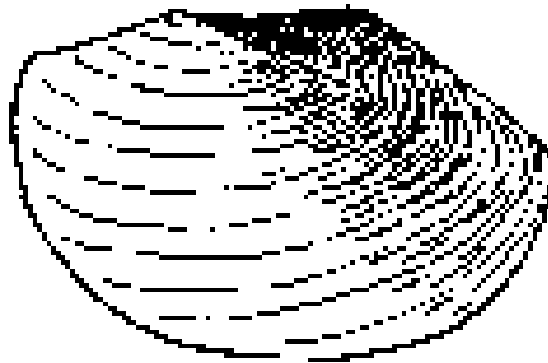


U.P.R.E.S. - E.B.S.E.  
Centre de Recherches Ecologiques  
Laboratoire d'Ecotoxicologie

Agence  
de l'eau  
Rhin - Meuse

**Etude *in situ* de la bioaccumulation de composés  
organo-halogénés chez *Anodonta cygnea* L.**



Rapport final

Juin 1998

## AVANT PROPOS

Le présent travail est le rapport définitif du contrat de recherche passé entre le Laboratoire d'Ecotoxicologie du Centre de Recherches Ecologiques de l'Université de Metz (CREUM) et l'Agence de l'Eau Rhin - Meuse. Il fait suite à l'étude : « Evaluation de la capacité bioaccumulatrice d'organismes aquatiques vis-à-vis de composés organo-halogénés » (CREUM - AERM, 1995), dont les principaux résultats ont été publiés avec l'accord de l'Agence de l'Eau Rhin - Meuse dans les revues *Chemosphere* et *AGHTM - Techniques, Sciences et Méthodes* (cf. annexes).

Le présent rapport comporte les résultats de l'étude sur l'accumulation et le relargage de composés organo-halogénés extractibles (EOX), de certains chlorophénols, ainsi que l'étude des éventuelles altérations histologiques chez le mollusque bivalve *Anodonta cygnea* L., exposé *in situ* aux effluents d'une usine de pâte à papier blanchissant au chlore. Il fait suite à trois rapports intermédiaires remis au cours des 18 mois de l'étude.

Ce travail s'inscrit dans le cadre des recherches effectuées par Frank Hayer ayant abouti à l'obtention du diplôme de docteur en sciences de l'Université de Metz le 6 Novembre 1997, et dont le titre est :

### **Estimation de la contamination du milieu aquatique par les composés organo-halogénés (AOX et EOX).**

### **Application à l'étude d'accumulation et de relargage des EOX par *Anodonta cygnea* L., exposé *in situ* aux effluents d'une usine de pâte à papier.**

Nous tenons à remercier l'Agence de l'Eau Rhin - Meuse, et plus particulièrement Monsieur Marc Babut, pour la confiance qu'il nous a témoigné au cours de ce travail.

Responsable scientifique :

**Jean Claude Pihan**, Professeur à l'Université de Metz

Etude réalisée par :

**Frank Hayer**, Docteur en sciences de la vie

Merci à Monsieur Philippe Wagner, technicien au Centre de Recherches Ecologiques de l'Université de Metz, pour son aide précieuse et efficace lors de la mise au point et de la réalisation des expérimentations sur le terrain.

Merci à Madame Mireille Ollivier, documentaliste au Centre de Recherches Ecologiques de l'Université de Metz, pour son aide dans la documentation bibliographique.

Merci à Mme. Antoinette Meyer pour la préparation des échantillons d'anodontes en vue de l'étude histologique, et à Mlle. Laure Giamberini pour son aide lors des observations microscopiques.

# SOMMAIRE

<b>1. Introduction</b>	8
<b>2. Matériel et méthodes</b>	11
<b>2.1. Présentation du matériel biologique, <i>Anodonta cygnea</i> L.</b>	11
2.1.1. Systématique - Morphologie	11
2.1.2. Répartition géographique - Habitat	12
2.1.3. Biologie - Ecologie	13
<b>2.2. Collecte, conditionnement, transfert et exposition des anodontes</b>	14
2.2.1. Collecte	14
2.2.2. Conditionnement au laboratoire	14
2.2.3. Transfert et exposition	15
<b>2.3. Présentation du site d'études</b>	16
2.3.1. L'usine de pâte à papier de Harnoncourt	16
2.3.2. Les stations d'étude	17
<b>2.4. Dosage des composés organo-halogénés</b>	19
2.4.1. Dosage des composés organo-halogénés adsorbables (AOX) dans l'eau	19
2.4.1.1. Prélèvement et traitement de l'eau	19
2.4.1.2. Adsorption et titration des composés organo-halogénés	19
2.4.2. Dosage des EOX dans les anodontes	20
2.4.2.1. Prélèvement et traitement des anodontes	20
2.4.2.2. Dissection des anodontes	21
2.4.2.3. Extraction et titration des composés organo-halogénés extractibles	21
<b>3. Etude de l'accumulation de composés organo-halogénés extractibles (EOX) dans différents organes de <i>Anodonta cygnea</i> L., exposé <i>in situ</i> aux effluents d'une usine de pâte à papier blanchissant au chlore</b>	23
<b>3.1. Protocole expérimental</b>	23
3.1.1. Collecte, conditionnement et transfert des anodontes	23
3.1.2. Prélèvement et analyse de l'eau	24
3.1.3. Prélèvement et analyse des anodontes	24
3.1.4. Etude statistique	24

