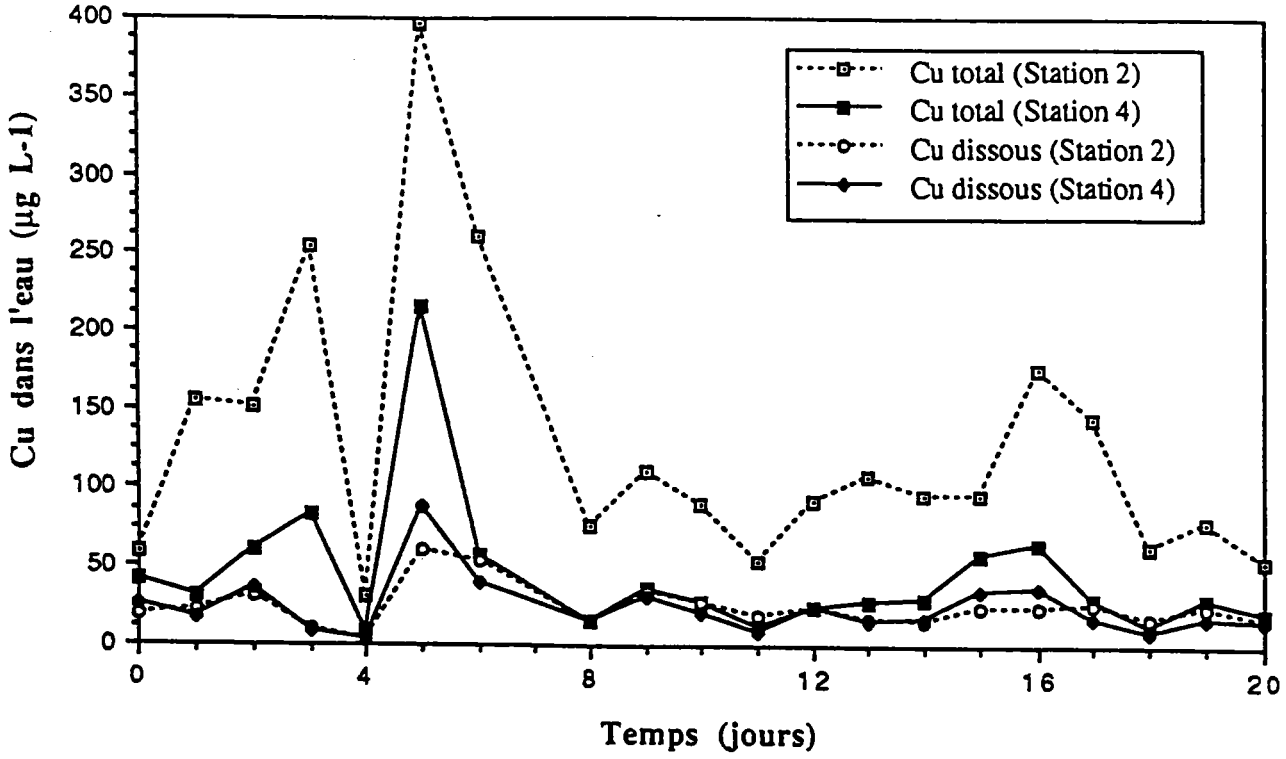


Figure 4-9: Evolution des concentrations en cuivre dans l'eau aux stations 2 et 4 durant la période d'exposition des mousses.

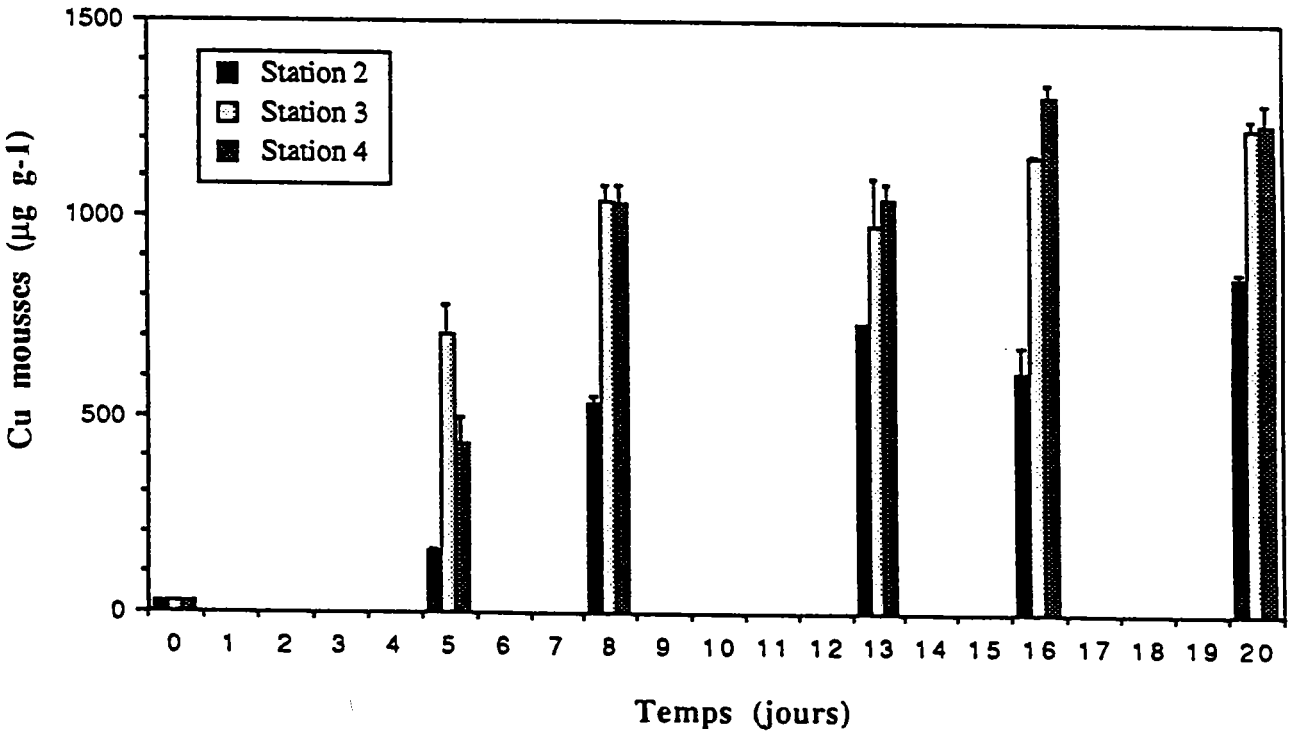


Figure 4-10: Evolution des concentrations en cuivre dans les mousses immergées aux stations 2, 3 et 4. Les barres verticales représentent l'écart-type (n = 3).

stations 2 et 4. Les quantités accumulées ne sont pas non plus le reflet de la teneur en Cu total, cette dernière étant 3 fois plus élevée à la station 2 qu'à la station 4.

Le cours d'eau étudié n'est pas fortement contaminé par le Zn. Cela se traduit alors par une faible accumulation du métal par les mousses transplantées aux stations 2, 3 et 4. D'une valeur de 159 $\mu g\ g^{-1}$ en début d'expérience, les concentrations en Zn dans les mousses ne varient que d'un facteur 1.6, de 157 ± 10 à $248 \pm 13\ \mu g\ g^{-1}$ (Figure 4-12). Le faible taux d'accumulation du Zn ne permet pas d'identifier un effet éventuel de la vitesse du courant. On remarque cependant que, contrairement à ce qui a été observé pour les autres métaux, la concentration en Zn la plus élevée après 20 jours est analysée dans l'échantillon collecté à la station 3. Les concentrations en Zn dans les mousses transplantées à la station 1 varient de 138 à 159 $\mu g\ g^{-1}$.

Concentrations en métaux dans les mousses autochtones en fonction du régime d'écoulement des eaux

Les stations 1, 2 et 4 offrent l'avantage de présenter des populations de *Rhynchostegium riparioides* autochtones permettant ainsi d'évaluer, comme par la méthode des transferts, l'effet du courant sur les quantités de métal accumulées par les organismes. Les échantillons collectés le premier jour de l'expérience (jour 0) présentent des concentrations en Cr et Cu significativement plus élevées à la station 4 tandis que l'on observe l'inverse dans le cas du zinc ($p < 0.01$) (Figure 4-13). Après 20 jours d'expérience, les concentrations en Cr dans les échantillons autochtones collectés (jour 20) ont considérablement diminué, notamment à la station 4, suggérant de ce fait le passage d'un pic de pollution par le Cr avant le début de l'expérience. Contrairement à ce qui a été observé au jour 0, les concentrations en Cr et Cu après 20 jours ne sont plus significativement différentes ($p > 0.05$) entre les échantillons collectés aux stations 2 et 4. Pour le zinc, on observe toujours après 20 jours une concentration en métal plus élevée dans l'échantillon collecté à la station 2 que dans celui prélevé à la station 4 ($p < 0.01$).

Comparaison des concentrations en métaux entre les mousses autochtones et les mousses transplantées

La présence de mousses autochtones aux stations 1, 2 et 4 permet aussi de comparer les niveaux d'accumulation entre mousses autochtones et transplantées. Dans ce cas, seules les concentrations en métaux après 20 jours dans les mousses autochtones et transplantées font l'objet d'une comparaison statistique, l'échantillon transféré étant "par définition" non contaminé au jour 0, sa comparaison avec l'échantillon autochtone correspondant ne se justifie pas.

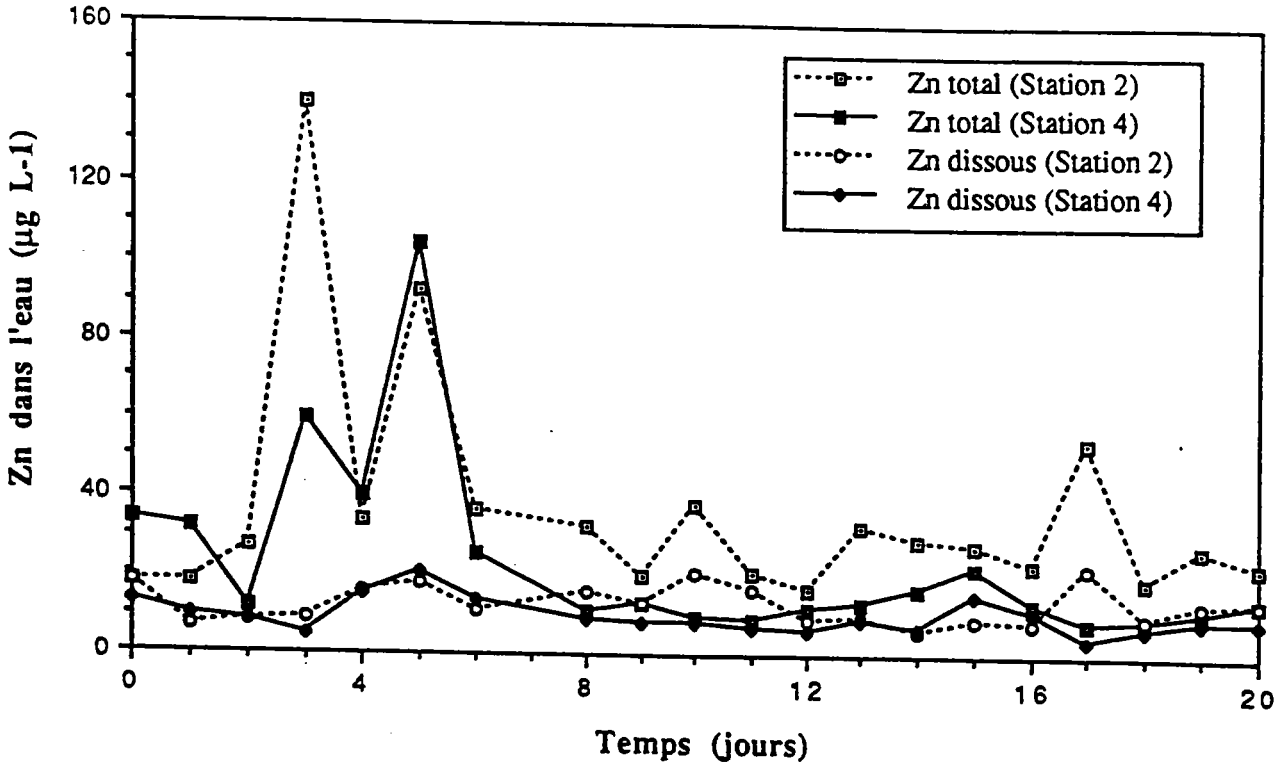


Figure 4-11: Evolution des concentrations en zinc dans l'eau aux stations 2 et 4 durant la période d'exposition des mousses.

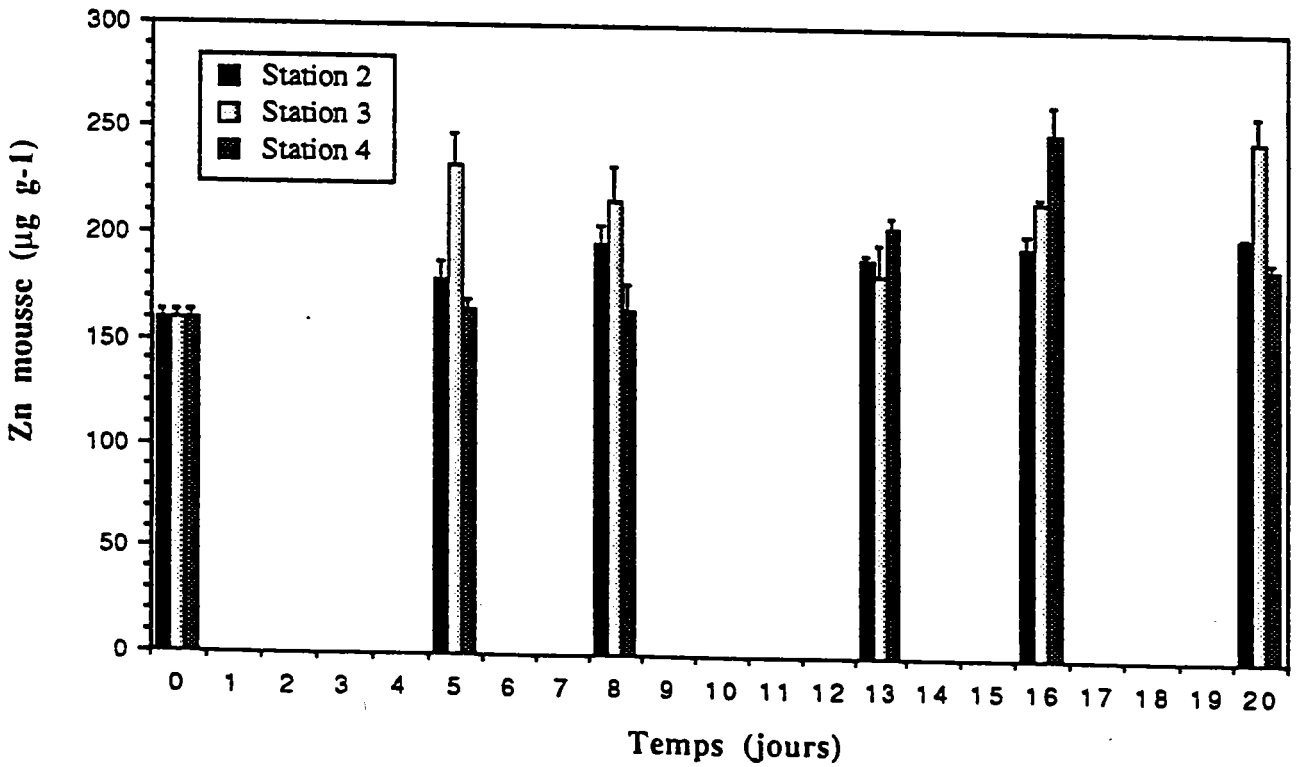


Figure 4-12: Evolution des concentrations en zinc dans les mousses immergées aux stations 2, 3 et 4. Les barres verticales représentent l'écart-type (n = 3).

Les concentrations en Cr dans les mousses autochtones et transplantées sont du même ordre de grandeur à la station 1 même si l'on observe une différence significative ($p < 0.05$) (Figure 4-13). Par contre, les concentrations sont systématiquement plus élevées dans les mousses autochtones aux stations 2 et 4 ($p < 0.01$). Dans le cas du cuivre, on n'observe une différence significative entre les concentrations des échantillons autochtones et transplantés que dans les échantillons de la station 2 ($p < 0.01$), où l'absence de courant n'a, semble t'il, pas favorisé l'accumulation du Cu par les mousses transplantées. Les différences de concentrations en Zn entre les mousses autochtones et transplantées ne sont pas significativement différentes ($p > 0.05$) pour les stations 1 et 2. Par contre, à la station 4, les mousses transplantées ont accumulé plus de Zn que les mousses autochtones ($p < 0.01$).

IV-4 DISCUSSION

Les expériences menées à la fois en laboratoire et sur le terrain ont permis d'évaluer l'effet du régime d'écoulement des eaux sur les capacités d'accumulation de Cr, de Cu et, dans une moindre mesure, de Zn par les mousses aquatiques. L'expérience menée en laboratoire montre clairement l'influence d'une diminution du temps de renouvellement des bacs sur les cinétiques d'accumulation des trois métaux alors que les concentrations d'exposition en métal ne varient pas d'un milieu à l'autre. Ce résultat implique que la réponse des mousses n'a pas été fonction de la seule concentration d'exposition, mais du flux de métal introduit dans les unités expérimentales durant la phase d'exposition. En effet, plus le temps de renouvellement du milieu est court, plus le flux de polluant existant dans le milieu est important et plus les mousses accumulent les métaux.

Les coefficients de corrélation entre les flux de polluant, calculés à partir du débit d'amenée d'eau et des concentrations d'exposition en métal dans l'eau, et les concentrations en métaux dans les mousses déterminées après 9 jours, sont respectivement de 0.975, 0.988 et 0.983 pour Cr, Cu et Zn ($p = 0.10$). Même si la signification de ces corrélations ne sont pas très fortes, elles indiquent cependant que l'accumulation du polluant par les mousses n'est pas uniquement fonction de la concentration d'exposition en métal. L'accumulation peut être aussi fonction de la distribution du polluant dans le temps, c'est-à-dire du flux de polluant. Cette observation peut s'expliquer par la probabilité de rencontre entre le polluant et les sites d'adsorption de la paroi cellulaire des mousses, probabilité d'autant plus importante que la concentration en métal dans le milieu est plus élevée, mais aussi que le flux de polluant en contact avec la mousse augmente. Cette hypothèse devrait aussi pouvoir s'appliquer dans le cas du relargage, le renouvellement du milieu par de l'eau non contaminée entraînant un lessivage des métaux adsorbés dans la paroi cellulaire, lessivage d'autant plus important que le renouvellement du milieu est rapide. Cette hypothèse n'est cependant pas confirmée par l'observation des cinétiques de relargage des trois

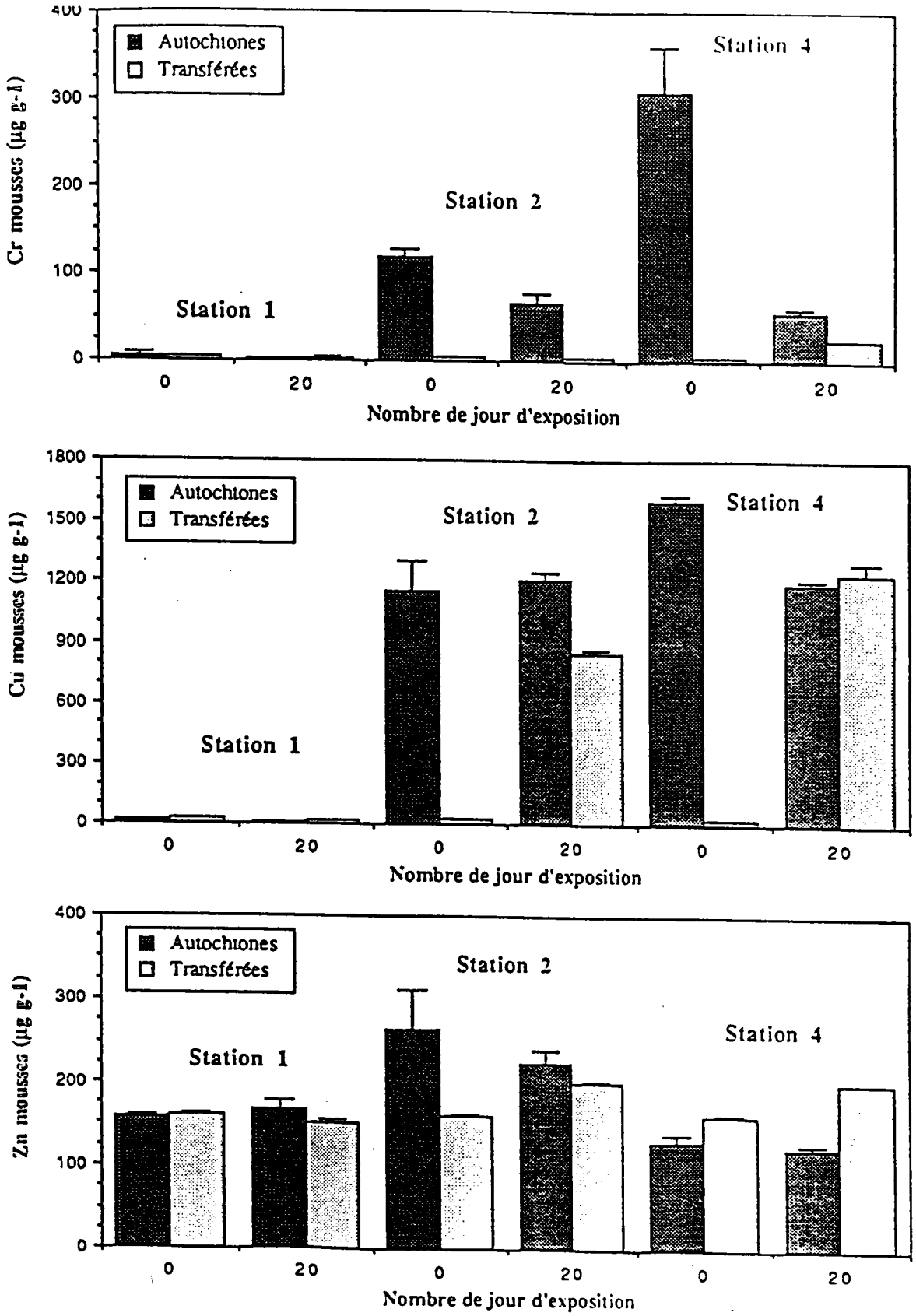


Figure 4-13: Concentrations en Cr, Cu et Zn dans les mousses autochtones et transplantées collectées aux stations 1, 2 et 4 le premier et dernier jour de l'expérience. Les barres verticales représentent l'écart-type (n =3).

métaux par les mousses. Ce résultat est en contradiction avec les observations faites *in situ* par Mouvet (1987) qui avait mis en évidence, dans des mousses transplantées dans deux stations dont les courants étaient de 1.3 m s^{-1} et inférieurs à 0.05 m s^{-1}, un relargage du Pb et du Zn d'autant plus important que le courant était rapide. Cependant, il est possible que les conditions envisagées au laboratoire ne soient pas suffisamment contrastées pour dégager un effet du temps de renouvellement du milieu sur le relargage.

Ces observations contradictoires sur le relargage n'ont pas pu être vérifiées lors de l'expérience *in situ*. Cette dernière a cependant permis de prendre en compte directement le paramètre vitesse de courant et de confirmer les résultats de laboratoire. La perturbation de l'écoulement créée par la présence d'un radier a permis de distinguer 3 stations présentant une gamme de vitesses de courant suffisamment étendue pour représenter la majorité des conditions auxquelles on peut être confronté lors d'études *in situ*. On peut cependant regretter la chute du débit de l'Andlau qui a entraîné une diminution de la vitesse du courant à la station 4, qui, lors des repérages, présentait des valeurs supérieures à 1 m s^{-1}. Les résultats obtenus *in situ* ont permis de conforter les observations effectuées en laboratoire. Ainsi, pour des concentrations en métal dissous similaires, l'augmentation des vitesses de courant entraîne *in situ* une augmentation très nette des concentrations en métaux accumulées par les mousses transplantées. Ce phénomène est aussi observé, de façon moins évidente, dans les échantillons autochtones. L'interprétation est, dans ce cas, rendue délicate par le fait que les mousses autochtones intègrent des événements de pollution antérieurs à l'étude. C'est le cas notamment du Cr où il est impossible de faire la part entre l'effet d'une pollution antérieure et la différence de régime d'écoulement entre les stations. Cependant, il est intéressant de constater la diminution, entre le jour 0 et le jour 20, des concentrations en Cr et Cu dans les mousses autochtones de la station 4 et la diminution de la vitesse du courant sur cette même station, consécutive à la chute du débit de l'Andlau.

Une des conséquences de l'influence du régime d'écoulement sur les cinétiques d'accumulation des métaux est mise en évidence lorsque l'on considère le traitement des données et l'interprétation qui en découle selon la méthode proposée par Mouvet (1986) et mise en application par les Agences de l'Eau. L'utilisation des résultats obtenus après 20 jours d'exposition aboutit à des interprétations différentes quant à la gravité de la contamination selon la station de provenance de l'échantillon (Tableau 4-8). Ainsi, la contamination du milieu par le Cr peut être jugée négligeable quand les mousses sont prélevées dans les stations 2 et 3, et suspecte si l'on considère l'échantillon collecté à la station 4, où le courant est le plus rapide. Dans le cas du Cu, on passe d'une pollution jugée importante (station 2, courant lent) à une situation jugée exceptionnelle (station 3 et 4).

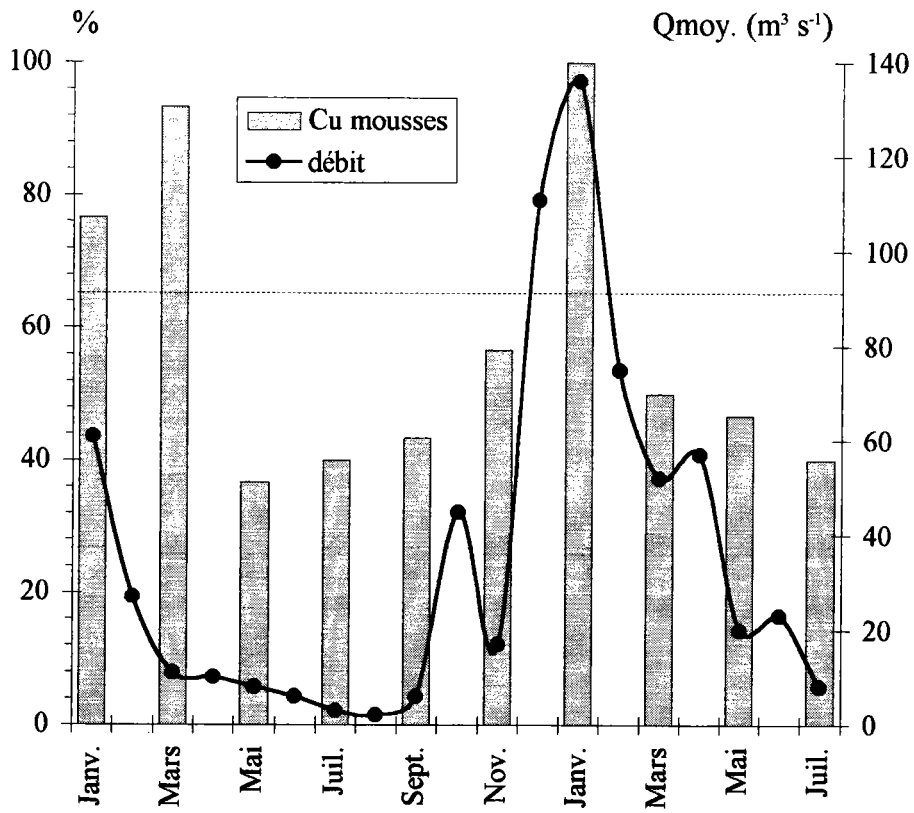


Figure 4-14: Evolution saisonnière des concentrations en Cu dans les mousses autochtones provenant du site de Commercy en parallèle avec l'évolution du débit mensuel de la Meuse (Limnigraphe de Saint Mihiel). (----) représente la concentration de référence pour le Cu (19 µg g^{-1} p.s.).

L'influence du flux de métal sur les cinétiques d'accumulation peut être aussi une des causes des fluctuations observées dans les mousses autochtones collectées sur le site de référence de Commercy (Chapitre II-1). A quelques exceptions près, ces fluctuations sont fonction du rythme des saisons avec des concentrations maximales observées généralement en hiver.

Tableau 4-8: Facteurs de pollution (FP) calculés à partir des concentrations en métaux dans les mousses transplantées collectées après 20 jours d'exposition dans les stations 2, 3 et 4.

Métal	Cr			Cu			Zn		
Stations	2	3	4	2	3	4	2	3	4
Conc. mousse ($\mu g\ g^{-1}$)	4	10	25	852	1233	1243	201	248	200
Référence ($\mu g\ g^{-1}$)		6			19			200	
FP	0.6	1.7	4.1	45	65	65	1	1.2	1

La figure 4-14 reprend la figure 2-1 décrivant l'évolution pluriannuelle des concentrations en Cu dans les mousses autochtones du site de Commercy avec, en parallèle, les valeurs de débits mensuelles relevées à Saint Mihiel (18 km à l'aval de Commercy). Aux concentrations en cuivre les plus élevées correspondent en général les débits les plus importants des périodes de crue (notamment l'hiver 93-94 qui correspond à la crue centenaire de la Meuse). Cette observation serait également valable en considérant d'autres métaux que le cuivre. Wehr et Whitton (1983b) ont observé sur un site la même évolution pluriannuelle du plomb avec des concentrations dans la mousse *Rhynchostegium riparioides* plus élevées durant les périodes hivernales de crue. Cependant, les auteurs attribuent ces variations saisonnières à la dilution des concentrations en Mg et formes du phosphore, qui, selon leur analyse statistique (Wehr et Whitton, 1983a), favorisent l'accumulation de ce métal. Les variations de débit sont susceptibles de modifier la concentration et la répartition des métaux (e.g. Pettine *et al*, 1994) mais aussi les autres éléments dans les divers compartiments physiques du milieu (Phase dissoute, particulaire, sédimentée). Ces modifications physico-chimiques concernant à la fois les éléments accumulés par les bryophytes et certains paramètres de spéciation intervenant dans la biodisponibilité des métaux pour les mousses peuvent avoir des conséquences sur les cinétiques d'accumulation des métaux. Dans cette optique, le débit serait un paramètre global, facile à mesurer, intégrant ces processus complexes intervenant sur la biodisponibité des métaux. Dans notre cas d'étude, la question est de savoir si le régime d'écoulement différent entre les stations 2, 3 et 4 perturbe suffisamment la biodisponibilité du métal dans l'eau pour intervenir sur les cinétiques

d'accumulation. Cette perturbation éventuelle n'a pas été mise en évidence, du moins par les paramètres suivis dans cette étude.

La diminution des concentrations en métaux dans les mousses durant les périodes estivales peut aussi provenir d'une dilution des concentrations provoquée par la croissance de la plante maximale à la fin du printemps et durant l'automne (Kelly et Whitton, 1987). Dire que cet accroissement de la plante contribue à diluer les concentrations métalliques accumulées implique que l'on admette que la jeune pousse n'accumule pas, ou n'a pas le temps d'accumuler les métaux. Toutefois, la rapidité des cinétiques d'accumulation des métaux rend peu plausible l'attribution des fluctuations saisonnières des concentrations en métaux dans les mousses à une dilution due à la croissance.

L'effet du courant sur les quantités de métal accumulées par les mousses peut être expliqué lorsque le phénomène de diffusion à l'interface eau - mousse est pris en compte. Celle-ci est constituée d'une couche intermédiaire de diffusion, où l'élément n'est plus dans le compartiment eau sans être encore piégé dans la paroi. Le transfert d'un élément à travers cette couche est régi par la loi de Fick et la vitesse de ce transfert est en partie tributaire de l'épaisseur de cette couche. Or, une augmentation de la vitesse du courant entraîne une diminution de cette couche dont la conséquence est alors un transfert plus rapide des éléments vers la paroi (Madsen *et al.*,1993). L'application de cette loi de diffusion aux transferts des métaux de l'eau vers la paroi cellulaire donne *a priori* une explication du phénomène observé, tant au laboratoire que *in situ*, encore faudrait-il qu'elle soit aussi vérifiée lorsque l'on considère le relargage, la loi de Fick s'appliquant indifféremment aux flux entrant et sortant. La confirmation de l'existence d'un phénomène de diffusion influencé par la vitesse du courant nécessite une expérience complémentaire dans laquelle des mousses présentant un même niveau de contamination en métal seraient transférées dans des stations différentes par leur régime de courant mais non contaminées.

IV-5 CONCLUSION

Suite à une expérience sur l'influence de la vitesse du courant sur les cinétiques de relargage des métaux, Mouvet (1987) recommande de prendre en compte ce paramètre lors du choix des sites où sont transplantées les mousses. La présente étude appuie cette recommandation, vu l'influence du temps de renouvellement en laboratoire et de la vitesse du courant *in situ* sur les quantités de métaux accumulées par les mousses. Il reste à confirmer ou infirmer les observations faites par Mouvet (1987) pour les cinétiques de relargage.

Les écarts de concentrations en métal, 525 % pour le chrome et 50 % pour le cuivre, accumulés par les mousses transplantées dans une eau stagnante et par celles transplantées dans un faciès lotique sont suffisamment importants pour qu'une attention particulière soit portée au paramètre vitesse de courant. Pour mémoire, l'étude d'intercalibration sur la détermination des concentrations métalliques dans les mousses (Agence de l'Eau, 1994) donne, sur l'analyse d'échantillons bruts, des coefficients de variation de 50 et 40 % pour le chrome et le cuivre. Or ces coefficients ne concernent que les variations liées aux erreurs analytiques et ne prennent pas en compte la variabilité liée à l'échantillonnage. André et Lascombe (1987) ont déjà mis en évidence une hétérogénéité des résultats liée à la localisation du prélèvement sur une même station en effectuant des prélèvements de mousse en fonction d'un transect vertical (sur la hauteur de la colonne d'eau) et horizontale (sur la largeur du cours d'eau). Cependant, les auteurs n'attribuent pas ces variations aux vitesses différentes du courant.

Les résultats obtenus pour le cuivre montrent que l'accumulation du métal par les mousses n'a pas été affectée en proportion avec l'augmentation de la vitesse du courant entre les stations 2, 3 et 4. Il est ainsi possible que ce paramètre n'intervienne que lorsque les régimes d'écoulement entre deux stations sont très différents, *e.g.* entre les stations 2 et 4. Cette hypothèse permettrait alors d'expliquer l'absence d'effet du temps de renouvellement sur les cinétiques de relargage en laboratoire, les conditions d'écoulement envisagées n'étant pas assez différentes entre les bacs.

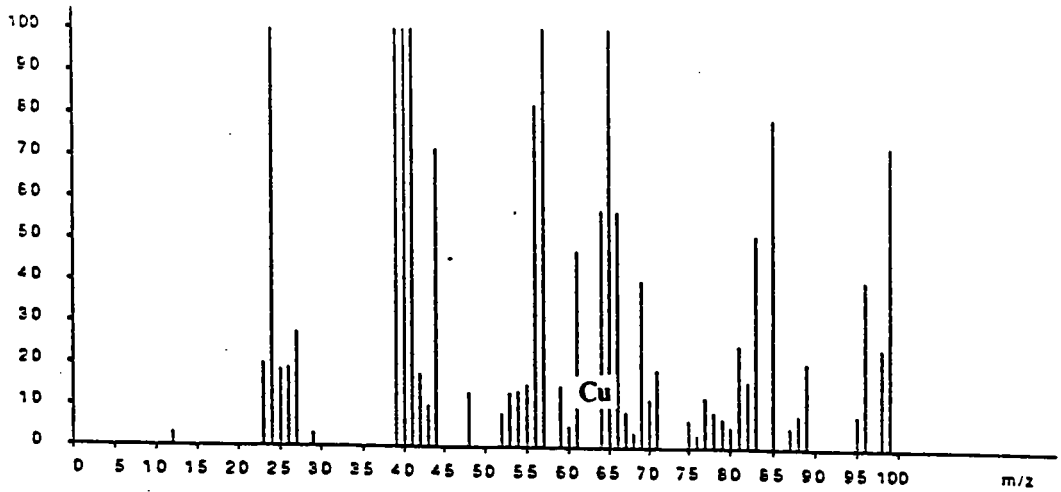
L'effet du paramètre vitesse de courant doit surtout être pris en compte lors de l'application de la méthode des transferts car celle-ci est souvent employée en absence de bryophytes autochtones, absence dont l'origine peut être justement un régime d'écoulement trop lent ne convenant pas au développement de l'organisme. Les conséquences des résultats exposés dans ce chapitre sur la validité des informations fournies par la collecte d'échantillons autochtones sont moindres. En effet, connaissant les préférences des bryophytes pour les substrats stables et les régimes d'écoulement lotique, les mousses autochtones sont généralement récoltées dans une classe de vitesse beaucoup plus homogène que lorsque les transferts sont employés. Par contre, que les bryophytes soient autochtones ou transplantées, la prise en compte du paramètre vitesse de courant reste nécessaire si l'on considère la période de l'année à laquelle sont menées les études, le débit des cours d'eau étant lié à de fortes variations saisonnières. C'est ainsi que, lors des choix des sites d'implantation de transferts de mousse, devraient être exclus ou minimisés ceux où les vitesses de courant sont faibles (eaux stagnantes, étangs, lacs), c'est-à-dire ne correspondant pas au biotope le plus généralement rencontré lors de la collecte de mousses autochtone ; le cas échéant, la vitesse du courant des stations prospectées devrait être relevée.

Chapitre V:
Approche des mécanismes d'accumulation du cuivre par *Rynchostegium riparioides*. Localisation cellulaire des métaux

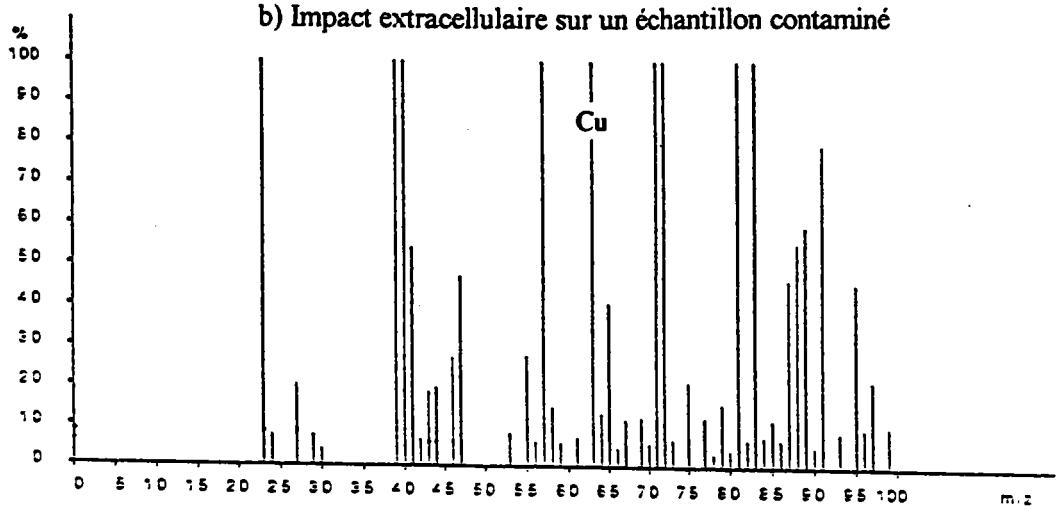
V-1 INTRODUCTION

La grande capacité d'accumulation des métaux par les bryophytes aquatiques est attribuée, pour l'essentiel, aux caractéristiques d'échanges d'ions de leur paroi cellulaire. En employant ces organismes comme support analytique censé refléter assez directement le niveau de contamination de l'eau (Mouvet, 1986), on considère l'accumulation comme étant essentiellement un mécanisme physico-chimique sur un support biologique. Cependant, si les bryophytes aquatiques s'avèrent polluo-résistantes, l'exposition prolongée à un métal peut se traduire par une diminution de la croissance ou de l'activité photosynthétique (Haseloff et Winkler, 1980; Mouvet, 1984a; Brown et Wells, 1990). L'altération de ces fonctions physiologiques exprime une toxicité du métal démontrant de ce fait la pénétration de l'élément à l'intérieur de la cellule. Des observations microscopiques effectuées sur des échantillons de mousses contaminées ont d'ailleurs révélé la présence de corps métalliques à l'intérieur de la cellule (Mouvet, 1984b; Satake et Miyasaka, 1984). La localisation cellulaire du cuivre par impact laser (LAMMS) sur des coupes de l'espèce *Rhynchostegium riparioides* préalablement exposée à 340 $\mu g\ L^{-1}$ de Cu pendant 168 heures a montré la présence systématique du métal dans la paroi mais a aussi dans la cellule (Figure 5-1). La présence de cette fraction intracellulaire du cuivre accumulé par la plante pourrait expliquer, au moins en partie, le fait que les mousses préalablement exposées au Cu ne relarguent pas la totalité du métal accumulé. L'hypothèse de l'existence d'une composante intracellulaire de l'accumulation des métaux par les mousses est également évoquée pour le Zn (Pickering et Puia, 1969) et pour le ^{106}Ru (Vray *et al.*, 1992). Les auteurs considèrent qu'à une phase d'adsorption rapide succède une phase d'absorption intracellulaire plus lente nécessitant une dépense d'énergie. La mise en jeu d'un tel processus lors de l'accumulation signifie que la physiologie de la plante devient un paramètre à prendre en compte au même titre que d'autres facteurs chimiques ou physiques. Or, la physiologie de l'organisme peut être affectée lors d'une pollution métallique ou lors du transfert de mousses d'un site non contaminé vers un site contaminé (Lopez *et al.*, 1994). L'altération de certaines fonctions physiologiques serait donc susceptible d'affecter la pénétration intracellulaire du métal et de modifier les capacités d'accumulation de l'organisme, du moins si le transfert des métaux adsorbés au travers de la

a) Impact intracellulaire sur un échantillon non contaminé



b) Impact extracellulaire sur un échantillon contaminé



c) Impact intracellulaire sur un échantillon contaminé

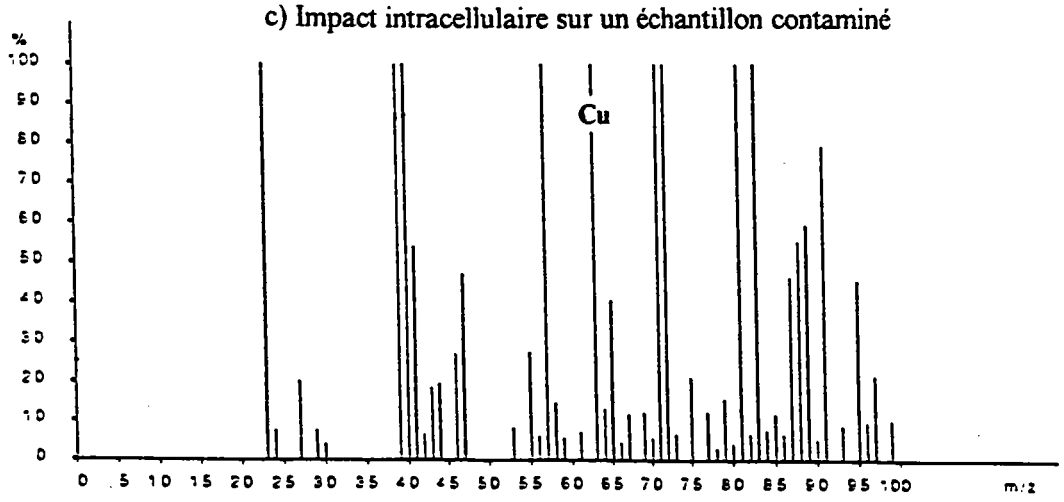


Figure 5-1: Mise en évidence du Cu par impact laser (LAMS) sur des coupes d'échantillons de *Rhynchostegium riparioides* exposées à 340 µg L^{-1} de Cu pendant 168 heures.

membrane est un processus qui contribue de façon significative à la quantité totale de métal accumulée.

La présence de métal dans la cellule n'étant pas mise en évidence de façon systématique (*e.g.* Gullvåg *et al.*, 1974), l'objectif de ce chapitre est de localiser le cuivre accumulé par les bryophytes au sein des divers compartiments constituant l'organisme. Deux approches ont été menées en parallèle. La première consiste à détecter et localiser le métal par des techniques histochimiques. La seconde consiste, après la mise au point de technique d'extraction du métal, à identifier et quantifier les fractions extracellulaires et intracellulaires du métal accumulé par la mousse. Ce dernier objectif nécessite dans un premier temps la mise au point d'un protocole permettant de discerner la fraction adsorbée de la fraction absorbée du métal accumulé par les bryophytes.

V-2 MISE AU POINT D'UNE TECHNIQUE DE DESORPTION DU CUIVRE ACCUMULE PAR LES MOUSSES AQUATIQUES

V-2-1 INTRODUCTION

Les travaux consacrés à l'estimation des fractions extra- et intracellulaire des métaux accumulées par les mousses sont fondés sur l'hypothèse selon laquelle la fraction intracellulaire correspond à la fraction résiduelle lorsque la totalité du métal extra-cellulaire est extrait. Bates (1992) résume les trois principales fractions de métal accumulées par les mousses, i) la fraction intercellulaire, piégée dans les espaces intercellulaires de la paroi, ii) la fraction extracellulaire, fixée sur les structures surfaciques de la paroi cellulaire, iii) la fraction intracellulaire. La première des trois fractions correspond selon l'auteur à la quantité de métal extraite par de l'eau distillée. Par contre, l'extraction de la fraction de métal fixée à la paroi nécessite l'emploi d'ions compétiteurs qui, en concentrations suffisantes, permettent le déplacement des métaux fixés et leur remise en solution. Bates et Brown (1974) repris par Brown et Buck (1979) ont mis au point une méthode de désorption des cations de la paroi des bryophytes en les immergeant successivement dans de l'eau distillée et dans une solution de $NiCl_2$. Cette méthode a été employée à plusieurs reprises pour identifier et quantifier les fractions intra- et extracellulaires des cations accumulés (*e.g.* Brown et Buck, 1978; Beckett et Brown, 1984). Cependant, lorsqu'il s'agit de déterminer la répartition des métaux accumulés par les bryophytes, éléments qui ont une affinité plus grande pour les sites d'échanges de la paroi que les alcalins et alcalino-terreux (Breuer et Melzer, 1990), l'emploi de solution de $NiCl_2$ ou $SrCl_2$ est moins efficace (Brown et Buck, 1985). Maeda *et al* (1990a et b) utilisent le même principe mais remplacent l'action du $NiCl_2$ en tant que compétiteur par les ions H^+ en immergeant l'algue *Chlorella vulgaris* dans de l'eau distillée à pH

< 3 pour en extraire le Zn. Ces mêmes auteurs emploient aussi l'EDTA à une concentration de 0,1 mM L^{-1}. Des tests menés par Bacle (1988) ont montré qu'une extraction optimale du cuivre par l'EDTA nécessite une concentration en complexant de 10 mM L^{-1} et une durée de contact de 30 minutes. La conséquence d'un tel traitement est une fuite de potassium, indicateur d'une altération de la perméabilité cellulaire susceptible alors de laisser échapper une partie de la fraction intracellulaire du métal accumulé (Brown et Bates, 1990).

En se basant sur ces précédents résultats, l'objectif fixé est la mise au point d'un traitement qui assure une désorption maximale du métal extracellulaire sans pour autant affecter l'intégrité de la perméabilité membranaire. La recherche du meilleur traitement est fondée sur l'hypothèse selon laquelle, lors de l'immersion d'un échantillon de mousse dans une solution non renouvelée de désorbant, il peut s'établir au cours du temps un équilibre entre le métal restant fixé à la paroi cellulaire et le métal déplacé et complexé par l'EDTA. Les précédents tests de Bacle (1988) montrent en effet un plateau dans l'efficacité de désorption de Pb et Zn par l'EDTA lorsque le temps de contact se prolonge au-delà de 30 minutes. Pour y remédier, la nouveauté du traitement de désorption envisagé réside alors dans la réalisation de désorptions successives du métal sur un même échantillon de mousse. Ce renouvellement devrait permettre d'utiliser des concentrations en désorbant moins élevées tout en assurant une désorption efficace de la fraction extracellulaire.

V-2-2 MATERIELS ET METHODES

Les paramètres testés

Afin de déterminer les conditions opératoires pour une extraction optimale du cuivre préservant l'intégrité de la cellule, plusieurs paramètres sont testés par un protocole de 12 traitements (Tableau 5-1).

Suite à l'étude bibliographique, deux types de désorbant sont retenus, l'EDTA testé à 3 concentrations différentes et le $NiCl_2$ à 2 concentrations. En plus de la nature du désorbant et de sa concentration sont testés le temps de contact entre la solution et l'échantillon de mousse, le volume de désorbant pour une même quantité d'échantillon, la concentration en Cu dans l'échantillon de mousse et enfin le nombre de désorptions successives effectuées.

Préparation des solutions de désorption

Une eau minéralisée est préparée à partir d'eau distillée dans laquelle sont ajoutées les quantités nécessaires d'anions et de cations pour atteindre une minéralisation du même ordre de

grandeur que celle du milieu d'exposition. Ceci permet de s'affranchir d'une éventuelle contamination métallique de la solution. D'autre part, l'emploi d'une eau de composition ionique sensiblement équivalente à l'eau du milieu d'exposition devrait permettre d'éviter un éventuel choc osmotique.

Tableau 5-1: Caractéristiques des différents traitements testés. Chaque traitement est doublé par un second différent par la concentration en désorbant égale à 0 mM L^{-1}.

Traitement	Solution de désorption			Temps de contact/trempage	Nombre de trempage
	Nature du désorbant	Concentration (mM L^{-1})	Volume (ml)		
A	EDTA	1	15	10	1
B	EDTA	1	15	30	1
C	EDTA	500	15	10	1
D	EDTA	500	15	30	1
E	EDTA	1	15	10	4
F	EDTA	5	15	10	4
G	EDTA	1	15	10	2
H	EDTA	1	30	10	1
I	$NiCl_2$	5	15	10	4
J	$NiCl_2$	5	15	30	4
K	$NiCl_2$	20	15	10	4
L	$NiCl_2$	20	15	30	4

Cette première solution sert ensuite à la préparation de 6 autres; 2 contenant du $NiCl_2$ aux concentrations de 5 et 20 mM L^{-1}, 3 contenant de l'EDTA à des teneurs de 1, 5 et 500 mM L^{-1}, et la dernière sans aucun ajout qui constitue la solution de contrôle. L'ajout d'EDTA à la solution mère entraînant une acidification du milieu, toutes les solutions sont ajustées à un pH égal à 6.0.

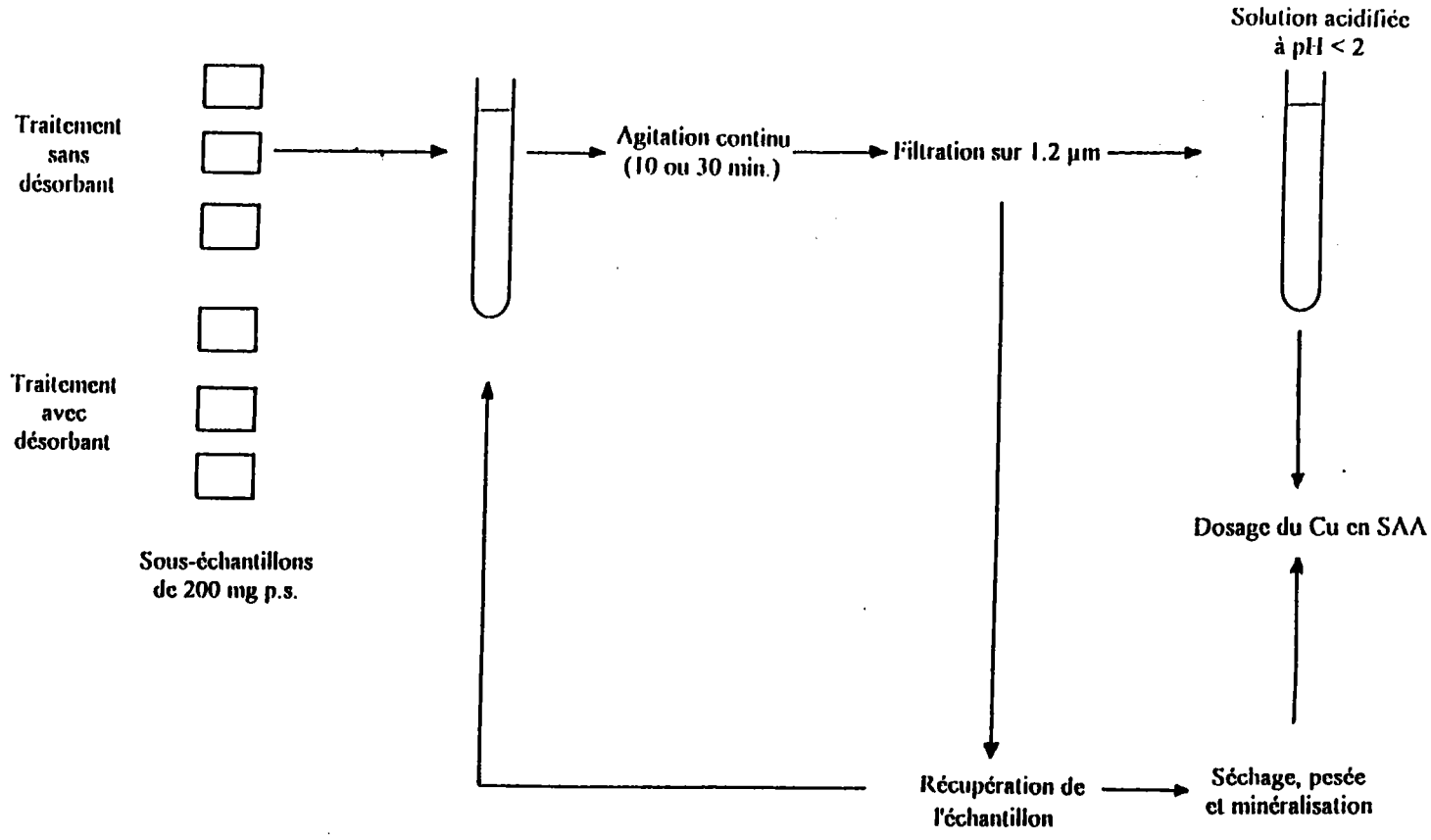


Figure 5-2: Protocole suivi pour chaque traitement de désorption envisagé

Protocole expérimental

L'espèce *Rhynchostegium riparioides* est collectée dans l'Orne en amont de Hatrize avant d'être préparée pour l'expérience de laboratoire selon le protocole précédemment décrit (Chapitre II-6-1). Les mousses sont ensuite divisées en deux lots avant d'être immergées dans deux bacs différents par la concentration d'exposition en Cu afin d'obtenir un lot fortement contaminé (lot FC) et un lot peu contaminé (lot PC). Après avoir été contaminées par le cuivre, les mousses sont essorées avant de subir les différents traitements envisagés.

Chaque traitement comprend six prises d'essai constituées d'un échantillon d'environ 200 mg frais de branches latérales (Figure 5-2). Trois de ces 6 sous-échantillons sont employés pour les traitement dans une solution sans désorbant tandis que les 3 autres sont immergés dans des solutions contenant du désorbant (EDTA ou $NiCl_2$). Le sous-échantillon de mousse est immergé pendant un temps de contact t en maintenant une agitation continue à l'aide d'une table d'agitation. Le temps de désorption t écoulé, la solution est récupérée après avoir été filtrée sur 1.2 µm afin d'extraire les débris organiques de mousse et acidifiée à pH < 2. Le sous-échantillon de mousse est entièrement récupéré et, selon le traitement, extrait une nouvelle fois ou préparé pour l'analyse ultérieure du métal résiduel par bref rinçage à l'eau distillée, suivi du séchage à 60 °C pendant 24 heures et de la pesée (Figure 5-2).

Chaque traitement fait l'objet de 6 prises d'essai. Seule cette étape permettra d'évaluer la variabilité inhérente au traitement, les étapes suivantes n'ayant pas été dupliquées. On connaît en effet mieux les sources de variation inhérentes au protocole de dosage des métaux que les sources de variations imputables au traitement lui-même.

Afin de vérifier que la performance des différents traitements n'est pas influencée par la concentration en cuivre dans l'échantillon testé, deux lots de mousse sont utilisés, l'un peu contaminé (lot PC), l'autre fortement contaminé (lot FC).

Les concentrations en Cu dans les mousses sont déterminées avant tout traitement sur les lots PC et FC puis sur chaque sous-échantillon ayant subi l'intégralité du traitement (Figure 5-2). Les teneurs en Cu sont également déterminées dans les solutions de désorption afin de pouvoir évaluer l'efficacité respective de chaque étape de trempage. Le potassium, choisi comme descripteur de l'intégrité cellulaire, est dosé dans toutes les solutions de désorption.

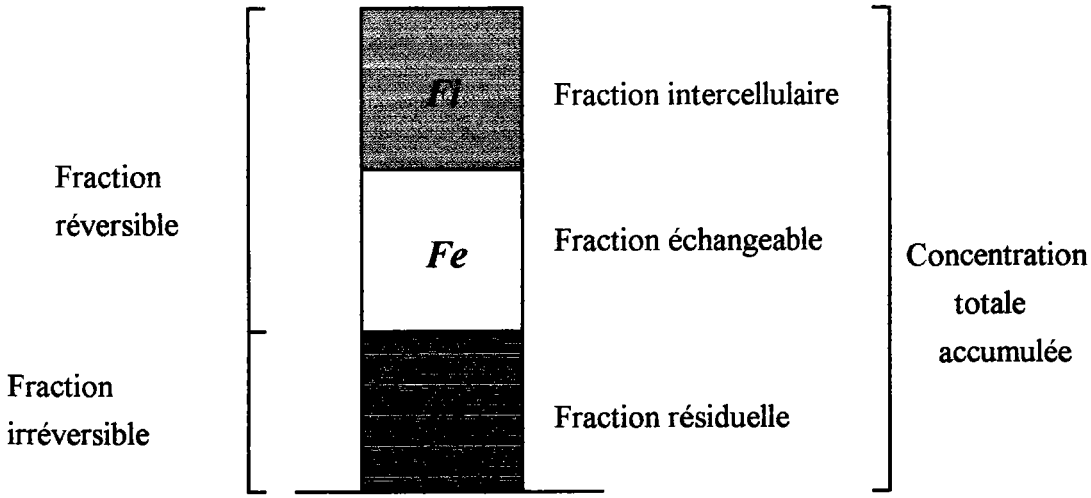


Figure 5-3: Représentation graphique des trois fractions identifiées lors des différents traitements

Expression des résultats

Les dosages successifs du métal dans les mousses avant et après les traitements, impliquant une solution avec ou sans désorbant, nécessitent la définition des différentes fractions de cuivre ainsi obtenues (Figure 5-3). La concentration totale en Cu dans la mousse avant tout traitement est appelée F_t ($\mu g\ g^{-1}$). La concentration résiduelle en Cu dans la mousse après un traitement avec désorbant est assimilée à la concentration résiduelle inéchangeable, F_r ($\mu g\ g^{-1}$). Ce traitement permet aussi de calculer, par différence, la fraction de métal accumulée de façon réversible dans la mousse, F_{rev} ($\mu g\ g^{-1}$):

$$F_{rev} = F_t - F_r \qquad (5\text{-}1)$$

La fraction réversible, F_{rev}, est composée de deux fractions, la fraction échangeable, F_e , et la fraction intercellulaire, F_i:

$$F_{rev} = F_i + F_e \qquad (5\text{-}2)$$

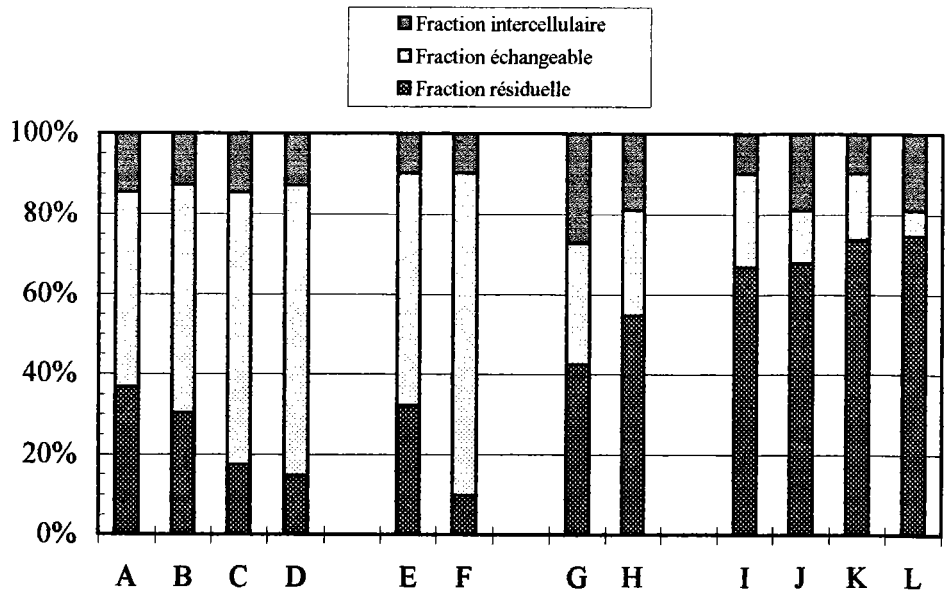
La fraction intercellulaire est obtenue par le traitement sans désorbant qui n'extrait que le métal facilement mobilisable. La concentration en métal restant dans la mousse après traitement sans désorbant correspond alors à la somme des fractions résiduelles, F_r et échangeables, F_e . La fraction F_i est alors égale à:

$$F_i = F_t - (F_e + F_r) \qquad (5\text{-}3)$$

Connaissant F_i, la fraction échangeable peut ensuite être calculée par l'intermédiaire de l'équation 5-3.

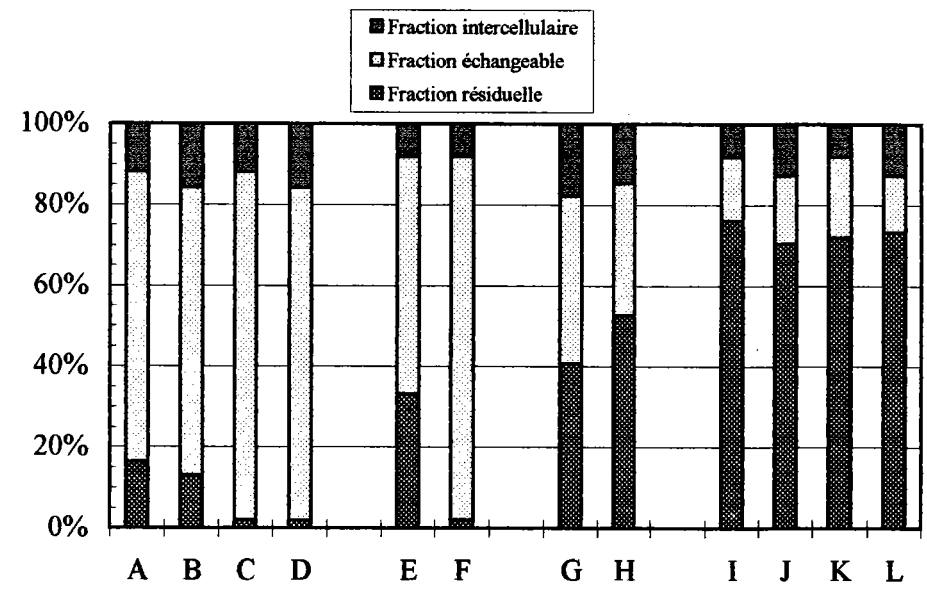
Statistiques

Les différences de concentrations en potassium entre les lots de mousses ayant subi le protocole sans désorbant et les lots ayant subi le protocole correspondant avec désorbant sont mises en évidence par le test *t* de Student.



	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
Conc. désorbant	1	1	500	500	1	5	1	1	5	5	20	20
Volume	15	15	15	15	15	15	15	30	15	15	15	15
Temps	10	30	10	30	10	10	10	10	10	10	30	10
Trempage	1	1	1	1	4	4	2	1	4	4	4	4

Figure 5-4: Contribution des 3 fractions métalliques évaluées selon différents traitements exprimées en pourcentage de la concentration totale en Cu déterminée dans l'échantillon peu contaminé (PC).



	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
Conc. désorbant	1	1	500	500	1	5	1	1	5	5	20	20
Volume	15	15	15	15	15	15	15	30	15	15	15	15
Temps	10	30	10	30	10	10	10	10	10	10	30	10
Trempage	1	1	1	1	4	4	2	1	4	4	4	4

Figure 5-5: Contribution des 3 fractions métalliques évaluées selon différents traitements exprimées en pourcentage de la concentration totale en Cu déterminée dans l'échantillon contaminé (FC).

V-2-3 RESULTATS ET DISCUSSION

Choix du traitement optimum

L'ensemble des 12 traitements envisagés n'ayant pu être réalisé dans un temps suffisamment court, les tests ont été menés en deux fois avec pour conséquence l'emploi de 2 séries différentes de lots PC et FC. Les traitements A, B, C et D ont été effectués avec des lots PC et FC qui présentent des concentrations en cuivre respectivement de 109 et 1576 $\mu g\ g^{-1}$. Les 8 autres traitements ont été effectués en utilisant 2 lots présentant des concentrations en cuivre respectivement de 205 et 2057 $\mu g\ g^{-1}$.

Pour les 12 traitements du protocole, la répartition du cuivre accumulé est représentée dans la figure 5-4 pour les mousses peu contaminées (lot PC) et dans la figure 5-5 pour les mousses fortement contaminées (lots FC). L'objectif du test de ces différents traitements est d'obtenir un protocole assurant une désorption maximale de Cu sans pour autant provoquer une altération de la perméabilité membranaire. C'est ainsi, qu'en se focalisant sur la contribution de la fraction résiduelle, F_r , estimée par les divers traitements, on note la grande disparité des pourcentages qui varient de 2 à 75 % selon l'échantillon et le traitement. Il ressort en premier lieu de ces différents tests que l'emploi du $NiCl_2$, agissant comme compétiteur du Cu pour les sites d'échanges de la paroi cellulaire, ne s'est pas révélé efficace (traitements I, J, K et L). Quels que soient la concentration en désorbant et le nombre de trempage, ces traitements n'extraient jamais plus de 35 % du cuivre accumulé par la mousse. Parmi les 8 traitements où l'EDTA est utilisé, 3 fournissent une estimation de la contribution de la fraction F_r nettement inférieure aux 9 autres. Il s'agit des traitements C, D et F. Pour les deux premiers, la concentration de 500 mM L^{-1} d'EDTA employée suffit à expliquer la désorption importante du cuivre. On remarque également que l'extension du temps de contact des mousses de 10 (traitement C) à 30 minutes (traitement D) ne s'accompagne pas d'une plus grande efficacité de désorption. Le traitement F confirme l'hypothèse selon laquelle plusieurs trempages successifs sont au moins aussi efficaces qu'un seul avec une concentration en EDTA 100 fois plus élevée. Pour les lots fortement contaminés (figure 5-5), la contribution de la fraction F_r , de 2 %, estimée par le traitement F, est identique à l'estimation qu'en ont donné les traitements C et D. Pour les lots peu contaminés (figure 5-4), la fraction F_r , estimée par le traitement F, est de 10 %, pourcentage inférieur aux pourcentages obtenus par les traitements C (17 %) et D (15 %). Cependant, le lot PC utilisé lors du traitement F est 2 fois plus contaminé que celui utilisé pour les traitements C et D, c'est-à-dire la quantité de Cu désorbable est plus importante. Pour cette raison, on peut considérer que ces trois traitements ont une efficacité similaire quelle que soit la concentration en métal dans la mousse. L'efficacité similaire de ces 3 traitements pour l'estimation de la fraction *Fr* favorise *a priori* l'emploi du protocole le plus simple, à savoir le traitement C. Cependant, la concentration élevée en EDTA pour ce

traitement est davantage susceptible de provoquer des dommages au niveau cellulaire que le traitement F. Le tableau 5-2 résume les concentrations en potassium désorbé par les mousses après traitement avec et sans désorbant.

Tableau 5-2: Différences entre les concentrations en potassium désorbées des mousses par les traitements avec ou sans EDTA.

Traitement	Lot	EDTA		Niveau de signification
		Oui	Non	
A	Peu Contaminé	632 ± 148	346 ± 75	**
	Contaminé	952 ± 282	687 ± 91	n.s.
B	Peu Contaminé	744 ± 61	236 ± 114	**
	Contaminé	526 ± 26	504 ± 136	n.s.
C	Peu Contaminé	3048 ± 1205	346 ± 75	**
	Contaminé	3400 ± 627	687 ± 91	**
D	Peu Contaminé	4683 ± 745	236 ± 114	**
	Contaminé	3941 ± 322	504 ± 136	**
E	Peu Contaminé	3084 ± 474	4267 ± 701	*
	Contaminé	4109 ± 280	3435 ± 819	n.s.
F	Peu Contaminé	3749 ± 463	4267 ± 701	n.s.
	Contaminé	3548 ± 670	3435 ± 819	n.s.
G	Peu Contaminé	1411 ± 330	1201 ± 60	n.s.
	Contaminé	1401 ± 132	2313 ± 606	*
H	Peu Contaminé	1168 ± 155	1074 ± 62	n.s.
	Contaminé	960 ± 77	875 ± 108	n.s.

*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; n.s. : différence non significative (test *t* de student)

Les concentrations en potassium désorbées lors des traitements sans désorbant sont considérées comme la traduction d'un phénomène de relargage du potassium fixé dans la paroi cellulaire ou présent dans l'apoplasme. Le relargage du potassium dans les solutions sans désorbant est probablement provoqué par la présence de protons (pH de la solution égal à 6.0) qui entre en compétition avec le cation pour les sites d'échanges. On considère alors qu'une augmentation de la quantité de potassium désorbée lors du traitement avec désorbant est la traduction d'une fuite excessive de potassium qui peut être attribuée, au moins en partie, à une éventuelle altération de la perméabilité cellulaire. Dans ce cas, on peut alors suspecter la fuite d'autres éléments localisés dans la cellule, y compris le cuivre. L'application des traitements C et D avec une concentration

en EDTA de 500 mM L^{-1} entraîne une augmentation significative de la quantité de potassium désorbée (Tableau 5-2).

A l'inverse, le traitement F, avec une concentration en EDTA 100 fois inférieure aux deux précédents traitements, n'entraîne pas de différences significatives entre les quantités de potassium désorbées lors du traitement avec ou sans désorbant. Le traitement F montre ainsi qu'il est préférable d'effectuer plusieurs trempages successifs à une faible concentration en EDTA plutôt qu'un seul trempage en présence d'une forte concentration en désorbant, et ce pour une efficacité de désorption identique. L'extension du temps de trempage de 10 à 30 minutes effectuée sur les premiers traitements (A, B, C et D) n'ayant pas pour effet une plus grande efficacité de désorption, un temps de 10 minutes apparaît suffisant. La détermination des concentrations en cuivre à la fois dans les mousses avant et après traitement, et dans les solutions de désorption permet d'évaluer l'efficacité de chacun des 4 trempages successifs. La figure 5-6 représente les quantités de cuivre déterminées dans les 4 solutions de trempage successives employées lors du traitement F. Plus le nombre de trempage d'un même échantillon augmente, moins la désorption est efficace. Ainsi, la contribution du $4^{ème}$ trempage à la quantité totale de cuivre désorbée devient plus faible que la variabilité de la mesure effectuée sur les 3 solutions de désorption du précédent trempage. Cette observation permet d'envisager le même traitement F avec une phase de trempage en moins.

Signification de l'information recueillie

L'emploi du $NiCl_2$ agissant comme compétiteur du cuivre pour les sites d'échanges de la paroi cellulaire ne s'est pas révélé efficace. Cette observation tend à confirmer l'hypothèse émise par Brown et Buck (1985) selon laquelle le $NiCl_2$, utilisé pour désorber de la paroi les alcalins et alcalino-terreux, s'avère inefficace lorsqu'il s'agit de désorber des métaux qui présentent une affinité pour les sites d'échanges au moins aussi grande que le nickel. La formation de complexes métalliques stables entre le cuivre et l'EDTA s'avère plus efficace. Cependant, les différents traitements envisagés ne garantissent pas que la fraction de métal non désorbé soit d'origine exclusivement intracellulaire. C'est la raison pour laquelle cette fraction est appelée fraction résiduelle ou fraction irréversible. La fraction réversible regroupe, quant à elle, les fractions échangeables et intercellulaires. Cette dernière représente en théorie la fraction métallique présente dans les espaces intercellulaires ou apoplasme. Bates (1992) considère que cette fraction correspond à la quantité de métal relarguée par le trempage des mousses dans l'eau distillée. Cependant, ni le traitement envisagé dans ce chapitre, ni celui décrit par Bates (1992), ne garantit que le métal extrait lors de cette phase du traitement corresponde uniquement à la fraction métallique présente dans l'apoplasme. L'emploi des techniques d'observations microscopiques et

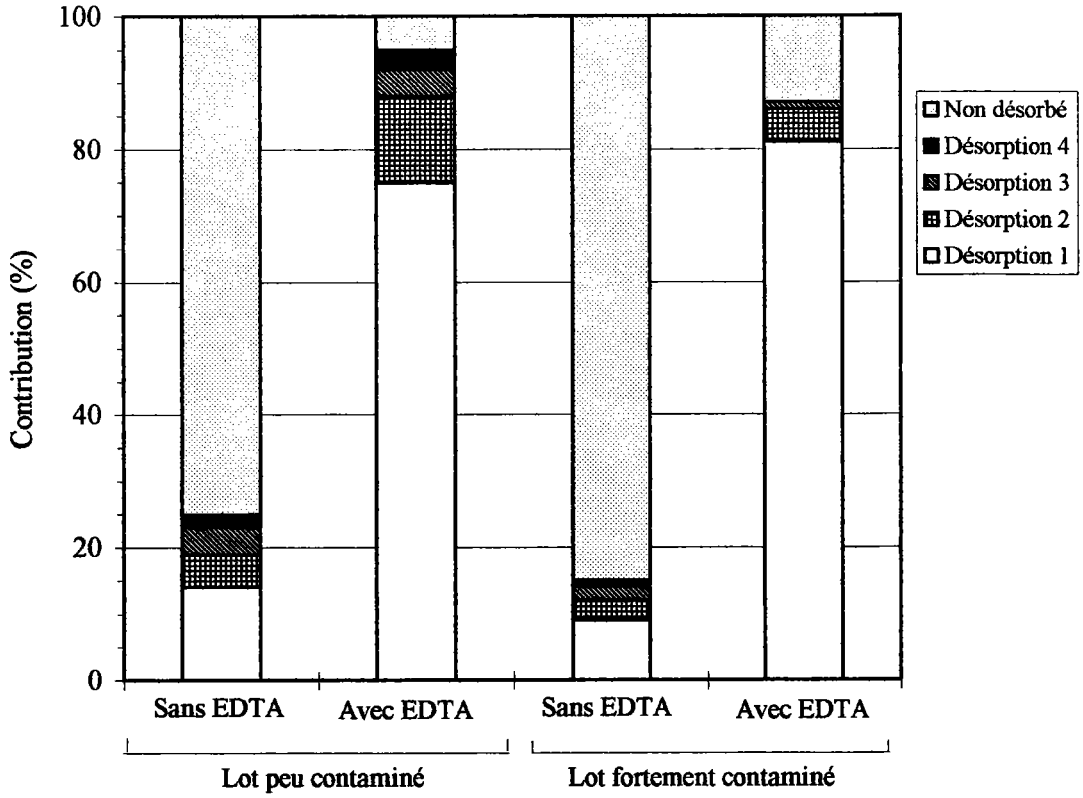


Figure 5-6: Contribution en pourcentage de la concentration initiale en Cu dans les mousses des 4 trempages successifs des échantillons peu et fortement contaminés dans les solutions sans et avec EDTA du traitement F.

microanalytiques devrait permettre de préciser si au moins une partie de la fraction résiduelle correspond à une localisation intracellulaire du cuivre.

En effet, plutôt que de considérer les différentes fractions métalliques identifiées comme correspondant à une localisation précise du métal, c'est-à-dire dans l'apoplasme, adsorbé dans la paroi, à l'intérieur de la cellule, les 3 fractions F_r , F_e et F_i , représentent par ordre décroissant les degrés d'affinité différents liant le métal à l'organisme.

V-3 LOCALISATION ET QUANTIFICATION DES DIFFERENTES FRACTIONS METALLIQUES ACCUMULEES PAR LES MOUSSES AQUATIQUES

V-3-1 PROTOCOLE EXPERIMENTAL

Déroulement de l'expérience

L'expérience est basée sur l'étude des cinétiques d'accumulation et de relargage du cuivre par l'espèce *Rhynchostegium riparioides*. L'établissement de ces cinétiques s'effectue à partir de la détermination des concentrations en Cu dans des échantillons de mousse prélevés tout au long de l'expérience. Trois moments sont importants:
- le début de la phase d'exposition au métal;
- la fin de la phase d'exposition au métal, c'est-à-dire le début de la phase de relargage;
- la fin de la phase de relargage.

Pour chacun des trois moments, différents types de prélèvement sont effectués pour:
- l'observation en microscopie optique après traitement cytochimique;
- la détermination des différentes fractions métalliques accumulées par les mousses;
- la mesure de l'activité photosynthétique.

L'étude porte sur le cuivre, élément physiologique nécessaire à la vie de la plante (Proctor, 1981). Pour juger si l'accumulation intracellulaire dépend du temps d'exposition, deux périodes d'exposition des mousses aux métaux sont envisagées, l'une de 7 jours, la seconde de 21 jours. Dans les deux cas, la phase de relargage dure 14 jours.

Dispositif expérimental

Le dispositif expérimental utilisé est celui qui est décrit au chapitre II-3. Il est constitué de 2 bacs expérimentaux alimentés en continu par de l'eau déchlorée. Dans chacun des bacs sont

introduits deux paniers maillés prévus pour isoler les échantillons sélectionnés pour la mesure de la photosynthèse (Chapitre III).

Conditions d'exposition des mousses

Une concentration de 2 mg L^{-1} d'EDTA est maintenue durant l'intégralité de l'expérience dans les 2 bacs expérimentaux. Le premier des deux bacs est contaminé pendant 21 jours par 160 µg L^{-1} de cuivre (Bac Ct). Le second sert de témoin (Bac T). Après 21 jours, l'apport de métal dans le milieu est stoppé permettant ainsi de suivre le relargage pendant 14 jours.

Un premier lot de mousse, de l'espèce *Rhynchostegium riparioides*, est collecté à Hatrize sur l'Orne. Ce premier lot, après avoir été lavé au laboratoire, est immergé dans les 3 bacs expérimentaux pour la durée totale de l'expérience, soit 35 jours dont 21 jours d'exposition au métal. Un second lot, de la même espèce, est collecté 13 jours plus tard sur le même site. Introduit dans les 3 bacs expérimentaux 14 jours après le premier, ce second lot est immergé pour une durée totale de 21 jours dont 7 jours d'exposition au métal.

Fréquence d'échantillonnage et de mesure

Le pH et la température sont mesurés quotidiennement dans les 2 bacs expérimentaux. Le prélèvement en continu d'échantillon d'eau à l'aide de pompes péristaltiques permet ensuite le dosage des teneurs d'exposition en Cu durant l'expérience.

Afin de déterminer les cinétiques d'accumulation et de relargage, des échantillons du lot immergé pendant 35 jours sont prélevés après 0, 1, 2, 4, 7, 10, 15, 21, 23, 24, 26, 29 et 35 jours. Pour le lot immergé pendant seulement 21 jours, les prélèvements sont effectués après 0, 1, 3, 5, 7, 8, 9, 13, 15 et 21 jours.

Prélèvement pour l'étude de la répartition cellulaire des métaux

Après 0, 10, 21 et 35 jours, un échantillon du lot exposé pendant 35 jours est prélevé dans chacun des 2 bacs. Cet échantillon est ensuite subdivisé en 6 sous-échantillons d'environ 200 mg frais constitués de branches latérales. Conservés frais, ces sous-échantillons subissent dans l'heure qui suit leur prélèvement le traitement de désorption précédemment sélectionné. Trois d'entre eux font l'objet d'un traitement sans EDTA, les 3 autres subissent le traitement avec EDTA selon le protocole établi au paragraphe précédent.

Avec la même fréquence, des prélèvements d'échantillon sont effectués avant d'être préparés soit pour l'observation histochimique pour la localisation du cuivre.

Il est procédé de la même manière avec le lot immergé pendant 21 jours. Dans ce cas, les prélèvements sont effectués après 0, 7 et 21 jours.

Mesure de l'activité photosynthétique

Lors de la préparation initiale des deux lots de mousses introduits successivement dans les bacs expérimentaux, une partie des touffes de mousses est sélectionnée selon le protocole précédemment décrit (chapitre III-2). Ces échantillons sont ensuite isolés du reste du lot de mousse grâce aux paniers maillés installés dans les 2 bacs.

Le principe de la mesure de l'activité photosynthétique est identique à celui développé dans le chapitre III. La mesure est effectuée en début d'expérience, à la fin de la phase d'exposition (après 7 ou 21 jours selon le lot) et à la fin de la phase de relargage (après 21 ou 35 jours selon le lot).

Statistiques

Les différences des pH moyens et des températures moyennes de l'eau entre le bac témoin et le bac contaminé sont mises en évidence par le test *t* de Student. Ce même test est employé lorsque sont comparées les concentrations en métal dans deux échantillons différents ainsi que lors de la comparaison de l'activité photosynthétique d'un échantillon de mousse issu du bac témoin et celle mesurée dans un échantillon provenant du bac contaminé.

V-3-2 RESULTATS

Conditions d'exposition des mousses

Durant la phase d'exposition de 21 jours, la concentration moyenne d'exposition en Cu dans le bac témoin est de 9.0 ± 3.0 µg L^{-1} ($n = 11$) tandis que la concentration moyenne d'exposition dans le bac contaminé est de 188.0 ± 10.0 µg L^{-1} ($n = 11$). Après 21 jours, l'apport de métal est stoppé dans le bac contaminé (Bac Ct). Les concentrations en Cu dans celui-ci retournent alors en 3 heures à la valeur rencontrée dans le bac témoin. Les concentrations en Cu dans l'eau durant la phase de relargage sont de 7.3 ± 3.0 µg L^{-1} dans les deux bacs. Le pH et la température, seuls paramètres suivis dans les 2 bacs (Tableau 5-3), ne sont pas significativement différents entre les bacs ($p < 0.01$; $n = 30$).

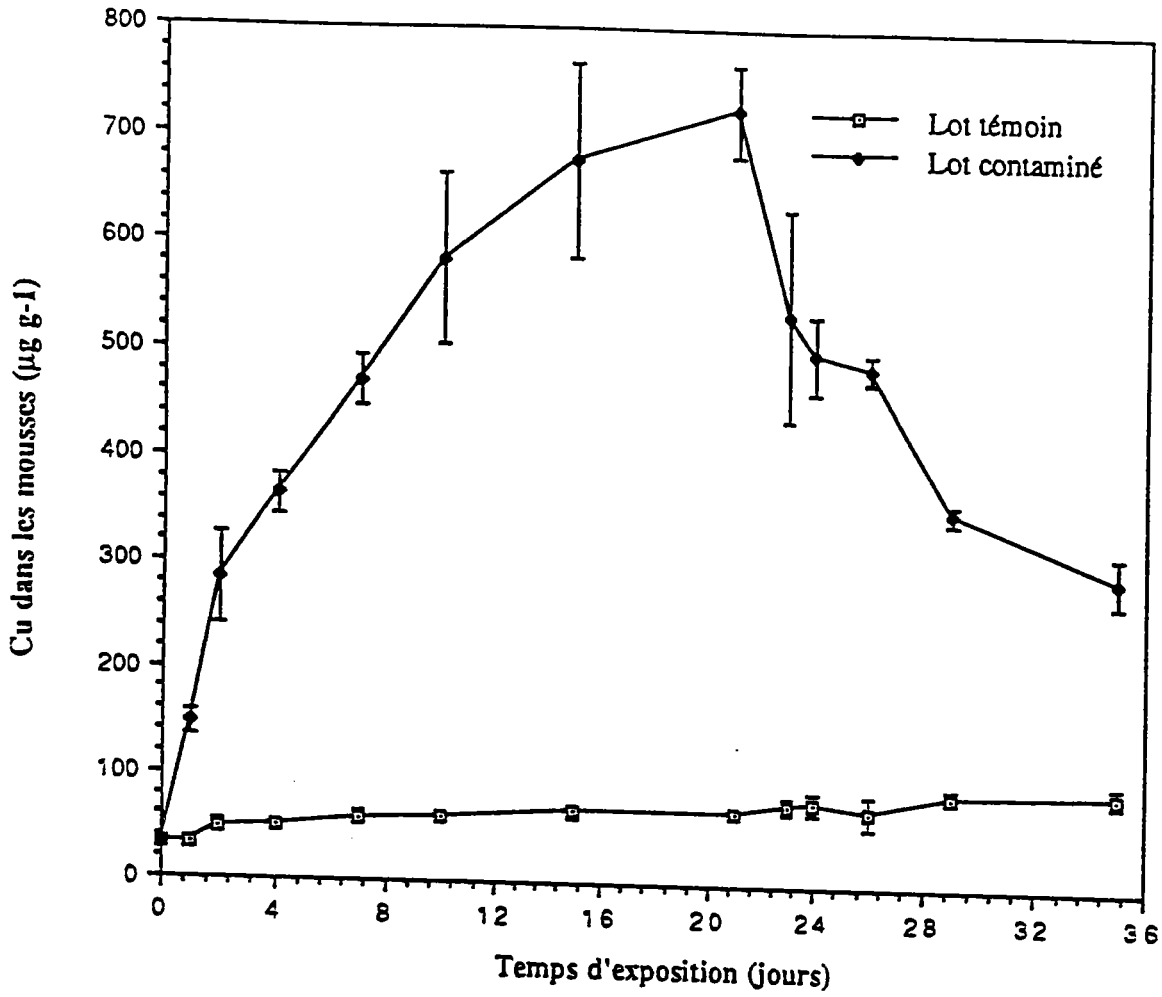


Figure 5-7: Evolution des concentrations moyennes en cuivre dans les mousses immergées dans le bac témoin pendant 35 jours et dans le bac contaminé par 188 µg L^{-1} de Cu pendant les 21 premiers jours de l'immersion. Les barres verticales représentent l'écart-type (n =3).

Tableau 5-3: Caractéristiques physico-chimiques du milieu d'exposition (n = 15).

Paramètres	Unités	Unité expérimentale	
		Bac T	Bac Ct
pH		7.59 ± 0.12	7.54 ± 0.10
Température	° C	16.5 ± 0.8	16.5 ± 0.8
Ca	mg L^{-1}	108 ± 14	-
Mg	mg L^{-1}	9 ± 1	-
Na	mg L^{-1}	16 ± 3	-
K	mg L^{-1}	4 ± 1	-
NO_3	mg L^{-1}	31 ± 9	-
Cl	mg L^{-1}	40 ± 3	-
SO_4	mg L^{-1}	49 ± 10	-
HCO_3	mg L^{-1}	219 ± 10	-

Evolution de la répartition des métaux accumulés par les mousses au cours des phases d'exposition et de relargage

La concentration en Cu dans le lot de mousse immergée pendant 35 jours dans le bac témoin augmente progressivement, de 32 ± 2 en début d'expérience à 90 ± 9 µg g^{-1} après 35 jours. La cinétique d'accumulation du Cu par les mousses exposées au métal pendant 21 jours montre une période d'accumulation rapide du métal à laquelle succède une phase plus lente qui tend vers un plateau d'équilibre (Figure 5-7). Le relargage se décompose également en 2 phases, la première correspondant à une désorption rapide, 50 % du métal relargué en 14 jours l'est au bout de 4 jours seulement, la seconde tendant progressivement vers une situation d'équilibre.

La figure 5-8 représente l'évolution de la contribution des différentes fractions métalliques, telles qu'elles ont été préalablement établies (Chapitre V-2), à la concentration totale en cuivre accumulé par les mousses immergées dans le bac témoin. Les 3 fractions contribuent de façon significative à la quantité de métal accumulée par la mousse, excepté dans l'échantillon initial qui ne comprend pas de fraction F_i. Contrairement à de précédentes expériences, les mousses immergées dans le bac témoin ont accumulé le cuivre durant 35 jours. Chacune des 3 fractions contribue à peu près au tiers à la concentration totale en métal accumulé quel que soit le moment du prélèvement (Figure 5-8). La contribution de la fraction F_r est en début d'expérience

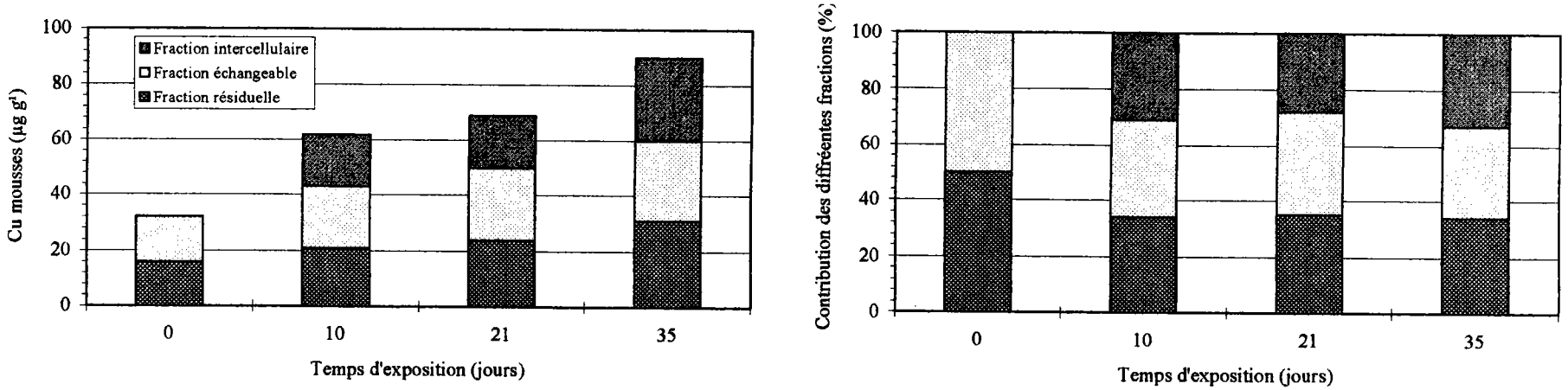


Figure 5-8: Evolution de la contribution des 3 fractions métalliques exprimée en µg g^{-1} de cuivre et en pourcentage de la quantité totale de Cu déterminée dans l'échantillon immergé pendant 35 jours dans le bac témoin.