<b>3.2. Résultats</b>	25
3.2.1. Résultats de l'analyse de l'eau	25
3.2.1.1. Physico-chimie de l'eau	25
3.2.1.2. Contamination de l'eau par les AOX	26
3.2.2. Résultats de l'analyse des anodontes	27
3.2.2.1. Caractéristiques morphologiques	27
3.2.2.2. Paramètres physiologiques des anodontes	28
* Mortalité	28
* Indice de condition	28
3.2.2.3. Indices organiques	29
* Pourcentage de poids sec - pourcentage de lipides	31
3.2.3. Etude de l'accumulation des EOX	34
3.2.3.1. Accumulation des EOX dans les organes de l'anodonte	34
* Les branchies	38
* Les glandes digestives	38
* Les gonades	38
3.2.3.2. Accumulation dans l'anodonte entier	43
<b>3.3. Discussion</b>	45
<b>3.4. Conclusion</b>	48
<b>3. Etude du relargage des composés organo-halogénés extractibles chez</b>	
<i>Anodonta cygnea</i>	49
<b>4.1. Protocole expérimental</b>	49
4.1.1. Collecte, conditionnement et exposition des anodontes à la station contaminée	49
4.1.2. Transfert et exposition des anodontes à la station non contaminée	50
4.1.3. Prélèvement et analyse de l'eau	50
4.1.4. Prélèvement et analyse des anodontes	50
4.1.5. Etude statistique	50
<b>4.2. Résultats</b>	51
4.2.1. Résultats de l'analyse de l'eau	51
4.2.2. Résultats de l'analyse des anodontes	52
4.2.2.1. Condition physiologique	52
* Mortalité	52
* Indice de condition	52
* Pourcentage de poids sec - pourcentage de lipides	53

4.2.2.2. Relargage des EOX	54
<b>4.3. Discussion</b>	56
<b>4.4. Conclusion</b>	58
<b>5. Etude des éventuelles altérations histologiques chez <i>Anodonta cygnea</i> L., exposé <i>in situ</i> aux effluents d'une usine de pâte à papier blanchissant au chlore</b>	59
<b>5.1. Protocole expérimental</b>	59
5.1.1. Collecte, exposition et prélèvement des anodontes	59
5.1.2. Préparation des anodontes pour les observations histologiques	60
<b>5.2. Résultats - discussion</b>	60
<b>5.3. Conclusion</b>	68
<b>6. Etude de l'accumulation de certaines molécules organo-chlorées spécifiques par <i>Anodonta cygnea</i> L., exposé <i>in situ</i> aux effluents d'une usine de pâte à papier blanchissant au chlore.</b>	69
<b>6.1. Exposition et prélèvement des anodontes</b>	69
<b>6.2. Analyse des anodontes</b>	69
<b>6.3. Résultats</b>	72
6.3.1. Etude statistique	72
6.3.2. Mortalité et paramètres physiologiques	73
* Mortalité	73
* Paramètres physiologiques	73
6.3.3. Accumulation des chlorophénols	74
<b>6.3. Discussion</b>	75
<b>6.4. Conclusion</b>	76
<b>7. Synthèse et conclusion générale</b>	77
<b>Références bibliographiques</b>	83
<b>Annexes</b>	