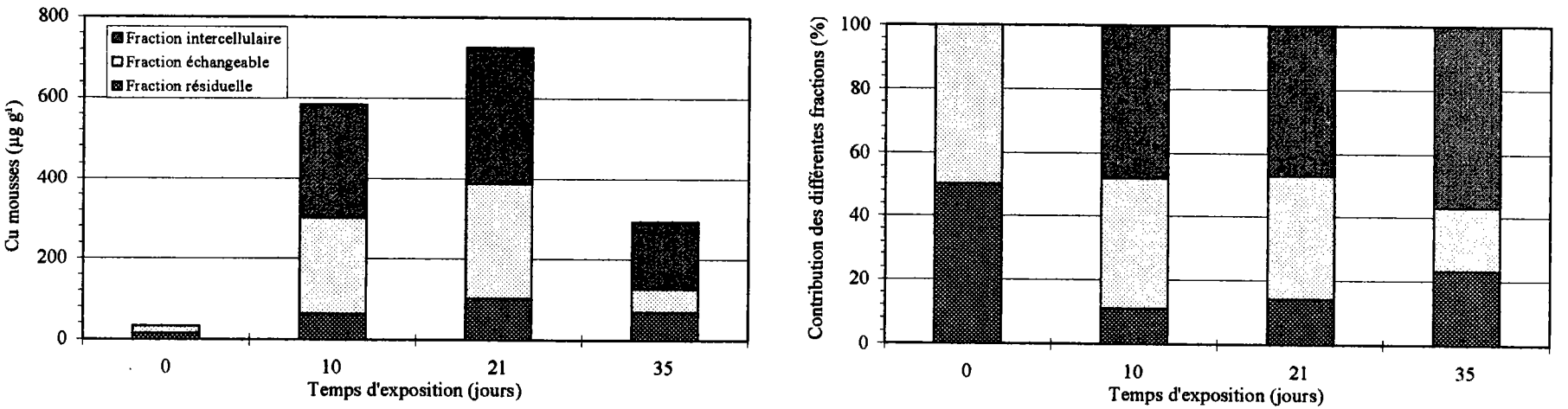


Figure 5-9: Evolution de la contribution des 3 fractions métalliques exprimée en µg g^{-1} de cuivre et en pourcentage de la quantité totale de Cu déterminée dans l'échantillon exposé au métal pendant 21 jours.

de 16 ± 1 μg g^{-1}, valeur proche du niveau de référence défini par Mouvet (1986), pour augmenter jusqu'à 31 ± 7 μg g^{-1} après 35 jours d'exposition dans le bac témoin.

Dans le cas où les mousses sont exposées pendant 21 jours à une concentration en Cu dans l'eau de 188.0 ± 10.0 μg L^{-1}, la contribution des fractions F_i et F_e devient majoritaire. La figure 5-9 révèle néanmoins que la fraction F_r augmente progressivement de 16 ± 1 μg g^{-1} à 101 ± 6 μg g^{-1} après 21 jours d'exposition au métal. Par contre, la détermination des différentes fractions métalliques accumulées à la fin de la phase de relargage montre que la fraction F_r a chuté durant les 14 jours de 101 ± 6 à 68 ± 10 μg g^{-1}. Cependant, sa contribution à la concentration totale en Cu restant dans les mousses devient importante, dépassant 20 % (Figure 5-9), conséquence du relargage des deux autres fractions. On remarque d'ailleurs que le relargage du cuivre concerne avant tout la fraction F_e, dont la concentration chute d'un facteur 5, alors que la fraction F_i, supposée être désorbée plus facilement, ne chute que d'un facteur 2.

L'accumulation du cuivre par le second lot de mousses, exposé au métal pendant seulement 7 jours, est plus importante que celle observée pour le premier lot puisque la concentration en métal dans les mousses après 7 jours atteint 638 ± 78 μg g^{-1} (Figure 5-10). Comme dans le précédent lot, les mousses du second lot immergées dans le bac témoin accumulent le cuivre, de 16 ± 1 μg g^{-1} en début d'expérience à 69 ± 6 μg g^{-1} après 21 jours. Si les quantités totales de Cu accumulé après 21 jours par les mousses témoins du premier et du second lot ne sont pas significativement différentes ($p > 0.05$), les concentrations initiales en Cu sont 2 fois plus importantes dans le premier des 2 lots, avec des concentrations respectivement de 32 ± 2 et 16 ± 1 μg g^{-1}. Pour mémoire, ces deux lots ont été prélevés sur le même site de référence mais à 13 jours d'intervalle. La détermination de la fraction F_r montre cependant que son évolution quantitative au cours du temps est similaire pour les deux lots témoins. La contribution de cette fraction à la quantité totale de cuivre dans les deux lots prélevés *in situ* sont à peu près équivalente avec des concentrations de 16 ± 1 et 14 ± 0 μg g^{-1} (Figure 5-11), valeur proche du niveau de référence défini par Mouvet (1986).

L'exposition au cuivre du second lot pendant seulement 7 jours met en évidence un accroissement significatif de la fraction F_r, 3 fois plus élevée à la fin de la phase d'exposition, 50 ± 18 μg g^{-1}, qu'en début d'expérience (Figure 5-12). Elle montre aussi que 7 jours d'exposition au métal suffisent pour que la concentration en Cu dans la fraction F_r après 14 jours de relargage, de 43 ± 2 μg g^{-1}, soit significativement supérieure à sa valeur avant exposition ($p < 0.01$). On remarque également qu'entre le $7^{ème}$ jour, fin de la phase d'exposition, et le $21^{ème}$ jour, fin de la phase de relargage, la quantité de cuivre dans la fraction F_r diminue (Figure 5-12). La fraction réversible, F_{rev}, représente, après 7 jours d'exposition, 92 % de la quantité totale de métal accumulée, dont les deux tiers sont attribués à la fraction F_i. Comme pour le précédent

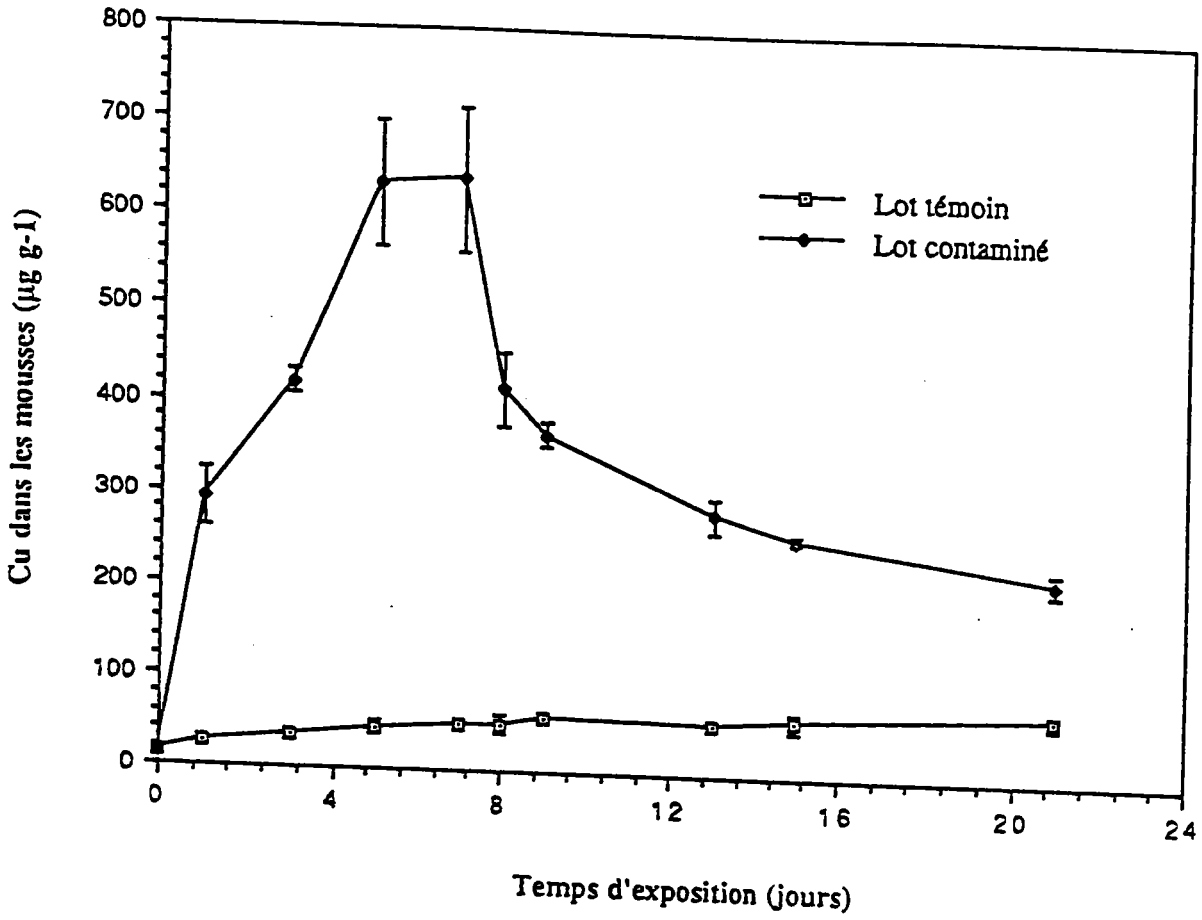


Figure 5-10: Evolution des concentrations moyennes en cuivre dans les mousses immergées dans le bac témoin pendant 21 jours et dans le bac contaminé par 188 µg L^{-1} de Cu pendant les 7 premiers jours de l'immersion. Les barres verticales représentent l'écart-type (n =3).

lot, le relargage du cuivre concerne en premier lieu la fraction F_e qui, entre le début et la fin de la phase de relargage, chute d'un facteur 4.5 contre 3.0 pour la fraction F_i .

Evolution de l'activité photosynthétique des mousses

L'activité photosynthétique des mousses en début d'expérience n'est pas significativement différente entre le premier et le second lot (Figures 5-13 et 5-14). La consommation de CO_2 est d'ailleurs du même ordre de grandeur que celle mesurée lors de l'expérience menée sur l'effet de la température (chapitre III). On n'observe pas de différence significative ($p < 0.01$) entre les mesures d'activité photosynthétique effectuées sur les échantillons du bac témoin et celles provenant du bac contaminé par le cuivre. Par contre, comme il avait été observé lors de l'expérience effectuée sur l'effet de la température, il y a une diminution de la consommation de CO_2 dans le temps, et ce, quel que soit le bac.

V-3-3 STRUCTURE PARIETALE D'UNE CELLULE DE BRYOPHYTE

L'observation des bryophytes tant en microscopie optique qu'en microscopie électronique à transmission (MET) permet de préciser l'ultrastructure de la cellule et de sa paroi en particulier.

La coloration des lames au rouge ruthénium permet de distinguer à la fois sur les coupes de tige et sur les coupes de feuille trois structures composants la paroi cellulaire visualisées par trois couleurs différentes (Figure 5-15). La coloration rouge révèle la présence de substance pectique dans la composition de la paroi. On retrouve cette coloration pour la majorité des cellules composants les tiges et les feuilles. On remarque cependant sur les cellules périphériques de la tige et sur les cellules de feuilles la présence de deux autres colorations, vert fonçé et vert clair, traduisant la présence de deux autres couches externes englobant la première. La couleur verte révèle en fait la présence de composés qui s'apparentent à la subérine. Cette évolution de la composition chimique de la paroi de l'intérieur vers l'extérieur pourrait traduire le viellissement de cette structure. En effet, l'observation au MET d'une cellule de feuille montre l'existence ultrastructure filamenteuse organisées de façon centrifuge sur la face interne de la paroi, et qui pourraient être l'amorce d'une nouvelle lamelle pariétale en constante formation durant la vie de la cellule (Figure 5-16a).

L'observation au MET met aussi en évidence les trois couches distinguées en microscopie optique en permettant en plus de visualiser leur arrangement structurel (Figure 5-16b). De l'intérieur vers l'extérieur, on distingue trois structures. La couche pectocellulosique interne colorée en rouge, appelée lamelle secondaire, est organisée en strates centifuges. Elle correspond probablement à la partie la plus jeune de la paroi. La seconde couche, partie plus agée de la

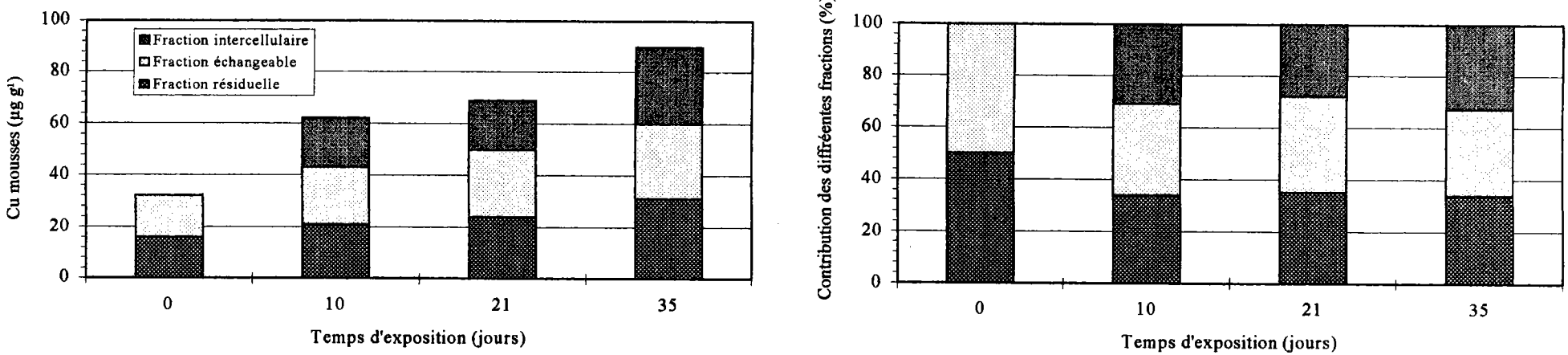


Figure 5-11: Evolution de la contribution des 3 fractions métalliques exprimée en µg g^{-1} de Cu et en pourcentage de la quantité totale de métal dans l'échantillon immergé pendant 21 jours dans le bac témoin.

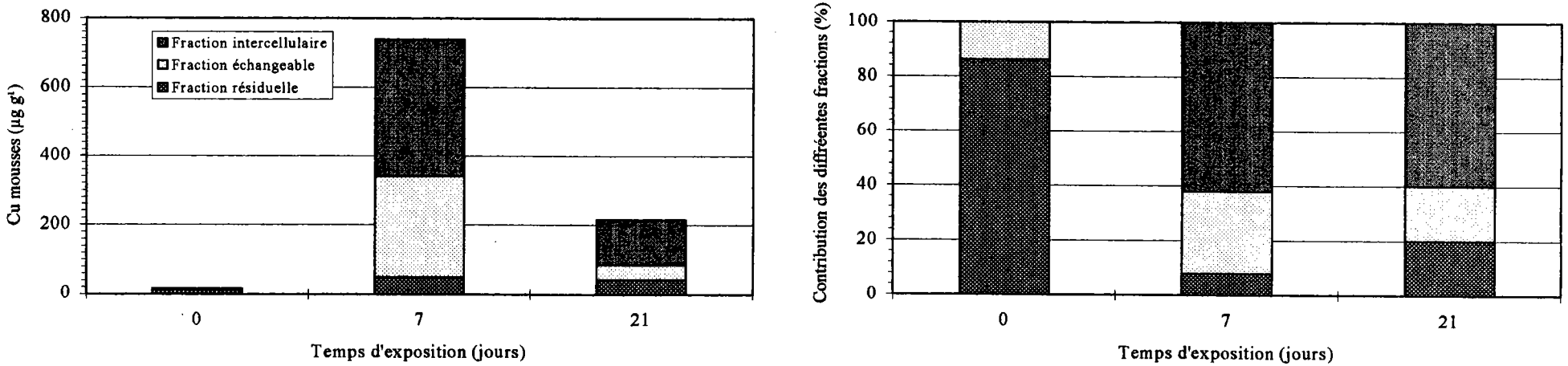


Figure 5-12: Evolution de la contribution des 3 fractions métalliques exprimée en µg g^{-1} de Cu et en pourcentage de la quantité totale de métal dans l'échantillon immergé pendant 21 jours et exposé pendant 7 jours au métal.

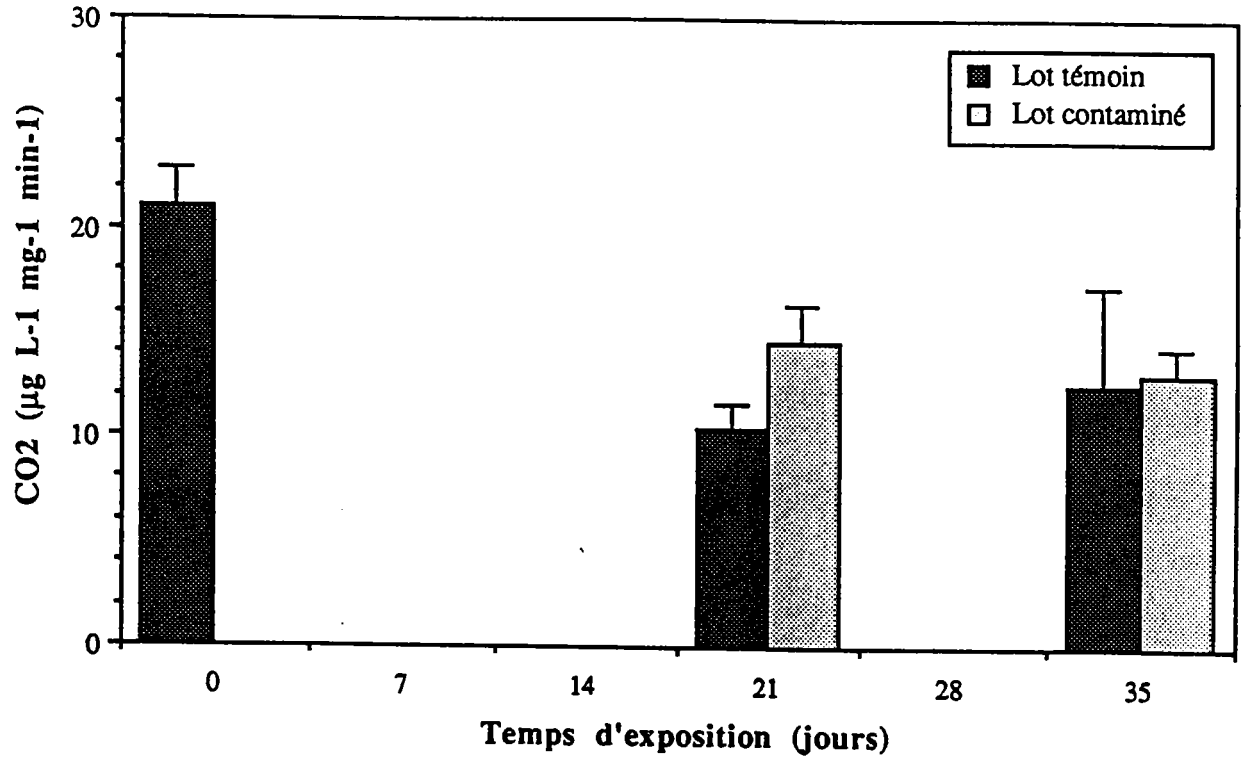


Figure 5-13: Evolution de l'activité photosynthétique des lots de mousses immergés pendant 35 jours dans les bacs témoin et contaminé. Les barres verticales représentent l'écart-type (n = 3).

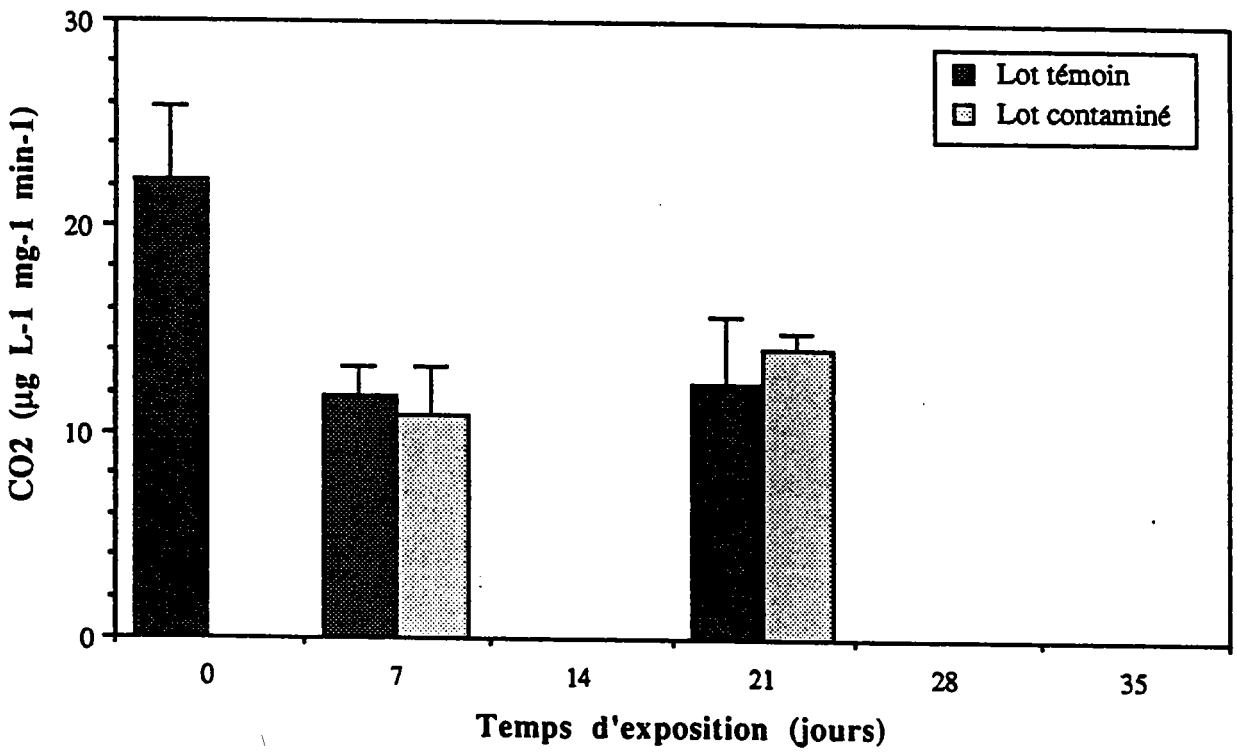


Figure 5-14: Evolution de l'activité photosynthétique des lots de mousses immergés pendant 21 jours dans les bacs témoin et contaminé. Les barres verticales représentent l'écart-type (n = 3).

paroi, appelée lamelle primaire, est organisée en strate circulaire. La limite entre ces deux couches n'est cependant pas toujours évidente à distinguer. Les deux lamelles primaires de deux cellules voisines se soudent formant un espace intercellulaire, espace très bien visualisé sur les coupes de tige (Figure 5-16c). On distingue facilement la troisième couche, la plus externe, appelée lamelle externe. On la remarque aisément par sa couleur très électrodense. Il semble que l'on n'observe cette troisième structure que sur les cellules périphériques de la paroi et sur les cellules de feuille.

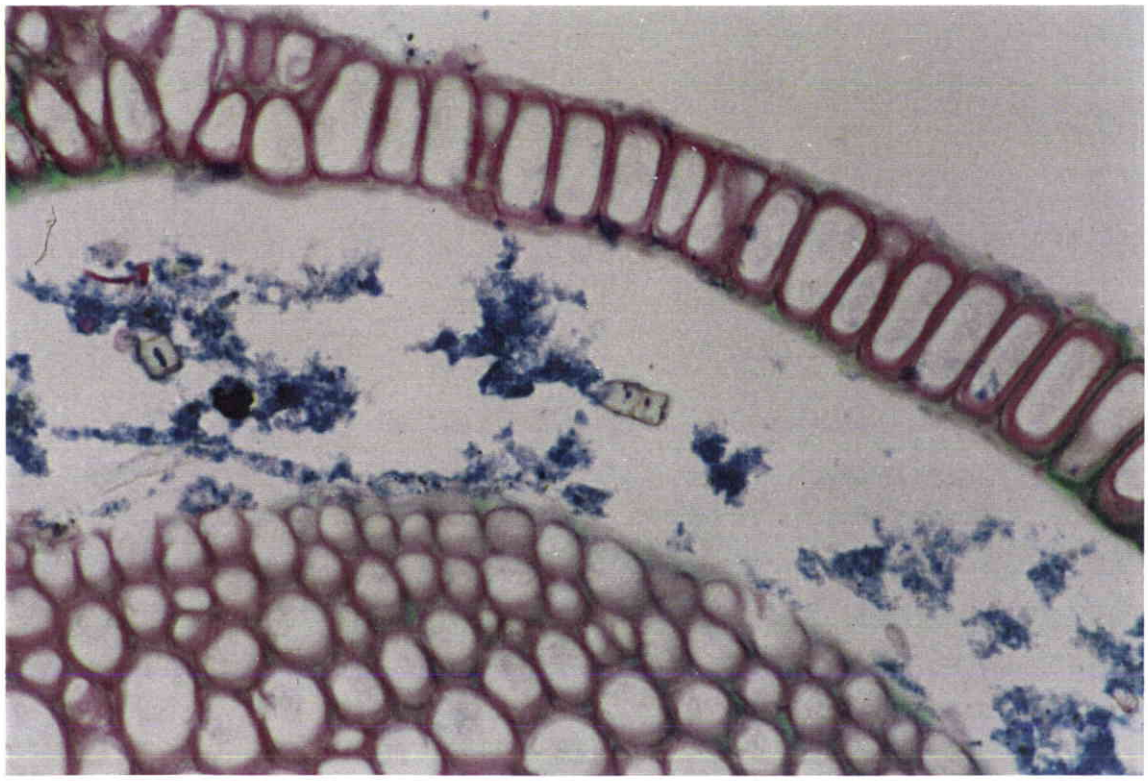
V-3-4 LOCALISATION ET REPARTITION DU CUIVRE DANS LA PLANTE

Des échantillons de mousses prélevés à la fin des phases d'exposition et de relargage ont ensuite été observés au microscope selon différentes techniques.

La première d'entre elles permet, grâce à l'acide rubéanique, de localiser sur une coupe transversale les sites où le cuivre est présent. Sur les échantillons de feuilles et de tiges témoins, cette méthode histochimique ne permet pas d'observer le métal. Par contre, des grains noirâtres, caractéristiques du précipité formé par le complexe Cu - acide rubéanique, sont observés sur les coupes de tige issues à la fois des échantillons collectés à la fin des phases d'exposition et de relargage (Figure 5-17). Cependant, on ne remarque pas ou très peu de métal à la périphérie de la tige, dans les parois cellulaires directement en contact avec le milieu d'exposition. On a également beaucoup de difficultés à distinguer du cuivre sur les coupes transversales de feuilles.

En parallèle avec la technique histochimique, des coupes transversales de feuilles sont aussi observées en microscopie électronique à transmission (MET), qui, couplé à l'analyse X (JEOL JEM 100 CX), permet de localiser plus précisément le métal dans la paroi et dans les différents organites de la cellule. L'observation simple des coupes ultrafines ne permet pas de distinguer des corps électroniques denses traduisant la présence d'agglomérats contenant des éléments lourds (Mouvet, 1984b; Satake et Miyisaka, 1984). La multiplicité des analyses X effectuées alors au hasard dans la paroi et dans la cellule n'a pas permis de détecter la présence du métal.

Plusieurs hypothèses peuvent expliquer l'absence de réponse positive par cette technique. Même si les concentrations en cuivre dans l'échantillon sont de l'ordre de 700 $\mu g\ g^{-1}$, les teneurs en cuivre sont à l'état de trace comparées aux teneurs des élements légers (C, O, N, P, S, Cl) qui constituent plus de 90 % de la masse de l'échantillon. Le reste est essentiellement constitué de cations majeurs (Ca, Mg, K, Na) dont la présence n'est déjà pas systématiquement détectée à chaque analyse. De plus, que ce soit par histochimie ou par microanalyse X, la préparation des coupes, consistant en une succession d'étapes de déshydratation et d'imprégnation, pourrait



A

B

Figure 5-15: Révélation au rouge de ruthénium de la composition chimique majeure de la paroi cellulaire sur une coupe de tige (A; x 400) et de feuille (B ; x 1000) de *Rhynchostegium riparioides*.

favoriser une fuite importante de métal accumulé essentiellement dans la paroi. Cette hypothèse permettrait notamment d'expliquer la rareté des grains noirs à la périphérie des coupes de tiges.

Il apparaît, selon les observations au MET, que le cuivre ne forme pas de précipité facilement repérable contrairement à d'autres éléments comme le chrome (Mouvet, 1984b), le mercure (Satake et Miyisaka, 1984) ou le plomb (Skaar *et al.*, 1973).

Une troisième technique d'observation et de localisation a été alors employée et qui consiste à utiliser toujours la même technique d'analyse X mais en employant un microscope électronique à balayage (MEB, LEICA S 440). L'avantage de cette technique est de pouvoir utiliser des échantillons de mousses entiers, non traités mise à part une étape de séchage à 60 °C pendant 24 heures. L'inconvénient est que l'analyse X ne permet pas de distinguer le métal intracellulaire du métal extracellulaire. En effet, le matériel biologique est très fin puisque l'épaisseur d'une feuille n'excède pas 15 - 20 µm. La recherche d'éléments traces comme le cuivre nécessite l'emploi d'une tension de 20 keV et un courant de faisceau (débit d'électron) trois fois supérieure (1300 picoAmpères) au courant employé pour la détermination de la composition chimique en éléments légers. La répartition du cuivre fournie par cette méthode comprend alors l'intégralité du volume de la feuille analysée sur une section longitudinale. Afin de s'assurer que le cuivre peut effectivement être détecté, les échantillons employés jusqu'à maintenant sont remplacés par un échantillon de la même espèce collecté dans le rejet de la centrale nucléaire de Nogent-sur-Seine car il contient 10 fois plus de cuivre.

La figure 5-18 représente l'attache d'une feuille sur un rameau. L'analyse X a été effectuée sur l'ensemble de la surface représentée à la figure 5-18 en effectuant une série de spot. Chaque spot correspond à l'analyse d'une surface de 1 μm^2. Le balayage de l'ensemble de la surface permet au bout de 3 heures d'obtenir une image X où les éléments sélectionnés par l'analyse apparaissent sous forme de pixel plus ou moins sombre. La figure 5-19 montre la répartition volumique du cuivre et de l'aluminium, deux éléments représentatifs des deux types de distribution que l'on peut observer. A l'instar de l'aluminium, le fer et la silice présente une répartition très hétérogène au sein du volume analysé. La superposition des images X correspondant à ces trois éléments montre que leur répartition est identique révélant ainsi qu'il s'agit probablement de précipités de Fe et de silicate d'alumine. Par contre, la répartition des éléments K, Ca et P est uniforme dans le volume analysé et semblable à celle du cuivre. Cette observation tend à confirmer l'hypothèse selon laquelle le cuivre est distribué de façon homogène au sein de la plante, comme peuvent l'être d'autres cations et contrairement à d'autres métaux comme le plomb par exemple.

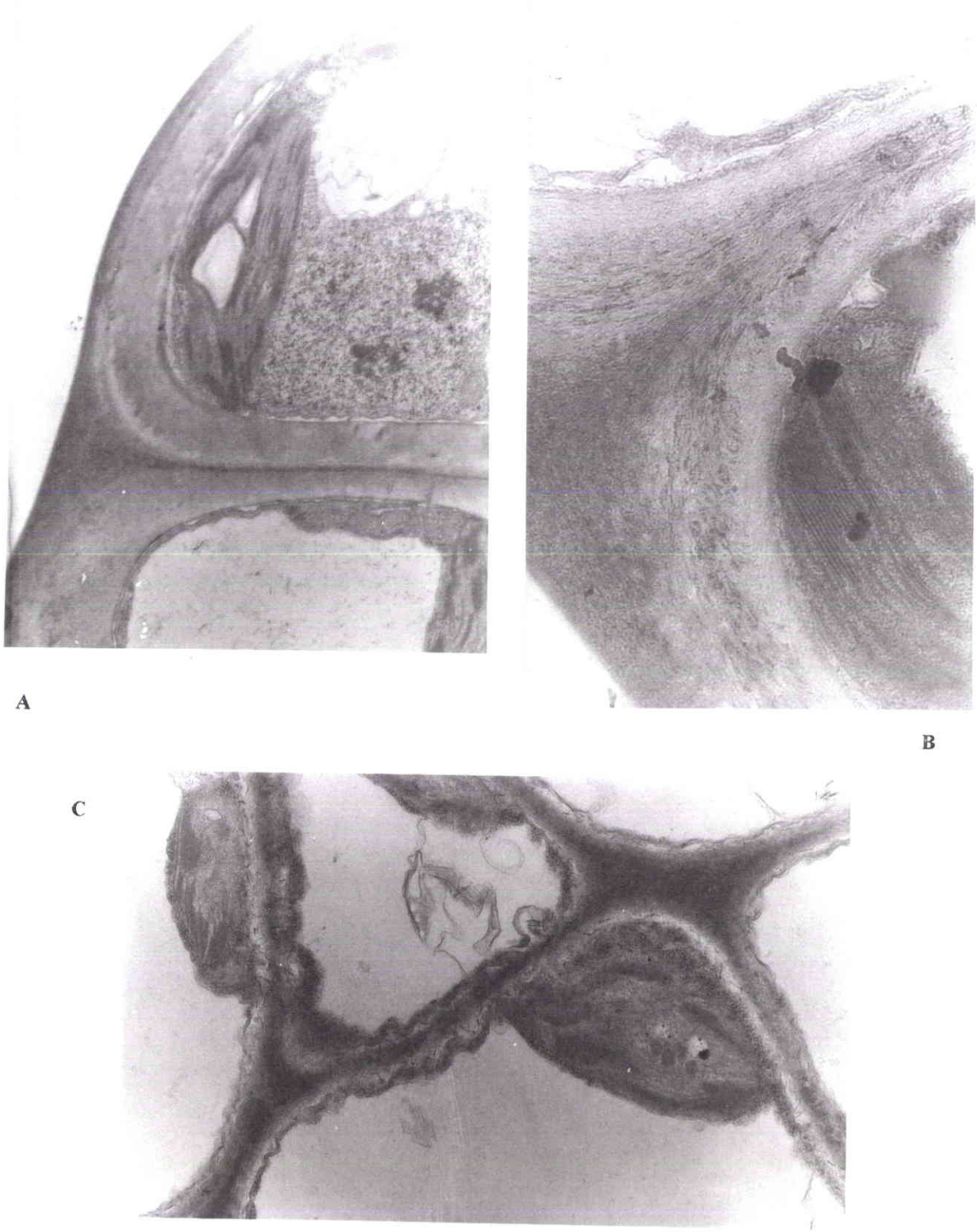


Figure 5-16: Ultrastructure de *Rhynchostegium riparioides*. Coupe transversale de feuille (A; 20000), de tige (B; 20000) et visualisation des espaces intercellulaires (méats) dans la tige (C; x 10000)(trait = 1 µm).

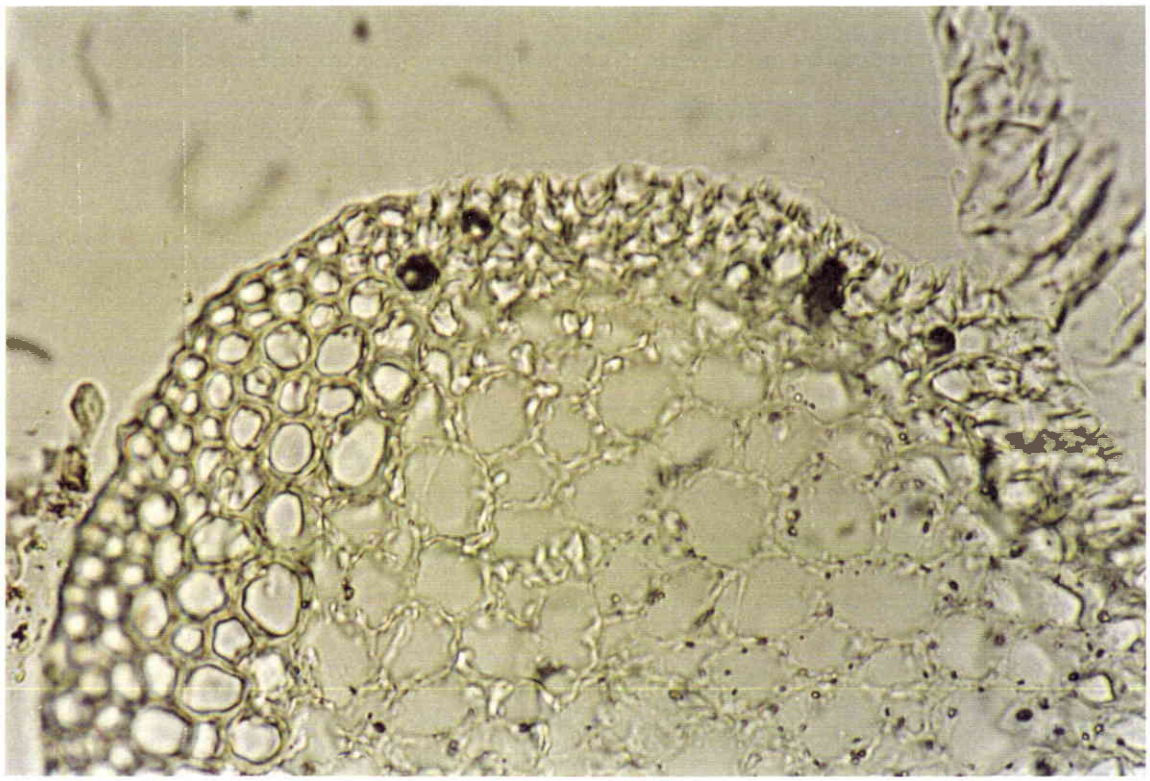
V-3-5 DISCUSSION

L'expérience de désorption effectuée à différents moments des cinétiques d'accumulation et de relargage du cuivre par *Rhynchostegium riparioides* a permis de distinguer et de suivre quantitativement trois fractions métalliques: i) une fraction intercellulaire F_i dont les métaux sont présents dans les espaces libres de la paroi, c'est-à-dire l'apoplasme, ii) une fraction échangeable F_e correspondant aux métaux adsorbés dans les structures surfaciques de la paroi, iii) une fraction résiduelle F_r difficilement échangeable dont au moins une partie serait localisée dans la cellule. L'addition des fractions F_i et F_e correspond à la fraction réversible, F_{rev} et la fraction F_r est aussi appelée par opposition fraction irréversible F_{irrev} .

Le premier enseignement de cette expérience est que la majorité du métal accumulée par la mousse se présente sous la fraction réversible. La contribution de cette fraction à la quantité totale de cuivre accumulée varie en effet de 76 à 92 % durant les phases d'accumulation et de relargage. Le fait que les fractions F_i et F_e soient celles qui sont principalement désorbées durant la phase de relargage valide leur regroupement sous le terme de fraction réversible et leur attribution à une localisation extracellulaire du métal. Cependant, l'évolution quantitative de ces deux fractions entre la fin de l'accumulation et la fin du relargage montre que c'est la fraction *Fe* qui est principalement concernée par le relargage. Or, d'après le protocole de désorption, on pourrait s'attendre à ce que la fraction intercellulaire soit désorbée plus facilement que la fraction échangeable. De cette remarque découle alors l'hypothèse selon laquelle l'accumulation et le relargage se décomposent en deux phases du fait de l'existence de 2 compartiments correspondant aux fractions F_i et F_e . Suite à la diminution des concentrations métalliques dans l'eau, la fraction F_i est désorbée vers le milieu extérieur, conséquence de l'inversion du gradient de concentration entre le milieu environnant et la mousse. Cette fuite de métal entraîne une modification de l'équilibre des concentrations en métal accumulé sous les formes F_i et F_e provoquant alors la mobilisation des métaux fixés aux sites d'échanges (fraction F_e) dans l'apoplasme pour se trouver ainsi dans la fraction F_i avant d'être définitivement relargués. La confirmation d'une telle hypothèse signifierait que l'accumulation extracellulaire du métal se décompose en deux phases du fait de la présence de deux compartiments, l'apoplasme et les structures surfaciques de la paroi.

La fraction F_i correspond à la fraction de métal désorbée par un simple trempage dans de l'eau minéralisée. Pour les deux lots de mousses collectés *in situ* avant l'expérience, cette fraction n'a pas une contribution significative, contrairement aux échantillons prélevés par la suite durant l'expérience. Deux raisons peuvent expliquer cette absence. La première est que l'échantillon, n'étant pas soumis à une contamination métallique du milieu lors de son prélèvement, la fraction F_i n'existe pas ou est trop faible pour être détectée. La seconde

A



B

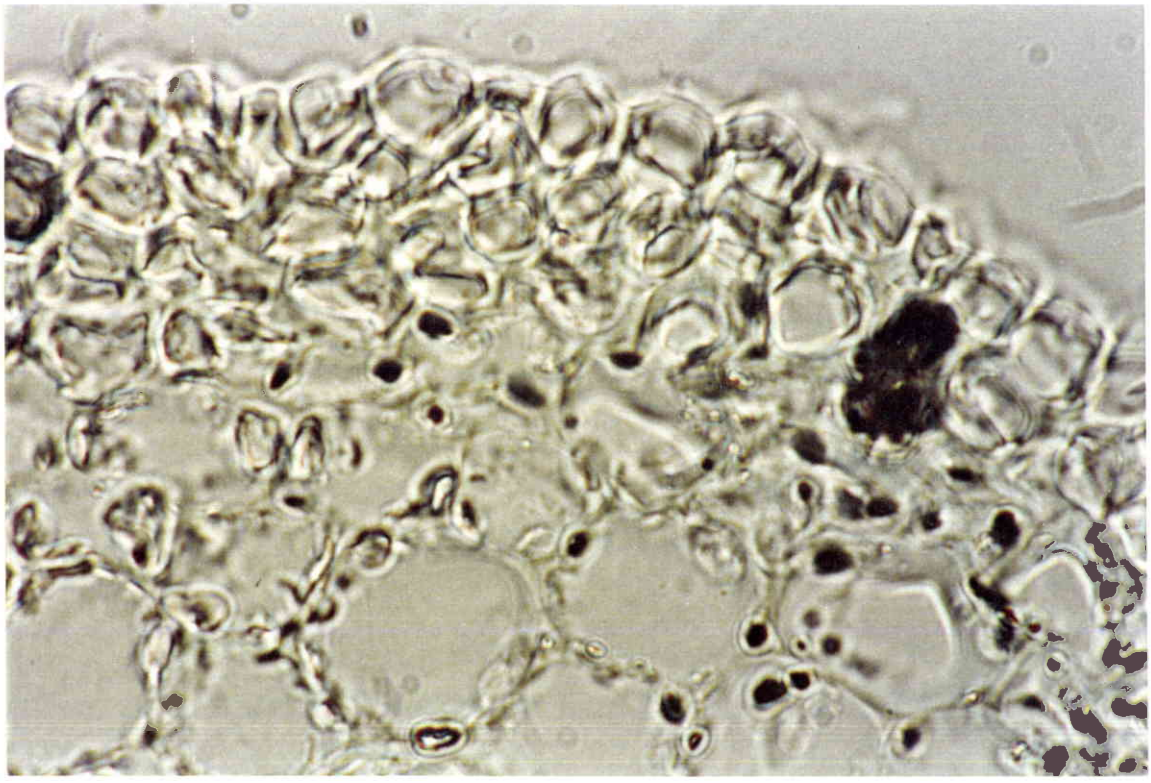


Figure 5-17: Coupe transversale d'un rameau traité à l'acide rubéanique. Le cuivre se révèle par des grains noirâtres, (A) x 400 ; (B) x 1000.

explication réside dans le fait que seul l'échantillon collecté *in situ* a subi le protocole de lavage complet conformément au protocole détaillé précédemment (chapitre II-6-1), les échantillons prélevés durant l'expérience pour les tests de désorption n'ayant subi qu'un lavage succinct à l'eau distillée. L'application du protocole de lavage (eau déminéralisée sous pression) sur l'échantillon initial a pu provoquer la désorption de la fraction F_i . Cette hypothèse mérite d'être prise en compte au niveau méthodologique. En effet si chaque échantillon, contaminé ou pas, subi ce protocole de lavage en entraînant une fuite d'une partie du métal accumulé (fraction F_i), l'estimation finale d'une contamination métallique d'un cours d'eau à partir des mousses aquatiques en serait affectée et pourrait se traduire par une sous-estimation systématique du niveau de contamination.

La détermination de la fraction résiduelle F_r montre que sa contribution à la quantité totale de métal accumulé par la mousse augmente durant la phase d'accumulation. La révélation histochimique de cuivre à l'intérieur de la cellule des mousses exposées au cuivre pendant 7 et 21 jours tend à montrer que la fraction F_r est, au moins en partie, représentative d'une localisation intracellulaire du métal. Dans ce cas, la présence significative de cette fraction dès les premiers jours de l'accumulation montre que la composante intracellulaire de l'accumulation intervient dès le début de l'exposition. La présence intracellulaire observée en histochimie ne se traduit toutefois pas par une altération de l'activité photosynthétique de la plante qui n'a pas évolué de manière significative durant l'expérience.

La contribution de la fraction résiduelle à la quantité totale de cuivre est surtout importante dans les échantillons prélevés sur le site de référence, où elle peut constituer jusqu'à 88 % de la concentration totale. La concentration de cette fraction dans les deux lots de mousse prélevés à 14 jours d'intervalle sur le site de référence est de 16 ± 1 $\mu g\ g^{-1}$, concentration proche du niveau de référence défini par Mouvet (1986) égale à 19 $\mu g\ g^{-1}$. Cette fraction pourrait être alors le reflet de la concentration physiologique de la plante, pour laquelle le cuivre est un oligo-élément (Proctor, 1990; Welch, 1995).

A la fin de la phase de relargage, la contribution de la fraction résiduelle à la quantité totale de cuivre présente dans les mousses est de plus de 20 %, que les échantillons aient été exposés au métal 7 ou 21 jours. Il est probable que la prolongation de la phase de relargage entraînerait une contribution encore plus importante de cette fraction du fait de la poursuite du relargage de la fraction réversible.

La désorption chimique du cuivre permet une quantification de la fraction F_r. Cependant, même si l'étude de la répartition cellulaire du cuivre montre qu'une partie est localisée dans la cellule, rien ne permet de conclure que l'intégralité de la fraction F_r se trouve à l'intérieur de la

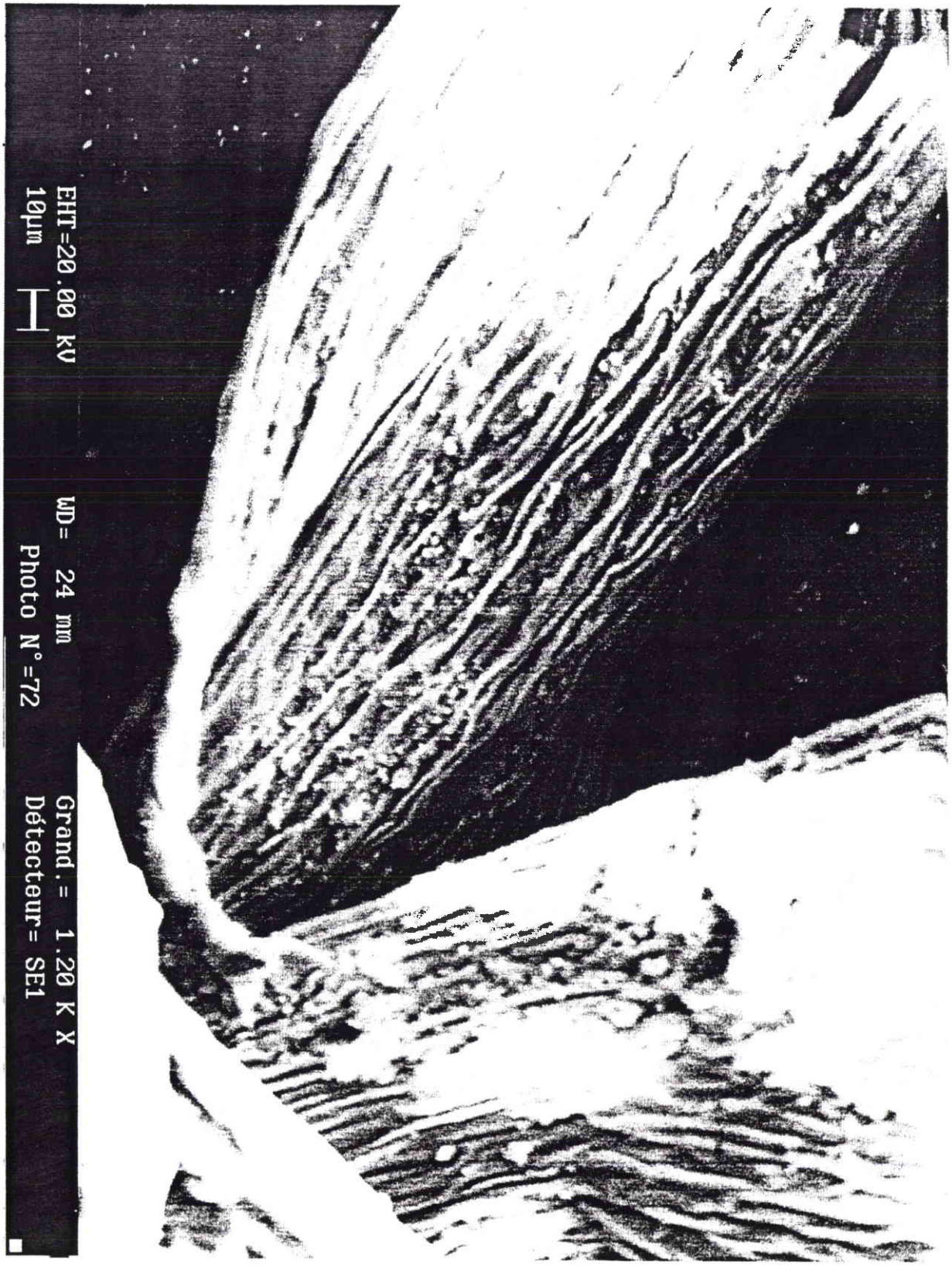


Figure 5-18: Attache d'une feuille sur un rameau de *Rhynchostegium riparioides* séché en microscopie électronique à balayage (surface analysée pour l'image X).

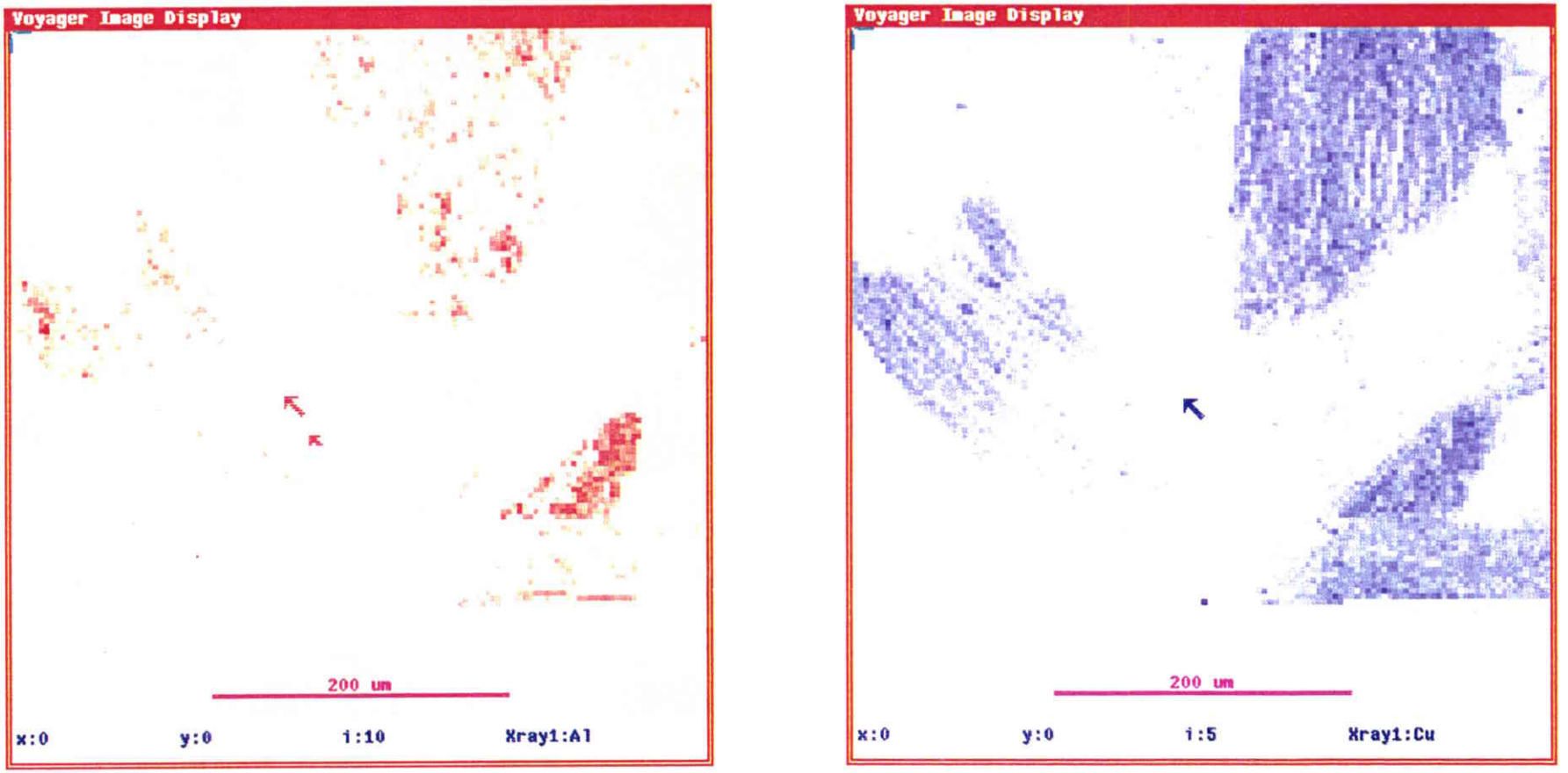


Figure 5-19 : Image X représentant la répartition de deux éléments caractéristiques, le cuivre et l'aluminium, dans le volume analysé représenté à la figure 5-18.

cellule. A l'inverse, le fait d'avoir mis en évidence une localisation intracellulaire du cuivre fournit une explication quant à l'accumulation irréversible d'une partie du métal. On observe aussi à la fin de la phase de relargage une diminution quantitative, non seulement de la fraction réversible, mais aussi d'une partie de la fraction résiduelle. Cela signifie que, si cette fraction correspond à la localisation intracellulaire du métal, il existe un mécanisme d'excrétion du métal de la cellule vers le milieu extérieur, impliquant que la cellule ne reste pas inactive face à l'agression que constitue un enrichissement en métal supérieur à ses besoins. Cela peut signifier aussi, et cela est plus probable, qu'une partie de la fraction F_r se partage entre le milieu intracellulaire et les structures surfaciques de la paroi.

V-3-5 CONCLUSION

La mise au point puis l'application d'un protocole de désorption du cuivre à différents moments d'une cinétique d'accumulation-relargage permet de mieux comprendre et de formuler des hypothèses relatives aux mécanismes d'accumulation des métaux. Les quantités de cuivre accumulées par l'organisme sont divisées en 3 fractions, F_i , F_e et F_r , chacune d'entre elles correspondant à la localisation du métal dans un compartiment. Ainsi, les fractions F_i et F_e représentent respectivement le métal présent dans l'apoplasme et adsorbé dans les structures surfaciques de la paroi, l'addition des deux fractions (F_{rev}) correspondant à une localisation extracellulaire du métal. En accord avec la littérature consacrée à ce sujet, cette fraction représente quantitativement la part la plus importante du métal accumulé par la mousse, au moins 80 %. La troisième fraction F_r pourrait correspondre à une localisation intracellulaire du métal. Cependant, même si l'observation histochimique révèle la présence de métal dans la cellule, on ne peut attribuer quantitativement l'intégralité de cette fraction au compartiment intracellulaire. De l'existence de 3 compartiments découlent 3 étapes distinctes lors de l'accumulation comme lors du relargage. L'accumulation du métal se ferait alors par l'établissement d'un gradient de diffusion entre les différents compartiments lorsque le milieu extérieur est contaminé. Le relargage se produit par simple inversion de ce gradient lorsque le milieu n'est plus contaminé. Néanmoins, ce schéma simplificateur ne tient pas compte des différents mécanismes permettant au métal de passer d'un compartiment à l'autre. Par exemple, le suivi de la fraction F_r au cours du temps montre, qu'une fois accumulée, le métal associé à cette fraction n'est pratiquement pas relargué, signifiant par la même que l'existence seule d'un gradient de concentration comme mécanisme d'accumulation n'est pas une explication suffisante.

Chapitre VI:
Optimisation de la méthode des mousses aquatiques pour l'évaluation de la micropollution métallique

VI-1 INTRODUCTION

L'analyse des métaux dans les mousses aquatiques permet, par l'identification et la localisation de rejets, une évaluation descriptive et par l'emploi des grilles de qualité, une évaluation semi-quantitative de la contamination métallique du milieu. Or, la relation existant entre le niveau d'exposition en métal dans l'eau et les concentrations observées dans les mousses, observée tant en laboratoire que sur le terrain, permet d'envisager une utilisation encore plus fine de ces organismes, où les quantités accumulées seraient directement reliées à la teneur moyenne d'exposition. L'obstacle majeur à une telle relation est l'interdépendance des cinétiques d'accumulation et des paramètres physiques et chimiques conditionnant la disponibilité du micropolluant pour les mousses. En effet, plusieurs paramètres influençant la spéciation des métaux (pH, présence de matières organiques, de matières en suspension, d'ions compétiteurs pour les sites d'adsorption) mais aussi des paramètres physiques comme le débit (Chapitre IV) sont susceptibles d'affecter les cinétiques d'échanges des métaux à l'interface eau-bryophytes.

Dans le cadre du programme engagé avec la Direction des Etudes et Recherches de EDF (EDF-DER), cette partie des travaux est la mise au point d'une méthodologie visant à une interprétation quantitative de la micropollution métallique à partir des mesures dans les mousses. La motivation d'un tel programme est de fournir un outil permettant d'évaluer l'importance de la contamination métallique liée aux rejets des eaux échauffées des Centres de Production Nucléaire (CPN). Le programme doit répondre à deux objectifs principaux, d'une part, la mise au point d'un outil mathématique décrivant les échanges de métaux à l'interface eau-bryophytes en fonction des teneurs d'exposition, et d'autre part, la mise au point d'une méthode permettant l'emploi des mousses en s'affranchissant de certains paramètres qui influencent les cinétiques d'accumulation et de relargage des métaux par les mousses aquatiques.

L'outil mathématique a été initialement développé pour le cuivre à EDF-DER [1] à partir de scénarios de pollution simulés en laboratoire et dont les résultats ont été publiés (Claveri *et al.*, 1994). La recherche d'une méthode visant à placer les mousses dans un environnement contrôlé

[1] P. Ciffroy, Ingénieur-chercheur (EDF-DER, 6 quai Watier, 78400 CHATOU)

s'est traduit par l'élaboration d'un module expérimental développé au CREUM. Une troisième phase a consisté à évaluer la méthode *in situ* afin de valider le modèle mathématique proposé et de tester l'efficacité, la fiabilité du module ainsi que son apport pour la méthode. Cette étape s'est faite dans le cadre du programme du suivi et d'évaluation des rejets métalliques des CPN mené par EDF-DER[2] dans lequel le CREUM a été associé sur trois sites, à Cattenom (Moselle), Dampierre (Loire) et Nogent-sur-Seine (Seine).

VI-2 DEVELOPPEMENT D'UN MODELE MATHEMATIQUE DECRIVANT LES RELATIONS D'ECHANGES A L'INTERFACE EAU-BRYOPHYTES

VI-2-2 THEORIE DU MODELE

La théorie du modèle est basée sur la connaissance des mécanismes d'accumulation des métaux par les bryophytes exposés précédemment (chapitre I-3-5 et I-3-6) et sur les enseignements tirés des expériences sur la localisation cellulaire des métaux (Chapitre V). Ce modèle descriptif des phases d'accumulation et de relargage des métaux par les mousses repose sur l'hypothèse d'une accumulation qui résulte d'abord d'une adsorption réversible sur les structures surfaciques de la paroi suivie d'une diffusion possible du polluant dans la cellule. Ces hypothèses permettent d'établir le schéma réactionnel suivant:

$$M_d \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftarrows}} M_s \xrightarrow{k_2} M_i \qquad (6\text{-}1)$$

où M_d est la concentration (µg L^{-1}) en métal dissous disponible pour les sites d'adsorption, M_S représente le complexe métallique formé par le métal fixé aux structures surfaciques de la paroi. La concentration s'exprime en considérant la quantité de métal fixée par gramme de mousse (µg g^{-1} p.s.). M_i représente la fraction de métal localisée à l'intérieur de la cellule (µg g^{-1} p.s.). k_1, k_{-1} et k_2 sont respectivement les constantes cinétiques pour les réactions d'adsorption (l g^{-1} h^{-1}), de désorption (h^{-1}) et d'absorption (h^{-1}). L'éventualité d'une excrétion du métal intracellulaire vers l'extérieur de la cellule n'est pas envisagée dans le modèle car elle n'a jamais été mise en évidence. Cependant, l'existence d'un tel phénomène ne se traduirait probablement par un flux de métal suffisamment important au regard du phénomène principal, c'est-à-dire l'adsorption extracellulaire. Ainsi, l'accumulation intracellulaire de l'élément est considérée comme irréversible.

---

[2] Responsable: D. Vazelle, Ingénieur (EDF-DER, même adresse)

Le développement du modèle est basé sur les hypothèses suivantes: i) chaque réaction obéit à une cinétique d'ordre 1, ii) la croissance de la mousse est considérée comme négligeable durant la période d'utilisation, iii) les sites de fixation ne sont pas saturés.

L'équation (6-1) ainsi que les hypothèses précédemment évoquées permettent d'exprimer (M_S) et (M_i) en fonction du temps:

$$\frac{d(M_s)}{dt} = k_1(M_d) - (k_{-1} + k_2)(M_s) \tag{6-2}$$

et:

$$\frac{d(M_i)}{dt} = k_2(M_s) \tag{6-3}$$

Comme les équations (6-2) et (6-3) sont susceptibles d'être utilisées sur des périodes variant de quelques heures à plusieurs jours, elles peuvent être simplifiées en considérant les valeurs moyennes de ces variables:

$$\frac{\Delta(M_s)}{\Delta t} = k_1(\overline{M_d}) - (k_{-1} + k_2)(\overline{M_s}) \tag{6-4}$$

et

$$\frac{\Delta(M_i)}{\Delta t} = k_2(\overline{M_s}) \tag{6-5}$$

où Δt, est le temps, en heures, séparant deux échantillonnages de mousses collectées à t_i et t_{i+1}, $\left(\overline{M_d}\right)$, la concentration moyenne de métal dissous biodisponible présent dans l'eau, et $\left(\overline{M_s}\right)$, la concentration moyenne de métal adsorbé dans la paroi entre t_i et t_{i+1}.

Les valeurs de $\left(\overline{M_s}\right)$ sont estimées par:

$$\left(\overline{M_s}\right) = \frac{\left(M_s\right)_{t_{i+1}} + \left(M_s\right)_{t_i}}{2} \tag{6-6}$$

où $(M_S)_{ti}$ et $(M_S)_{ti+1}$ représentent les concentrations métalliques adsorbées à t_i et t_{i+1} respectivement.

A partir des équations (6-5) et (6-6), l'équation (6-4) peut aussi s'écrire de la façon suivante :

$$\frac{(M_s)_{t_{i+1}} - (M_s)_{t_i}}{\Delta t} = \frac{\Delta[(M_s)+(M_i)]}{\Delta t} - k_2 \frac{(M_s)_{t_{i+1}} + (M_s)_{t_i}}{2} \qquad (6\text{-}7)$$

où $\Delta[(M_S) + (M_i)]$ est la différence de concentration en métal dans les mousses entre t_i et t_{i+1}.

A partir de l'équation (6-7), $(M_S)_{ti+1}$ peut être exprimé en fonction de $(M_S)_{ti}$:

$$(M_s)_{t_{i+1}} = \left[\frac{1}{\frac{1}{\Delta t} + \frac{k_2}{2}}\right] \cdot \left[\left(\frac{1}{\Delta t} - \frac{k_2}{2}\right) \cdot (M_s)_{t_i} + \left(\frac{\Delta[(M_s)+(M_i)]}{\Delta t}\right)\right] \qquad (6\text{-}8)$$

Le modèle est basé exclusivement sur l'emploi de mousses transplantées. Ainsi, les concentrations en métal dans les échantillons collectés sur un site de référence peuvent être considérées comme négligeables:

$(M_S)_{ti} = 0$ pour i = 0 (6-9)

A partir des équations précédentes, la concentration moyenne en métal dans l'eau $\left(\overline{M_d}\right)$, exprimée en µg L^{-1}, peut être maintenant calculée:

$$\left(\overline{M_d}\right) = \left[\frac{\frac{(M_s)_{t_{i+1}} - (M_s)_{t_i}}{\Delta t} + (k_{-1} + k_2)\frac{(M_s)_{t_{i+1}} + (M_s)_{t_i}}{2}}{k_1}\right] \qquad (6\text{-}10)$$

VI-2-2 DETERMINATION DES CONSTANTES DE CINETIQUE

Expérience de laboratoire

Un lot de l'espèce *Rhynchostegium riparioides* est collecté sur un site de référence. Après avoir été préparées selon le protocole déjà décrit, les mousses sont placées dans quatre unités expérimentales. Celles-ci sont contaminées en continu pendant 168 heures par une solution de cuivre aux concentrations de 40, 80, 160 et 320 µg L^{-1}. La phase d'exposition au cuivre est suivie d'une phase de relargage qui dure 240 heures. Le protocole expérimental est similaire à celui déjà

développé pour les expériences sur la température, la vitesse du courant et la localisation cellulaire. Plus de détails sont disponibles ailleurs (Claveri *et al.*, 1994).

Principe de calcul des constantes k_1,, k_{-1} et k_2

En théorie, l'évolution du niveau de contamination en métal dans les mousses, noté (M_S) + (M_i), pendant les phases d'exposition et de relargage peut être décrite par les cinétiques présentées à la figure 6-1.

La constante d'adsorption, k_1, peut être estimée au début de la phase d'exposition au métal (t_0), lorsque les phénomènes de désorption et d'absorption peuvent être considérés comme négligeables. Les équations (6-4) et (6-5) peuvent alors être simplifiées:

$$k_1 = \left[\frac{1}{\overline{M_d}} \cdot \frac{\Delta[(M_s)+(M_i)]}{\Delta t} \right] \tag{6-11}$$

où (M_d) représente la concentration moyenne en métal dissous biodisponible dans l'eau entre t_0 et t_i, $\Delta(M_S)+(M_i)$, la variation des concentrations en métaux dans les mousses entre t_0 et t_i,.

La constante de désorption, k_{-1}, peut être estimée en considérant l'évolution des concentrations métalliques dans les mousses au début de la phase de relargage, entre t'_0 et t'_i (Figure 6-1). En se basant sur les équations (6-4) et (6-5), k_{-1} peut être calculé à partir de l'équation suivante:

$$k_{-1} = \frac{k_1(\overline{M_d}) - \left[\frac{\Delta[(M_s)+(M_i)]}{t'_i - t'_0} \right]}{\left(\overline{M_s}\right)} \tag{6-12}$$

où $\left(\overline{M_d}\right)$ représente la concentration moyenne de la fraction biodisponible du métal dissous présent dans l'eau entre t'_0 et t'_i ; (M_S), la concentration moyenne en métal qui reste adsorbée sur les structures surfaciques de la paroi cellulaire entre t'_0 et t'_i et $\Delta[(M_S)+(M_i)]$, la variation de concentration en métal déterminée dans les mousses entre t'_0 et t'_i .

(M_S) peut être estimée à partir des concentrations en métal observées dans les mousses, $(M_S)+(M_i)$. En effet, la concentration en métal adsorbée, (M_S), à t'_0 est par définition inférieure à la concentration totale en métal déterminée dans les mousses, $(M_S)+(M_i)$:

$$\left(M_s\right)_{t'_0} < \left[\left(M_s\right)+\left(M_i\right)\right]_{t'_0} \tag{6-13}$$

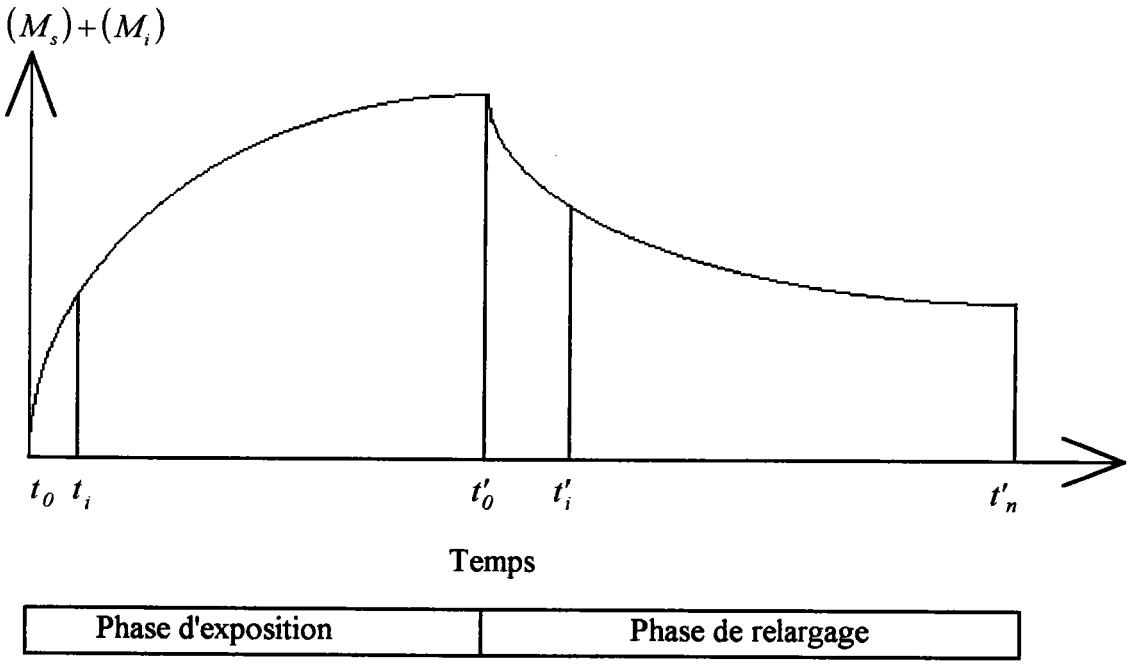


Figure 6-1: Evolution thérorique des concentrations en métaux dans les mousses lors d'une phase d'exposition au métal suivi d'une phase de relargage.

En outre, la phase adsorbée dans la paroi cellulaire (M_S) est considérée, selon les hypothèses du modèle comme la seule réversible. La totalité du métal relarguée à l'issue de la phase de relargage peut alors être considérée comme appartenant à la fraction adsorbée. On peut alors établir:

$$(M_s)_{t'_0} > \left[(M_s)+(M_i)\right]_{t'_0} - \left[(M_s)+(M_i)\right]_{t'_n} \qquad (6\text{-}14)$$

En procédant de la même manière pour $(M_S)_{t'_1}$, on obtient une fourchette de valeurs possibles pour $\left(\overline{M_s}\right)$:

$$\left[(M_s)+(M_i)\right]_{t'_1} - \left[(M_s)+(M_i)\right]_{t'_n} < \left(\overline{M_s}\right) < \left[(M_s)+(M_i)\right]_{t'_0} \qquad (6\text{-}15)$$

Les valeurs limites de $\left(\overline{M_s}\right)$, introduites dans l'équation (6-12), permettent de déduire une gamme de valeurs pour k_{-1}. La constante k_1 étant connue et les bornes de k_{-1} étant définies, la valeur probable de k_{-1} et k_{-2} peut être obtenue en comparant les concentrations moyennes en métal dans l'eau calculées et observées. Les valeurs de k_{-1} et k_2 retenues sont celles pour lesquelles la somme des carrés des écarts entre les concentrations calculées et observées est minimale.

Calcul des constantes cinétiques

Les principales caractéristiques physiques et chimiques du milieu d'exposition sont résumées dans le tableau 6-1.

Les concentrations moyennes en Cu dans les quatre unités expérimentales durant la phase d'exposition sont de 42, 82, 178 et 340 µg L^{-1}. Les variations temporelles des concentrations d'exposition sont inférieures à 5 %. Des 4 concentrations d'exposition résultent 4 cinétiques d'accumulation du cuivre par les mousses (Figure 6-2). Après l'arrêt de l'apport de métal, les concentrations en Cu dans les unités expérimentales diminuent pour atteindre, en 3 heures, le niveau de concentration de l'eau de distribution. La concentration moyenne en cuivre dans le milieu durant la phase de relargage est de 3 ± 2 µg L^{-1}. De la phase de relargage résulte 4 cinétiques (Figure 6-3).

Les trois constantes cinétiques k_1, k_{-1} et k_2 sont calculées pour chacune des 4 cinétiques d'accumulation et de relargage. Comme il n'y a pas de corrélation significative entre les concentrations d'exposition en Cu et les 3 constantes, ces dernières peuvent être moyennées (Tableau 6-2).

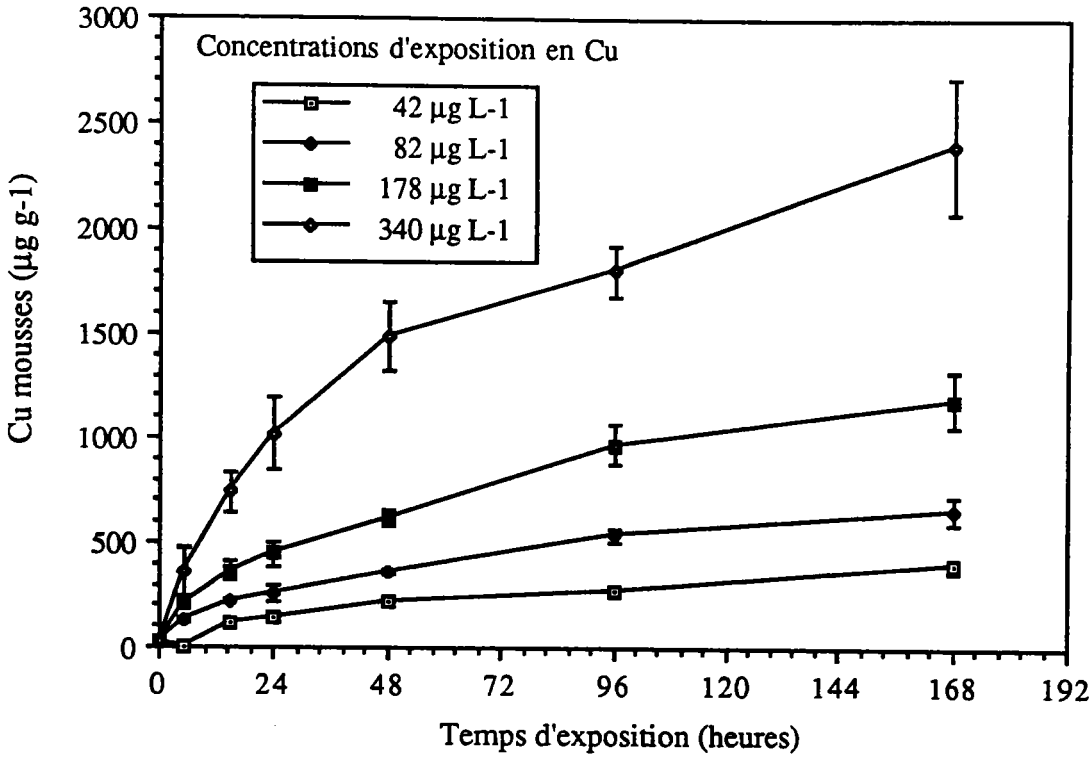


Figure 6-2: Cinétiques d'accumulation du Cu par *Rhynchostegium riparioides* selon la concentration d'exposition.. Les barres verticales représentent l'écart-type (n = 3).

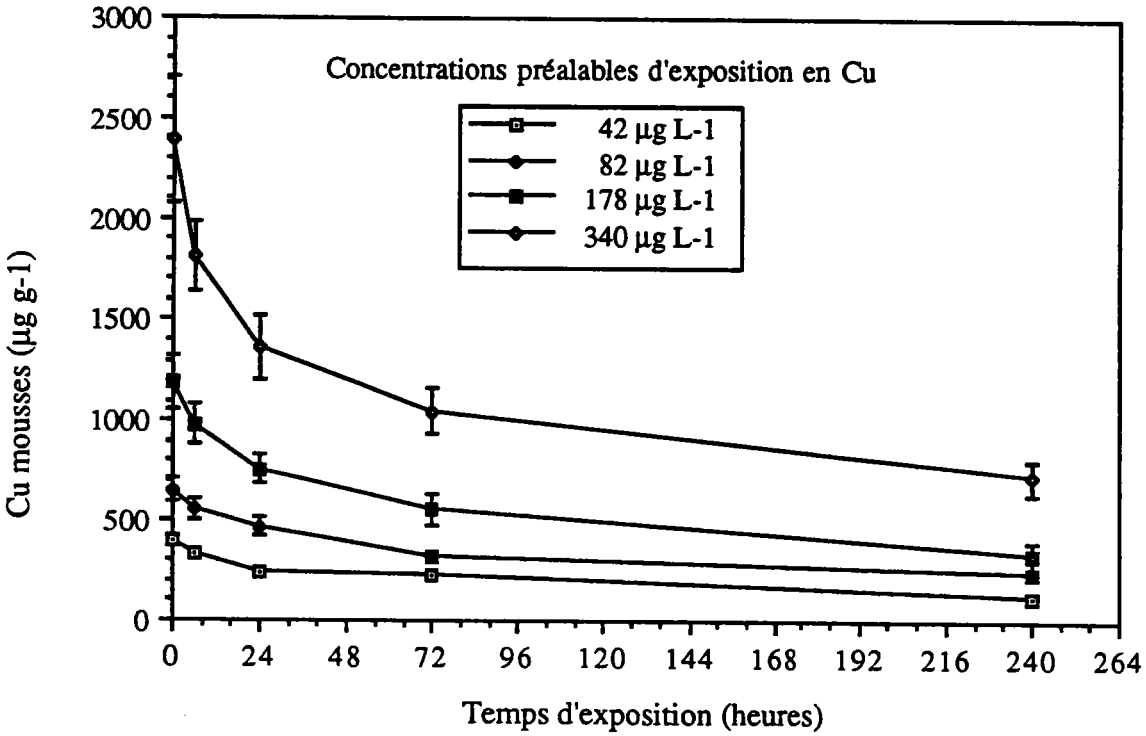


Figure 6-3: Cinétiques de relargage du Cu par *Rhynchostegium riparioides* selon la concentration préalble d'exposition. Les barres verticales représentent l'écart-type (n = 3).

Tableau 6-1: Principales caractéristiques physico-chimiques du milieu d'exposition

Paramètres	Unité	Moyenne	Ecart-type	n
pH		7.8	1.0	66
Température	° C	10.7	0.6	66
Ca	$mg\ L^{-1}$	105	29	54
Mg	$mg\ L^{-1}$	11	1	54
Na	$mg\ L^{-1}$	5	1	54
K	$mg\ L^{-1}$	1	1	54
NO_3	$mg\ L^{-1}$	27	1	54
SO_4	$mg\ L^{-1}$	41	3	54
Cl	$mg\ L^{-1}$	22	1	54
HCO_3	$mg\ L^{-1}$	275	4	54

Tableau 6-2: Valeurs des constantes cinétiques pour chacune des 4 cinétiques d'accumulation. Corrélation (r) entre les concentrations d'exposition en cuivre durant la phase d'exposition et les valeurs des constantes cinétiques

Constantes	Unité	Concentration d'exposition en Cu ($\mu g\ L^{-1}$)				r	Moyenne
		42	82	178	340		
k_1	$l\ g^{-1}\ h^{-1}$	0.200	0.250	0.220	0.210	-0.21	0.220
k_{-1}	h^{-1}	0.045	0.046	0.062	0.059	0.21	0.053
k_2	h^{-1}	0.009	0.010	0.008	0.008	-0.59	0.009

VI-3 DEVELOPPEMENT D'UN MODULE EXPERIMENTAL

VI-3-1 INTRODUCTION

La méthode des transferts, utilisée essentiellement en l'absence d'échantillons autochtones, présente l'avantage de pouvoir comparer des résultats obtenus sur un lot homogène d'une même espèce selon un même protocole. Elle fournit une évaluation de la contamination métallique récente, excluant par exemple les artefacts liés à la persistance d'une fraction métallique résiduelle dont l'origine serait une contamination du milieu antérieure à l'étude.

L'application du protocole de lavage (chapitre II-6-1) avant le transfert des échantillons sur les stations d'étude permet aussi d'extraire une bonne partie des matières exogènes, sources d'erreur, et de vérifier la qualité du matériel biologique.

Cependant, l'utilisation de cette méthode n'est pas sans inconvénient. Le principal problème rencontré par les utilisateurs de cette méthode est l'effet négatif des MES, qui, en s'incrustant entre les mailles des paniers de mousse, sont à la fois responsables d'un effet abrasif sur les feuilles et d'un colmatage progressif des paniers, réduisant alors le contact entre le milieu et la mousse. Lewis (1973a et b) a révélé l'importance de ce paramètre dans la répartition de l'espèce *Rhynchostegium riparioides* le long d'un cours d'eau et de son effet sur la reproduction et le développement de la plante.

D'un point de vue analytique, l'incrustation des MES dans la plante pose aussi des problèmes lors de la détermination des concentrations métalliques qui peut être entachée d'erreur lorsque le pourcentage de résidu, critère de propreté de l'organisme (Mouvet, 1986), est trop élevé (Figure 2-4, chapitre II). Afin de remédier à ce problème, il est alors conseillé de surveiller l'état de propreté des paniers durant l'expérience et d'assurer un lavage rigoureux, conseil difficile à suivre *in situ* car il nécessite plusieurs interventions (au lieu de 2, au début et à la fin de l'exposition). Par ailleurs, un lavage trop vigoureux peut conduire à une détérioration du matériel biologique. La détermination du pourcentage de résidu sur des échantillons de mousses transférés lors d'une expérience où était prise en compte la vitesse du courant montre que, lorsque ces deux paramètres sont mis en relation, le risque d'erreur lié aux résidus est d'autant plus grand que la vitesse du courant de la station où sont collectées les mousses est importante (Figure 6-4). Si l'on considère en plus les résultats obtenus au chapitre IV relatif à l'influence de la vitesse du courant sur l'accumulation des métaux par les mousses, il apparaît que ces deux facteurs, la charge en MES et la vitesse du courant, ont un effet perturbateur important.

Ces deux facteurs ont guidé la conception d'un module expérimental, dont l'objectif principal est de permettre des conditions d'immersion homogène d'une station à l'autre mais aussi d'offrir un support à des interventions plus complexes sur la physico-chimie de l'eau (ex: régulation de la température) si le besoin s'en fait ressentir. La conception de ce dispositif s'inscrit dans un contexte particulier, celui d'une utilisation prévue sur les sites de production nucléaires d'EDF. Ceux-ci se caractérisent en effet par une grande amplitude des variables telles que la température de l'eau, la charge en MES et la vitesse du courant aux stations d'études généralement suivies (amont et aval des rejets, rejets, stations internes à la centrale).

VI-3-2 PRINCIPE

Il s'agit de développer un système pouvant être utilisé *in situ* et permettant de placer les mousses dans un environnement où certains paramètres influençant de façon significative les cinétiques d'accumulation pourront être, sinon maîtrisés, au moins mesurés. Le système doit ainsi permettre d'obtenir que certaines des conditions d'exposition des mousses soient reproductibles d'un site à l'autre.

L'objectif premier du système est d'obtenir des conditions hydrodynamiques stables et d'éliminer autant que possible les matières en suspension. Le dispositif est constitué de deux parties principales. La première d'entre elles est constituée d'un décanteur facilitant la précipitation des matières en suspension. Le décanteur est alimenté en eau de façon continue par l'intermédiaire d'une pompe dont le débit peut être régulé. La seconde partie, placée à l'aval du décanteur, est formée d'un bac d'immersion des mousses dans lequel le milieu d'exposition, préalablement décanté, est introduit par surverse pour être repris ensuite par une pompe centrifuge d'homogénéisation selon le même principe que celui développé en laboratoire.

VI-3-3 CARACTERISTIQUES TECHNIQUES

L'alimentation en eau

L'eau est prélevée dans le milieu (cours d'eau, rejet industriel) par une crépine raccordée par un tuyau à une pompe péristaltique à galet dont le débit peut être ajusté entre 0 et 5 l min^{-1}. Cette pompe placée dans un compartiment étanche sous le décanteur (Figure 6-5) alimente le décanteur en continu au débit fixé.

Le décanteur

Le décanteur est composé de deux parties, le système de décantation proprement dit et, en amont, un compartiment réceptionnant l'apport de milieu. Les deux sont séparés par une paroi ouverte en fond de bac permettant l'alimentation en eau par le fond et empêchant les turbulences provoquées par l'arrivée de l'eau ce qui gênerait l'efficacité de la décantation (Figure 6-5). Le principe du décanteur est basé sur les dispositifs d'élimination des matières en suspension utilisés dans les stations de traitement de l'eau.

Les particules en suspension dans le milieu liquide, soumises à deux forces, la force gravitaire et la force liée à la viscosité de l'eau, décantent à une vitesse V_S. Dans un décanteur, où les particules ne sont pas au repos, seules peuvent décanter les particules dont la vitesse de

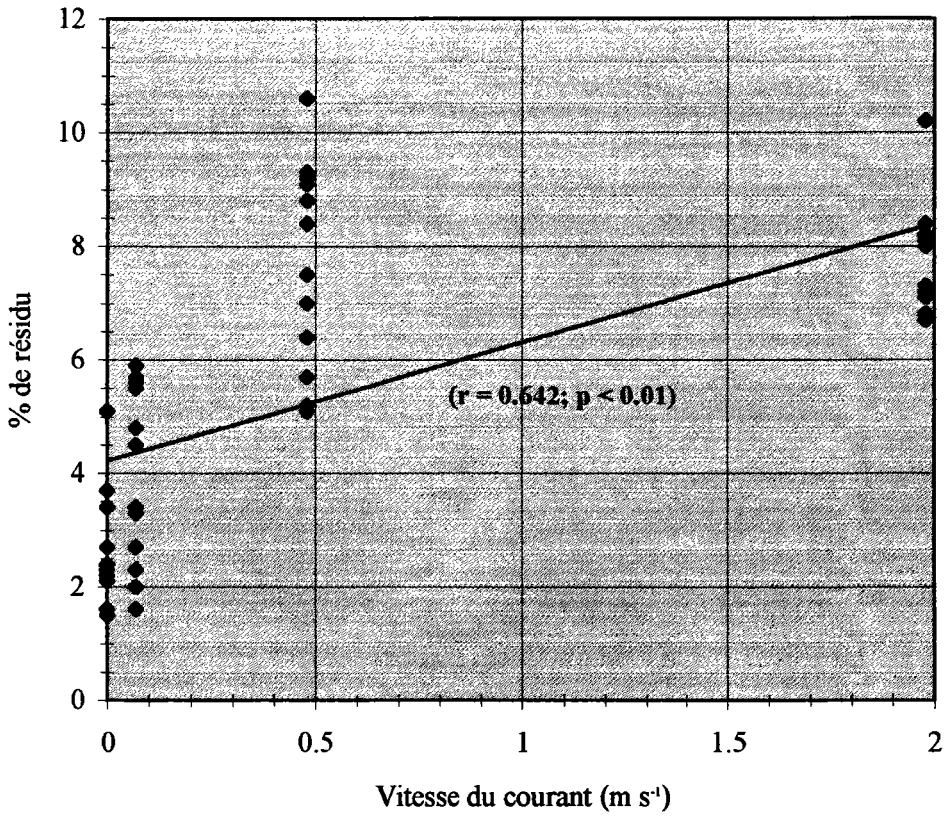


Figure 6-4: Pourcentage de résidu en fonction de la vitesse du courant des stations dans lesquelles les mousses ont été transplantées pendant 9 jours.

sédimentation (V_S) est supérieure à la composante verticale de la vitesse ascensionnelle de l'eau (V_a). Cette dernière peut être calculée selon l'équation (6-16):

$$V_a = Q / S \qquad (6\text{-}16)$$

avec V_a, la vitesse ascensionnelle de l'eau en m h^{-1}, Q, le débit d'eau en m^3 s^{-1} et S, la surface solide en contact avec l'eau (m^2). Lors du dimensionnement d'un décanteur, V_a est généralement fixée à une valeur n'excédant pas 2 m h^{-1}, valeur maximale nécessaire pour obtenir un rendement de décantation d'au moins 50 %. Les restrictions de surface au sol et les gros débits à traiter dans une station d'épuration ont motivé la conception de décanteurs lamellaires, principe dont est inspiré le décanteur du module expérimental. Il s'agit dans un espace défini, pour une valeur de V_a et un débit fixé, d'augmenter le rendement de décantation par l'augmentation de la surface de contact. Celle-ci est obtenue par l'ajout de lames dans le décanteur. Inclinées selon un angle α. Les lames ainsi introduites permettent à la fois d'augmenter la surface de décantation et de faciliter le glissement par gravité des agrégats de matières en suspension vers le fond du décanteur. La composante de la vitesse ascensionnelle de l'eau devient alors:

$$V_a = Q / S \times \cos(\alpha) \qquad (6\text{-}17)$$

Six lames ont été introduites dans le décanteur et inclinées selon un angle α de 45°. La surface de contact des lames avec le milieu qui est de 0.52 m^2 ce qui permet en théorie d'appliquer un débit de 2 l min^{-1} pour une valeur de V_a de 2 m h^{-1} et d'obtenir un abattement de 50 % des M.E.S.

Le bac d'immersion

L'eau décantée se déverse, par gravité, dans le bac d'immersion des mousses par l'intermédiaire d'un réservoir placé en fond de bac. Une pompe centrifuge (6 l min^{-1}) assure la circulation et l'homogénéisation du milieu en prélevant dans le réservoir et en redistribuant l'eau par une crépine couvrant le fond du bac. Un panier de maille 5 x 5 mm en forme de cube est entièrement immergé dans le bac assurant ainsi une immersion complète et permanente des mousses (Figure 6-5).

L'alimentation électrique

Elle est assurée par un branchement sur le secteur (220 V), les stations EDF se situant souvent à proximité d'une source électrique.