## Liste des tableaux

- Tableau 1 : Noms communs et scientifiques des deux espèces d'anodontes et de pseudoanodonta.
- Tableau 2 : Caractéristiques physico-chimiques (moyenne  $\pm$  écart type) de l'eau des trois stations. La significativité des différences est indiquée dans les dernières colonnes (St : station ; n.s. : différence non significative ; \* : différence significative).
- Tableau 3 : Concentrations minimales, moyennes et maximales en AOX au niveau des trois stations.
- Tableau 4 : Caractéristiques morphologiques des anodontes utilisés dans cette étude (n=180).
- Tableau 5 : Pourcentages relatifs (par rapport au poids frais total) des trois composantes principales des anodontes (n=180).
- Tableau 6 : Poids relatif des trois organes par rapport au poids frais des parties molles (n=180).
- Tableau 7 : Pourcentages moyens de poids sec et de poids de lipides dans les trois organes étudiés et les restes (n=60).
- Tableau 8 : Concentrations en EOX dans les trois types d'organes chez les anodontes témoins (moyenne  $\pm$  écart-type ; n=3)
- Tableau 9 : Concentrations en EOX dans les organes des anodontes exposés durant 91 jours à la station 2 et à la station 3.
- Tableau 10 : Facteur de bioaccumulation dans les trois organes des anodontes exposés durant 91 jours au niveau de la station 2 et de la station 3.
- Tableau 11 : Facteur de concentrations dans les anodontes ayant été exposés durant 91 jours au niveau des trois stations.
- Tableau 12 : Physico-chimie de l'eau des deux stations (\* : différence significative entre la station 1 et la station 2 ; n.s. : différence non significative).
- Tableau 13 : Mortalité des anodontes durant les deux phases d'exposition
- Tableau 14 : Evolution de l'indice de condition des anodontes.
- Tableau 15 : Evolution des différents paramètres physiologiques chez les anodontes témoins, exposés à la station 2 (durant 91 et 147 jours), et à la station 1, 42 jours après le transfert (moyenne  $\pm$  écart type).
- Tableau 16 : Concentrations en EOX chez les anodontes témoins, exposés à la station 2 (durant 91 et 147 jours), et à la station 1, 42 jours après le transfert (moyenne  $\pm$  écart type).
- Tableau 17 : Etude de la gamme de linéarité du 2,6-Dichlorophénol.
- Tableau 18 : Etude de la gamme de linéarité du Pentachlorophénol.
- Tableau 19 : Principales caractéristiques physico-chimiques des chlorophénols suivis dans cette étude (n.i. : non indiqué ; dans Suntio *et al.*, 1988).
- Tableau 20 : Mortalité observée durant les 70 jours au niveau des deux stations.
- Tableau 21 : Paramètres physiologiques (indice de condition, pourcentage de poids sec et de lipides ; n=5 pour tous ; Test T de Student au seuil de 5 % ; \* : différence significative entre le lot témoin et les lots exposés ; + : différence significative entre les lots des stations 1 et 2).
- Tableau 22 : Concentrations (en ng.g<sup>-1</sup> lipides) en chlorophénols dans les anodontes témoins et exposés (n.d. : non détecté ; n=5 pour tous ; Test T de Student au seuil de 5 % ; \* : différence significative entre le lot témoin et les lots exposés ; + : différence significative entre les lots des stations 1 et 2).

## Liste des figures

- Figure 1 : Localisation géographique des stations d'étude.
- Figure 2 : Protocole expérimental de l'étude d'accumulation d'EOX dans différents organes de *Anodonta cygnea*.
- Figure 3 : Evolution de la concentration en AOX dans l'eau des trois stations.
- Figure 4 : Evolution de l'indice de condition en fonction du temps et de la station d'exposition. Les histogrammes représentent les moyennes, les barres verticales les écart-types (n=9).

- Figure 5 : Evolution des indices organiques en fonction du temps et de la station d'exposition. Les histogrammes représentent les moyennes, les barres verticales les écart-types (n=9 pour tous).
- Figure 6a-d : Evolution du pourcentage de poids sec (/poids frais) en fonction du temps et de la station d'exposition dans les différents organes. Les histogrammes représentent les moyennes, les barres verticales les écart-types (n=3 pour tous).
- Figure 7a-d : Evolution du pourcentage de lipides (/poids sec) en fonction du temps et de la station d'exposition dans les différents organes. Les histogrammes représentent les moyennes, les barres verticales les écart-types (n=3 pour tous).
- Figure 8a-d : Evolution de la concentration en EOX ( $\mu\text{g Cl/g}$  poids frais) en fonction du temps et de la station d'exposition dans les différents organes. Les histogrammes représentent les moyennes, les barres verticales les écart-types (n=3 pour tous).
- Figure 9a-d : Evolution de la concentration en EOX ( $\mu\text{g Cl/g}$  poids sec) en fonction du temps et de la station d'exposition dans les différents organes. Les histogrammes représentent les moyennes, les barres verticales les écart-types (n=3 pour tous).
- Figure 10a-d : Evolution de la concentration en EOX ( $\mu\text{g Cl/g}$  lipides) en fonction du temps et de la station d'exposition dans les différents organes. Les histogrammes représentent les moyennes, les barres verticales les écart-types (n=3 pour tous).
- Figure 11 : Evolution des facteurs de concentration dans les trois organes en fonction du temps et de la station d'exposition des anodontes.
- Figure 12 : Comparaison des facteurs de concentrations dans les différents organes de *Anodonta cygnea* exposé durant 91 jours au niveau des trois stations (calculés à partir des concentrations en EOX exprimées par rapport au poids sec).
- Figure 13 : Evolution des concentrations en EOX dans les anodontes en fonction de la station et du temps d'exposition. Les concentrations sont recalculées à partir des concentrations dans les organes et les restes. a) en fonction du poids frais, b) en fonction du poids sec, c) en fonction des lipides.
- Figure 14 : Evolution de la concentration en EOX dans les anodontes exposés durant 147 jours au niveau de la station 2.
- Figure 15 : Protocole expérimental de l'étude de relargage d'EOX par *Anodonta cygnea*.
- Figure 16 a : Evolution du pourcentage de poids sec chez les anodontes transférés et exposés à la station 1.
- Figure 16b : Evolution du pourcentage de lipides chez les anodontes transférés et exposés à la station 1.
- Figure 17 : Evolution des concentrations en EOX dans les anodontes après transfert à la station 1. a) en fonction du poids frais, b) en fonction du poids sec, c) en fonction des lipides. Les points représentent les moyennes, les barres verticales les écart-types (n=4 pour tous). Les pointillés représentent la concentration en EOX avant le transfert à la station 2.
- Figure 18 : Droite d'étalonnage du 2,6-Dichlorophénol.
- Figure 19 : Droite d'étalonnage du Pentachlorophénol.
- Figure 20 : Synthèse des phases d'accumulation et de relargage de composés organo-halogénés extractibles par l'anodonte, *Anodonta cygnea* L., exposé à des effluents d'une usine de pâte à papier blanchissant au chlore, puis transférés au niveau d'une station non contaminée.
- Figure 21 : Schéma de synthèse hypothétique de l'accumulation et du relargage de composés organo-halogénés par *Anodonta cygnea*.

## Liste des photos

- Photo 1 : L'anodonte, *Anodonta cygnea*
- Photo 2 : Cage d'exposition (ouverte) des anodontes.
- Photo 3 : Présentation de l'usine de pâte à papier.
- Photo 4 : Branche d'*Anodonta cygnea* L., exposé en amont des rejets de l'usine de pâte à papier (grossissement x 63).

- Photo 5 : Branchie d'*Anodonta cygnea* L., exposé en amont des rejets de l'usine de pâte à papier (grossissement x 250).
- Photo 6 : Branchie d'*Anodonta cygnea* L., exposé en aval des rejets de l'usine de pâte à papier (grossissement x 63).
- Photo 7 : Branchie d'*Anodonta cygnea* L., exposé en aval des rejets de l'usine de pâte à papier (grossissement x 250).
- Photo 8 : Gonade d'*Anodonta cygnea* L. (mâle), exposé en amont des rejets de l'usine de pâte à papier (grossissement x 63).
- Photo 9 : Gonade d'*Anodonta cygnea* L. (mâle), exposé en amont des rejets de l'usine de pâte à papier (grossissement x 400).
- Photo 10 : Gonade d'*Anodonta cygnea* L. (mâle), exposé en aval des rejets de l'usine de pâte à papier (grossissement x 63).
- Photo 11 : Gonade d'*Anodonta cygnea* L. (mâle), exposé en aval des rejets de l'usine de pâte à papier (grossissement x 400).
- Photo 12 : Glande digestive d'*Anodonta cygnea* L., exposé en amont des rejets de l'usine de pâte à papier (grossissement x 63).
- Photo 13 : Glande digestive d'*Anodonta cygnea* L., exposé en amont des rejets de l'usine de pâte à papier (grossissement x 400).
- Photo 14 : Glande digestive d'*Anodonta cygnea* L., exposé en aval des rejets de l'usine de pâte à papier (grossissement x 63).
- Photo 15 : Glande digestive d'*Anodonta cygnea* L., exposé en aval des rejets de l'usine de pâte à papier (grossissement x 400).