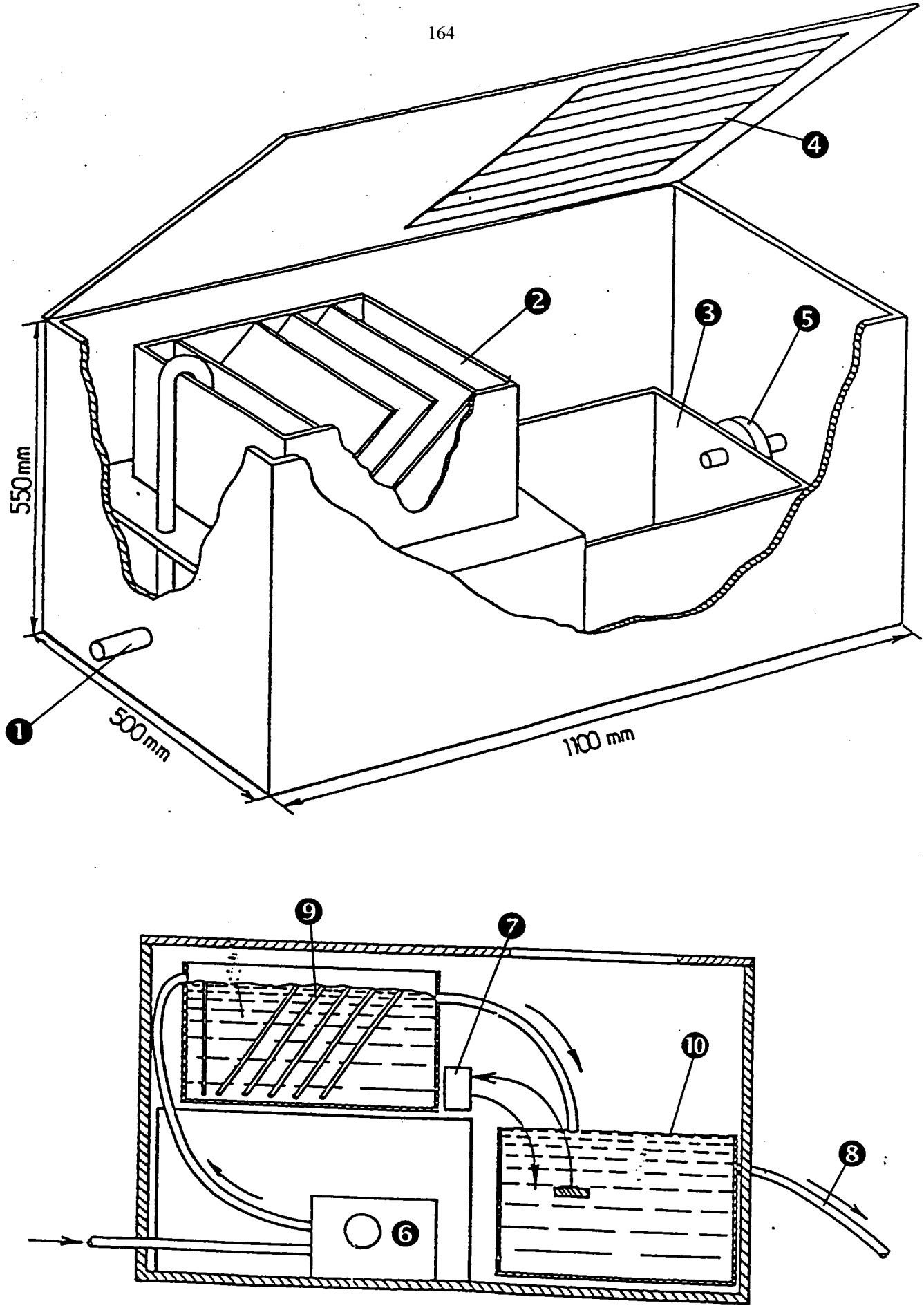


Figure 6-5: Schéma du module expérimental. ❶: arrivée d'eau; ❷:décanteur lamellaire; ❸: bac d'immersion; ❹:fenêtre; ❺: débitmètre; ❻: pompe péristaltique; ❼: pompe centrifuge d'homogénéisation; ❽: trop-plein; ❾: lames; ❿: grillage.

Néanmoins, deux possibilités ont été envisagées pour que le module puisse fonctionner indépendamment d'une source de 220V. La première consiste à utiliser un circuit 12 V, alimenté par 4 batteries de 6 V mises en parallèle deux à deux. Une expérience sur le terrain, dont les résultats ne sont pas détaillés dans ce document, a permis de tester le dispositif. Les 4 batteries peuvent être rangées dans le coffre de protection sous le décanteur en même temps qu'une pompe fonctionnant sur 12 V. En comptant sur une capacité de 520 A h^{-1} (donnée constructeur) et en tenant compte d'une décharge n'excédant pas 80 %, l'autonomie espérée lors de cette expérience était de 700 heures maximum (consommation de la pompe utilisée 0.5 A h^{-1}). On peut néanmoins estimer l'autonomie du module en fonctionnement continu à 10 jours, pour des températures extérieures inférieures 15°C et pour une consommation inférieure à 1 A h^{-1}.

La seconde option, qui n'a pas été développée, est de fonctionner sur 220 V à partir de batteries de 6 V, et ce, grâce à l'emploi d'un convertisseur de courant. Cependant, outre les problèmes de sécurité liés à l'utilisation d'un voltage élevé, l'autonomie se trouve largement amputée par ce système et chute à moins de 4 jours. Celle-ci pourrait être néanmoins compensée à l'aide de deux modules photovoltaïques (50 W-3 A pour 1 kW m^{-2}, donnée constructeur), et en utilisant les pompes de manière discontinue afin de favoriser la recharge des batteries.

Le coffre de protection

L'ensemble des constituants du module, à l'exception du tuyau de prélèvement et de la crépine, est installé dans un coffre de protection fermant à clé dont le dimensionnement (Long.x larg. x Haut. = 1100 x 500 x 500 mm) permet le transport par une seule personne (Figure 6-6). Le coffre est divisé en deux parties, la première, étanche, située sous le décanteur, permet le rangement du matériel électrique. Une fenêtre en plexiglass à la verticale du bac d'immersion permet le passage d'une partie de la lumière solaire. Deux fenêtres latérales grillagées assurent l'aération du coffre.

VI-4 EVALUATION DE LA CONTRIBUTION DE REJETS INDUSTRIELS

VI-4-1 INTRODUCTION

Les centres de production nucléaire (CPN) sont soumis à un suivi et à une réglementation très stricte de leurs rejets radioactifs. Par contre, l'importance des rejets métalliques et leur impact sur le niveau de contamination des cours d'eau utilisés pour le refroidissement des centrales est moins connu. Le département Environnement de EDF-DER a développé un programme visant à une meilleure évaluation de la contamination métallique au droit des CPN.

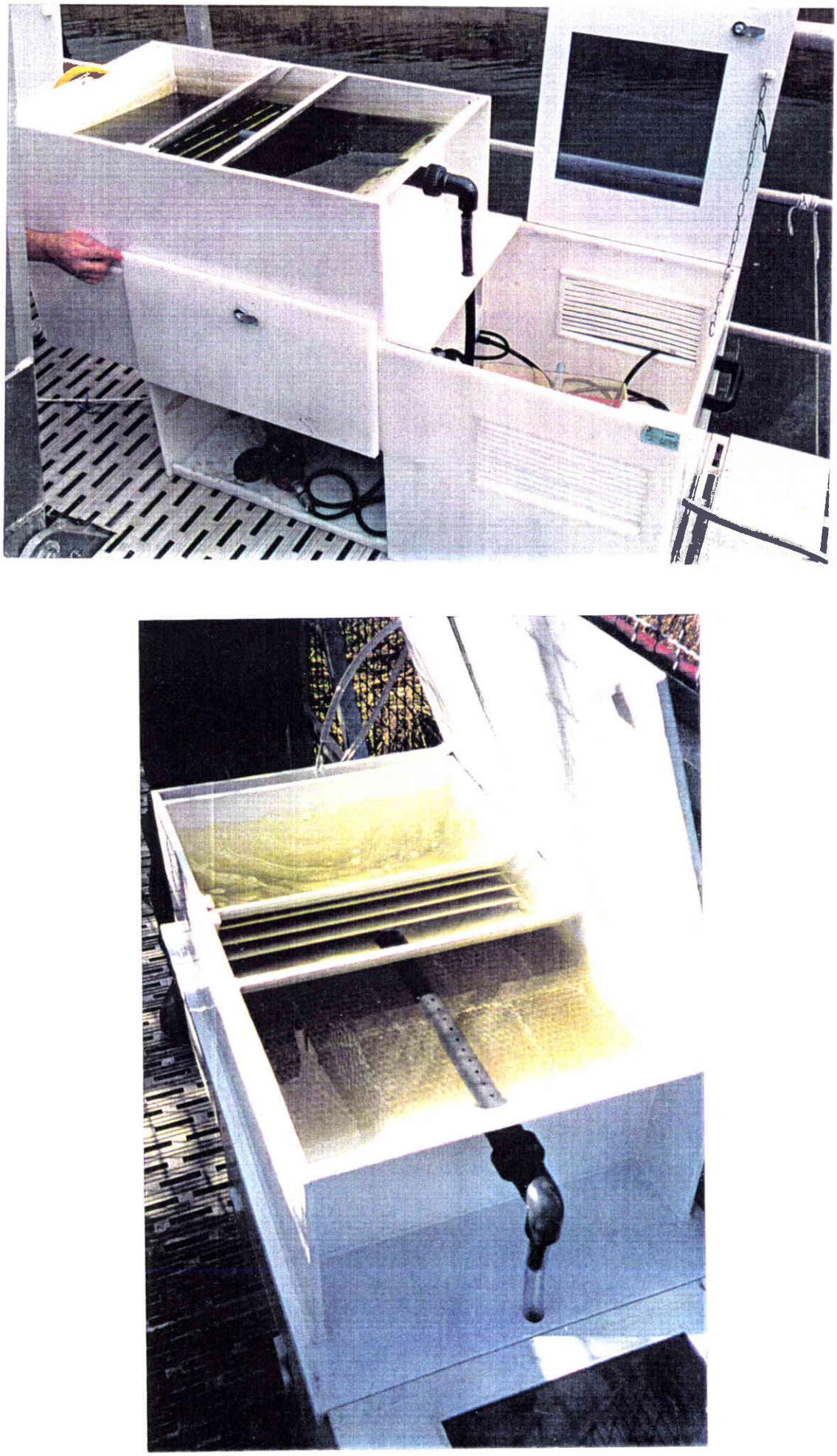


Figure 6-6: Module expérimental. Vue d'ensemble et détail du nouveau décanteur (version 1995) constitué de lames et d'une structure en nid d'abeille.

Dans le cadre de ce programme, le CREUM a été associé trois fois lors des campagnes des CPN de Cattenom (Mai 1993), de Dampierre (Juillet 1993) et Nogent-sur-Seine (Novembre 1993). L'objectif est de quantifier l'apport métallique des rejets d'eaux échauffées provenant du circuit de refroidissement des centrales et d'évaluer leur impact sur le niveau de contamination des cours d'eau dans lesquels les eaux échauffées sont rejetées.

Pour atteindre cet objectif, 3 méthodes d'évaluation ont été utilisées:
- l'analyse des concentrations en métaux dans l'eau;
- l'analyse des concentrations en métaux dans des mousses transplantées;
- l'estimation mathématique des teneurs en métaux dans l'eau à l'aide du modèle mathématique.

L'utilisation de ces 3 méthodes en parallèle a également d'autres buts. La connaissance des concentrations métalliques dans l'eau doit permettre de vérifier la pertinence de l'information fournie par l'analyse des mousses et par le calcul mathématique des concentrations d'exposition. Ces trois campagnes sont également l'occasion de tester le module expérimental mis au point précédemment tant au niveau de son fonctionnement qu'au niveau des informations qu'il est susceptible d'apporter. Les tests ont été effectués exclusivement dans les rejets en parallèle avec les autres méthodes. Il est en effet indispensable de pouvoir comparer l'information fournie par un nouveau dispositif à l'information donnée par des méthodes classiques.

VI-4-2 PROTOCOLE EXPERIMENTAL

Sites et stations d'étude

Les trois sites sont le CPN de Cattenom sur la Moselle, le CPN de Dampierre sur la Loire et le CPN de Nogent sur la Seine. Pour chacun des trois sites, trois stations sont sélectionnées, la station amont au niveau de la prise d'eau de la centrale, une station aval installée à une distance suffisante du rejet afin de garantir le mélange des eaux échauffées avec le milieu récepteur, et une station située dans l'ouvrage de rejet de la centrale. La durée de chaque campagne est de 10 jours sauf à Dampierre où elle est de 9 jours. Dans le cadre du programme associant EDF-DER au CREUM, seuls les résultats concernant les rejets sont développés dans ce chapitre.

Suivi des concentrations métalliques dans l'eau

Sur chacune des stations sélectionnées, un préleveur automatique permet par une fréquence d'échantillonnage de 2 heures d'obtenir des échantillons moyens sur 24 heures. Le

dosage des métaux avant et après filtration à 0.45 µm (acétate de cellulose, Sartorius) permet la détermination des teneurs en métal total et dissous sur un échantillon moyen de 24 heures.

Suivi des concentrations métalliques dans les mousses

Sur chacune des trois centres de production nucléaire sont implantées, dans des paniers maillés, des mousses aquatiques de l'espèce *Rhynchostegium riparioides* collectées pour les trois campagnes sur le site de Commercy (Meuse). Un échantillon provenant de Commercy est conservé au laboratoire en début d'expérience afin de déterminer les concentrations en métaux avant exposition. Les échantillons de mousses dans les rejets sont collectés:
- pour Cattenom après 72, 168 et 240 heures;
- pour Dampierre après 72, 168 et 216 heures;
- pour Nogent après 72, 168 et 240 heures.

Conditions d'utilisation du module expérimental

Pour chaque campagne, environ 80 g frais de mousse sont introduits dans le bac d'immersion. Les échantillons sont collectés:
- pour Cattenom après 24, 48, 96, 168 et 240 heures;
- pour Dampierre après 24, 48, 72, 96, 168 et 216 heures;
- pour Nogent après 24, 48, 72, 96, 168 et 240 heures.

Un préleveur automatique dont la crépine de prélèvement est placée dans le bac d'immersion permet un échantillonnage journalier de l'eau selon une fréquence identique à celle appliquée pour les autres stations.

Le débit d'amenée d'eau dans le décanteur est fixé à 0.5 l min^{-1}.

Suivi de la physico-chimie du milieu

Le pH, la conductivité, l'oxygène dissous, la température ainsi que les anions et cations majeurs sont suivis quotidiennement aux trois stations ainsi que dans le module expérimental.

Suivi des concentrations en métaux dans les matières en suspension

Les matières en suspension ont été collectées dans les rejets de façon ponctuelle par centrifugation de l'eau pendant 8 heures. Celles-ci ont été également récoltées en fin d'expérience dans le décanteur du module expérimental.

Statistiques

Les différences de valeurs pour ce qui concerne les paramètres physico-chimiques et les concentrations métalliques d'exposition observées entre le module et le rejet sont mises en évidence par le test *t* de Student.

VI-4-3 RESULTATS

Physico-chimie des rejets

Les trois rejets étudiés ont fait l'objet d'un suivi physico-chimique dont les principaux résultats sont donnés dans le tableau 6-3.

Tableau 6-3: Principales caractéristiques physico-chimiques (Moyenne ± écart-type; n = 10) des eaux de rejet de Cattenom, Dampierre et Nogent

Paramètres	Unité	CATTENOM		DAMPIERRE		NOGENT	
		Moyenne	Ecart	Moyenne	Ecart	Moyenne	Ecart
pH		8.0	0.1	8.5	0.2	8.3	0.1
Température	° C	21.2	0.8	24.2	1.1	18.7	2.2
$O_{2\ dissous}$	mg L^{-1}	8.1	0.4	8.3	0.4	10.5	0.8
Conductivité	µS cm^{-1}	2350	84	288	23	618	17
Ca	mg L^{-1}	250	14	36	2	136	5
Mg	mg L^{-1}	23	1	7	1	6	0
Na	mg L^{-1}	198	6	18	1	7	2
K	mg L^{-1}	12	1	5	1	3	0
NO_3	mg L^{-1}	20	7	1	0	3	0
SO_4	mg L^{-1}	151	6	24	5	112	22
Cl	mg L^{-1}	561	65	20	1	-	-
CO_3	mg L^{-1}	-	-	14	7	-	-
HCO_3	mg L^{-1}	371	10	211	21	258	20

Les paramètres physiques, à savoir le pH, la température, l'oxygène dissous et la conductivité, se caractérisent d'abord par une relative stabilité dans le temps au regard des coefficients de variation qui n'excèdent pas 12 %. Le pH moyen d'exposition s'avère similaire

entre les trois sites, variant de 8.0 à 8.5. Les différences de température moyenne entre les rejets sont à l'image des périodes où ont été effectuées les expériences, en début d'été pour les premières, en automne dans le cas de Nogent. La composition des rejets se distingue par contre par leur conductivité qui varient d'un facteur 8 entre les eaux les moins minéralisées de Dampierre et les plus minéralisées de Cattenom. Cette dernière est particulièrement chargée en anions et cations. Le phénomène de concentration provoqué par l'évaporation d'une partie des eaux de refroidissement lors de leur passage dans les aéroréfrigérants n'est pas la seule explication à cette forte minéralisation. Son origine peut être aussi attribué à la contribution de rejets salins en amont de la centrale.

Concentrations en métal total et dissous dans les rejets

Les trois rejets présentent des concentrations moyennes en Cu et Zn, sous leur forme dissoute et totale, très contrastées (Tableau 6-4).

Tableau 6-4: Concentrations d'exposition (moyenne ± écart-type) en métal total et dissous ($\mu g\ L^{-1}$, n = 10) dans les trois rejets (*Minimum / Maximum*)

Paramètres	Cattenom	Dampierre	Nogent
Cu_{total}	22 ± 4	132 ± 14	427 ± 137
	(*15 / 30*)	(*110 / 160*)	(*270 / 715*)
$Cu_{dissous}$	13 ± 3	55 ± 4	280 ± 54
	(*9 / 19*)	(*50 / 60*)	(*190 / 350*)
Zn_{total}	87 ± 13	59 ± 7	137 ± 56
	(*67 / 105*)	(*50 / 70*)	(*85 / 260*)
$Zn_{dissous}$	36 ± 5	11 ± 2	85 ± 12
	(*29 / 44*)	(*<10 / 15*)	(*70 / 100*)

Par exemple, le rejet de Nogent est 21 fois plus contaminé en Cu dissous que le rejet de Cattenom. Des trois rejets étudiés, le site de Dampierre présente le niveau de contamination le plus stable, sachant que sur les deux autres sites, les variations en métal dissous ne dépassent pas 20 %. La répartition des métaux sous leur forme dissoute et particulaire est différente selon le site et selon le métal. Le calcul du coefficient de partage (Cp) entre les formes particulaire et dissoute montrent la prépondérance de la fraction dissoute du cuivre à Cattenom (Cp = 0.7) et Nogent (Cp = 0.5) et celle du zinc à Nogent (Cp = 0.6). Seul le site de Dampierre présente une répartition des

métaux en faveur de la fraction particulaire avec un coefficient de partage de 1.4 et 4.4 pour Cu et Zn respectivement.

Concentrations en métaux dans les mousses aquatiques transplantées

Exposées à trois milieux dont les teneurs moyennes en métaux sont différentes, les mousses accumulent selon trois cinétiques proportionnelles aux niveaux de contamination observés (Tableau 6-5).

Tableau 6-5: Concentrations en Cu et Zn dans les mousses transplantées (µg g^{-1} p.s.) pendant 240 heures dans les rejets des 3 centrales

Paramètres	Temps d'exposition	Cattenom	Dampierre	Nogent
Cuivre	0	9*	11*	33*
	72	85*	383*	7100*
	168	114*	555*	8800*
	240 (a)	186*	705*	10500*
Zinc	0	58*	51*	253*
	72	219*	163*	1700*
	168	295*	228*	1750*
	240 (a)	505*	242*	1900*

(a): la durée d'exposition des mousses à Dampierre est de 216 heures

Les concentrations initiales en métaux dans des mousses pourtant prélevées au même endroit (site de référence de Commercy) illustrent une nouvelle fois l'influence probable de la saison sur les concentrations dans les végétaux. En se reportant au calendrier des expériences, on note en effet que, de concentrations faibles en Cu et Zn observées dans les échantillons collectés en avril (Expérience de Cattenom) et juillet (Expérience de Dampierre), on passe à des teneurs de référence 3 fois (Cu) et 4 fois (Zn) plus élevées en novembre (Expérience de Nogent). L'exposition des mousses pendant seulement 10 jours semble suffisante pour que soit atteint un plateau d'équilibre, qui, cependant, est toujours difficile à identifier *in situ*. On note cependant que ce plateau ne semble pas atteint à Cattenom alors que c'est le site qui présente les eaux les moins contaminées, tant en cuivre qu'en zinc. Les teneurs moyennes en métaux sont différentes sur les trois sites et permettent de mettre en évidence la corrélation positive entre les quantités de

métal accumulées par les mousses après 10 jours et les teneurs en Cu total (r = 0.975), en Cu dissous (r = 0.994), en Zn total (r = 0.977) et en Zn dissous (r = 0.982).

Concentrations en métaux dans les matières en suspension centrifugées

Lors des trois expériences, des séries de centrifugation de l'eau des rejets, d'une durée variant de 8 à 12 heures, ont permis de récolter des quantités conséquentes de MES, permettant la détermination des teneurs en Cu et Zn. Parallèlement aux centrifugations, les teneurs en MES et leur pourcentage de matières organiques ont été suivies ponctuellement par des prélèvements ponctuels journaliers. Le tableau 6-6 présente les teneurs moyennes en MES ainsi que la part des matières organiques. Les pourcentages de matières organiques contenues dans les MES sont différents selon le rejet et sont respectivement de 85, 55 et 27 % pour Cattenom, Dampierre et Nogent.

Les concentrations métalliques déterminées dans les MES centrifugées sont le reflet de la contamination de la fraction non filtrée (fraction particulaire) des échantillons d'eau. Les concentrations en cuivre particulaire (obtenues par soustraction du métal dissous au métal total) sont respectivement de 11, 77 et 147 $\mu g\ L^{-1}$ à Cattenom, Dampierre et Nogent. On retrouve ce même ordre, du moins au plus contaminé, lorsque le métal est dosé dans les MES centrifugées (Tableau 6-6).

Tableau 6-6: Teneurs métalliques des matières en suspension (M.E.S.) échantillonnées dans les 3 rejets

Paramètres	Unité	Cattenom	Dampierre	Nogent
M.E.S.	$mg\ L^{-1}$	13.4 ± 2.9	36.4 ± 7.2	21.0 ± 10.2
Matières organiques	$mg\ L^{-1}$	11.5 ± 2.4	20.1 ± 5.5	5.6 ± 1.4
Cu	$\mu g\ g^{-1}$	523	1750	3700
Zn	$\mu g\ g^{-1}$	1500	1277	1300

La contribution de la fraction particulaire de zinc à la concentration totale en métal dans l'eau est similaire dans les trois rejets, environ 50 $\mu g\ L^{-1}$. Là aussi, le dosage du zinc dans les MES reflète le même phénomène puisque les teneurs en zinc ne varient que de 1277 à 1500 $\mu g g^{-1}$.

VI-4-4 INFORMATIONS OBTENUES PAR L'INTERMEDIAIRE DU MODULE EXPERIMENTAL

Conditions d'utilisation du module

Lors des trois campagnes, la proximité d'une source électrique 220 V nous a permis d'éviter les problèmes liés à l'autonomie énergétique du dispositif et d'utiliser une pompe péristaltique garantissant un débit dont les fluctuations dans le temps n'ont pas excédé 5 % du débit nominal. L'utilisation du système dans des eaux dépourvues de débris grossiers et faiblement chargées en matières organiques et la présence d'une double crépine à la prise d'eau a permis d'éviter le colmatage des tuyauteries et raccords. Cependant la charge croissante de MES décantée peut favoriser l'apparition d'un film bactérien ou algal, ainsi que la formation de floc pouvant freiner la circulation de l'eau. Si ce cas n'a pas été observé lors de ces trois campagnes, une précédente étude visant essentiellement à tester le module avait révélé que ce genre de problème pouvait survenir lorsque l'eau est prélevée dans un milieu riche en débris organiques.

La bonne circulation de l'eau dans le dispositif a été particulièrement surveillée afin de garantir un milieu homogène dans le bac d'immersion. La circulation de l'eau a été suivie une première fois en laboratoire sur l'ensemble du dispositif par l'adjonction d'un traceur coloré. Elle a été également suivie ponctuellement à deux reprises *in situ*. 20 ml d'eau ont été prélevés en cours d'expérience en différents points du bac d'immersion à l'aide d'une seringue. L'analyse des teneurs en métaux dans les échantillons ainsi collectés révèle une disparité des concentrations en métal total n'excédant pas respectivement 8 et 10 % pour le cuivre et le zinc.

Conditions d'exposition des mousses

Le suivi des conditions physico-chimiques dans le module (Tableau 6-7) permet de vérifier si le pompage de l'eau et le temps de séjour de l'eau dans le dispositif modifient ces conditions par rapport à celles du rejet (Tableau 6-3). Le passage de l'eau dans le module n'affecte ni le pH, ni la conductivité sur les 3 sites d'études ($p > 0.05$). Par contre, on observe un déficit en oxygène à Cattenom et Dampierre ($p < 0.01$) probablement provoqué par le séjour de l'eau dans le décanteur. La faible augmentation de la température de l'eau à Dampierre ($p < 0.01$) n'a pas d'incidence sur les cinétiques d'accumulation d'après les résultats exposés au chapitre III. Cette augmentation de la température de l'eau dans le bac d'immersion s'explique aisément par l'époque de l'année (Juillet) et l'implantation du module, en plein soleil, alors qu'il était protégé dans les deux autres sites.

Tableau 6-7: Principales caractéristiques physico-chimiques des eaux de rejet de Cattenom, Dampierre et Nogent échantillonnées dans le bac d'immersion (n = 10).

Paramètres	Unité	CATTENOM		DAMPIERRE		NOGENT	
		Moyenne	Ecart	Moyenne	Ecart	Moyenne	Ecart
pH		7.9	0.1	8.5	0.2	8.3	0.1
Température	° C	21.5	1.1	26.5	1.3	17.1	2.8
$O_{2\ dissous}$	mg L^{-1}	6.7	0.5	7.0	0.3	10.3	0.8
Conductivité	µS cm^{-1}	2316	75	289	10	609	22
Ca	mg L^{-1}	277	9	-		-	
Mg	mg L^{-1}	26	1	-		-	
Na	mg L^{-1}	179	8	-		-	
K	mg L^{-1}	12	1	-		-	
NO_3	mg L^{-1}	20	7	-		-	
SO_4	mg L^{-1}	151	6	-		-	
Cl	mg L^{-1}	599	19	-		-	
CO_3	mg L^{-1}	-	-	-		-	
HCO_3	mg L^{-1}	371	10	-		-	

Rendement de décantation

Le rendement du décanteur a été déterminé de façon ponctuelle lors des 3 expériences sur site (Tableau 6-8).

Tableau 6-8: Pourcentage d'abattement des matières en suspension dans le décanteur du module expérimental (en %).

Site	Temps d'exposition (heures)						
	0	48	96	120	168	192	216
Cattenom	64	64	55	70	46	61	-
Dampierre	-	41	36	-	47	-	-
Nogent	-	30	27	-	-	-	28

Excepté à Cattenom, le pourcentage d'abattement des MES n'a pas été jugé suffisamment important car non conforme au calcul effectué. Un nouveau système de décantation, basé sur le même principe que le premier, est en cours de réalisation (figure 6-6). Il diffère du premier simplement par l'ajout d'une structure en nid d'abeille qui devrait faciliter la décantation des particules les plus fines.

Concentrations en métaux dans l'eau

A la différence des eaux de rejet, le milieu d'exposition des mousses dans le module a subi préalablement une décantation. Cette étape, qui a pu avoir des conséquences à la fois sur les concentrations d'exposition et la répartition du métal sous ses formes particulaires et dissoutes, a justifié le suivi des concentrations en Cu et Zn dans le bac d'immersion. Le tableau 6-9 résume les concentrations moyennes en Cu et Zn déterminées dans le module en parallèle avec les teneurs observées dans les rejets.

Tableau 6-9: Différences entre les concentrations moyennes en métal (n =10) déterminées dans les échantillons provenant du module et ceux provenant directement des rejets.

Site		Concentrations en métaux dans l'eau ($\mu g\ L^{-1}$)			
		Cu_{total}	$Cu_{dissous}$	Zn_{total}	$Zn_{dissous}$
Cattenom	Module	20 ± 5	13 ± 3	80 ± 19	43 ± 10
	Rejet	22 ± 2	13 ± 3	87 ± 13	36 ± 5
	Signification	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Dampierre	Module	62 ± 8	40 ± 5	50 ± 13	18 ± 5
	Rejet	132 ± 14	55 ± 4	59 ± 13	11 ± 2
	Signification	*	*	n.s.	*
Nogent	Module	357 ± 89	243 ± 42	102 ± 31	55 ± 20
	Rejet	427 ± 137	280 ± 54	137 ± 56	85 ± 12
	Signification	n.s.	n.s.	n.s.	*

*: $p < 0.01$; n.s. = différence non significative

Cattenom est le seul site où le passage de l'eau de rejet dans le décanteur n'entraîne pas de modification des concentrations métalliques totales et dissoutes dans l'eau. A Dampierre, seule la concentration moyenne d'exposition en Zn total n'est pas significativement différente entre le module et le rejet, le passage de l'eau dans le décanteur entraînant une baisse significative des concentrations en Cu total et dissous ainsi qu'en Zn dissous. A Nogent, la décantation n'a d'effet que sur le Zn dissous. L'influence du système de décantation sur la répartition des métaux entre les formes particulaire et dissoute est montrée sur les figures 6-7 pour le cuivre et 6-8 pour le zinc.

Le passage des eaux de rejet dans le décanteur se traduit toujours par une augmentation de la fraction dissoute, puisque la décantation concerne avant tout les formes particulaires du métal. La décantation entraîne également dans trois cas sur six une modification des teneurs en métal dissous, fraction qui est la plus susceptible d'être accumulée par les mousses.

Concentrations en métaux dans les mousses

Les concentrations dans les mousses immergées dans le module sont déterminées par le CREUM, celles immergées dans les rejets, par l'Institut Pasteur de Lille (IPL).

Les cinétiques d'accumulation du cuivre par les mousses immergées dans le module sont différentes de celles des mousses immergées dans les rejets. Cette différence, observée essentiellement à Cattenom et Nogent, se traduit après 10 jours d'exposition par une quantité de métal accumulée par les mousses du module 2 fois inférieure à celle observée dans les mousses du rejet correspondant (Figure 6-9). Cette différence ne peut cependant pas être attribuée aux concentrations métalliques d'exposition qui sont similaires entre le module et les rejets de ces deux sites (Tableau 6-9). Par contre, à Dampierre, le passage de l'eau dans le décanteur entraîne une modification des conditions d'exposition en cuivre total, 2 fois inférieures dans le module. Les concentrations moyennes d'exposition en cuivre dissous sont également significativement inférieures dans le module. On observe cependant des cinétiques d'accumulation du cuivre équivalentes entre les mousses provenant du module et celles issues du rejet.

Les concentrations en zinc dans les mousses sont également plus élevées dans les échantillons collectés dans les rejets de Cattenom et de Nogent que dans les échantillons provenant du module (Figure 6-10). Si les concentrations en zinc dans l'eau, total et dissous, ne sont pas significativement différentes entre le module et le rejet à Cattenom, les teneurs d'exposition en zinc dissous plus importantes dans le rejet de Nogent que dans le module peuvent expliquer en partie les différentes cinétiques d'accumulation observées sur ce site. La même

raison peut être évoquée pour expliquer les différentes cinétiques d'accumulation du zinc observées entre les mousses issues du rejet de Dampierre et celles provenant du module.

Concentrations en métaux dans les matières en suspension décantées

La circulation de l'eau en continu au travers du décanteur a permis de récolter une quantité suffisante de MES décantée permettant ainsi le dosage du cuivre et du zinc (Tableau 6-10). Les concentrations en métaux dans les MES décantées sont toujours supérieures à celles déterminées dans les MES centrifugées (tableau 6-6), à l'exception du zinc à Dampierre où les concentrations peuvent être considérées comme équivalentes. Les teneurs en cuivre dans les MES décantées donne la même succession que celle observée pour les MES centrifugées, avec , du plus contaminé au moins contaminé : Nogent > Dampierre > Cattenom.

Tableau 6-10: Caractéristiques et teneurs métalliques des matières en suspension (M.E.S.) échantillonnées dans le module après 10 jours de décantation

Paramètres	Unité	Cattenom	Dampierre	Nogent
Cu	$\mu g\ g^{-1}$	720	1950	4100
Zn	$\mu g\ g^{-1}$	2200	1140	3100

VI-4-5 APPLICATION DU MODELE MATHEMATIQUE AUX DONNEES RECUEILLIES

Définition d'une stratégie d'échantillonnage

La fréquence des prélèvements d'échantillons de mousse lors des expériences sur sites avait pour objectif le suivi des cinétiques d'accumulation. Le calcul à partir du modèle de la concentration en cuivre dans l'eau s'effectuant selon un mode pas à pas, les prélèvements de mousse effectués pendant les campagnes de mesure sur les sites nucléaires offrent la possibilité de tester plusieurs stratégies d'échantillonnage.

L'étape préalable à l'utilisation du modèle mathématique est la définition d'une stratégie d'échantillonnage permettant d'obtenir des résultats calculés en accord avec les résultats observés. La définition de cette stratégie d'échantillonnage est basée sur les résultats obtenus sur les mousses transplantées dans les rejets de Cattenom et Dampierre et dont les concentrations en cuivre ont été déterminées par l'IPL. Les fréquences de prélèvement de mousses appliquées lors de ces deux expériences permettent de tester 7 simulations différentes, *i.e.* 7 stratégies

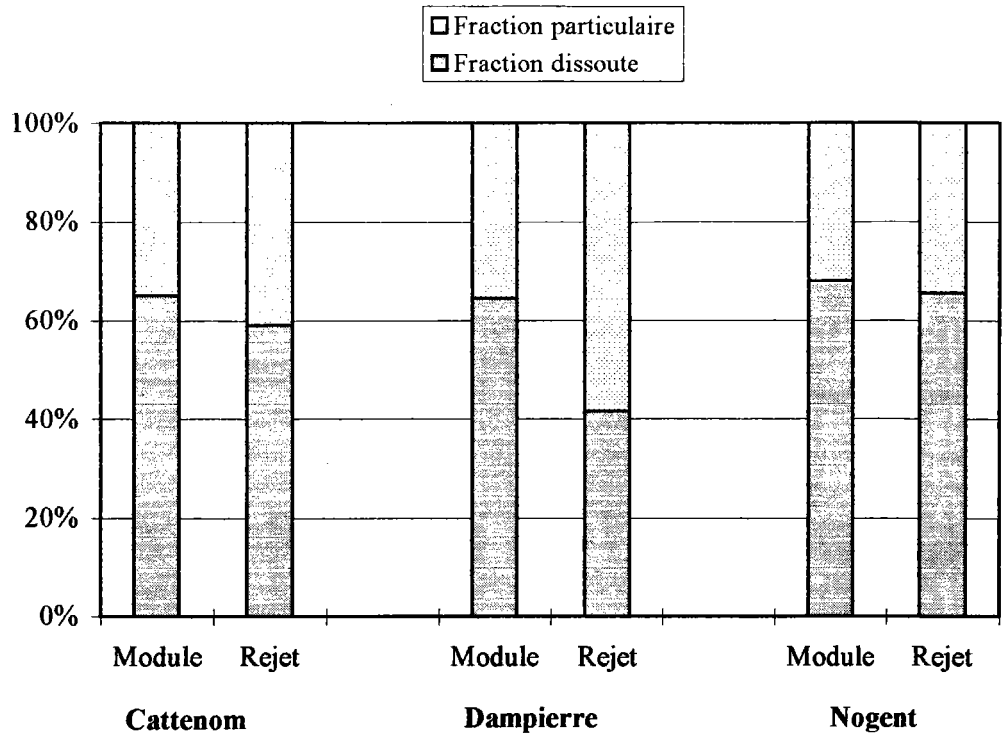


Figure 6-7: Répartition du cuivre entre les formes particulaires et dissoutes dans les rejets de Cattenom, Dampierre et Nogent.

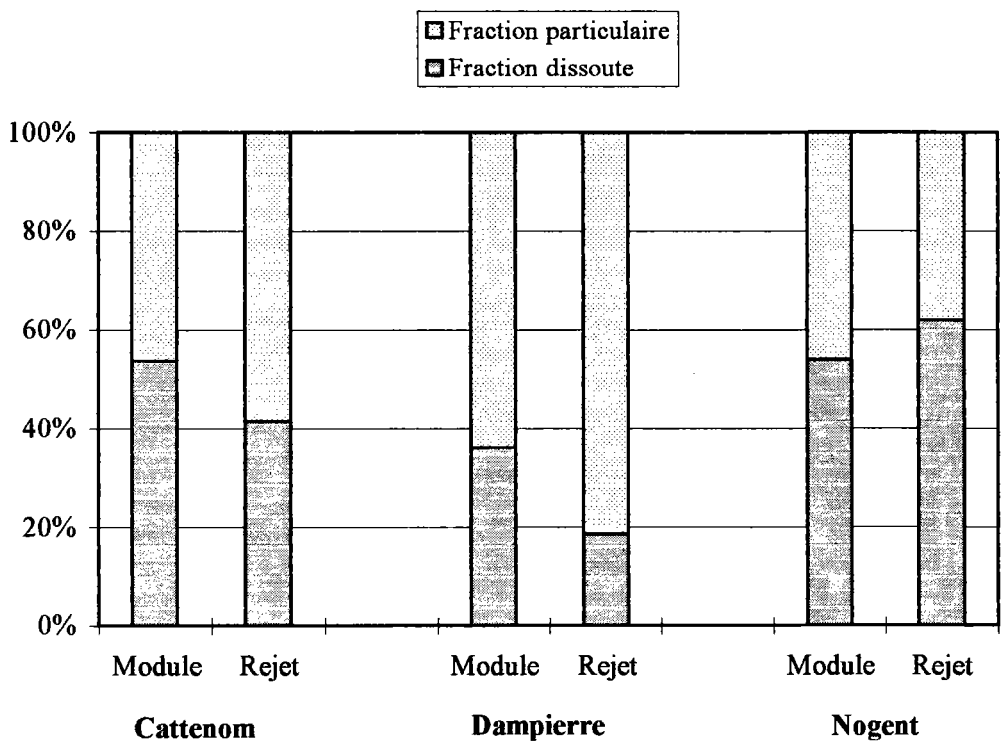


Figure 6-8: Répartition du zinc entre les formes particulaires et dissoutes dans les rejets de Cattenom, Dampierre et Nogent.

d'échantillonnage, auxquelles correspondent pour chacune d'elles une estimation calculée de la concentration en cuivre dans l'eau (Tableau 6-11). La différence entre la valeur calculée et la valeur observée est testée en considérant la première comme une valeur théorique et la seconde comme la valeur observée décrite par sa moyenne et sa distribution (écart-type).

Tableau 6-11: Différences entre les concentrations en Cu dissous observées dans les rejets de Cattenom (11.8 ± 2.7 µg L^{-1}) et de Dampierre (55.0 ± 4.1 µg L^{-1}) et les valeurs correspondantes calculées ($Cu_{calc.}$;µg L^{-1}), obtenues en appliquant les 7 simulations.

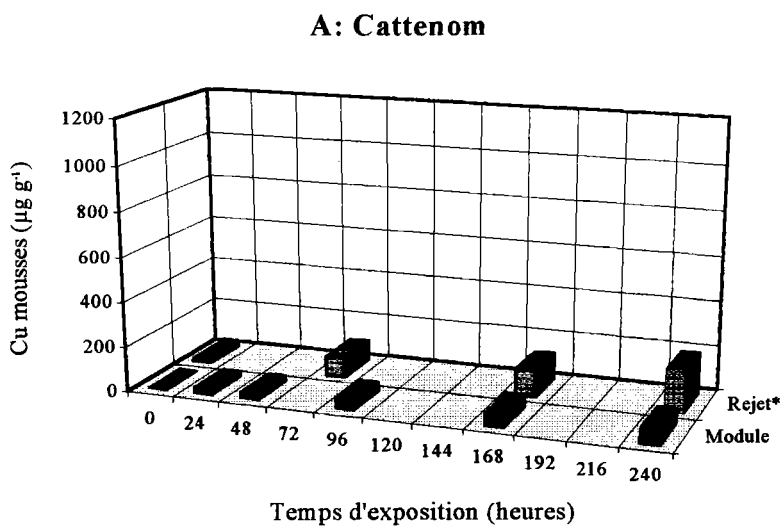
Simulations	Prélèvement utilisé[a]	CATTENOM		DAMPIERRE	
		Cu_{calc}	Signification	Cu_{calc}	Signification
1	240[b]	13.6	n.s.	57.0	n.s.
2	72 - 168 - 240[b]	18.9	**	75.0	**
3	168 - 240[b]	21.9	**	90.4	**
4	72 - 240[b]	17.5	**	74.8	**
5	72 - 168	13.5	n.s.	69.8	**
6	168	10.0	n.s.	52.0	*
7	72	11.7	n.s.	57.3	n.s.

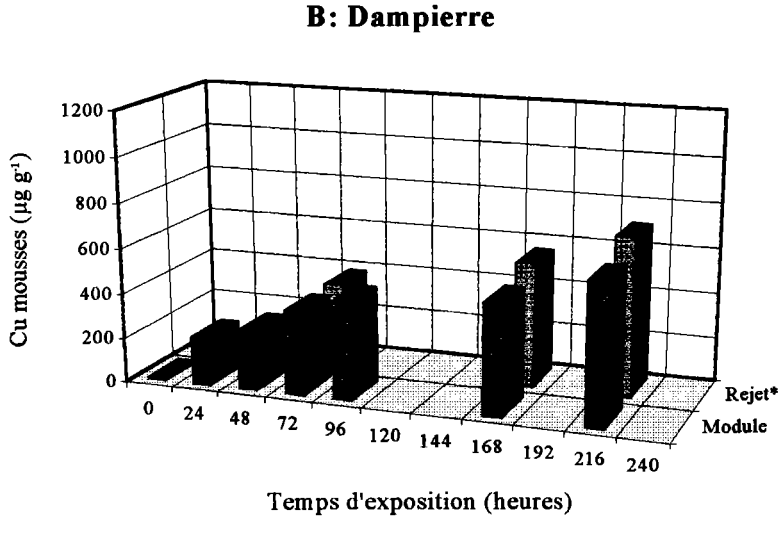
* = $p < 0.01$; n.s. = différence non significative
[a]: L'échantillon témoin collecté à t = 0 est toujours compris dans les calculs
[b]: Dans le cas de Dampierre, le dernier échantillon est collecté après 216 heures au lieu de 240 heures.

Plusieurs simulations (n°1, 5, 6 et 7 pour Cattenom et n°1 et 7 pour Dampierre) fournissent chacune une estimation de la concentration en cuivre dans l'eau qui n'est pas significativement différente des concentrations en cuivre dissous observées. Parmi ces différentes simulations, seule la simulation n°1, comportant deux prélèvements à t = 0 et à t = 240 heures, est la mieux adaptée. En effet, cette stratégie d'échantillonnage ne comprend que deux prélèvements, ce qui dans l'optique d'une utilisation *in situ*, est un avantage. Par ailleurs, le risque d'erreur étant d'autant plus grand que les échantillons sont collectés au début de la phase d'exposition, période durant laquelle les concentrations en cuivre dans les mousses augmentent rapidement avec le temps, une stratégie d'échantillonnage comportant l'échantillon prélevé après 240 heures minimise le risque de ce genre d'erreurs.