## **Abréviations utilisées dans le texte**

AOX : composés Organo-Halogénés Adsorbables

EOX : composés Organo-Halogénés extractibles

EPKB : Effluents d'usines de Pâte à papier Kraft Blanchissant au chlore

FB : Facteur de Bioaccumulation (=Concentration dans les organismes / concentration dans l'eau)

FC : Facteur de Concentration (=Concentration dans les sédiments / concentration dans l'eau)

FP : Facteur de Pollution (=concentration station aval / concentration station amont)

2-CP : 2-Chlorophénol

3-CP : 3-Chlorophénol

4-CP : 4-Chlorophénol

2,4-DCP : 2,4-Dichlorophénol

2,6-DCP : 2,6-Dichlorophénol

2,4,6-TCP : 2,4,6-Trichlorophénol

PCP : Pentachlorophénol



## 1. Introduction

Malgré de grands efforts, notamment dans l'épuration des eaux usées, le recyclage des déchets, l'établissement de circuits fermés et la mise en œuvre de nouvelles technologies, les émissions d'Effluents d'usine de Pâte à papier Kraft Blanchissant au chlore (EPKB) comptent encore parmi les plus importantes sources de pollution anthropiques de l'écosystème aquatique (Vogel & Chovanec, 1989). A côté d'un grand nombre de paramètres physico-chimiques affectant la qualité générale de l'eau et la vie aquatique dans le milieu récepteur, les EPKB comportent un mélange complexe de composés organo-halogénés, et plus particulièrement organo-chlorés. Ces derniers proviennent essentiellement de la conservation du bois (*e.g.* 2,4,6-trichlorophénol, 2,3,4,6-tetrachlorophénol, pentachlorophénol), et du blanchiment (*e.g.* dichlorophénols, 2,4,5-trichlorophénol) de la pâte par le chlore (Herve, 1991).

Afin de résoudre les problèmes analytiques de l'identification et de la quantification individuelle de ces composés, dont seul environ 20%, représentant plus de 200 xénobiotiques halogénés différents (Suntio *et al.*, 1988) sont connus, différents paramètres de groupes ont été établis. La méthode des AOX (composés Organo-Halogénés Adsorbables), basée sur l'adsorption des composés organo-halogénés sur du charbon actif, permet ainsi de quantifier 90 à 95% des composés organo-halogénés présents dans l'eau, avec un taux de recouvrement généralement supérieur à 95 % (Stevens *et al.*, 1985). Cependant, elle ne résout pas le problème de la représentativité de l'échantillonnage, due aux fortes fluctuations des concentrations dans l'eau, et ne donne pas d'informations sur la fraction de micropolluants biodisponibles, qui est celle qui risque d'avoir des effets écotoxicologiques (Mäkelä *et al.*, 1992). L'utilisation d'organismes intégrateurs permet de pallier à ces problèmes et donne une meilleure image de l'état de santé actuel de l'écosystème.

Les mollusques aquatiques filtreurs répondent à la plupart des caractéristiques définissant un indicateur biologique selon Phillips (1977), à savoir : présenter une bonne résistance vis-à-vis de polluants ; une vie suffisamment longue pour permettre des études sur de grandes périodes ; une taille raisonnable donnant assez de tissus pour l'analyse ; être sédentaire, abondant et facile à échantillonner ; supporter des expériences en laboratoire tout en présentant une relation simple entre la concentration du polluant dans le milieu et celle accumulée dans l'organisme. Depuis le lancement du programme, *Mussel Watch*, vers le milieu des années 70 par Goldberg (1975) et son équipe (Goldberg *et al.*, 1978), visant à doser les micropolluants métalliques dans les moules marines sur les côtes nord américaines, de nombreuses études de surveillance, avec différentes espèces de mollusques bivalves, ont été réalisées, aussi bien en milieu marin (Broman *et al.*, 1991 ; Zatta *et al.*, 1992) qu'en milieu dulcicole (Léglize & Crochard, 1987 ; Kraak *et al.*, 1991 ; Mersch, 1993). L'élargissement du concept du *Mussel Watch* aux

composés organiques et organo-halogénés s'est rapidement fait vers les PCBs (Koenig & Metcalfe, 1990) et les pesticides (Metcalfé & Charlton, 1990), et plus récemment vers les effluents d'usine de pâte à papier blanchissant au chlore.

De nos jours, de nombreuses espèces d'organismes aquatiques, dont notamment les poissons (Kovacs *et al.*, 1995 ; Soimasuo *et al.*, 1995 ; Hodson *et al.*, 1996) et les mollusques aquatiques (Herve, 1991 ; Pellinen *et al.*, 1994 ; Mäkelä, 1995) sont utilisés en milieu dulcicole pour rendre compte de la pollution organo-halogénée engendrée par l'industrie papetière, et plus particulièrement par l'industrie de la pâte à papier blanchie au chlore. Cependant, en raison des grandes différences existantes dans les procédés de fabrication (essences de bois, séquences de blanchiment et formes de chlore utilisées, épuration des eaux usées), et de l'absence de protocole normalisé pour l'exposition des organismes (avec ou sans sédiments), ainsi que l'extraction et le dosage des composés organo-halogénés, les comparaisons entre les études sont souvent délicates et difficiles.

Après avoir vu l'accumulation des EOX au niveau de quatre espèces de mollusques aquatiques différents (Hayer *et al.*, 1996, publication en annexe), le bivalve *Anodonta cygnea* s'est révélé être plus intéressant que les autres espèces. En effet, en plus de sa grande résistance aux EPKB, *Anodonta cygnea* est l'espèce qui présente le plus fort taux d'accumulation de composés organo-halogénés. De plus, sa grande taille permet d'avoir assez de matière fraîche pour réaliser des analyses sur des organismes distincts, et ainsi de tenir compte de la variabilité interindividuelle ; cette caractéristique morphologique permet également de disséquer facilement les différents organes des anodontes.

Après avoir vu l'accumulation au niveau des organismes entiers (Hayer & Pihan, 1996, publication en annexe), le premier but de ce travail est d'étudier l'accumulation de composés organo-halogénés extractibles au niveau de différents organes cibles de *Anodonta cygnea*, pour mettre en évidence, le cas échéant, un organo-tropisme de ces composés. Pour cela trois organes ont été choisis : les branchies, qui par leurs fonctions dans l'alimentation et la respiration représentent le premier lieu de contact entre l'anodonte et le milieu extérieur ; la glande digestive, lieu de digestion et d'adsorption des aliments et des micropolluants associés à travers les parois du tractus digestif ; et les gonades, où l'accumulation des micropolluants peut entraîner des dérèglements pouvant mener à des problèmes de reproduction et donc de survie de l'espèce. Parallèlement, un lot d'anodontes a été exposé au niveau de la station la plus contaminée durant une période totale de 147 jours, afin de mettre en évidence un éventuel plateau d'équilibre des concentrations.

Dans la deuxième partie de ce travail, des anodontes ayant été exposés durant 147 jours au niveau de la station la plus contaminée sont transférés au niveau de la station située en amont de l'usine de pâte à papier, afin de rendre compte des effets qu'auraient une diminution, voire un arrêt, des rejets d'EPKB sur la physiologie et les concentrations en EOX dans les anodontes.

La troisième partie de ce travail est consacrée à l'étude des éventuelles altérations histologiques chez *Anodonta cygnea*, qui peuvent apparaître lors d'une exposition à moyen terme aux EPKB.

Dans la dernière partie seront présentés les premiers résultats de la quantification individuelle de certains composés organo-halogénés de la famille des chlorophénols, accumulés dans des anodontes ayant été exposés durant 42 jours aux EPKB.

## 2. Matériel et méthodes

### 2.1. Présentation du matériel biologique, *Anodonta cygnea* L.

#### 2.1.1. Systématique - Morphologie

*Anodonta cygnea* est un mollusque aquatique eulamellibranche de la classe des bivalves, famille des unionidés. Cette famille comprend trois genres principaux en Europe : *Unio*, *Anodonta* et *Pseudoanodonta*. La systématique des anodontes européens est quelque peu confuse car beaucoup d'espèces ont porté successivement différents noms (Tableau 1).

Tableau 1 : Noms communs et scientifiques des deux espèces d'anodontes et de pseudoanodonta.

<i>Anodonta cygnea</i> L.	<i>Anodonta anatina</i> L.	<i>Pseudoanodonta complanata</i> R.
<i>Mytilus cygneus</i>	<i>Mytilus anatinus</i>	<i>Pseudoanodonta minima</i>
<i>Anodonta cygneus</i>	<i>Anodonta anatinus</i>	<i>Anodonta complanata</i>
	<i>Anodonta avonesis</i>	
	<i>Anodonta intermedia</i>	
	<i>Anodonta incrassata</i>	
	<i>Anodonta piscinalis</i>	
Moule cygne	Moule canard	<i>Pseudoanodonta</i>
Swan mussel	Duck mussel	