Application du modèle mathématique et de la stratégie d'échantillonnage

La stratégie d'échantillonnage étant établie, le modèle peut être appliqué à d'autres données issues des expériences de Nogent et des travaux sur l'influence du régime d'écoulement





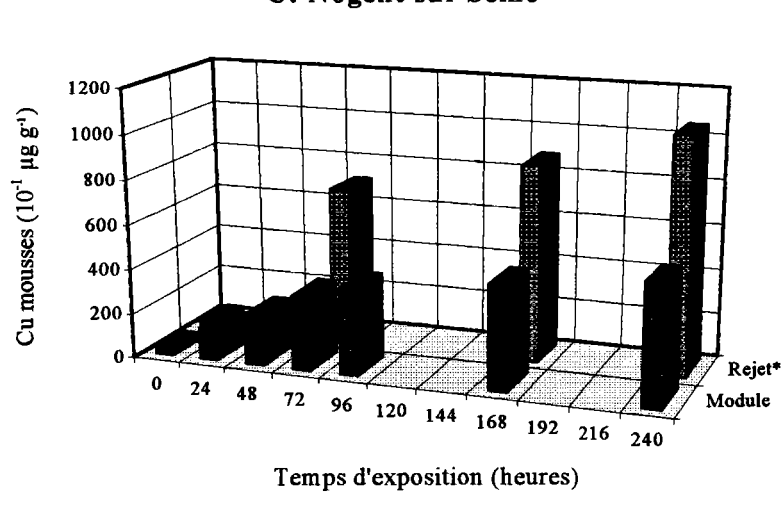
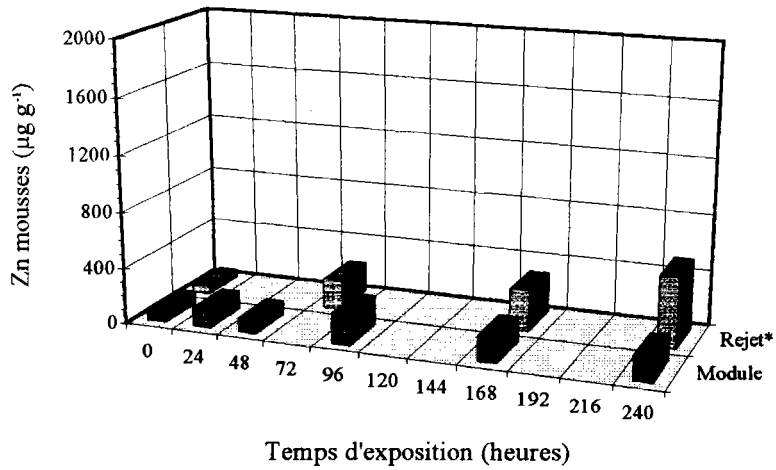
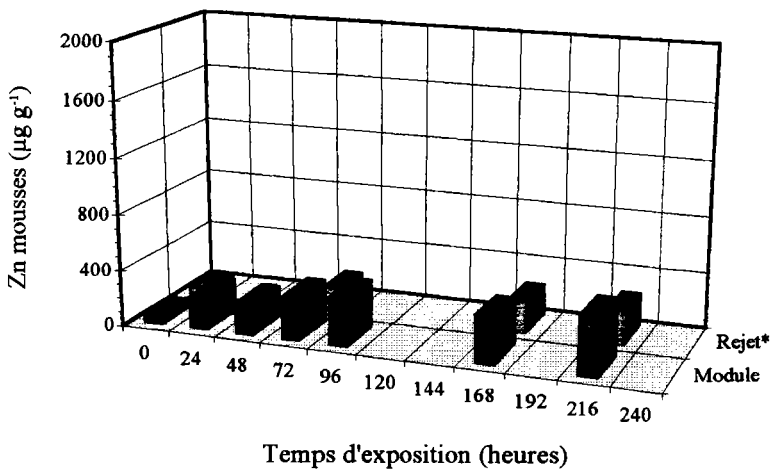


Figure 6-9: Evolution des concentrations en Cu dans les mousses immergées dans le module et les rejets.

A: Cattenom



B: Dampierre



C: Nogent sur Seine

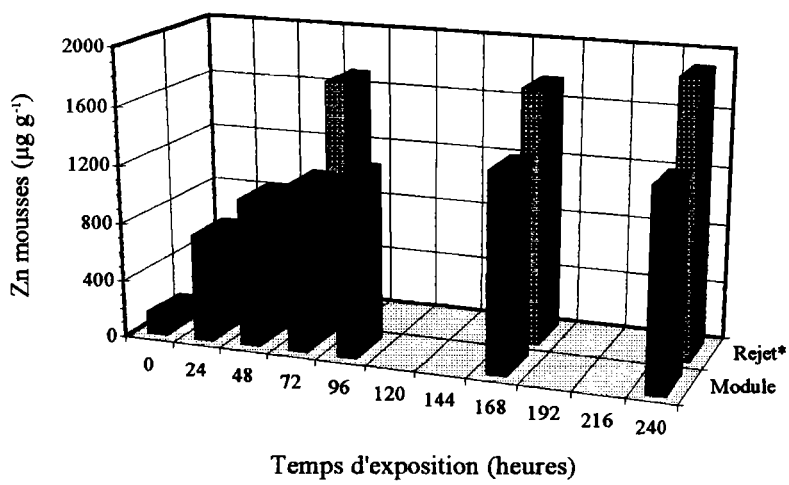


Figure 6-10: Evolution des concentrations en Zn dans les mousses immergées dans le module et les rejets.

en laboratoire (Chapitre IV-2) et *in situ* (Chapitre IV-3). L'application du modèle aux données obtenues sur le site de Nogent est loin de fournir une estimation aussi représentative de la contamination en cuivre du rejet que les résultats obtenus dans les deux autres sites (Tableau 6-12).

Tableau 6-12: Application à différentes expériences de la stratégie d'échantillonnage choisie pour le calcul des concentrations en Cu dissous dans l'eau ($\mu g\ L^{-1}$).

Expérience	Variables de calcul			$Cu_{calc.}$ ($\mu g\ L^{-1}$)	$Cu_{obs.}$ ($\mu g\ L^{-1}$)	Signification
	Cu à t_0 ($\mu g\ g^{-1}$)	Cu à t_1 ($\mu g\ g^{-1}$)	t_1 (heures)			
Cattenom rejet	9	186	240	14	13 ± 3	n.s.
Dampierre rejet	11	705	216	57	55 ± 4	n.s.
Nogent rejet	33	10500	240	804	280 ± 54	*
Cattenom module	7	70	240	6	13 ± 3	*
Dampierre module	10	626	216	51	40 ± 5	*
Nogent module	27	5401	240	413	243 ± 42	*
ANDLAU (St. 2)	26	852	480	39	25 ± 13	*
ANDLAU (St. 4)	26	1243	480	58	25 ± 18	*
Chapitre IV-2 (Bac A)	9	356	216	28	40 ± 2	*
Chapitre IV-2 (Bac B)	9	564	216	45	37 ± 1	*
Chapitre IV-2 (Bac C)	9	947	216	77	37 ± 1	*

* : $p < 0.01$; n.s. : différence non significative

Alors que le modèle fournit une estimation de la concentration en cuivre présente dans l'eau proche des teneurs en cuivre dissous observées à Cattenom et Dampierre, la concentration estimée par le modèle à Nogent est 3 fois supérieure à la concentration réellement observée.

L'application du modèle aux données issues du module n'est satisfaisante que dans le cas de Dampierre, la concentration en cuivre étant sous-estimée à Cattenom et surestimée à Nogent. Dans ce dernier cas, on remarque cependant que l'écart entre la concentration calculée et la teneur observée en cuivre dissous n'est plus que d'un facteur 1.7.

Le modèle est également appliqué aux résultats fournis par l'expérience exposée au chapitre IV. Pour ce qui concerne l'expérience de laboratoire, l'estimation la plus fiable est donnée en considérant les résultats obtenus dans le bac alimenté par un débit de 0.5 L min^{-1} (temps de renouvellement de 35 minutes), résultat qui n'a rien de surprenant puisque ce débit correspond à celui employé lors de l'expérience de calibration du modèle. Plus intéressant sont les résultats fournis par l'expérience de terrain (chapitre IV-3). Ceux-ci montrent que l'on obtient une estimation de la contamination en cuivre plus proche de la teneur en cuivre dissous observée en prenant en considération les données obtenues dans les mousses immergées dans la station où le courant est le plus faible (station 2). L'effet de la vitesse du courant sur l'accumulation du cuivre par les mousses entraîne par contre une surestimation de la concentration en métal dissous par le modèle (station 4).

VI-5 DISCUSSION

Les bryophytes aquatiques et les matières en suspension comme traceurs complémentaires de la pollution par les métaux

Les trois sites d'études offrent à la fois des conditions physico-chimiques et des teneurs métalliques d'exposition contrastées. Dans un premier temps, ces conditions différentes permettent de montrer la fiabilité de la réponse des mousses aquatiques qui accumulent d'autant plus le métal que le milieu est contaminé. Les quantités de métal accumulées par les bryophytes implantées dans les rejets donnent en effet une représentation du niveau de contamination en adéquation avec les résultats fournis par la détermination des concentrations métalliques dans l'eau. Dans le même temps, la détermination des concentrations métalliques dans les matières en suspension centrifugées révèle que ce support analytique donne une image de la contamination représentative de la fraction particulaire du métal présent dans l'eau.

Le calcul du facteur de pollution (Concentration en métal observée dans le support analytique / concentration de référence) permet d'exprimer la gravité de la contamination observée sur les 3 sites. Ce calcul permet ensuite de définir le niveau de contamination selon une grille de qualité (tableau 6-13) basée sur la grille proposée par Mouvet (1986) et qui offre l'avantage de réunir en un même outil d'évaluation les deux indicateurs que sont les bryophytes et les sédiments.

En prenant en compte à la fois les résultats obtenus dans les mousses et dans les matières en suspension, on note que le classement des différents sites n'est généralement pas affecté par l'origine des données, le rejet ou le module, et ce, malgré les différences de concentrations observées entre le rejet et le module (Figure 6-11). Il existe cependant deux exceptions. A

Cattenom, les résultats des mousses du module entraînent un déclassement du niveau de contamination en cuivre par rapport à l'estimation que fournissent les mousses du rejet. A Nogent, ce sont les matières en suspension du module, plus fortement chargées en Zn, qui provoquent le déclassement de N2 en N3. Dans tous les cas de figure, la prise en compte des résultats fournis par les matières en suspension entraîne une estimation de la gravité de la contamination toujours plus importante que lorsque l'on considère l'estimation fournie par les mousses. Cette remarque ne signifie pas forcément que les matières en suspension sont un traceur de la contamination plus sensible que les mousses aquatiques mais que ces deux supports fournissent une indication différente et complémentaire sur l'état de contamination du milieu. L'exemple du zinc dans les mousses et les matières en suspension collectées dans les rejets illustre bien leur complémentarité (Figure 6-11). Le facteur de pollution du zinc dans les matières en suspension est similaire sur les trois sites. Ce résultat est sans surprise lorsque l'on considère l'estimation de la fraction du zinc particulaire fournie par le dosage du métal dans l'eau et égale sur les 3 sites à environ 50 µg L^{-1}. Le facteur de pollution du zinc dans les mousses est par contre différent comme le sont les concentrations d'exposition en zinc dissous.

Tableau 6-13: Concentrations de référence (µg g^{-1}) et facteur limites de pollution pour les mousses et le sédiment (Agence de l'Eau).

	Concentrations de référence							Facteurs limites de pollution		
	Cd	Cr	Cu	Hg	Ni	Pb	Zn	N1	N2	N3
Mousses	1	7	19	0.08	20	19	200	< 6	6 à 18	> 18
Sédiments	0.5	25	20	0.1	10	20	75			

Ce résultat montre que les bryophytes aquatiques et les matières en suspension sont deux traceurs différents et complémentaires, le premier, indicateur de la fraction de métal disponible pour la biomasse dont la détermination de la concentration en métal dissous semble être un bon descripteur, le second, indicateur de la contamination de la phase particulaire du métal présent dans l'eau. Cette complémentarité est valorisée lorsque le module expérimental est utilisé. En effet, le fonctionnement en continu du système de décantation offre, par opposition au prélèvement ponctuel par centrifugation, un échantillon de matières en suspension représentatif de la contamination moyenne du milieu durant la période d'exposition. Ainsi, le principe d'une décantation en continu des matières en suspension offre deux avantages. Il donne probablement une image plus fiable de la contamination de la phase particulaire du métal présent dans l'eau et

facilite la détection de rejet intermittent comme les rejets d'effluents radioactifs des centres de production nucléaire.

Utilisation du module expérimental en parallèle avec la méthode des transferts

L'emploi du module expérimental en parallèle avec la méthode des transferts permet aussi de comparer les informations fournies par les deux méthodes et de juger de la représentativité des conditions d'exposition des mousses dans le module et des résultats obtenus par rapport à ce qui a été obtenu lors du suivi des rejets. Les quantités de métal accumulées par les mousses du module sont souvent différentes de celles accumulées par les mousses implantées directement dans les rejets. Ces différences entraînent une estimation de la gravité de la contamination différentes selon que l'on considère les résultats fournis par l'un ou l'autre des lots de mousse. Cependant, la gamme de valeurs des différentes classes N1, N2 et N3 est trop large pour mettre en évidence les différences importantes observées entre les concentrations métalliques accumulées par les mousses du module et celles issues du rejet. Or, si ces différences ne se ressentent pas lorsqu'on applique la grille de qualité, elles risquent de se faire ressentir lors de l'application du modèle mathématique. Les différences les plus importantes à considérer en priorité dans ce chapitre sont celles observées entre les concentrations métalliques, principalement le cuivre, observées dans les mousses du module et celles déterminées dans les échantillons directement collectés dans les rejets. Ces différences peuvent provenir :

- des concentrations d'exposition en métal différentes dans certains cas entre le module et le rejet ;
- des variations analytiques inter-laboratoires incontournables lorsqu'au moins deux laboratoires ont été sollicités pour les analyses ;
- des différences de protocole entre ces laboratoires en amont de la phase analytique ;
- avoir aussi pour origine des conditions d'immersion différentes des mousses provenant du module et celles implantées dans le rejet.

L'hypothèse selon laquelle les différences observées entre les quantités accumulées par les mousses du module et du rejet sont imputables à une différence des concentrations d'exposition dans l'eau a été abandonnée. Cette hypothèse n'est en effet pas valable à Cattenom où aucune différence significative n'a été observée entre les teneurs d'exposition en métal dans le module et le rejet. Pourtant, les concentrations en cuivre dans les mousses après 10 jours d'immersion sont plus de deux fois supérieures dans l'échantillon collecté dans le rejet et analysé par l'IPL que dans celui prélevé dans le module et analysé par le CREUM. Lors de cette première campagne, un lot supplémentaire de mousses a été implanté dans le rejet, prélevé et analysé par le CREUM. La concentration en cuivre dans l'échantillon collecté après 10 jours dans ce lot, de 80 ± 2 $\mu g\ g^{-1}$, est similaire à celle déterminée par le même laboratoire dans les mousses du module. Elle confirme ainsi le facteur 2 existant entre l'estimation des concentrations en cuivre fournie par le

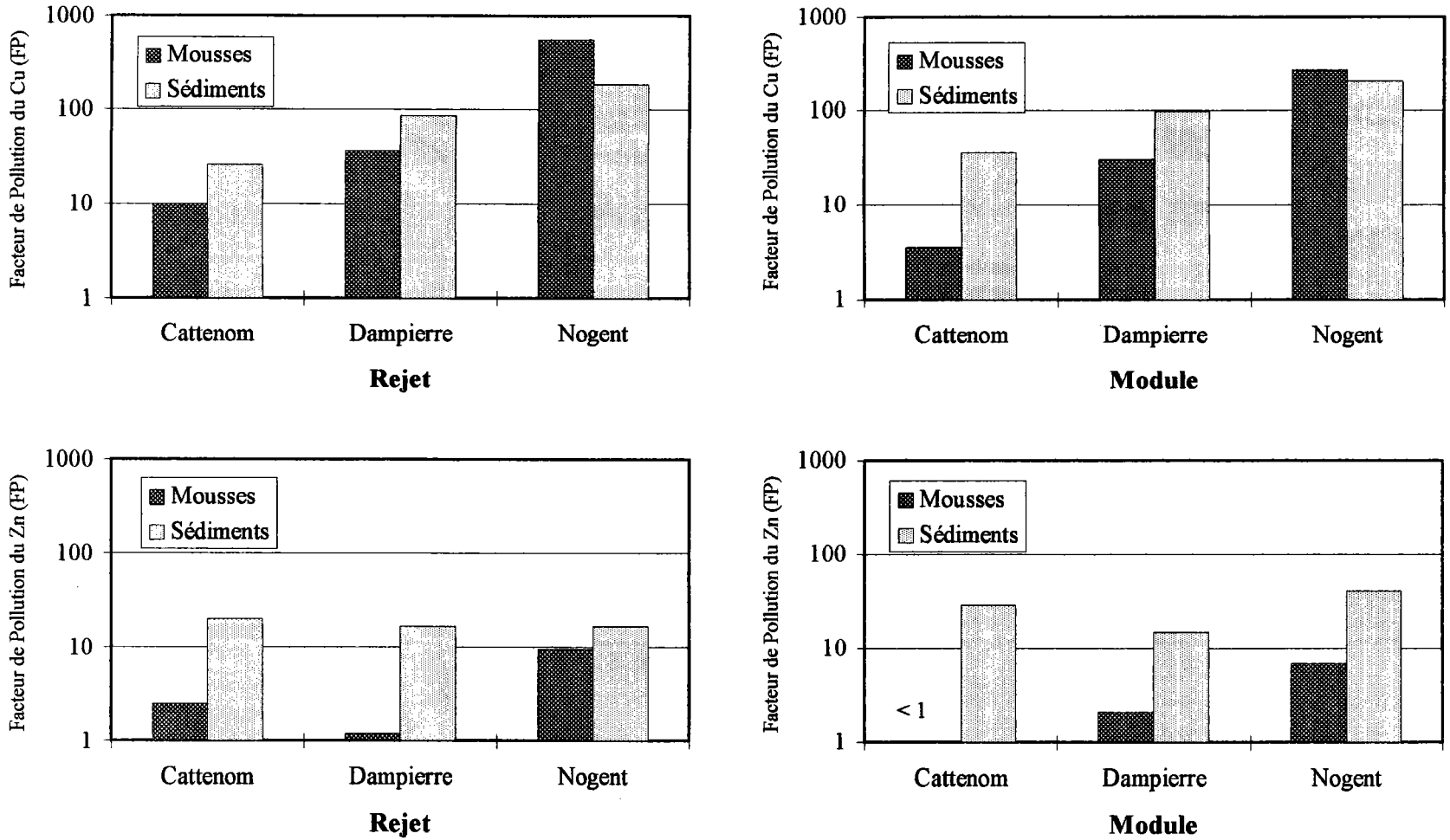


Figure 6-11: Facteurs de pollution (concentration métallique observée dans le support analytique / concentration de référence) calculés pour les mousses et les matières en suspension collectées dans le rejet et le module de chacun des 3 sites d'étude.

CREUM et l'IPL. Cette observation suggère l'existence d'une ou plusieurs sources de divergence dans le protocole analytique de l'un des deux laboratoire chargés des analyses.

Après concertation et comparaison des résultats de dosage en SAA, l'éventualité d'une erreur liée à la détermination des concentrations métalliques dans les minéralisats a été abandonnée. L'étude d'intercalibration comprenant 14 laboratoires (Agence de l'eau, 1994) révèle que la variation interlaboratoire pour le cuivre varie de 17 à 39 % selon le degré de contamination de l'échantillon. Même en gardant à l'esprit que ce pourcentage n'est que la moyenne des sources de variations rencontrées entre 14 laboratoires et qu'il peut être supérieur lorsque seulement deux laboratoires sont pris en compte, il ne suffit pas à expliquer les différences enregistrées. Cette étude montre aussi que l'étape de minéralisation ne contribue pas de facon significative à augmenter la variabilité de la mesure. Par contre, les étapes antérieures à la minéralisation, de l'échantillonnage au lavage de l'échantillon, peuvent être à l'origine d'une part importante de la variabilité. Or, l'une des différences de protocole entre le CREUM et l'IPL porte sur l'une de ces étapes, le lavage en laboratoire qui n'est pas appliqué par l'IPL. Cette différence de protocole peut alors contribuer à l'explication des écarts de concentration observés entre les deux laboratoires. Ainsi, l'application des deux protocoles de lavage sur un même échantillon de mousse permet d'évaluer l'effet du lavage sur les concentrations en cuivre et en zinc (Tableau 6-14).

Tableau 6-14: Concentrations en Cu et Zn dans le même lot de mousses ayant subi différents protocoles de lavage.

	Protocole de lavage		Métal dans les mousses ($\mu g\ g^{-1}$)	
	in situ	au laboratoire	Cuivre	Zinc
IPL	oui	non	6403 ± 197	1601 ± 94
CREUM	oui	oui	5401 ± 135	1356 ± 89

De ce tableau ressort très clairement l'impact du protocole de lavage employé par le CREUM sur les concentrations finales en Cu et Zn dans les mousses aquatiques. Le fait que les concentrations métalliques soient systématiquement inférieures lorsque le protocole du CREUM est appliqué s'explique dans un premier temps par l'extraction plus efficace des corps étrangers, organiques et minéraux, susceptibles, eux aussi d'être contaminés. De plus, le lavage des échantillons par de l'eau déminéralisée sous pression pourrait entraîner une perte de métal appartenant à la fraction intercellulaire. On a en effet remarqué lors des travaux sur les différentes fractions de métal accumulées par les mousses que la fraction intercellulaire pouvait être facilement désorbée par une eau minéralisée à pH 6 (Chapitre V). Cette hypothèse n'a

cependant jamais été vérifiée lors de la mise au point du protocole de lavage. Elle pourrait être néanmoins l'une des principales causes expliquant les différences de résultats entre les deux laboratoires. Suite à ces observations, un nouvel échantillon de mousse a été fourni aux deux laboratoires qui ont alors appliqué le même protocole de lavage. Les concentrations en cuivre dans cet échantillon sont encore différentes selon le laboratoire d'analyse. Cependant, l'écart de concentration n'est plus que de 22 % .

Les résultats obtenus au chapitre IV relatif à l'influence des conditions hydrodynamiques sur les cinétiques d'accumulation des métaux permettent d'évoquer une autre source potentielle de variabilité. A Cattenom et Nogent, les concentrations en cuivre dans les mousses du rejet sont environ 2 fois plus élevées que dans les mousses du module tandis qu'à Dampierre, elles sont similaires, voire plus élevées dans les mousses du module. Or, ce dernier site diffère des deux autres par les conditions d'immersion des mousses dans le rejet. Celui-ci est en effet constitué d'un canal reliant la centrale à la Loire. Le courant y est faible (inférieur à 0.1 m s^{-1}) par rapport au déversoir des rejets de Cattenom et Nogent où le courant peut être estimé supérieur à 1 m s^{-1}. En plus des problèmes analytiques rencontrés, les concentrations supérieures en cuivre observées dans les mousses des rejets de Cattenom et Nogent pourraient être, au moins en partie, attribuées au régime d'écoulement rapide de l'eau. Cette observation signifie également que les conditions d'immersion dans le module, identiques sur les trois sites, sont plutôt caractéristiques d'un régime d'écoulement lent, comme celui observé à Dampierre, seul site où les résultats du module et du rejet sont comparables.

L'étude des concentrations en Zn dans les mousses analysées par les deux laboratoires ne pose pas les mêmes problèmes. En considérant les résultats obtenus à Cattenom, on remarque en effet que les cinétiques d'accumulation du Zn par les deux lots de mousses immergées dans le rejet sont du même ordre de grandeur durant les premières heures d'exposition. Cependant, les concentrations en Zn dans les mousses du rejet deviennent plus importantes après 7 jours que dans les mousses du module. Le même phénomène est observé à Nogent. Les mêmes hypothèses précédemment évoquées pour le cuivre peuvent expliquer les différences de quantités de zinc accumulées par les mousses. Dampierre est une nouvelle fois le seul site où les mousses ont au moins autant accumulé dans le module que dans le rejet. Contrairement au cuivre, les mousses du module ont même accumulé sgnificativement plus de métal que les mousses du rejet. Ce résultat peut apparaître surprenant dans un premier temps si l'on considère que les concentrations déterminées dans les mousses du rejet par l'IPL sont surestimées. Dans ce cas particulier, on remarque que les concentrations d'exposition en zinc dissous sont pratiquement deux fois supérieures dans le module ce qui explique les concentrations supérieures dans les mousses issues du dispositif expérimental.

Les écarts de concentrations métalliques observées entre les mousses issues du module et celles provenant des rejets peuvent avoir plusieurs explications. Cette multiplicité des causes éventuelles ne facilite pas la mise en évidence des effets induits par l'immersion des mousses dans le module. Il est cependant probable que toutes les raisons invoquées précédemment ont induit des erreurs, qui en s'ajoutant, donnent des résultats qui varient dans le pire des cas de plus d'un facteur 2 entre le module et le rejet.

Utilisation du modèle mathématique

L'application du modèle aux diverses données de laboratoire et de terrain montre les limites actuelles de l'utilisation de cet outil. L'influence significative du régime d'écoulement de l'eau sur les cinétiques d'accumulation des métaux par les mousses a probablement des répercussions sur les estimations produites par le modèle qui n'intègre pas ce paramètre. L'application du modèle aux données issues du module devrait permettre de s'en affranchir. Cependant, les résultats obtenus tant avec le module qu'avec le modèle tendent à montrer que ces deux outils sont plutôt représentatifs d'une situation où le régime d'écoulement est lent. Le module fournit en effet une estimation toujours inférieure à la contamination réelle à Cattenom et Nogent, deux sites où le régime d'écoulement de l'eau est lotique. L'application du modèle aux données provenant de l'Andlau donne une estimation proche de la teneur en cuivre dissous uniquement à la station 2, où le régime d'écoulement est lent. Cependant, même si la concentration calculée à la station 2 est la plus proche de la teneur en cuivre dissous réllement observée, elle reste significativement plus élevée. La raison de cette surestimation de la contamination peut être l'environnement physico-chimique rencontré lors de cette étude, très différent des conditions observées lors de l'expérience de calibration. En effet le modèle n'intègre pas les paramètres de spéciation qui vont conditionner la disponibilité du métal pour la mousse. La faible minéralisation de l'Andlau, notamment les faibles teneurs en cations, a pu favoriser l'accumulation des métaux, ceux-ci n'étant pas ou peu en compétition avec les cations pour la fixation sur les sites d'échange de la paroi cellulaire. L'importance de la composition ionique du milieu a été mise en évidence par plusieurs auteurs. Ainsi, Say et Whitton (1983) ont montré que l'accumulation des métaux par *Fontinalis antipyretica* pouvait être corrélée négativement à l'alcalinité totale, paramètre fortement lié à la teneur en Ca dans le milieu. Pickering et Puia (1969) relate l'effet inhibiteur de ce cation sur l'accumulation du zinc par *Fontinalis antipyretica* tandis que Sommer et Winkler (1982) constatent, sur la même espèce, qu'une quantité d'autant plus importante de calcium dans le milieu freine l'effet inhibiteur du cadmium sur la photosynthèse.

Tout en confirmant l'effet du calcium et du magnésium , des expériences de laboratoire et de terrain mettent aussi en évidence une réduction significative de la disponibilité du métal pour les mousses causée par l'augmentation des teneurs en matières organiques dans le milieu (Wehr et

Whitton, 1983a ; Wehr *et al*, 1987). Ce paramètre pourrait avoir joué un rôle important lors des études menées sur les trois rejets. En effet, le pourcentage de matières organiques contenues dans les matières en suspension est respectivement de 85, 55 et 27 % pour Cattenom, Dampierre et Nogent. Or, c'est à Nogent que les mousses ont le plus accumulé. La raison principale est la teneur d'exposition élevée en cuivre dans le milieu. Mais les faibles teneurs en matières organiques observées à Nogent comparées aux deux autres sites a pu favoriser une plus grande disponibilité du cuivre pour les mousses.

De ces trois expériences sur sites, il ressort entre autres que la composition ionique et les teneurs en matières organiques sont deux paramètres dont les prochaines études menées par EDF devrait tenir compte. Les résultats permettraient ainsi de mieux cerner leur influence et d'envisager, le cas échéant, leur intégration dans le modèle mathématique.

CHAPITRE VII: Discussion générale

VII-1 SCHEMA DECRIVANT L'ACCUMULATION ET LE RELARGAGE DES METAUX PAR LES BRYOPHYTES AQUATIQUES

VII-1-1 PRESENTATION

La résultante de l'exposition des bryophytes aquatiques à un métal est une cinétique d'accumulation rapide durant les premières heures d'exposition puis qui tend progressivement vers un état d'équilibre. Cette cinétique, facile à observer, n'est cependant que la conséquence de phénomènes complexes d'échanges, de transferts et de stockage du métal qui se produisent entre le milieu et l'organisme. La description de ces phénomènes se restreint le plus souvent à un échange physico-chimique des métaux à l'interface entre le milieu et la paroi cellulaire. Les caractéristiques de cette paroi font que ce phénomène est sans aucun doute le mécanisme principal expliquant la forte capacité des bryophytes à accumuler les métaux. L'examen de la littérature et les résultats des expériences des chapitres précédents permettent de proposer une vision plus détaillée des différents mécanismes entrant en jeu lors de l'accumulation ou du relargage d'un métal même si certains mécanismes restent à confirmer.

Les travaux sur la distinction de différentes fractions métalliques accumulées par les bryophytes détaillés au chapitre V, confortés par les résultats par Brown et Bates (1990) et Bates (1992) ont permis de distinguer trois compartiments. Les deux premiers, l'apoplasme et les sites d'échanges de la paroi, correspondent à la fraction extracellulaire du métal accumulé, principale fraction concernée lors du relargage. Cette fraction, appelée aussi fraction réversible (F_{rev}) regroupe la fraction intercellulaire (F_i) représentant les métaux présents dans l'apoplasme et la fraction échangeable (F_e) représentant les métaux complexés avec les sites d'échanges de la paroi. Le troisième compartiment identifié est le milieu intracellulaire. La fraction métallique ou tout du moins une partie de celle-ci correspondant à une localisation intracellulaire du métal est la fraction F_r.

Les trois compartiments et leurs fractions correspondantes sont représentés figure 7-1. A ces 3 compartiments s'ajoute un quatrième, le milieu d'exposition, caractérisé par la concentration

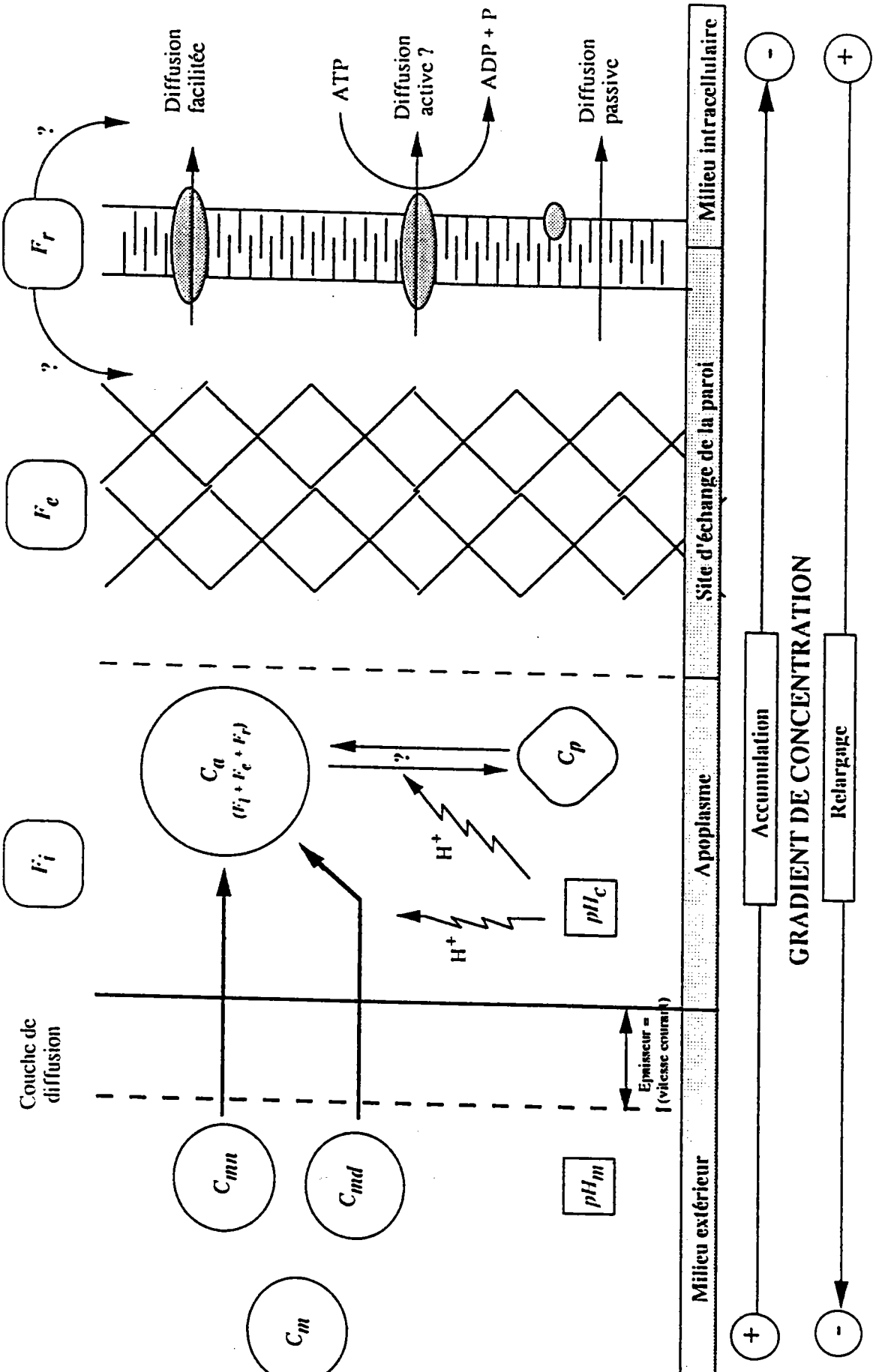


Figure 7-1: Schéma décrivant les différentes étapes de l'accumulation d'un métal par les bryophytes aquatiques. C_m représente la concentration d'exposition en métal dans le milieu qui se décompose en fraction disponible (C_{md}) et non disponible (C_{mn}). C_a est la concentration de métal accumulable regroupant C_{md}, une partie de Cmn qui devient disponible par le contact avec le pH_c de l'environnement cellulaire différent du pH_m du milieu environnant. C_p est la fraction métallique présente sous forme de précipité.

en métal dans l'eau (Cm), facteur principal conditionnant l'accumulation du métal par la mousse (e.g. Wehr et Whitton, 1983a).

Le métal dans l'eau (C_m) peut se diviser en deux fractions. La première est la concentration en métal directement disponible pour la mousse (C_{md}), c'est-à-dire bioaccumulable, et dont une estimation approximative peut être donnée par la détermination de la concentration en métal dissous dans l'eau. La seconde correspond à la fraction de métal qui n'est pas directement disponible pour la mousse (C_{mn}).

L'accumulation de la fraction disponible pour la mousse (C_{md}) présente dans le milieu se fait par diffusion passive selon le gradient de concentration qui s'établit entre le milieu et le premier compartiment de l'organisme en contact, l'apoplasme. Ce premier phénomène peut être décrit par la première loi de Fick employée comme modèle de diffusion des polluants dans les plantes (Madsen *et al.*, 1993; Wolf *et al.*, 1991):

$(dM/dt)/A = D(dC/dX)$

où M (g) est la masse transportée à travers la surface A (cm^2) dans le temps t (heures) et proportionnelle au coefficient spécifique de diffusion D du polluant et au gradient de concentration dC mais inversement proportionnel à l'épaisseur de la couche de diffusion dX existant à l'interface des 2 compartiments.

Cette loi introduit l'hypothèse d'une couche de diffusion à l'interface entre le milieu et la mousse. Le flux d'éléments au travers de cette couche dépend en grande partie du gradient de concentration dC existant entre le milieu (C_{md}) et l'apoplasme (fraction F_i). Plus ce gradient est fort, *i.e.* $C_{md} >>> F_i$, plus le flux entrant est important et rapide. C'est effectivement ce que l'on observe au début d'une cinétique d'accumulation lorsque la mousse non contaminée est brutalement exposée à un milieu contaminé. L'existence d'une couche de diffusion fournit aussi une explication relative à l'effet de la vitesse du courant sur les cinétiques d'accumulation des métaux constaté au chapitre IV. En effet, une augmentation de la vitesse du courant tend à diminuer l'épaisseur de la couche de diffusion avec pour conséquence, selon l'équation de Fick, une augmentation du flux entrant (Madsen *et al.*, 1993). Par ailleurs, cette hypothèse sur l'importance du paramètre vitesse de courant tend à confirmer la remarque de Proctor (1990) qui explique la préférence des bryophytes aquatiques pour les faciès lotiques par leur nécessité à se trouver en contact avec un flux maximal de nutriments.

La paroi cellulaire a été divisée en deux compartiments distincts, l'apoplasme comprenant la fraction métallique F_i et les structures surfaciques d'adsorption de la fraction F_e. Cette

distinction de la paroi en deux compartiments a déjà été employée par divers auteurs cités par Haynes (1980). Les auteurs considèrent un espace libre où la concentration de l'élément (F_i) dépend du gradient de concentration et un espace englobant les structures surfaciques où la concentration de l'élément (F_e) dépend, outre du gradient de concentration, des propriétés de l'élément, notamment sa valence électronique, et son affinité pour les sites d'adsorption. Dans les faits, cette distinction est probablement trop simpliste. La paroi cellulaire est en effet constituée d'une ossature cellulosique englobant plusieurs macromolécules complexes (hémicellulose, pectines, protéines) formant un maillage où les espaces libres sont nombreux (Haynes, 1980).

L'augmentation de la concentration en métal dans l'apoplasme (F_i) a pour conséquence la création d'un nouveau gradient de concentration entre ce compartiment et les structures surfaciques d'adsorption de la paroi. La fraction métallique associée à ce compartiment est la fraction échangeable définie au chapitre V. Cependant, la fixation du métal aux sites d'échanges de la paroi ne dépend pas uniquement du gradient de concentration, c'est-à-dire de la fraction F_i et de la fraction déjà adsorbée, *Fe*. La fixation dépend aussi de la valence électronique de l'élément et de son affinité pour les sites d'échanges. Ainsi, les cations divalents sont accumulés préférentiellement aux cations monovalents (Brown et Bates, 1990; Welch, 1995).

La résultante de l'ensemble de ces mécanismes est l'augmentation de la fraction F_e avec la création d'un nouveau gradient de concentration entre la paroi et le milieu intracellulaire. L'existence de ce gradient ne suffit cependant pas pour expliquer le flux de l'élément puisque l'augmentation de la fraction intracellulaire du métal nécessite avant tout le transfert du métal au travers de la membrane plasmique. La membrane plasmique, constituée d'une double couche phospholipidique dans laquelle sont inclus des glycolipides, des protéines et des glycoprotéines, se comporte comme une barrière semi-perméable. Ainsi, des complexes organométalliques lipophiles peuvent passer la membrane par simple diffusion. Il existe aussi des canaux hydrophiles pour le transport des ions vers l'intérieur de la cellule selon un gradient électrochimique ou de concentration (Van Cutsem et Gillet, 1981 et 1982; Dallinger, 1995; Welch, 1995). Des protéines transmembranaires, les perméases, permettent une diffusion facilitée des éléments, essentiellement les alcalins et alcalino-terreux (Dallinger, 1995). Cependant, il peut y avoir compétition pour les sites de ces protéines de transport entre plusieurs éléments présentant le même rayon ionique. Ainsi, Wells et Brown (1987) évoquent cette hypothèse pour le transport du cadmium par des mousses terrestres utilisant alors les mêmes sites de transport que le calcium. La destination du métal à l'intérieur de la cellule est mal connue. Burton et Peterson (1979) rapportent une quantité importante de Zn associée aux débris des mitochondries après fractionnement de la cellule. Jackson *et al.* (1991) ont montré que la pénétration intracellulaire du Cd et du Pb induisait la synthèse de molécules de faible poids moléculaire qui neutralise le métal en le complexant. Le passage d'éléments dont l'activité n'est pas neutre peut être responsable, en effet, de réaction

d'oxydo-réduction nécessitant alors leur oxydation ou leur réduction, rôle joué par ces molécules (Welch, 1995).

La concentration d'exposition en métal est divisé en deux fractions, la première directement disponible pour la mousse (C_{md}), la seconde indirectement disponible pour la mousse (C_{mn}). Cette dernière, qui, à l'origine, n'est pas accumulable par les mousses, peut le devenir lorsque l'on considère l'éventuelle influence de l'environnement cellulaire sur la spéciation du métal. La régulation du pH dans le proche environnement cellulaire est un moyen mis en évidence chez les algues et les végétaux pour prévenir une accumulation excessive de micronutriments ou de favoriser leur assimilation (Cumming et Taylor, 1990; Maeda et Sakagushi, 1990). Bates (1992) relate, pour des bryophytes terrestres, les capacités d'échange cationique réduites lorsque ces espèces vivent sur des substrats acides comparées aux capacités d'échange cationique des mêmes espèces poussant sur des sols calcaires. La réduction de la capacité d'échange cationique, par une saturation des sites d'adsorption par les protons, serait un moyen de prévenir l'accumulation excessive d'éléments, notamment d'aluminium rendu plus disponible dans un environnement acidifié. Nous avons également évoqué cette hypothèse lors de l'évaluation de la contamination métallique de cours d'eau acide dans le massif vosgien en utilisant en parallèle des mousses transférées et des hépatiques autochtones (Claveri *et al.*, sous presse). En effet, les mousses aquatiques non acclimatées aux conditions du milieu accumulaient d'autant plus d'aluminium et de plomb que le pH de l'eau devenait acide, à l'inverse des hépatiques autochtones. Contrairement à la mousse transplantée, l'hépatique employée, *Pellia epiphylla* adaptée au milieu acide (Augier, 1966; Bates, 1993), évite l'accumulation excessive de ces deux métaux en maintenant une concentration importante dans les structures surfaciques. En maîtrisant le pH à la périphérie de la cellule (pH_C), en régulant le flux de protons au travers de la membrane, la mousse aurait donc la possibilité de réguler la teneur en métal disponible dans son proche environnement cellulaire.

Le phénomène de relargage peut s'expliquer par l'inversion des différents gradients de concentration provoquée à l'origine par la diminution de la concentration d'exposition en métal dans le milieu. A cette diminution correspond alors un gradient de concentration entre l'apoplasme et le milieu extérieur entraînant la fuite de la fraction F_i. Cette fuite provoque alors le transfert progressif dans l'apoplasme de la fraction F_e, fixée aux sites d'échange, maintenant ainsi pendant un certain temps le gradient de concentration entre le milieu extérieur et l'apoplasme. L'hypothèse d'un transfert préliminaire de la fraction F_e vers l'apoplasme avant son relargage définitif est étayé par les observations issues du suivi quantitatif des fractions F_i et F_e durant le relargage. On a en effet remarqué que le relargage concernait en premier la fraction F_e plutôt que la fraction Fi alors que le traitement de désorption a montré que la fraction F_e était plus difficilement désorbable que la fraction F_i. Cette observation tend à confirmer l'existence de deux

compartiments extracellulaires. L'expérience décrite au chapitre V révèle une faible diminution de la fraction résiduelle durant la phase de relargage.

Théoriquement, des mousses préalablement contaminées et placées dans un milieu exempt de métaux devraient relarguer le métal pour atteindre une concentration dans l'organisme en équilibre avec le milieu, et retrouver ainsi le niveau de contamination antérieur à l'exposition au métal. L'évaluation quantitative des différentes fractions métalliques à la fin de la phase de relargage (chapitre V) a montré que la contribution de la fraction F_r à la quantité totale de métal restant dans la mousse pouvait dépasser 20 %. La première hypothèse permettant d'expliquer le relargage seulement partiel du métal préalablement accumulé est la localisation intracellulaire d'une partie du métal et sa neutralisation dans la vacuole sous forme de précipité (Jackson *et al.*, 1991). Il est également possible qu'une partie du métal compris dans la fraction F_r soit difficilement désorbable du fait de la nature des complexes qu'il forme avec les sites d'échange, complexes suffisamment stables pour empêcher le relargage du métal.

VII-1-2 LES POINTS NON ENCORE ECLAIRCIS

En premier lieu figure la signification de la fraction F_r, identifiée et quantifiée au chapitre V, et qui peut atteindre en fin de relargage 20 % de la quantité totale de Cu résiduel. Si l'observation histologique effectuée en parallèle avec la technique de désorption a mis en évidence une localisation intracellulaire du Cu, rien ne prouve que l'intégralité de la fraction F_r correspond à une localisation intracellulaire du métal. C'est la raison pour laquelle la fraction F_r est représentée dans la figure 7-1 à la fois dans le compartiment intracellulaire et les structures surfaciques de la paroi.

Si la présence intracellulaire d'une fraction du métal accumulée permet d'expliquer l'effet mémoire observé à la fin de relargage, il ne semble pas que ce soit une explication suffisante puisque 80 % du métal se trouvent encore dans la fraction réversible. Le fait qu'une partie des métaux se trouve dans la fraction *Fe* peut constituer un frein à la désorption du métal qui est relargué plus lentement qu'il n'a été accumulé au préalable. La stabilité des complexes métalliques formés dans les structures surfaciques de la paroi peut constituer un frein au relargage du métal. Le fait que, contrairement à la phase d'accumulation, le métal concerné par le phénomène de relargage soit complexé, peut expliquer sa désorption plus lente même s'il existe un gradient de concentration.

Connaissant l'épaisseur de la paroi (environ le quart de l'épaisseur d'une feuille) et l'affinité des métaux pour les sites d'échange, il devient alors difficile d'expliquer le passage d'une partie du métal de la fraction F_e vers l'intérieur de la cellule. Le passage au travers de la paroi

vers la membrane implique soit qu'il y ait un phénomène de migration des métaux grâce au gradient de concentration, soit que c'est la fraction F_i qui est concernée par le transport transmembranaire. Ce dernier cas n'est cependant pas envisagé dans le schéma simplificateur qui découpe l'accumulation en 4 compartiments successifs n'incluant pas de contact direct entre l'apoplasme et la membrane.

Enfin, ce schéma descripteur n'apparait valable que pour les métaux montrant nettement une cinétique d'accumulation et une cinétique de relargage (ex: Cd, Cu, Zn). Le schéma ne permet pas d'expliquer l'absence ou le très faible relargage observé pour certains éléments comme le chrome ou le plomb. Les propriétés intrinsèques des métaux et la composition des sites d'échanges ont probablement un rôle comme le suggèrent Nieboer et Richardson (1980) qui proposent une classification des éléments selon leur tendance à former des espèces ioniques ou des complexes métalliques avec liaison covalente. Ces aspects n'ont cependant pas été encore suffisamment pris en compte pour fournir une explication satisfaisante sur le comportement différent des métaux lors de l'accumulation et du relargage par les mousses.