Ainsi, environ 200 espèces ont été signalées en France, alors que seulement 16 espèces et de nombreuses sous-espèces ont été décrites en Allemagne. Même si Haas (1969) a tenté, dans un effort de simplification, de regrouper toutes les espèces au sein d'une seule, *Anodonta cygnea*, il est de nos jours généralement admis que les trois espèces, *Anodonta cygnea*, *Anodonta anatina* et *Pseudoanodonta complanata*, sont différentes et se distinguent aussi bien par leur morphologie que par leur biologie (Mäkelä, 1995). Selon Girardi & Ledoux (1989), une nouvelle espèce, *Anodonta woodiana*, provenant de l'est asiatique s'est acclimatée en Europe depuis quelques années. Dans ce travail nous adopterons la classification proposée par Adams (1960) :

Classe : Bivalves  
Famille : *Unionidae*  
Genre : *Anodonta* (Lamarck, 1799)  
Espèce : *Anodonta cygnea* (Linné, 1758),

L'anodonte, *Anodonta cygnea*, a une coquille ovale, plus ou moins allongée avec les bords supérieur et inférieur à peu près parallèles ou convexes, le bord supérieur étant plus droit que l'inférieur (Photo 1). La région antérieure est largement arrondie et assez courte, alors que la partie postérieure est généralement plus longue. Le ligament est assez long et saillant. Les sommets de la coquille sont très peu gonflés et garnis de fines rides parallèles aux stries de croissance (Adams, 1960).

Photo 1 : L'anodonte, *Anodonta cygnea*

### **2.1.2. Répartition géographique - Habitat**

Parmi les trois genres principaux d'unionidés, le genre *Anodonta* est le plus répandu sur le continent européen (Illies, 1978). On le rencontre depuis la péninsule ibérique à l'ouest jusqu'à la région caspienne à l'est, depuis l'Italie et la Grèce au sud jusqu'à la limite de la toundra au nord ; il est absent de l'Islande. L'espèce *Anodonta cygnea* est plus commune en Europe centrale alors que *Anodonta anatina* est plus abondant dans les pays scandinaves (Mäkelä, 1995). Les deux espèces sont présentes dans les cours d'eau prospectés au cours de ce travail, avec une large dominance de l'espèce *Anodonta cygnea*. *Anodonta cygnea* est abondant dans les eaux douces et légèrement saumâtres jusqu'à une salinité de 0.1 - 0.2 ‰ et une altitude de 465 mètres (Glöer et Meier-Brock, 1994). On le rencontre préférentiellement dans les eaux stagnantes telles que les lacs, les étangs et les canaux, mais aussi dans les endroits calmes des grands cours d'eau (Foulquier, 1972), peu profonds (1 à 3 mètres) et avec un lit meuble et vaseux. Les anodontes vivent plus ou moins enfoncés dans le sédiment et on ne les distingue parfois que grâce à leurs siphons ou aux traces qu'ils laissent dans le sédiment en se déplaçant.

### 2.1.3. Biologie - Ecologie

Les anodontes sont des mollusques à sexes séparés, et dans les populations naturelles le sexe ratio de 50%-50% est à peu près respecté (Heard, 1975). Les femelles pondent jusqu'à 500.000 oeufs par individu. Les oeufs, pondus en été, se développent dans des poches incubatrices des femelles, situées au niveau des lames branchiales externes. Les larves glochidies comportent une coquille triangulaire d'environ 0.35 mm et dont chaque valve est munie d'un crochet pourvu de petites épines. Après avoir été incubées pendant tout l'hiver, les larves sont expulsées au printemps suivant et se fixent au moyen d'un long filament muqueux sur des poissons. Au contact de celui-ci les larves ferment leur coquille et se fixent à l'aide des crochets dans la peau du poisson, provoquant la formation d'un kyste. Durant la vie parasitaire, dont la durée dépend de la température de l'eau (80 jours à 8-10°C, 12 jours à 20°C), les glochidies se métamorphosent puis quittent l'hôte pour vivre librement pendant le reste de leur vie (Adams, 1960).

La croissance des anodontes est continue durant leur vie, et des tailles de 200 mm et 140 mm ont été respectivement rapportées pour *Anodonta cygnea* et *Anodonta anatina* (Adams, 1960). Cependant, la croissance rapide observée durant les premières années ralentit à partir de la 4-6<sup>ème</sup> année (Hanson *et al.*, 1988). La période de croissance maximale se situe au début de l'été, avant l'émission des gamètes, et un arrêt de croissance hivernal se matérialise par un anneau plus sombre sur la coquille, servant à déterminer l'âge des individus (Pekkarinen, 1991).