VII-2 INTERETS ET LIMITES DE L'EMPLOI DE LA METHODE DES TRANSFERTS

VII-2-1: IMPORTANCE DES CARACTERISTIQUES PHYSIQUES ET CHIMIQUES DE LA STATION DE TRANSFERT

En voulant appliquer la méthode des transferts dans un contexte physico-chimique aussi particulier que celui des rejets d'eau échauffée d'une centrale nucléaire, la question principale était de savoir si le transfert d'un échantillon d'un site non contaminé où les bryophytes poussent naturellement, donc dans des conditions favorables à leur survie, dans un milieu physiquement et chimiquement différent pouvait entraîner des conséquences sur les cinétiques d'accumulation des métaux. L'examen de la littérature relative à l'application de la méthode des transferts ne fait quasiment jamais mention des conséquences du transfert des mousses dans un milieu différent de celui d'origine. D'ailleurs, la méthodologie proposée (Mouvet, 1986; Kelly *et al.*, 1987) n'inclut pas d'étape préalable d'acclimatation de l'organisme à ces nouvelles conditions d'exposition. Les conséquences d'un transfert n'ont été évaluées que par Lopez *et al.* (1994) qui ont suivi la dégradation des pigments chlorophylliens chez *Fontinalis antipyretica* transplantée dans divers sites plus ou moins contaminés par les métaux. Les auteurs montrent que lors des premiers jours du transfert, les mousses subissent un stress marqué qui s'atténue avec le temps. La question est de savoir si cette dégradation de l'état physiologique de l'organisme n'entraîne pas aussi une altération de ses capacités à accumuler les métaux. Beaugelin-Seiller (1994) a ainsi mis en

évidence l'accumulation moindre du ^{60}Co par un lot de *Platyhypnidium riparioides* préalablement conservé 45 jours dans un milieu non contaminé comparée à l'accumulation d'un lot de la même espèce fraîchement collecté *in situ*.

Le plus souvent, il est fait appel à la méthode des transferts uniquement lorsque le site d'étude ne présente pas d'échantillons autochtones. C'est une des raisons qui explique le faible nombre de travaux consacrés à la comparaison de l'information fournie par les mousses autochtones et les mousses transplantées. La détermination des concentrations en Cr dans des échantillons de *Fontinalis antipyretica* autochtones et transférées pendant 31 jours dans la rivière Amblève révèle des teneurs en métal 4 fois supérieures dans les échantillons autochtones (Mouvet, 1984b). L'emploi en parallèle de l'espèce *Cinclidotus nigricans* transplantée dans le bassin de la Meurthe et de l'espèce *Fontinalis antipyretica* autochtone montre également que cette dernière a accumulé plus de Cr, Ni, Pb et Zn que les échantillons transférés 21 jours (Mersch et Johansson, 1993). Dans ce dernier exemple, la variabilité interspécifique n'est pas suffisante pour expliquer les différences de concentrations observées entre les lots autochtones et les lots transplantés. Le temps d'exposition doit aussi être pris en compte. En effet, les concentrations observées dans les échantillons autochtones sont le reflet d'une contamination historique du cours d'eau du fait des cinétiques d'accumulation et de relargage successives, de l'effet mémoire observé lors du relargage et de la possible formation de précipité d'oxyde métallique à la surface des feuilles (Wehr *et al.*, 1987). Les concentrations en métal observées dans les échantillons transférés ne sont que le reflet de la contamination du milieu durant la durée d'exposition de la mousse. De cette différence de temps d'intégration découle une signification différente de l'information recueillie par ces deux méthodes. Il devient alors opportun de s'interroger sur la validité de l'utilisation des transferts, dans le cadre d'un suivi de bassin employant des mousses autochtones, uniquement comme substitut palliant l'absence d'échantillon sur certaines stations, et de considérer l'emploi des mousses autochtones et l'emploi des transferts comme deux méthodes différentes.

Le transfert d'un échantillon de mousse dans un cours d'eau présentant des caractéristiques physiques et chimiques différentes de son milieu d'origine peut également affecter l'accumulation des métaux. En se plaçant dans des conditions extrêmes de pH, nous avons pu évaluer l'effet de ce paramètre sur l'accumulation des métaux à la fois par des hépatiques autochtones et des mousses transplantées (Claveri *et al.*, sous presse).

Qu'elles soient autochtones ou transférées, les bryophytes accumulent d'autant moins l'aluminium et le manganèse que le pH de l'eau est acide (Tableau 7-1). On remarque cependant que les concentrations en métal chutent beaucoup plus dans les hépatiques autochtones que dans les mousses transférées. L'acidification du milieu n'affecte pas de la même façon les capacités d'accumulation des

deux espèces. Ce comportement accumulateur différent de ces deux espèces a pour conséquence une estimation de la contamination métallique différente, notamment sur le site présentant un pH moyen de 4.6, où les mousses transférées accumulent 3 fois plus de Al et 18 fois plus de Mn que les hépatiques. Dans le cas du plomb, si l'estimation de la contamination que donnent les 2 espèces est similaire sur la station d'étude présentant le pH le moins acide, les concentrations en Pb dans les mousses transplantées sur le site le plus acide sont 38 fois supérieures à celles observées dans les hépatiques échantillonnées dans le même cours d'eau. Avec une concentration de 5 $\mu g\ g^{-1}$ dans l'hépatique autochtone, la situation peut être jugée satisfaisante puisque cette concentration est plus faible que le niveau de référence fixé à 19 $\mu g\ g^{-1}$. Dans le cas précis de cette étude, l'emploi de la technique des transferts permet de mettre en évidence que les conditions du milieu favorise une accumulation importante de plomb, observation que ne permet pas l'échantillonnage de bryophytes autochtones. En suivant les concentrations métalliques dans des bryophytes autochtones et transférées dans des conditions extrêmes, où en l'absence d'une forte minéralisation, le pH devient le paramètre de spéciation prépondérant, cette étude a montré l'influence non seulement de ce paramètre mais aussi la réponse différente selon l'espèce, son origine (autochtone ou transférée) et le métal considéré.

Tableau 7-1: Concentrations en métaux ($\mu g\ g^{-1}$) dans l'hépatique autochtone *Pellia epiphylla* et la mousse transplantée *Hygrohypnum ochraceum* dans 3 cours d'eau de pH différent dans le massif vosgien.

pH moyen	Espèces	Concentration en métal dans les bryophytes ($\mu g\ g^{-1}$ p.s.)		
		Al	Mn	Pb
4.6 ± 0.3	*Hygrohypnum sp.*	10143	803	189
	Pellia epiphylla	3272	45	5
4.8 ± 0.3	*Hygrohypnum sp.*	10122	886	91
	Pellia epiphylla	4297	90	30
5.4 ± 0.4	*Hygrohypnum sp.*	13228	1102	41
	Pellia epiphylla	16500	1164	32

L'exemple des Vosges montre que l'utilisation de la méthode des transferts de mousse nécessite la prise en compte, ou tout du moins l'estimation de l'influence de certains paramètres du milieu susceptibles d'avoir des variations importantes, notamment le pH. Lors de l'évaluation de la contamination et de la contribution des rejets d'eau échauffée des centrales nucléaires, notre

attention s'est portée sur deux autres paramètres caractéristiques de ce contexte particulier, la température et le régime d'écoulement de l'eau. La température de l'eau peut varier selon les stations où sont implantées les mousses (en amont et en aval du rejet ou directement dans le rejet). Or il est établi que la température de l'eau est l'un des rares facteurs du milieu restreignant la distribution des bryophytes aquatiques car celles-ci supportent difficilement des températures excédant 30 °C (Glime et Vitt, 1984), température susceptible d'être rencontrée sur les sites EDF. Ce facteur physique du milieu a donc des implications sur la physiologie des bryophytes. L'étude des cinétiques d'accumulation du Cu par des mousses exposées à ce métal à différentes températures a montré l'effet inhibiteur d'une augmentation de ce paramètre sur l'activité photosynthétique. Par contre, l'altération physiologique entraînée par l'accroissement de la température de l'eau n'a pas eu d'effet sur l'ampleur des cinétiques d'accumulation et de relargage du Cu. Dans le cadre du programme de surveillance EDF, ce résultat montre que ce paramètre peut être négligé.

L'emploi des bryophytes dans des conditions hydrodynamiques potentiellement différentes nous a également amené à évaluer l'effet de la vitesse du courant sur l'ampleur des cinétiques d'accumulation des métaux. L'expérience *in situ* (Chapitre IV-3) a montré que l'accumulation du Cr, du Cu et du Zn est d'autant plus importante que la vitesse du courant à la station d'implantation des mousses est grande. Wehr et Whitton (1983b) évoque l'effet du débit sur l'accumulation du Pb par les mousses. Les auteurs suggèrent néanmoins que ce n'est pas directement le débit qui influe sur l'accumulation du métal mais les modifications de la physico-chimie du milieu que ces variations engendrent. Pourtant, les mousses transplantées sur l'Andlau présentant des concentrations en métal différentes sont issues de 3 stations d'étude situées à quelques mètres l'une de l'autre sur la même rivière, sont implantées et collectées en même temps et sont exposées à des concentrations en métal dissous similaires. S'il est effectivement possible que le débit influe sur la disponibilité du métal pour la mousse, cette expérience à laquelle s'ajoute celle effectuée en laboratoire (chapitre IV-2) montre que les mousses n'ont pas été sensibles uniquement à la concentration d'exposition mais aussi au flux de métal.

Cette mise en évidence de l'influence du paramètre vitesse de courant sur l'accumulation des métaux par les mousses n'implique pas directement qu'il doit être pris en compte lors d'une étude utilisant les bryophytes aquatiques comme traceurs de la contamination. En effet, ce facteur pourrait être considéré, au même titre que d'autres paramètres comme le pH ou la minéralisation, comme un des facteurs régissant la disponibilité du métal par la mousse. La réponse que fournit la bryophyte par la quantité de métal accumulée intègre alors l'influence de ce facteur du milieu. L'influence de ce facteur peut probablement être minimisée si l'on considère premièrement que la présence des mousses est généralement associée au courant rapide et deuxièmement, que l'échantillonnage *in situ* est effectué de façon rigoureuse, c'est-à-dire dans la zone de plus fort

courant (où l'on est sûr de ne pas être dans la zone de battement des eaux). Dans ce cas, le prélèvement d'échantillons autochtones doit naturellement se restreindre à des stations présentant une gamme de vitesse de courant peu contrastée. Cette remarque signifie néanmoins que l'échantillonnage de mousses autochtones revêt une grande importance. André et Lascombe (1987) avaient relevé une hétérogénéité des concentrations métalliques dans des mousses prélevées sur une même station selon un profil vertical et transversal, sans toutefois associer cette hétérogénéité à la vitesse du courant.

La prise en compte de ce paramètre est par contre impérative lorsque la méthode des transferts est utilisée, le choix des stations d'implantation des paniers maillés devenant primordial. Ce choix est d'autant plus important que, d'une part la méthode des transferts est couramment employée pour pallier l'absence de mousses autochtones, c'est-à-dire souvent dans des stations à courant lentique, et d'autre part, cette méthode est souvent utilisée pour la comparaison du niveau de contamination de différentes stations d'un même cours d'eau. La comparaison de ces différents points nécessite alors une homogénéité des vitesses de courant observées. Le problème se pose notamment lors de l'évaluation de la contribution des rejets de centrale nucléaire à la contamination du milieu récepteur. Les stations amont et aval au rejet où sont implantées les bryophytes ne présentent pas les mêmes caractéristiques hydrodynamiques que le rejet.

VII-2-2 AVANTAGES ET INCONVENIENTS DE L'EMPLOI DE LA METHODE DES TRANSFERTS

L'emploi systématique de la méthode des transferts durant ce travail permet de dégager brièvement les avantages et les inconvénients de la méthode par rapport à l'utilisation d'échantillons autochtones.

Avantages

- Maîtrise de la qualité biologique de l'échantillon choisi pour le transfert (sélection des touffes, élimination des matières exogènes)
- Connaissance des concentrations métalliques de l'échantillon à la condition de bien connaître le site de référence
- Elimination de la variation interspécifique par la sélection d'une seule espèce lors de la collecte
- Attribution certaine des quantités de métal accumulées par la mousse à la contamination du milieu durant la période d'exposition de l'échantillon. Pas de risque de contamination historique difficilement interprétable
- Choix des stations d'études théoriquement illimité
- Période d'intégration de la contamination connue.

Inconvénients

- Difficulté de trouver et surtout de maintenir l'intégrité d'une station de référence
- Difficulté d'échantillonnage (crue, population en faible quantité et de mauvaise qualité)
- Nécessité d'au moins deux interventions sur le site (pose + prélèvement)
- Risque d'encrassement et de colmatage des paniers de mousses
- Risque de vandalisme
- Influence de certains paramètres physico-chimiques sur l'accumulation (pH, vitesse du courant)
- Période d'intégration de la contamination limitée dans le temps.

VII-3 INTERETS ET LIMITES ACTUELLES DE L'APPLICATION DU MODELE MATHEMATIQUE ET DE L'EMPLOI DU MODULE EXPERIMENTAL

La conception du module expérimental et l'élaboration d'un modèle mathématique décrivant les échanges de métal à l'interface eau-mousse offrent de nouvelles perspectives d'utilisation de la méthode des transferts. L'emploi sur une station d'étude de ces deux outils fournit simultanément plusieurs informations relatives à la contamination métallique du milieu.

L'utilisation des mousses aquatiques transplantées dans des conditions hydrodynamiques reproductibles d'un site à l'autre grâce au module expérimental permet d'obtenir dans un premier temps une estimation du niveau de contamination métallique du milieu. Celle-ci peut être interprétée de deux facon différentes, soit par l'emploi de la grille de qualité, soit par l'application du modèle mathématique. Ce dernier permet de passer d'une estimation semi-quantitative, c'est-à-dire la grille de qualité, à une estimation quantitative de la pollution en fournissant, à partir des concentrations métalliques observées dans la mousse, une valeur de la concentration moyenne en métal dissous dans l'eau.

Le module expérimental fait l'objet actuellement d'une procédure de mise sous brevet par EDF, titulaire de droit, sous le n°9403204 et le nom de Module d'Intégration de la Micropollution (MIM).

Dans le même temps, le système de décantation fournit à la fin de la période de fonctionnement du module une quantité de matières en suspension suffisante pour la détermination des concentrations métalliques. Contrairement à d'autres méthodes de prélèvement ponctuel, les concentrations métalliques de l'échantillon collecté sont représentatives de la contamination moyenne de la phase particulaire durant la durée de fonctionnement du module.

L'emploi simultané de ces deux outils offre ainsi une nouvelle méthode intégratrice de la contamination métallique de la phase circulante d'un cours d'eau en fournissant une première approche de la spéciation du métal sous ses formes particulaires et dissoutes. La capacité d'intégration dans le temps de la méthode peut s'avérer intéressante dans le cas de pollutions discontinues. L'avantage d'utiliser les bryophytes aquatiques dans ces cas-là se retrouve aussi dans l'emploi du système de décantation des matières en suspension. En décantant de façon continue les matières en suspension, un pic de pollution comme le rejet ponctuel d'effluents radioactifs aura plus de chance d'être détecté que si d'autres méthodes de prélèvement ponctuel sont employées.

En plaçant les mousses aquatiques dans des conditions physiques d'exposition stables, reproductibles d'un site à l'autre, le module expérimental permet une utilisation plus fiable du modèle mathématique. Il permet notamment de s'affranchir de l'influence de la vitesse du courant et de maintenir les mousses en contact avec le milieu sans risque de colmatage et d'abrasion comme cela est observé lorsqu'est employée la méthode des transferts. De plus, le module expérimental offre un support à la fois pour le suivi en continu de paramètres du milieu et pour la régulation éventuelle de paramètres dont l'influence sur l'accumulation des métaux par les bryophytes se sera révélée significative, comme c'est le cas par exemple pour la vitesse du courant.

Le développement de cette méthode n'a pas pour objet de remplacer la technique des transferts mais offre plutôt une alternative intéressante dans le cadre du contrôle d'effluents industriels et de l'évaluation de leur contribution à la contamination du milieu récepteur.

Le module expérimental n'a pas été conçu à l'origine pour être utilisé en routine dans un réseau de mesure tel que le Réseau National de Bassin. Son coût et la lourdeur de sa mise en oeuvre comparés à l'emploi de la technique faisant appel aux mousses autochtones ou transplantées ne plaident pas en sa faveur dans ce type d'étude. De plus, nous n'avons pas, à ce jour, résolu le problème de l'autonomie énergétique du système.

Le module est cependant une alternative intéressante lors d'études plus ponctuelles. Ses inconvénients deviennent alors des avantages lorsqu'on considère les informations qu'il permet d'obtenir. Par exemple, l'échantillon de matières en suspension récolté dans le décanteur est probablement plus représentatif de la contamination moyenne de la phase particulaire qu'un simple prélèvement ponctuel. Il se pose néanmoins le problème de la validité de l'échantillonnage ainsi effectué et par voie de conséquence de la signification de l'estimation de la contamination des matières en suspension décantées. Le niveau de contamination en métal de la phase particulaire est en partie fonction de sa granulométrie. Or, les matières en suspension décantées par le système précédemment décrit ne sont pas forcément représentatives des matières en

suspension obtenues par centrifugation par exemple. La décantation, dont l'efficacité peut être très variable car dépendante de la nature des matières en suspension, ne garantit pas une sédimentation de toutes les classes granulométriques, notamment les plus fines. La validation de l'information fournie par l'intermédiaire du système de décantation a nécessité alors une étude d'intercalibration avec les autres méthodes de prélèvements de matières en suspension. Celle-ci vient d'être effectuée sur le site de Nogent-sur-Seine en mars et juin 1995. Trois techniques de prélèvements ont été comparées:

- la centrifugation en continu (méthode 1);
- la décantation par l'intermédiaire du module (méthode 2);
- les trappes à sédiments (méthode 3).

Les premiers résultats de cette étude montrent que les méthodes 1 et 2 fournissent des matières en suspension contenant des quantités similaires de cuivre et de zinc, quantités plus élevées que celles obtenues par les trappes à sédiments (Vazelle, communication personnelle). La détermination des spectres granulométriques révèlent également que ces deux méthodes permettent de récolter des particules de tailles semblables, inférieures à ce que fournissent les trappes. L'étude révèle néanmoins que la centrifugation reste plus efficace pour la collecte des particules les plus fines, 20 % des MES récoltées sont constituées de particules inférieures à 1 µm contre 8 % seulement lorsqu'est employé le système de décantation.

L'importance accordée à l'influence du régime d'écoulement amène à se demander si les mousses introduites dans le bac d'immersion sont dans des conditions hydrodynamiques optimales. L'application du modèle mathématique aux résultats obtenus sur les 3 sites nucléaires et sur l'Andlau tend à montrer que les conditions choisies pour le module sont plutôt représentatives d'un régime d'écoulement lentique. Le choix du régime d'écoulement dans le module a été délibérément calqué sur les conditions choisies lors de l'expérience de calibration en laboratoire. Les constantes cinétiques calculées lors de cette expérience de calibration décriraient les échanges de métaux entre les mousses et le milieu dans un contexte où le régime d'écoulement de l'eau est lent. Cette observation ne plaide pas en faveur d'une application du modèle sur n'importe quelle donnée car celui-ci, dans sa conception, ne prend pas en compte l'influence de la vitesse du courant. Par contre, elle renforce l'idée selon laquelle le module est nécessaire pour une évaluation plus fiable de la contamination car il permet de s'affranchir de l'influence de la vitesse du courant.

La démarche, qui consiste à réguler un paramètre influant de façon significative sur l'accumulation du métal, pourrait être également envisagée pour des paramètres ou groupes de paramètres autres que la vitesse du courant dont l'effet significatif sur les cinétiques d'accumulation des métaux aura été au préalable identifié et quantifié. L'emploi en parallèle du module et du modèle offre alors deux niveaux d'intervention lorsqu'un facteur contribue de façon

significative à la relation quantitative décrite par le modèle reliant les concentrations d'exposition en métal à la concentration métallique observée dans la mousse. Soit, l'intervention porte directement sur le modèle en introduisant une nouvelle variable décrivant l'influence du facteur sélectionné, soit l'intervention porte sur le module par l'installation d'un système de régulation de ce paramètre. Si ce dernier choix peut être facilement applicable dans le cas où le paramètre identifié est facilement maîtrisable comme par exemple l'oxygène dissous ou l'intensité lumineuse, deux paramètres qui n'ont pas encore été testés, la régulation de facteurs liés à la spéciation du milieu risque d'entraîner une complication du système qui, finalement, perdrait un de ses atouts majeurs, à savoir la simplicité de sa conception et de sa mise en oeuvre.

Dans le contexte du suivi et du contrôle de rejets identifiés comme c'est le cas pour les rejets des centrales électronucléaires, une autre solution consiste à adapter le modèle aux spécificités de chaque site d'étude. Il s'agit dans un premier temps d'effectuer un suivi tel qu'il a été envisagé lors des trois expériences sur sites décrites précédemment. Connaissant les concentrations d'exposition dans le milieu et les concentrations en métal dans les mousses après exposition, les constantes cinétiques préalablement calculées à partir de l'expérience de calibration peuvent alors être ajustées tenant compte ainsi des caractéristiques physico-chimiques du milieu susceptibles d'influencer les échanges de métaux entre l'eau et les mousses. Cet étalonnage du modèle à un site d'étude précis permet ensuite son application en routine en acceptant l'hypothèse selon laquelle la physico-chimie du milieu ne varie pas dans des proportions suffisantes pour entraîner une modification de la relation quantitative reliant les concentrations d'exposition en métal aux concentrations accumulées par les mousses.

Conclusion

L'emploi des bryophytes aquatiques tant en France qu'à l'étranger, dans le cadre de réseaux de surveillance ou d'études ponctuelles, montre l'intérêt porté à ces organismes traceurs de la contamination métallique des eaux continentales.

Le programme engagé par EDF et les conditions spécifiques dans lesquelles l'utilisation des bryophytes est envisagée (transfert d'échantillons directement dans les rejets d'eaux échauffées) a permis d'éclaircir plusieurs points restés jusque là en suspens et d'élaborer une nouvelle méthodologie profitant au mieux des potentialités de cet indicateur.

Les différentes expériences de laboratoire ont permis de proposer une description des différentes étapes intervenant lors du processus d'accumulation qui ne peut se réduire à un simple échange physico-chimique entre la paroi cellulaire et le milieu environnant. L'organisme a ainsi été divisé en trois compartiments successifs : l'apoplasme, les structures d'échanges de la paroi et le milieu intracellulaire. L'accumulation du métal s'effectue selon une succession de gradients de concentration qui s'établissent entre les trois compartiments lorsque la concentration dans le milieu environnant augmente. Le passage et le flux de métal d'un compartiment à l'autre sont fonction en premier lieu de l'existence d'un gradient de concentration mais sont aussi assujettis aux mécanismes physico-chimiques et biologiques mis en jeu lors du transfert de l'élément d'un compartiment à l'autre. Ainsi, le flux d'élément transitant du milieu extérieur vers l'apoplasme serait tributaire de l'épaisseur de la couche de diffusion séparant ces deux compartiments, épaisseur variable car dépendant notamment de la vitesse du courant. La fixation des métaux sur les sites d'échanges va dépendre entre autres de l'affinité respective des éléments et des sites de fixation, et probablement de la présence d'ions compétiteurs. Le gradient de concentration seul n'est pas suffisant pour justifier la présence de métal dans la cellule puisque le transfert de l'élément dans ce compartiment nécessite le passage de la membrane plasmique mettant alors en jeu des processus biologiques. La quantification d'une fraction métallique accumulée de façon quasi irréversible et localisée à l'intérieur de la cellule montre que le métal n'est pas accumulé uniquement au niveau extracellulaire mais qu'une fraction pénètre l'intérieur de la cellule. Cette observation permet d'expliquer, au moins en partie, l'effet mémoire observé chez les organismes préalablement exposés au métal et qui conservent par la suite une trace de cette contamination en ne relarguant pas la totalité du métal accumulé.

La prise en compte de la vitesse du courant a montré que ce paramètre a une influence sur l'accumulation des métaux. Les expériences de laboratoire et de terrain révèlent que la

concentration en métal accumulé par la mousse n'est pas uniquement fonction de la teneur d'exposition mais peut être également influencée par le flux de métal. Outre sa prise en considération dans la description de l'accumulation des métaux par les bryophytes, la mise en évidence de l'influence de ce paramètre a des conséquences au niveau méthodologique, surtout lorsque la méthode des transferts est employée. Les résultats obtenus montrent que ce paramètre doit impérativement être pris en compte lors de l'emploi de la méthode des transferts. Cette remarque est aussi valable lorsqu'on fait appel aux mousses autochtones, même si les conséquences au niveau méthodologique sont probablement moins prononcées. En effet, si l'on considère d'une part, la préférence des bryophytes pour les courants rapides et d'autre part, un échantillonnage rigoureux dans la veine du courant, l'influence de la vitesse du courant devient moindre, les stations prospectées se restreignant à une gamme de vitesse beaucoup moins large.

L'adaptation de la méthodologie au contexte particulier que constitue un rejet industriel tel que les effluents d'une centrale électronucléaire et la volonté d'optimiser l'information fournie par cet indicateur ont abouti à l'élaboration de deux outils.

Le premier est un dispositif expérimental utilisable *in situ* appelé Module d'Intégration de la Micropollution (MIM) dont le premier intérêt est de placer les bryophytes aquatiques dans des conditions d'immersion reproductibles d'un site à l'autre. Constitué d'un bac d'immersion dans lequel est introduit en continu et à débit constant l'eau de rivière préalablement débarrassée de la majorité de ces matières en suspension grâce à un décanteur, ce dispositif offre deux avantages. Il permet à la fois de s'affranchir de l'influence de la vitesse du courant en maintenant un débit fixe et de protéger les bryophytes des effets néfastes des matières en suspension (abrasion et colmatage) grâce au système de décantation. Le second intérêt est l'obtention grâce au décanteur d'une quantité suffisante de matières en suspension pour permettre la détermination des concentrations métalliques. Contrairement aux méthodes de prélèvement ponctuel, les concentrations en métal dans l'échantillon récolté sont représentatives de la contamination moyenne des matières en suspension durant la période de fonctionnement du dispositif. L'intérêt et la validité de l'information fournie par les matières en suspension décantées sont actuellement évalués dans le cadre d'une étude d'intercalibration des méthodes d'échantillonnage des matières en suspension menée par EDF et le Groupe De Recherche sur la Seine (GDR Seine).

Le second outil est un modèle mathématique, élaboré par P. Ciffroy (EDF-DER) à partir d'expériences de calibration menées au CREUM, qui permet de simuler les échanges de métaux entre le milieu et l'organisme. La conception de ce modèle permet de fournir une estimation de la concentration moyenne d'exposition en métal dissous présent dans le milieu à partir des concentrations déterminées dans des échantillons de mousses exposées pendant plusieurs jours.

L'emploi simultané de ces deux outils offre une nouvelle méthodologie basée sur l'utilisation des qualités d'indicateur des bryophytes aquatiques. Cette méthode fournit, grâce à deux méthodes d'intégration complémentaires, une estimation de la contamination métallique des deux principaux compartiments du milieu aquatique, l'eau et les matières en suspension, c'est-à-dire le futur sédiment. L'utilisation des mousses aquatiques permet d'avoir à la fois une évaluation de la fraction métallique disponible pour la biomasse et de fournir par l'intermédiaire du modèle, une estimation quantitative de la contamination de l'eau. Cette méthode peut s'avérer une alternative intéressante à l'emploi des deux méthodes classiques (prélèvements de mousses autochtones et transferts de mousses), notamment dans le cadre d'études ponctuelles et localisées comme ce fut le cas lors des campagnes EDF visant à évaluer la contribution des rejets de centrale à la pollution du milieu récepteur. Les potentialités de ces deux outils, qui font l'objet d'un dépôt de brevet (INPI n° 9403204 / EDF) devraient se révéler au travers de conventions d'étude liant EDF aux Agences de l'Eau.

Références bibliographiques

André B., Lascombe C., 1987. Comparaison de deux traceurs de la pollution métallique des cours d'eau: les sédiments et les bryophytes. *Sci. Eau*, 6, 225-247.

Agences de l'Eau, 1994. Métaux lourds et mousses aquatiques. Standardisation des aspects analytiques. 2ème phase: calibration multilaboratoire.

Association Française de Normalisation , 1992. Détermination de l'indice biologique global normalisé (IBGN). NF T 90-350, AFNOR, Paris, 9 p.

Augier J., 1966. Flore des bryophytes. Lechevalier, Paris, 706 p.

Axelsson L., 1988. Changes in pH as a mesure of photosynthesis by marine macroalgae. *Marine Biol.*, 97, 287-294.

Azxue J., Mudroch A., 1994. Comparison of different washing, ashing and digestion methods for the analysis of trace elements in vegetation. *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, 57, 151-162.

Bacle I., 1988. Accumulation et relargage du cuivre et du cadmium par deux espèces de mousses aquatiques. Influence du pH, de l'EDTA et des phosphates. Mém. DEA toxicologie, Univ Metz, 142 p.

Bates J.W., 1992. Mineral nutrient acquisition and retention by bryophytes. *J. Bryol.*, 17, 223-240.

Bates J.W., 1993. Comparative growth patterns of the thalloid liverworts *Pallavicinia liellii* and *Pellia epyphylla* at Silwood park, southern England. *J. Bryol.*, 17, 439-445.

Baudin J.P., Lambrechts A., Pally M., 1992. Utilisation des mousses aquatiques comme bioindicateurs de contamination radioactive. *Hydroécol. Appl.*, 3 (2), 209-240.

Beaugelin-Seiller K., 1994. Caractérisation de mousses dulçaquicoles comme indicateurs de contamination radioactive. Th. Doct. : Univ. Montpellier II, 243 p.

Beaugelin-Seiller K., Baudin J.P., Brottet D., 1994. Use of aquatic mosses for monitoring artificial radionuclides downstream of the nuclear power plant of Bugey (river Rhone, France). *J. Environ. Radioact.*, 24, 217-233.

Beaugelin-Seiller K., Baudin J.P., Casellas C., 1995. Experimental study of the effects of various factors on the uptake of ^{60}Co by freshwater mosses. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 28, 125-133.

Beckett R.P., Brown D.H., 1984. The relationship between cadmium uptake and heavy metal tolerance in the lichen genus *Peltigra*. *New Phytol.*, 97, 301-311.

Benson-Evans K., Williams P.F., 1976. Transplanting aquatic bryophytes to assess river pollution. *J. Bryol.*, 9, 81-91.

Blandin P., 1986. Bioindicateurs et diagnostic des systèmes écologiques. *Bull. Ecol.*, 17 (4), 215-307.

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*. *Oecol.*, 82, 461-467.

Brown D.H., Buck G.W., 1978. Cation contents of acrocarpous and pleurocarpous mosses growing on a strontium-rich substratum. *J. Bryol.*, 10, 199-209.

Brown D.H., Buck G.W., 1979. Dessication effects and cation distribution in bryophytes. *New Phytol.*, 82, 115-125.

Brown D.H., Buck G.W., 1985. The cellular location of metals in two bryophytes and a lichen. *Cryptog. Bryol. Lichenol.*, 6, 3, 279-286.

Brown D.H, Beckett R.P., 1985. Intracellular and extracellular uptake of cadmium by the moss *Rhytidiadelphus squarrosus*. *Ann. Bot.*, 55, 179-188.

Brown D.H., Whitehead A., 1986. The effect of mercury on the physiology of *Rhytidiadelphus squarrosus* (Hedw.) Warnst. *J. Bryol.*, 14, 367-374.

Brown D.H., Bates J.W., 1990. Bryophytes and nutrient cycling. *Bot. J. Linn. Soc.*, 104, 129-147.

Brown D.H., Wells J.M., 1990. Physiological effects of heavy metals on the moss *Rhytidiadelphus squarrosus*. *Ann. Bot.*, 66, 641-647.

Burton M.A.S., Peterson P.J., 1979. Studies on zinc localization in aquatic bryophytes. *The Bryologist*, 82, 4, 594-598.

Burton M.A.S., 1990. Terrestrial and aquatic bryophytes as monitors of environmental contaminants in urban and industrial habitats. *Bot. J. Linn. Soc.*, 104, 267-280.

Caines L.A., Watt A.W., Wells D.E., 1985. The uptake and release of some trace metals by aquatic bryophytes in acicidified waters in Scotland. *Environ. Pollut.*, B, 10, 1-18.

Campbell J.H., Evans R.D., 1987. Inorganic organic ligand binding of lead and cadmium and resultant implications for bioavailability. *Sci. Total Environ.*, 87 (62), 219-227.

Chambers P.A., Prepas E.E., Hamilton H.R., Bothwell M.L., 1991. Current velocity and its effect on aquatic macrophytes in flowing waters. *Ecological Applications*, 1, 3, 249-257.

Cardinal H., 1992. Rapport d'avancement des travaux du CEA et de l'Université de Metz sur les mousses aquatiques. Lancement des thèses. Rapport EDF-HE-31/92-17.

Claveri B., Morhain E., Mouvet C., 1994. A methodology for the assessment of accidental copper pollution using the aquatic moss *Rhynchostegium riparioides*. *Chemosphere*, 28 (11), 2001-2010.

Claveri B., Guérold F., Pihan J.C. Use of tranplanted mosses and autochthonous liverworts to monitor trace metals in acidic and non-acidic headwater streams (Vosges mountains, France). *Sci. Total Environ.* (in press)

Clymo R.S, 1963. Ion exchange in *Sphagnum* and its relation to bog ecology. *Ann. Bot.*, 27, 309-324.

Cumming J.R., Taylor G.J., 1990. Mechanisms of metal tolerance in plants: physiological adaptations for exclusion of metal ions from the cytoplasm. *In* Stress responses in plants: adaptation and acclimation mechanisms. Wiley-liss Inc., 329-356.

Dallinger R., 1994. Invertebrate organisms as biological indicators of heavy metal pollution. - *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 48, 27-31.

Dallinger R., 1995. Mechanisms of metal incorporation into cells. *In* Cell bilogy in environmental toxicology. M.P. Cajareville (ed.), 135-144. ISBN: 84-7585-666-7.

Demayo A., Taylor M.C., Taylor K.W., 1982. Effects of copper on humans, laboratory and farm animals, terrestrial plants and aquatic life. *CRC Critical Reviews in Environmental Control*, 183-255.

Descy J.P., 1979. A new approach to water quality estimation using diatoms. *Nova hedwigia Beih.*, 64, 305-323.

Devantery P., 1987. Action des courants sur la faune d'une mousse immercée: *Platyhypnidium riparioides* (Bryophyta). Th. Doct. : Univ. Lyon, 278 p.

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.

Empain A., 1977. Ecologie des populations bryophytiques aquatiques de la Meuse, de la Sambre et de la Somme. Relation avec la qualité des eaux, écophysiologie comparée et étude de la contamination par métaux lourds. Th. Doct. Sc. Bot. : Univ. Liège (Belgique), 179 p.

Englund G., 1991. Effects of disturbance on stream moss and invertebrate community structure. *J. N. Am. Benthol. Soc.*, 10 (2), 143-153.

Florence T.M., 1977. Trace metal species in fresh waters. *Water Res.*, 11, 681-687.

Florence T.M., Morrison G.M., Stauber J.L., 1992. Determination of trace element Speciation and the role of speciation in aquatic toxicity. *Sci. Total Environ.*, 125, 1-13.

Förstner U., 1980. Inorganic pollutants, particularly heavy metals in estuaries. *In* Chemistry and Biochemistry of estuaries, E. Olausson & I. Cato (eds.), John Wiley, New York, 307-348.

Förstner U., Wittman G.T.W., 1981. Metal pollution in the aquatic environment. 2nd ed Springer-Verlag, Berlin, 486 p.

Foster I.D.L., Charlesworth S.M., Keen D.H., 1991. A comparative study of heavy metal contamination and pollution in four reservoir in the english midlands, UK. *Hydrobiol.*, 214, 155-162.

Gallissot B., 1988. Mise en évidence du potentiel bioaccumulateur des bryophytes aquatiques vis-à-vis des CB et des pesticides organochlorés. Etude *in situ* et en laboratoire. Proposition de grille d'évaluation de la contamination par les organochlorés. Th. Doct., Univ. Metz, 277p.

Gandais V., Marchandise P., 1992. Behaviour of micropollutants in soils amended with river cleaning out sludge in northern France. *Water. Sci. Technol.*, 25 (11), 433-440.

Gerdol R., Degetto S, Mazzotta D., Vecchiati G, 1994. The vertical distribution of the Cs-137 derived from Chernobyl fall-out in the uppermost *Sphagnum* layer of two peatlands in the southern Alpes (Italy). *Water, Air and Soil Pollut.*, 75, 93-106.

Glime J.M., Acton D.W., 1979. Temperature effects on assimilation and respiration in the *Fontinalis duriaei*-periphyton association, *The bryologist*, 82 (3), 382-392.

Glime J.M., 1980. Effects of temperature and flow on rhizoid production in *Fontinalis*. *The Bryologist*, 83 (4), 477-485.

Glime J.M., Vitt D.H., 1984. The physiological adaptations of aquatic Musci. *Lindbergia*, 10, 41-52.

Goldberg E.D., Bowen V.T., Farrington J.W., Harvey G., Martin J.H., Parker P.L., Risebrough R.W., Robertson W., Schneider E., Gamble E., 1978. The mussel watch. *Environ. Conserv.*, 5, 101-125.

Golterman H.L., 1969. Method for chemical analysis of fresh waters. 3th ed., Blackwell, Oxford (IBP handbook n°8),166 p.

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.

Gonçalves E.P.R., Soares H.M.V.M., Boaventura R.A.R., Machado A.A.S.C., Esteves da Silva J.C.G., 1994. Seasonal variations of heavy metals in sediments and aquatic mosses from the Cavado river basin (Portugal). *Sci. Total Environ.*, 142, 143-156.

Grasmück N., Haury J., Léglize L., Muller S., 1993. Analyse de la végétation aquatique fixée des cours d'eau lorrains en relation avec les paramètres d'environnement. Ann. Limnol., 29 (3-4), 223-237.

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.

Haseloff H.P., Winkler S., 1980. Influence of heavy metal ions on the gas exchange of mosses. *Cryptog. Bryol. Lichenol.*, 1 (1), 53-65.

Havas M., Hutchinson T.C., 1987. Aquatic macrophytes as biomonitors of metals and macronutrients in acidic and alkaline ponds at the smoking hills, Canada. *In* Heavy metal in the environment, International conference , New Orleans, vol. 2. S.E. Lindberg & T.C. Hutchinson (ed.), CEP consultants, Edinburgh (USA) 430-432.

Haynes R.J., 1980. Ion exchange properties of roots and ionic interactions within the root apoplasm: their role in ion accumulation by plants. *Bot. Rev.*, 46, 75-99.

Jackson P.P., Robinson N.J., Whitton BA., 1991. Low molecular weight metal complexes in the freshwater moss *Rhynchostegium riparioides* exposed to elevated concentrations of Zn, Cu, Cd and Pb in the laboratory and field. *Environ. Exp. Bot.*, 31 (3), 359-366.

Jackson L.J., Kalff J., 1993. Patterns in metal content of submerged aquatic macrophytes: the role of plant growth form. *Freshwater Biol.*, 29, 351-359.

Kelly M.G., Girton C., Whitton B.A., 1987. Use of moss-bags for monitoring heavy metals in rivers. *Water Res.*, 21 (11), 1429-1435.

Kelly M.G., Whitton B.A., 1987. Growth rate of the aquatic moss *Rhynchostegium riparioides* in Northern England. *Freshw. Biol.*, 18, 461-468.

Kooner Z.S., 1992. Adsorption of copper onto goethite in aqueous systems. *Environ. Geol. Water Sci.*, 20 (3), 205-212.

Lanaras T., Moustaka M., Symeodinis L., Diamantoghou S., Karateglis S., 1993. Plant metal content, growth responses and some photosynthetic measurements on field-cultivated wheat growing on ore bodies enriched in Cu. *Physiol. Plant.*, 88, 307-314.

Lange C.R., Lambert K.E., 1994. Biomonitoring. *Water Environ. Res.*, 66 (4), 642-651.

Lawrey J.D., 1993. Lichens as monitors of pollutant elements at permanent sites in Maryland and Virginia. *The Bryologist*, 96 (3), 339-341.

Legret M., Colandini V., Demare D., Balades J.D., Madiec H., 1994. Pollution par les métaux lourds liée à l'infiltration des eaux de ruissellement urbaines dans une chaussée poreuse à structure réservoir. *Environ. Technol.*, 15, 1183-1191.

Lehtonen J., 1989. Effects of acidification on the metal levels in aquatic macrophytes in Espoo, S. Finland. *Ann. Bot. Fenn.*, 26, 39-50.

Lewis K., 1973a. The effect of suspended coal particles on the life forms of the aquatic moss *Eurhynchium riparioides* (Hedw.). I. The gametophyte plant. *Freshw. Biol.*, 3, 251-257.

Lewis K., 1973b. The effect of suspended coal particles on the life forms of the aquatic moss *Eurhynchium riparioides* (Hedw.). II. The effect on spore germination and regeneration of apical tips. *Freshw. Biol.*, 3, 391-395.

Light J.J., Lewis-Smith R.I., 1976. Deep-water bryophytes from the highest Scottish lochs. *J. Bryol.*, 9, 55-62.

Livens F.R., 1991. Chemical reactions of metals with humic material. *Environ. Pollut.*, 70, 183-208.

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.

Lopez J., Carballeira A., 1993. Interspecific differences in bioaccumulation and plant-water concentration ratios in five aquatic bryophytes. *Hydrobiol.*, 263, 95-107.

Lopez J., Vasquez M.D., Carballeira A., 1994. Stress responses and metal exchange kinetics following transplant of the aquatic moss *Fontinalis antipyretica*. *Freshw. Biol.*, 32, 185-198.

Loppi S., Chiti F., Bernadi L., 1994. Lichen monitoring of trace metals in the pistoria area (central northern Italy). *Environ. Monit. Assess.*, 29, 17-27.

Madsen T.V., Warncke E., 1983. Velocities of currents around and within submerged aquatic vegetation. *Arch. Hydrobiol.*, 97 (3), 389-394.

Madsen T.V., Enevoldsen H.O., Jorgensen T.B., 1993. Effects of water velocity on photosynthesis and dark respiration in submerged macrophytes. *Plant Cell Environ.*, 16, 317-322.

Maeda S., Mizogushi M., Ohki A., Takeshita T., 1990a. Bioaccumulation of zinc and cadmium in freshwater alga, *Chlorella vulgaris*. Part I. Toxicity and accumulation. *Chemosphere*, 21 (8), 953-963.

Maeda S., Mizogushi M., Ohki A., Inanaga J., Takeshita T., 1990b. Bioaccumulation of zinc and cadmium in freshwater alga, *Chlorella vulgaris*. Part II. Association mode of the metals and cell tissue. *Chemosphere*, 21 (8), 965-973.

Maeda S., Sakagushi T., 1990. Accumulation and detoxification of toxic metal elements by algae. *In* Introduction to applied phycology, Akatsuka (Ed.), SPB Academic Publishing BV, The Hague, The Netherlands, 109-136.

Markert B., Weckert V., 1989. Use of *Polytrichum formosum* (moss) as a passive biomonitor for heavy metal pollution (cadmium, copper, lead and zinc). *Sci. Total Environ.*, 89 (86), 289-294.

Martinez-Abaigar J., Nunez-Olivera E., Sanchez-Diaz M., 1993. Effects of organic pollution on transplanted aquatic bryophytes. *J. Bryol.*, 17, 553-566.

McLean R.O., Jones A.K., 1975. Studies of tolerance to heavy metals in the flora of the river Ystwyth and Clarach, Wales. *Freshw. Biol.*, 5, 431-444.

Meador J.P., 1991. The interaction of pH, dissolved organic carbon, and total copper in the determination of ionic copper and toxicity. *Aquat. Toxicol.*, 19, 13-32.

Meador J.P., Taub F.B., Sibley T.H., 1993. Copper dynamics and the mechanism of ecosystem level recovery in a standardized aquatic microcosm. *Ecol. Appl.*, 3, 1, 139-155.

Meharg A.A., 1993. The role of plasmalemma in metal tolerance in angiosperms. *Physiol. Plant.*, 88, 191-198.

Mersch J., 1993. Modalités d'utilisation de la moule zébrée *Dreissena polymorpha* en tant qu'indicateur biologique de la contamination des écosystèmes d'eau douce par les métaux lourds. Comparaison avec un autre type d'organismes sentinelles, les mousses aquatiques. Th. Doct. Ecotoxicol., Univ. Metz, 231 p.

Mersch J., Guérold 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.

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.

Mersch J., Pihan J.C., 1993. Simultaneous assessment of environmental impact on condition and trace metal avaibility 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.

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.

Mouvet C., 1984a. Métaux lourds et mousses aquatiques. Spéciation physico-chimique, bioaccumulation et toxicité. Th. Doct. Sc. Bot. : Univ. Liège (Belgique), 157 p.

Mouvet C., 1984b. 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.

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.

Mouvet C., 1986. Métaux lourds et mousses aquatiques; synthèse méthodologique. Rapport de contrat Lab. Ecol., Univ. Metz / Agence de l'Eau Rhin-Meuse / Agence de l'Eau Rhône-Méditerranée-Corse, 104 p.

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 (1), 77-91.

Mouvet C., 1987. Accumulation et relargage de plomb, zinc, cadmium, chrome et cuivre par des mousses aquatiques en milieu naturel et en laboratoire. Rapport de contrat Lab. Ecol., Univ. Metz / Agence de l'Eau Rhône-Méditerranée-Corse, 122 p.

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 and Soil Pollut.*, 66, 333-348.

Neubecker T.A., Allen H.E., 1983. The measurement of complexation capacity and conditional stability constants for ligands in natural waters. *Water Res.*, 17, 1-14.

Nieboer E., Richardson D.H.S., 1980. The replacement of the nondescript term heavy metals by a biologically and chemically significant classification of metal ions. *Environ. Pollut.*, B, 1, 3-26.

Odu E.A., 1978. The adaptative importance of moss rhyzoids for attachment to the substratum. *J. Bryol.*, 10, 163-181.

O'Shea T.A., Mancy K.H., 1978. The effect of pH and hardness metal ions on the competitive interaction between trace metal ions and inorganic and organic complexing agents found in natural waters. *Water Res.*, 12, 703-711.

Ouddane B., Fischer J.C., Wartel M., 1992. Statistical Evaluation of the Distribution of Trace Metals Cd, Pb, Cu, Zn and Mn in the Seine River and Estuary. *Oceanol. Acta*, 15 (4), 347-354.

Ouzounidou G., Lannoye R., Karateglis S., 1993. Photoacoustic measurements of photosynthetic activities in intact leaves under copper stress. *Plant. Sci.*, 89, 221-226.

Pentecost A., 1987. Some observations on the growth rates of mosses associated with tufa and the interpretation of some postglacial bryoliths. *J. Bryol.*, 14, 543-550.

Peñuelas J., 1984. Pigment and morphological response to emersion and immersion of some aquatic and terrestrial mosses in N.E. Spain. *J. Bryol.*, 13, 115-128.

Pettine M., Camusso M., Martinotti W., Marchetti R., Passino R., Queirazza G., 1994. Soluble and particulate metals in the Po river: factors affecting concentrations and partitioning. *Sci. Total Environ.*, 145, 243-265.

Phillips D.J.H., 1977. The use of biological indicator organisms to monitor trace metal pollution in marine and estuarine environments - a review. *Environ. Pollut.*, 13, 281-314.

Phillips D.J.H., Rainbow P.S., 1993. Biomonitoring of trace aquatic contaminants. Elsevier, London. 371 p.

Pickering D.C., Puia I.L., 1969. Mechanism for the uptake of zinc by *Fontinalis antipyretica*. *Physiol. Plant.*, 22, 653-661.

Pommery J., Imbenotte M., Erb F., 1985. Relation entre toxicité et formes libres de quelques métaux traces. *Environ. Pollut.*, B, 9, 127-136.

Poskuta J.W., 1991. Toxicity of heavy metals to growth, photosynthesis and respiration of *Chlorella pyrenoidosa* cells grown either in air or 1-percent CO_2. *Photosynthetica*, 25 (2), 181-188.

Proctor M.C.F., 1981. Physiological ecology of bryophytes. *Adv. in bryol.*, 1, 79-166.

Proctor M.C.F., 1990. The physiological basis of bryophyte production. *Bot. J. Linn. Soc.*, 104, 61-77.

Pryegiel J., Coste M., 1992. Utilisation des diatomées et des indices diatomiques pour la mesure de la qualité biologique des cours d'eau du bassin Artois-Picardie. Communication au colloque international sur les acquis de la limnologie et la gestion des systèmes continentaux. Besançon, novembre 1992.

Puls R.W., Powell R.M., Clark D., Eldred C.J., 1991. Effects of pH, solid solution ratio, ionic strength, and organic acids on Pb and Cd sorption on kaolinite. *Water Air and Soil Pollut.*, 57 (8), 423-430.

Ramade F., 1992. Précis d'écotoxicologie. Masson, Paris, 300 p.

Richardson D.H.S., 1981. The biology of moss. Blackwell, Oxford, 220 p.

Rautengarten A., 1993. Sources of heavy metal pollution in the Rhine basin. *Land Degrad. Rehabilit.*, 4, 339-349.

Ribeyre F., Boudou A., 1994. Experimental study of inorganic and methylmercury bioaccumulation by four species of freshwater rooted macrophytes from water and sediment contamination sources. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 28, 270-286.

Roeck U., Trémolières M., Exinger A., Carbiener R., 1991. Les mousses aquatiques bioindicateurs du niveau de pollution chimique. Utilisation des mousses aquatiques dans une étude sur le transfert du mercure en tant que descripteur du fonctionnement hydrologique (échanges cours d'eau-nappe) en plaine d'alsace. *Hydroécol. Appl.*, 3 (2), 241-256.

Samecka-Cymerman A., 1983. The effect of phenol on aquatic mosses *Fontinalis antipyretica* L. and *Platyhypnidium rusciforme* (Neck.) Fleisch. in cultures. *Pol. Arch. Hydrobiol.*, 30 (2), 141-147.

Samecka-Cymerman A., Kempers A.J., Bodelier P.L.E., 1991. Preliminary investigations into the background levels of various metals and boron in the aquatic liverwort *Scapania uliginosa* (Sw.) Dum. *Aquat. Bot.*, 39, 345-352.

Satake K., Miyasaka K., 1984. Evidence of high mercury accumulation in the cell wall of the liverwort *Jungermannia vulcanicola* steph. to form particles of a mercury-sulfur compound. *J. Bryol.*, 13, 101-105.

Satake K., Shibata K, Nishikawa M, Fuwa K., 1988. Copper accumulation and location in the moss *Scopelophila cataractae*. *J. Bryol.*, 15, 353-376.

Savarino J., Boutron C.F., Jaffrezo J.L., 1994. Short-term variations of Pb, Cd, Zn and Cu in recent greenland snow. *Atmospheric Environ.*, 28 (10), 1731-1737.

Say P.J., Harding P.C., Whitton B.A., 1981. Aquatic mosses as monitors of heavy metal contamination in the river Etherow, Great Britain. *Environ. Pollut.*, B, 2, 295-307.

Say P.J., Whitton B.A., 1983. Accumulation of heavy metals by aquatic mosses. 1: *Fontinalis antipyretica* hedw. *Hydrobiol.*, 100, 245-260.

Skaar H., Ophus E., Gullvag B.M., 1973. Lead accumulation within nuclei of moss leaf cells. *Nature*, 241, 215-216.

Slack N.G., 1990. Bryophytes and ecological niche theory. *Bot. J. Linn. Soc.*, 104, 187-213.

Sloof J.E., Wolterbeck B.H., 1993. Interspecies comparison of lichens as biomonitors of trace-elements air pollution. *Environ. Monit. Assess.*, 25, 149-157.

Sladecek M.W., 1973. System of water quality from the biological point of view. *Arch. Hydrobiol.*, 7, 1-218.

Smith A.J.E., 1978. The moss flora of Britain and Ireland. Cambridge Univ. Press, Cambridge, 706 p.

Sommer V.C., Winkler S., 1982. Reaktionen im gaswechsel von Fontinalis antipyretica Hedw. nach experimentellen belastungen mit schwermetallverbindungen. *Arch. Hydrobiol.*, 93, 503-524.

Spry D.J., Wiener J.G., 1991. Metal bioavailability and toxicity to fish in low-alkalinity lakes: a criterial review. *Environ. Pollut.*, 71, 243-304.

Stadler M., Schindler P.W., 1993. Modeling of H^+ and Cu^{2+} adsorption on calcium-montmorillonite. *Clays Clay Miner.*, 41 (3), 288-296.

Starodub M.E., Wong P.T.S, Mayfield C.I., 1987. Short term and long term studies on individual and combined toxicities of copper, zinc and lead to *Scenesdesmus quadricauda*. *Sci. Total Environ.*, 63, 101-110.

Steinman A.D., Boston H.L., 1993. The ecological role of aquatic bryophytes in woodland stream. *J.N. Am. Benthol. Soc.*, 12 (1), 17-26.

Steinman A.D., 1994. The influence of phosphorus enrichment on lotic bryophytes. *Freshw. Biol.*, 31, 53-63.

Steinnes E., Njåstad O., 1993. Use of mosses and lichens for regional mapping of ^{137}Cs fallout from the Chernobyl accident. *J. Environ. Radioact.*, 21, 65-73.

Steinnes E., Hanssen J.E., Rambaek J.P., Vogt N.B., 1994. Atmospheric deposition of trace elements in Norway: Temporal and spatial trends studied by moss analysis. *Water Air and Soil Pollut.*, 74, 121-140.

Suren, A.M., 1991. Bryophytes as Invertebrate Habitat in 2 New-Zealand Alpine Streams. *Freshw. Biol.*, 26 (3), 399-418.

Swedish Environmental Protection Agency, 1991. Quality criteria for lakes and watercourses. A system for classification of water chemistry and sediment and organism metal concentrations. ISBN 91-620-1107-3, 171 85, Solna, Sweden.

Tyler G., 1990. Bryophytes and heavy metals: a litterature review. *Bot. J. Linn. Soc., 104*, 231-253.

Van Cutsem P., Gillet C., 1981. A thermodynamic study of Cu++ - Zn++ ion exchange in the Nitella flexilis cell wall. *Plant and Soil*, 62, 367-375.

Van Cutsem P., Gillet C., 1982. Activity coefficients and selectivity values of Cu++, Zn++ and Ca++ ions adsorbed in the Nitella flexilis cell wall during triangular ion exchanges. *J. Exp. Bot.*, 33 (136), 847-853.

Van Daalen J., 1991. Air quality and deposition of trace elements in the province of south-holland. *Atmospheric Environ.*, 25A (3/4), 691-698.

Van den Berg C.M.G., 1991. Monitoring of Labile Copper and Zinc in Estuarine Waters Using Cathodic Stripping Chronopotentiometry. *Mar. Chem.*, 34 (3-4), 211-223.

Verneaux J., Tuffery G., 1967. Une méthode zoologique pratique de détermination de la qualité biologique des eaux courantes. Indices biotiques. *Ann. Sci. Univ. Besançon Zool.*, 79-90.

Vogel W.R., Chovanec A., 1992. Sediment analysis as a method of monitoring industrial emissions. *Hydrobiol.*, 235, 723-730.

Vray F., Baudin J.P., Svadlenkova M., 1992. Effects of some factors on uptake and release of Ru-106 by a freshwater moss, *Plathypnidium riparioides*. *Arch Environ Contam Toxicol*, 23 (2), 190-197.

Vrhovsek D., Martincic A., Kralj M., 1984. The applicability of some numerical methods and the evaluation of bryophyta indicator species for the comparison of the degree of pollution between two rivers. *Arch. Hydrobiol.*, 100 (4), 431-444.

Wachs B., 1985. Bioindicators for the heavy metal load of river ecosystems. *Symp. Biol. Hung.*, 29, 179-189.

Ward N.I., Brooks R.R., Roberts E., 1977. Heavy metals in some New Zealand bryophytes. *The Bryologist*, 80, 304-312.

Wehr J.D., 1983. Accumulation of heavy metals by aquatic bryophytes in streams and rivers in northern England. Ph. D. : Univ. Durham (Grande-Bretagne), 432 p.

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 (9), 985-992.

Wehr J.D., Whitton B.A., 1983a. Accumulation of heavy metals by aquatic mosses, 2: *Rhynchostegium riparioides*. *Hydrobiol.*, 100, 261-284.

Wehr J.D., Whitton B.A., 1983b. Accumulation of heavy metals by aquatic mosses. 3: seasonal changes. *Hydrobiol.*, 100, 285-291.

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.

Wehr J.D., Kelly M.G., Whitton B.A., 1987. Factors affecting accumulation and loss of zinc by the aquatic moss *Rhynchostegium riparioides* (Hedw.) C. Jens. *Aquat. Bot.*, 29, 261-274.

Welch R.M., 1995. Micronutrient nutrition of plants. *Crit. Rev. Plant Sci.*, 14 (1), 49-82.

Wells J.M., Brown D.H., 1987. Factors affecting the kinetics of intra- and extracellular cadmium uptake by the moss *Rhytidiadelphus squarrosus*. *New Phytol.*, 105, 123-137.

Wells J.M., Brown D.H., 1990. Ionic control of intracellular and extracellular Cd uptake by the moss *Rhytidiadelphus squarrosus* (Hedw.) Warnst. *New Phytol.*, 116, 541-553.

Winner R.W., 1985. Bioaccumulation and toxicity of copper as affected by interactions between humic acid and water hardness. *Water Res.*, 19 (4), 449-455.

Whitton B.A., Say P.J. and Wehr J.D., 1981. Use of plants to monitor heavy metals in rivers. *In* Heavy metals in Northern England: environment and biological aspects (P.J. Say & B.A. Whitton, ed), Univ. Durham Depart. Bot. (England), 135-146.

Whitton B.A., Say P.J., Jupp B.P., 1982. Accumulation of zinc, cadmium and lead by the aquatic liverwort *Scapania*. *Environ. Pollut.*, B, 3, 299-316.

Whitton B.A., 1991. Aims of monitoring. *In* B.A. Whitton, E. Rott & G. Friedrich (ed). Use of algae for monitoring rivers. Institut für Botanik, Innsbrück.

Wolf S.D., Lassiter R.R., Wooten S.E., 1991. Predicting chemical accumulation in shoots of aquatic plants. *Environ. Toxicol. Chem.*, 10, 665-680.

Annexe A
(chapitre III)

Tableau A-1: Evolution au cours du temps des concentrations en Cu dans les mousses (moyenne ± écart-type, n=3) immergées à différentes températures dans les bacs témoins et contaminés

Temps (heures)	Cu dans les mousses (µg g^{-1} p.s.)					
	Lot témoin			Lot contaminé		
	7 °C	17 °C	29 °C	7 °C	17 °C	29 °C
0	23 ± 5	23 ± 3	20 ± 3	23 ± 5	23 ± 3	20 ± 3
24	21 ± 3	18 ± 1	19 ± 2	115 ± 5	139 ± 14	106 ± 9
48	18 ± 2	19 ± 2	19 ± 1	148 ± 12	177 ± 10	144 ± 9
96	20 ± 1	20 ± 2	18 ± 1	233 ± 7	222 ± 13	195 ± 3
144	20 ± 2	18 ± 1	24 ± 4	281 ± 25	251 ± 20	235 ± 19
216	18 ± 1	18 ± 1	18 ± 3	305 ± 18	301 ± 27	303 ± 49
288	21 ± 2	19 ± 1	23 ± 2	340 ± 30	330 ± 60	310 ± 26
312		18 ± 1	19 ± 3		280 ± 33	271 ± 32
360	19 ± 3	23 ± 1	20 ± 1	254 ± 60	202 ± 17	175 ± 16
528	17 ± 5	22 ± 2	20 ± 2	175 ± 16	153 ± 10	138 ± 8

Tableau A-2: Evolution au cours du temps de l'activité photosynthétique (moyenne ± écart-type, n=3) des mousses aquatiques immergées dans les bacs témoins et contaminés à différentes températures.

Temps (heures)	Activité photosynthétique (µg L^{-1} mg^{-1} min^{-1})					
	Lot témoin			Lot contaminé		
	7 °C	17 °C	29 °C	7 °C	17 °C	29 °C
0	15.9 ± 1.6	18.7 ± 2.0	14.9 ± 3.0	-	-	-
72	12.9 ± 0.7	16.2 ± 1.5	13.2 ± 1.6	n.m.	16.3 ± 1.2	11.9 ± 1.0
144	13.7 ± 0.1	16.0 ± 2.2	10.4 ± 0.4	16.4 ± 1.8	15.9 ± 1.2	11.1 ± 3.8
216	11.8 ± 4.4	15.3 ± 2.2	10.3 ± 2.2	12.3 ± 2.2	14.2 ± 0.5	6.4 ± 0.9
288	12.6 ± 0.1	10.3 ± 2.3	6.8 ± 1.1	n.m.	11.8 ± 0.4	3.0 ± 1.2
360	10.7 ± 2.8	7.4 ± 1.3	4.4 ± 1.2	10.7 ± 1.5	9.3 ± 1.1	0.4 ± 0.5
528	10.3 ± 0.8	5.8 ± 0.9	3.9 ± 0.7	9.1 ± 1.0	8.1 ± 1.1	-1.7 ± 0.4

n.m.: non mesuré

Annexe B
(Chapitre IV)

Tableau B-1: Evolution des concentrations en Cr dans l'eau (µg L^{-1}) et les mousses (µg g^{-1}) durant la phase d'exposition selon le temps de renouvellement des bacs. Expérience en laboratoire (Chapitre IV-2).

Jours	Bac A		Bac B		Bac C	
	Eau	Mousse	Eau	Mousse	Eau	Mousse
0	-	3 ± 0	-	3 ± 0	-	3 ± 0
1	27.1	919 ± 137	24.1	528 ± 67	16.2	192 ± 17
2	24.1	1471 ± 97	23.2	833 ± 21	15.0	353 ± 9
3	23.6	2022 ± 60	22.4	1294 ± 75	15.5	546 ± 16
4	22.5	2539 ± 179	22.0	1553 ± 27	15.5	668 ± 46
5	24.9	3351 ± 180	23.6	1848 ± 133	16.3	854 ± 116
6	24.3	3573 ± 173	23.6	2337 ± 154	16.5	962 ± 129
7	24.5	4681 ± 391	22.0	2845 ± 292	14.6	1155 ± 17
8	-	5553 ± 677	-	2662 ± 166	-	1470 ± 43
9	24.9	5470 ± 627	22.4	3171 ± 251	16.0	1580 ± 59

Tableau B-2: Evolution des concentrations en Cu dans l'eau (µg L^{-1}) et les mousses (µg g^{-1}) durant la phase d'exposition selon le temps de renouvellement des bacs. Expérience en laboratoire (Chapitre IV-2).

Jours	Bac A		Bac B		Bac C	
	Eau	Mousse	Eau	Mousse	Eau	Mousse
0		9 ± 0		9 ± 0		9 ± 0
1	34.8	406 ± 53	36.8	184 ± 21	37.4	93 ± 5
2	35.7	455 ± 39	35.4	255 ± 3	38.3	160 ± 4
3	37.6	575 ± 16	38.2	349 ± 16	43.1	211 ± 3
4	37.5	632 ± 18	37.6	375 ± 20	39.2	233 ± 17
5	38.6	782 ± 24	36.8	419 ± 17	40.9	276 ± 23
6	37.8	734 ± 14	38.4	480 ± 21	40.1	274 ± 9
7	35.6	862 ± 53	37.1	516 ± 45	40.3	312 ± 13
8	-	915 ± 63	-	485 ± 16	-	354 ± 16
9	35.5	947 ± 61	35.5	564 ± 37	42.2	356 ± 10

Tableau B-3: Evolution des concentrations en Zn dans l'eau (µg L^{-1}) et les mousses (µg g^{-1}) durant la phase d'exposition selon le temps de renouvellement des bacs. Expérience en laboratoire (Chapitre IV-2).

Jours	Bac A		Bac B		Bac C	Bac C
	Eau	Mousse	Eau	Mousse	Eau	Mousse
0		442 ± 26		442 ± 26		442 ± 26
1	122	485 ± 66	119	413 ± 33	116	321 ± 27
2	113	491 ± 53	113	455 ± 78	110	377 ± 24
3	123	510 ± 20	123	438 ± 26	106	400 ± 20
4	112	518 ± 27	117	416 ± 39	109	368 ± 49
5	118	589 ± 24	114	457 ± 24	108	404 ± 51
6	144	522 ± 34	112	480 ± 27	104	360 ± 3
7	108	612 ± 35	106	442 ± 43	100	408 ± 31
8	-	607 ± 22	-	409 ± 14	-	415 ± 42
9	119	600 ± 66	105	466 ± 55	104	385 ± 35

Tableau B-4: Evolution des concentrations en Cr dans les mousses ($\mu g\ g^{-1}$) durant la phase de relargage selon le temps de renouvellement des bacs (Chapitre IV-2). Expérience en laboratoire (Lettre majuscule: bac de provenance de l'échantillon; lettre minuscule: bac dans lequel est immergé l'échantillon durant la phase de relargage).

Jours	Aa	Ab	Ac	Ba	Bb	Bc	Ca	Cb	Cc
0	5470 ± 627	-	-	3171 ± 251	-	-	1580 ± 59	-	-
1	5103 ± 686	5598 ± 260	5594 ± 174	3773 ± 462	3507 ± 27	2764 ± 124	1356 ± 201	1411 ± 294	1511 ± 123
2	5594 ± 680	-	5846 ± 662	3271 ± 188	3844 ± 340	3212 ± 179	1405 ± 74	1318 ± 286	1506 ± 16
3	6061 ± 703	4795 ± 231	6019 ± 359	3059 ± 286	3405 ± 660	2924 ± 157	1722 ± 122	1421 ± 133	1509 ± 214
4		4983 ± 540	-	2999 ± 164	3122 ± 380	3031 ± 329	1549 ± 110	1410 ± 132	1351 ± 75
6	5006 ± 215	5319 ± 197	5155 ± 359	2747 ± 238	2886 ± 382	3125 ± 230	1440 ± 112	1481 ± 260	1292 ± 188
8	5106 ± 209	5243 ± 265	4375 ± 310	2737 ± 219	2732 ± 480	2904 ± 133	1499 ± 22	1414 ± 124	1318 ± 66
10	4003 ± 222	5430 ± 1105	4785 ± 429	2855 ± 349	2405 ± 263	2723 ± 480	1397 ± 170	1374 ± 107	1246 ± 40

Tableau B-5: Evolution des concentrations en Cu dans les mousses ($\mu g\ g^{-1}$) durant la phase de relargage selon le temps de renouvellement des bacs (Chapitre IV-2). Expérience en laboratoire (Lettre majuscule: bac de provenance de l'échantillon; lettre minuscule: bac dans lequel est immergé l'échantillon durant la phase de relargage).

Jours	Aa	Ab	Ac	Ba	Bb	Bc	Ca	Cb	Cc
0	947 ± 61	-	-	564 ± 37	-	-	356 ± 10	-	-
1	762 ± 37	805 ± 11	754 ± 43	513 ± 44	507 ± 33	438 ± 10	291 ± 17	278 ± 10	293 ± 18
2	732 ± 43	743 ± 15	742 ± 37	451 ± 22	456 ± 35	412 ± 25	265 ± 9	258 ± 25	270 ± 19
3	650 ± 67	639 ± 32	732 ± 38	446 ± 24	421 ± 25	379 ± 2	272 ± 17	239 ± 24	261 ± 24
4	599 ± 54	688 ± 55	589 ± 63	372 ± 26	385 ± 12	381 ± 45	228 ± 3	218 ± 11	234 ± 15
6	542 ± 16	632 ± 43	593 ± 26	359 ± 50	320 ± 21	349 ± 17	233 ± 16	220 ± 9	212 ± 13
8	539 ± 43	570 ± 2	503 ± 4	279 ± 2	284 ± 24	287 ± 20	209 ± 10	189 ± 8	188 ± 6
10	474 ± 40	534 ± 41	464 ± 22	305 ± 7	272 ± 11	266 ± 11	204 ± 14	182 ± 4	191 ± 10

Tableau B-6: Evolution des concentrations en Zn dans les mousses ($\mu g\ g^{-1}$) durant la phase de relargage selon le temps de renouvellement des bacs (Chapitre IV-2). Expérience en laboratoire (Lettre majuscule: bac de provenance de l'échantillon; lettre minuscule: bac dans lequel est immergé l'échantillon durant la phase de relargage).

Jours	Aa	Ab	Ac	Ba	Bb	Bc	Ca	Cb	Cc
0	600 ± 66	-	-	466 ± 55	-	-	385 ± 35	-	-
1	590 ± 12	557 ± 15	487 ± 38	442 ± 52	415 ± 26	350 ± 38	305 ± 17	342 ± 32	310 ± 38
2	531 ± 43	568 ± 96	497 ± 37	392 ± 13	415 ± 5	330 ± 25	298 ± 8	310 ± 20	290 ± 57
3	509 ± 49	436 ± 33	523 ± 47	388 ± 19	427 ± 34	356 ± 13	316 ± 61	362 ± 23	330 ± 55
4	498 ± 49	474 ± 50	412 ± 38	390 ± 18	376 ± 15	355 ± 31	299 ± 15	332 ± 7	299 ± 9
6	478 ± 33	450 ± 44	464 ± 23	332 ± 18	378 ± 85	356 ± 29	272 ± 30	357 ± 25	329 ± 15
8	476 ± 48	445 ± 9	396 ± 4	325 ± 20	343 ± 4	307 ± 31	261 ± 17	354 ± 18	287 ± 35
10	441 ± 25	422 ± 33	371 ± 23	335 ± 2	387 ± 25	270 ± 14	276 ± 15	361 ± 41	295 ± 10

Tableau B-7: Evolution des concentrations en Cr total et dissous (fraction filtrée sur 0.45 µm) aux stations 1, 2, 3 et 4 sur l'Andlau (µg L^{-1}). Etude *in situ* (Chapitre IV-3).

Jours	Station1		Station 2		Station 4	
	Total	Dissous	Total	Dissous	Total	Dissous
0			-	0.7	4.4	1.0
1			4.7	0.8	1.8	< 0.2
2			9.2	0.7	1.9	-
3			7.0	0.6	4.7	0.2
4			8.5	0.7	1.1	-
5	0.3	0.2	8.3	0.7	1.3	0.2
6			3.3	0.3	1.2	0.2
7	-	-	-	-	-	-
8	< 0.2	< 0.2	4.4	0.7	1.1	< 0.2
9			2.3	0.4	0.9	0.6
10			1.7	0.4	0.8	0.4
11			2.0	0.4	1.2	0.5
12			2.7	0.6	0.9	0.3
13	< 0.2	< 0.2	3.4	0.8	0.9	0.7
14			3.1	0.8	1.0	0.8
15			2.3	0.9	0.8	0.4
16	< 0.2	< 0.2	-	-	-	-
17			2.9	0.3	1.5	0.5
18			2.5	0.3	0.9	0.5
19			3.3	0.3	0.7	0.2
20	< 0.2	< 0.2	-	0.5	3.2	1.2

Tableau B-8: Evolution des concentrations en Cr dans les mousses (moyenne ± écart-type, n = 3; µg g^{-1}) autochtones (Autocht.) et transplantées (Transpl.) aux stations 1, 2, 3 et 4 sur l'Andlau (Chapitre IV-3).

Temps d'exposition (jours)	Station 1		Station 2		Station 3		Station 4	
	Transpl.	Autocht.	Transpl.	Autocht.	Transpl.	Autocht.	Transpl.	Autocht.
0	4.6 ± 0.5	2.8 ± 0.1	4.6 ± 0.5	118.9 ± 10.8	4.6 ± 0.5	-	4.6 ± 0.5	307.8 ± 50.3
5	2.9 ± 0.3		4.3 ± 1.3		26.6 ± 2.1		50.0 ± 12.0	
8	2.3 ± 0.4		4.1 ± 0.0		38.0 ± 5.5		10.4 ± 4.3	
13	1.9 ± 0.3		4.5 ± 0.9		14.6 ± 7.6		5.4 ± 0.3	
16	1.9 ± 0.2		3.2 ± 0.4		11.1 ± 3.4		11.5 ± 0.3	
20	2.6 ± 1.1	1.4 ± 0.3	3.8 ± 0.4	67.2 ± 10.9	13.1 ± 0.1	-	24.9 ± 0.3	56.3 ± 2.9

Tableau B-9: Evolution des concentrations en Cu total et dissous (fraction filtrée sur 0.45 µm) aux stations 1, 2, 3 et 4 sur l'Andlau (µg L^{-1}). Etude *in situ* (Chapitre IV-3).

Jours	Station 1		Station 2		Station 4	
	Total	Dissous	Total	Dissous	Total	Dissous
0			59	19	42	26
1			154	23	32	18
2			152	31	61	37
3			256	11	83	8
4			32	4	9	4
5	< 10	< 10	397	61	218	89
6			262	54	58	40
7	-	-	-	-	-	-
8	< 10	< 10	76	15	16	15
9			112	34	37	32
10			91	28	27	21
11			54	19	12	9
12			93	25	25	25
13	< 10	< 10	107	18	27	16
14			96	15	29	17
15			96	24	57	35
16	< 10	< 10	175	25	65	37
17			144	26	29	18
18			63	18	12	8
19			78	24	29	17
20	< 10	< 10	54	18	20	16

Tableau B-10: Evolution des concentrations en Cu dans les mousses (moyenne ± écart-type, n = 3; µg g^{-1}) autochtones (Autocht.) et transplantées (Transpl.) aux stations 1, 2, 3 et 4 sur l'Andlau (Chapitre IV-3).

Temps d'exposition (jours)	Station 1		Station 2		Station 3		Station 4	
	Transpl.	Autocht.	Transpl.	Autocht.	Transpl.	Autocht.	Transpl.	Autocht.
0	26 ± 4	17 ± 1	26 ± 4	1158 ± 151	26 ± 4	-	26 ± 4	1608 ± 26
5	21 ± 2		153 ± 8		703 ± 74		432 ± 65	
8	17 ± 0		533 ± 21		1045 ± 39		1038 ± 43	
13	17 ± 0		734 ± 1		984 ± 116		1050 ± 39	
16	15 ± 1		611 ± 66		1157 ± 4		1313 ± 35	
20	18 ± 2	9 ± 1	852 ± 14	1217 ± 32	1233 ± 23	-	1243 ± 53	1191 ± 18

Tableau B-11: Evolution des concentrations en Zn total et dissous (fraction filtrée sur 0.45 µm) aux stations 1, 2, 3 et 4 sur l'Andlau (µg L^{-1}). Etude *in situ* (Chapitre IV-3).

Jours	Station1		Station 2		Station 4	
	Total	Dissous	Total	Dissous	Total	Dissous
0			18	18	34	13
1			18	7	32	10
2			27	8	12	8
3			140	9	60	5
4			34	16	40	15
5	< 10	< 10	93	18	105	21
6			37	11	26	14
7			-	-	-	-
8	< 10	< 10	33	16	11	9
9			20	13	13	8
10			38	21	10	8
11			21	17	9	7
12			17	9	12	6
13	< 10	< 10	33	10	13	9
14			29	6	17	7
15			28	9	22	15
16	< 10	< 10	23	8	13	11
17			54	22	8	4
18			19	10	9	7
19			27	13	11	9
20	< 10	< 10	23	14	14	9

Tableau B-12: Evolution des concentrations en Zn dans les mousses (moyenne ± écart-type, n = 3; µg g^{-1}) autochtones (Autocht.) et transplantées (Transpl.) aux stations 1, 2, 3 et 4 sur l'Andlau (Chapitre IV-3).

Temps d'exposition (jours)	Station 1		Station 2		Station 3		Station 4	
	Transpl.	Autocht.	Transpl.	Autocht.	Transpl.	Autocht.	Transpl.	Autocht.
0	159 ± 4	158 ± 2	159 ± 4	265 ± 45	159 ± 4	-	159 ± 4	129 ± 9
5	138 ± 5		179 ± 8		233 ± 15		157 ± 10	
8	139 ± 5		196 ± 9		216 ± 17		217 ± 27	
13	185 ± 10		190 ± 3		182 ± 16		193 ± 8	
16	159 ± 15		196 ± 7		218 ± 2		228 ± 11	
20	151 ± 5	167 ± 10	201 ± 2	224 ± 17	248 ± 13	-	200 ± 1	123 ± 3

Annexe C
(Chapitre V)

Tableau C-1: Concentrations en cuivre résiduel (moyenne ± écart-type; n=3) après l'application des différents traitements en absence et en présence de désorbant.

Traitement	Cu dans les mousses (µg g^{-1} p.s.)			
	Lot peu contaminé (PC)		Lot contaminé (FC)	
	Sans désorbant	Avec désorbant	Sans désorbant	Avec désorbant
A*	93 ± 11	40 ± 3	1387 ± 330	258 ± 125
B*	95 ± 8	33 ± 2	1327 ± 150	205 ± 61
C*	93 ± 11	19 ± 2	1387 ± 330	33 ± 4
D*	95 ± 8	16 ± 1	1327 ± 150	31 ± 5
E**	185 ± 50	66 ± 4	1891 ± 189	683 ± 133
F**	185 ± 50	20 ± 1	1891 ± 189	42 ± 5
G**	149 ± 25	87 ± 8	1692 ± 398	837 ± 140
H**	166 ± 19	112 ± 17	1757 ± 145	1081 ± 109
I**	185 ± 50	137 ± 9	1891 ± 189	1566 ± 181
J**	166 ± 8	139 ± 9	1794 ± 295	1449 ± 14
K**	185 ± 50	151 ± 13	1891 ± 189	1480 ± 49
L**	166 ± 8	153 ± 21	1794 ± 295	1509 ± 57

*: concentrations initiales en Cu de 109 et 1576 µg g^{-1} pour les lots PC et FC respectivement
**: concentrations initiales en Cu de 205 et 2057 µg g^{-1} pour les lots PC et FC respectivement

Tableau C-2: Evolution des concentrations en cuivre dans les mousses immergées dans le bac témoin pendant 21 jours et dans les mousses immergées pendant 21 jours dans le bac contaminé par le cuivre pendant 7 jours.

Temps d'immersion (heures)	Cu dans les mousses (µg g^{-1} p.s.)	
	Lot témoin (Moyenne ± écart-type)	Lot contaminé (Moyenne ± écart-type)
0	16 ± 1	16 ± 1
1	27 ± 2	292 ± 32
3	35 ± 3	401 ± 14
5	45 ± 8	633 ± 68
7	49 ± 3	638 ± 78
8	51 ± 10	415 ± 39
9	60 ± 3	367 ± 13
13	55 ± 5	284 ± 19
15	61 ± 10	259 ± 5
21	69 ± 6	216 ± 12

Tableau C-3 Evolution des concentrations en cuivre dans les mousses immergées dans le bac témoin pendant 35 jours et dans les mousses immergées pendant 35 jours dans le bac contaminé par le cuivre pendant 21 jours (n = 3).

Temps d'immersion (heures)	Cu dans les mousses ($\mu g\ g^{-1}$ p.s.)	
	Lot témoin (Moyenne ± écart-type)	Lot contaminé (Moyenne ± écart-type)
0	32 ± 2	32 ± 2
1	34 ± 1	147 ± 11
2	49 ± 6	285 ± 44
4	52 ± 4	366 ± 19
7	59 ± 6	471 ± 22
10	62 ± 5	584 ± 80
15	68 ± 6	677 ± 91
21	69 ± 1	725 ± 42
23	76 ± 8	536 ± 98
24	79 ± 11	499 ± 36
26	72 ± 15	486 ± 13
29	87 ± 6	353 ± 8
35	90 ± 9	293 ± 24

Tableau C-4: Evolution des concentrations résiduelles en cuivre (moyenne ± écart-type; n = 3) dans les mousses immergées 35 jours dans les bacs témoin et contaminé après les traitements de désorption en absence et en présence de 5 mM L^{-1} d'EDTA.

Temps (heures)	Cu dans les mousses ($\mu g\ g^{-1}$ p.s.)			
	Lot témoin		Lot contaminé	
	Sans EDTA	Avec EDTA	Sans EDTA	Avec EDTA
0	30 ± 3	16 ± 1	30 ± 3	16 ± 1
10	43 ± 2	21 ± 6	302 ± 38	63 ± 5
21	50 ± 1	24 ± 4	387 ± 84	101 ± 6
35	60 ± 7	31 ± 7	126 ± 28	68 ± 10

Tableau C-5: Evolution des concentrations résiduelles en cuivre (moyenne ± écart-type; n = 3) dans les mousses immergées 21 jours dans les bacs témoin et contaminé après les traitements de désorption en absence et en présence de 5 mM L^{-1} d'EDTA.

Temps (heures)	Cu dans les mousses (µg g^{-1} p.s.)			
	Lot témoin		Lot contaminé	
	Sans EDTA	Avec EDTA	Sans EDTA	Avec EDTA
0	18 ± 3	14 ± 0	18 ± 3	14 ± 0
7	34 ± 1	17 ± 2	240 ± 28	50 ± 18
21	42 ± 1	20 ± 2	86 ± 13	43 ± 2

Tableau C-6: Activité photosynthétique moyenne (n = 3) des lots de mousses immergés 35 jours dans les bacs témoin et contaminé par le cuivre, exprimée en µg CO_2 L^{-1} min^{-1} mg^{-1}

Temps d'immersion (heures)	Activité photosynthétique	
	Lot témoin (Moyenne ± écart-type)	Lot contaminé (Moyenne ± écart-type)
0	21.1 ± 1.8	21.1 ± 1.8
21	10.4 ± 1.1	14.6 ± 1.7
35	12.5 ± 4.8	13.0 ± 1.3

Tableau C-7: Activité photosynthétique moyenne (n = 3) des lots de mousses immergés 21 jours dans les bacs témoin et contaminé par le cuivre, exprimée en µg CO_2 L^{-1} min^{-1} mg^{-1}

Temps d'immersion (heures)	Activité photosynthétique	
	Lot témoin (Moyenne ± écart-type)	Lot contaminé (Moyenne ± écart-type)
0	22.2 ± 3.7	22.2 ± 3.7
7	11.8 ± 1.4	10.9 ± 2.3
21	12.5 ± 3.2	14.2 ± 0.7

Annexe D
(Chapitre VI)

Tableau D-1: Concentrations en Cu dans les mousses ($\mu g\ g^{-1}$) durant la phase d'exposition. Expérience de calibration (Chapitre VI-2).

Temps d'exposition (heures)	Concentrations d'exposition en Cu dans l'eau ($\mu g\ L^{-1}$)			
	42	82	178	340
0	27 ± 3	27 ± 3	27 ± 3	27 ± 3
5	66 ± 8	127 ± 12	206 ± 31	362 ± 118
15	110 ± 8	224 ± 11	365 ± 48	740 ± 96
24	147 ± 17	258 ± 40	443 ± 57	1018 ± 174
48	216 ± 22	359 ± 19	616 ± 42	1485 ± 165
96	273 ± 20	535 ± 32	967 ± 95	1802 ± 118
168	393 ± 28	652 ± 63	1184 ± 132	2392 ± 321

Tableau D-2: Concentrations en Cu dans les mousses ($\mu g\ g^{-1}$) préalablement exposées au Cu durant la phase de relargage. Expérience de calibration (Chapitre VI-2).

Temps d'exposition (heures)	Concentrations préalables d'exposition en Cu dans l'eau ($\mu g\ L^{-1}$)			
	42	82	178	340
0	393 ± 28	652 ± 63	1184 ± 132	2392 ± 321
6	327 ± 28	555 ± 51	983 ± 97	1808 ± 171
24	239 ± 27	465 ± 47	759 ± 72	1363 ± 156
72	224 ± 24	322 ± 27	555 ± 77	1048 ± 113
240	120 ± 10	240 ± 28	331 ± 65	723 ± 84

Tableau D-3: Concentrations en métal dans les mousses implantées dans le rejet de Cattenom (données CREUM et IPL*) et dans le module (données CREUM) (Chapitre VI-4).

Temps d'exposition (heures)	Cu dans les mousses ($\mu g\ g^{-1}$)			Zn dans les mousses ($\mu g\ g^{-1}$)		
	Module	Rejet	Rejet*	Module	Rejet	Rejet*
0	7 ± 1	7 ± 1	9	89	89	58
24	29 ± 2	33 ± 4	-	132	136	-
48	30 ± 2	44 ± 2	-	98	132	-
72	-	-	85	-	-	219
96	46 ± 3	61 ± 2	-	212	197	-
168	60 ± 7	55 ± 1	114	180	254	295
240	70 ± 4	80 ± 2	186	179	285	505

Tableau D-4: Concentrations en métal dans les mousses implantées dans le rejet de Dampierre (données CREUM et IPL*) et dans le module (données CREUM) (Chapitre VI-4).

Temps d'exposition (heures)	Cu dans les mousses ($\mu g\ g^{-1}$)			Zn dans les mousses ($\mu g\ g^{-1}$)		
	Module	Rejet	Rejet*	Module	Rejet	Rejet*
0	10 ± 1	n.d.	11	55 ± 3	n.d.	51
24	218 ± 6	n.d.	-	233 ± 10	n.d.	-
48	268 ± 9	n.d.	-	224 ± 9	n.d.	-
72	377 ± 4	n.d.	383	311 ± 12	n.d.	163
96	436 ± 13	n.d.	-	349 ± 20	n.d.	-
168	493 ± 17	n.d.	555	340 ± 26	n.d.	228
216	626 ± 26	n.d.	705	420 ± 23	n.d.	242

Tableau D-5: Concentrations en métal dans les mousses (µg g^{-1}) implantées dans le rejet de Nogent sur Seine (données CREUM et IPL*) et dans le module (données CREUM) (Chapitre VI-4).

Temps d'exposition (heures)	Cu dans les mousses (µg g^{-1})			Zn dans les mousses (µg g^{-1})		
	Module	Rejet	Rejet*	Module	Rejet	Rejet*
0	27 ± 1	n.d.	33	155 ± 2	n.d.	253
24	1437 ± 63	n.d.	-	732 ± 20	n.d.	-
48	2336 ± 55	n.d.	-	1009 ± 54	n.d.	-
72	3337 ± 122	n.d.	7100	1135 ± 77	n.d.	1700
96	3875 ± 93	n.d.	-	1220 ± 40	n.d.	-
168	4674 ± 56	n.d.	8800	1356 ± 15	n.d.	1750
240	5401 ± 335	n.d.	10500	1356 ± 89	n.d.	1900

Annexe E

Claveri B., Guérold F., Pihan J.C. (1993). Acidification des ruisseaux du massif vosgien et contamination métallique (Al, Mn, Pb, Cd). Mise en évidence dans l'eau et dans des bryophytes transplantées. *Hydroécol. appl.*, 5, 1, 111-125.

Claveri B., Morhain E., Mouvet C. (1994). A methodology for the assessment of accidental copper pollution using the aquatic moss *Rhynchostegium riparioides*. *Chemosphere*, 28, 11, 2001-2010.

Claveri B., Mouvet C. (1995). Temperature effects on copper uptake and CO_2 assimilation by the aquatic moss *Rhynchostegium riparioides*. *Arch. environ. contam. toxicol.*, 28, 3, 314-320.

Claveri B., Guérold F., Pihan J.C. (sous presse). Use of transplanted mosses and autochthonous liverworts to monitor trace metals in acidic and non-acidic headwater streams (Vosges mountains, France). *Sci. total environ.*

Mersch J., Claveri B. (sous presse). Wassermoose "Umweltproben für die Schadstoffanalytik im Biomonitoring: Standards zur Qualitäts-Sicherung bis zum Laboreingang".Klein R. & Paulus M. (Ed. Scientifiques), Gustav Fisher-Verlag, Jena (Allemagne).

Annexe F

Abstract

The widespread occurrence of aquatic bryophytes and their ability to accumulate metals make them useful as environmental monitors. The laboratory and field experiments performed in this work and the results reported in the literature enable a detailed description of the successive steps occurred during the accumulation of trace metals by the aquatic moss to be proposed.

In order to optimisized the ability of these organism to reflect the mean water contamination level, a new methodology is developed. First, a mathematical model describing the exchange process of metals between mosses and water is proposed. Based on a previous laboratory experiment, the use of the model in field experiments provides a quantitative assessment of the dissolved metal concentration in the water. Secondly, an experimental pilot, which can be used in field studies, is developed. The system provided on one hand stable and reproductible physical conditions of exposure for the moss, and on other hand, a sufficient quantity of suspended matter for the determination of the particulate matter metal contamination. The suspended matter are obtained through a decantation system from which the first objective was to protect the organisms from abrasion and siltation.

Key words : Aquatic bryophytes - Trace metals - biomonitoring - Cellular location - Current velocity - Integrative pollution methodology

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE METZ

Auteur : Bruno CLAVERI
Année : 1995

Titre : 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 (M.I.M.).

Résumé

Par leur grande capacité à accumuler les métaux, les bryophytes aquatiques fournissent une indication sur le niveau de contamination du milieu. La localisation cellulaire du métal par des méthodes chimiques et histologiques permet de décrire les différentes étapes du processus d'accumulation des métaux. Trois fractions métalliques sont ainsi distinguées correspondant à trois compartiments cellulaires. Le passage et le flux de métal d'un compartiment à l'autre dépendent de l'existence d'un gradient de concentration et sont assujettis aux mécanismes physico-chimiques et biologiques mis en jeu lors du transfert de l'élément. Si le passage du métal au travers de la membrane est effectif, il n'est pas attribué à un phénomène d'absorption actif. Une variation de la température de l'eau, facteur primordial influençant l'état physiologique de l'organisme, n'a en effet aucune conséquence sur l'accumulation du cuivre. L'étude de l'influence du régime d'écoulement de l'eau sur les cinétiques d'accumulation des métaux montrent que les bryophytes n'accumulent pas uniquement en fonction de la concentration d'exposition en métal mais aussi en fonction du flux de métal. Ce paramètre nécessite d'être pris en compte à la fois dans le schéma décrivant le mécanisme d'accumulation et dans la méthodologie.

L'optimisation de la méthode faisant appel aux bryophytes pour l'évaluation de la contamination a abouti à l'élaboration de deux outils : un modèle mathématique décrivant les échanges de cuivre à l'interface eau-bryophytes et un module expérimental exploitable *in situ*. La conception de ces deux outils offrent de nouvelles perspectives d'utilisation de cet organisme. L'emploi de ces outils sur une station d'étude fournit simultanément plusieurs informations relatives au degré de contamination du milieu.

Mots-clés : Bryophytes aquatiques - Métaux traces - traceurs - Localisation cellulaire - Vitesse du courant - Méthode d'intégration de la micropollution - Modélisation