Les populations naturelles d'anodontes sont composées pour plus de 60% par des individus dont la taille est supérieure à 40 mm. Selon Negus (1966), le grand nombre d'individus de taille élevée est le résultat d'une faible mortalité après la deuxième année. Cependant, la composition exacte des populations est difficile à déterminer car le nombre de jeunes est souvent sous-estimé, ceci est dû au fait qu'ils s'enfouissent profondément dans le sédiment, rendant leur échantillonnage difficile.

La densité des anodontes est variable et dépend notamment de la nature du sédiment et de l'état d'eutrophisation du milieu de prélèvement. Ainsi Englund & Heino (1994) observent des densités d'*Anodonta anatina* variant de moins d'un individu.m<sup>2</sup> à 60 individus.m<sup>2</sup> dans deux lacs de Finlande. Des dragages dans le secteur canalisé de la Moselle française ont montré des densités variant respectivement de 6 à 20 et de 6 à 13 individus.m<sup>2</sup> pour *Anodonta cygnea* et *Anodonta anatina* (Bachmann, communication personnelle).

## **2.2. Collecte, conditionnement, transfert et exposition des anodontes**

### **2.2.1. Collecte**

Les anodontes utilisés pour les différentes études du présent travail ont été prélevés au niveau du plan d'eau de la ville de Metz. Plusieurs critères de sélection ont dicté le choix de ce site de prélèvement, à savoir :

- une contamination faible du site. Etant donné que dans toutes les expériences réalisées il s'agit de surveillance active, c'est-à-dire faisant appel à un transfert d'organismes, il est important que ceux-ci proviennent d'un site présentant des concentrations en micropolluants organo-halogénés faibles, voir nulles, dans l'eau et les sédiments.
- une facilité d'accès et de prélèvement, car comme il a été décrit ci-dessus, les anodontes vivent enfoncés dans le sédiment et ne sont pas toujours faciles à voir.
- une densité élevée d'anodontes, étant donné le nombre important d'individus nécessaires pour les expériences.

Les anodontes sont prélevés à la main à une profondeur de 40 à 70 cm, en fouillant le sédiment sur une profondeur d'environ 15 cm. Ils sont soigneusement triés, en faisant bien la différence entre les deux espèces, *Anodonta cygnea* et *Anodonta anatina*, qui se ressemblent beaucoup et vivent généralement dans les mêmes biotopes. Le critère de sélection est la longueur. Seuls les individus de taille comprise entre 50 et 100 mm sont retenus afin de réduire les différences interindividuelles. Le sexe des anodontes n'est pas définissable sur les animaux vivants, mais étant donné que le sexe ratio de 50%-50% est à peu près respecté, la probabilité d'avoir autant de mâles que de femelles dans chaque prélèvement est élevée.

Les anodontes sont ramenés au laboratoire dans des glacières contenant de l'eau du site de prélèvement, aérée à l'aide d'un bulleur à piles, afin de maintenir une concentration en oxygène suffisante.

### **2.2.2. Conditionnement au laboratoire**

Au laboratoire les coquilles des anodontes sont précautionneusement nettoyées sous l'eau courante afin d'éliminer les algues et les saletés qui y sont fixées, puis rincées avec de l'eau du robinet déchlorée. Les animaux sont placés dans des bacs en plastique contenant de l'eau déchlorée par passage sur charbon actif, et aérée par bullage.

Durant cette phase de stabulation les animaux sont nourris quotidiennement avec une solution d'algues (*Chlorella vulgaris*), et tout apport de nourriture est interrompu trois jours avant le transfert sur le terrain. L'eau déchlorée est changée toutes les 12 heures afin d'éviter l'accumulation de fèces au fond des bacs. L'état de vitalité de tous les animaux est vérifié à chaque changement d'eau et les morts sont comptabilisés et retirés des bacs.

Avant chaque transfert sur le terrain, les animaux sont répartis en groupes homogènes et un lot est mis de côté pour servir de témoin.

### **2.2.3. Transfert et exposition**

Les animaux sont transportés sur le site expérimental dans des glacières contenant de l'eau déchlorée et aérée à l'aide d'un bulleur à piles. Sur le terrain, ils sont exposés dans des cages en plastique de taille 60 x 40 x 20 cm (Photo 2).

Photo 2 : Cage d'exposition (ouverte) des anodontes.

Les côtés et le couvercle des cages sont percés de trous de 2 cm de diamètre, permettant une bonne circulation de l'eau à l'intérieur de la cage, tout en évitant l'accumulation de saletés et de détritux végétaux. Une couche de 2 à 3 cm de sédiment du site d'exposition est déposée sur le fond de la cage, puis les anodontes sont placés sur celui-ci, et la cage est refermée. L'ensemble est fixé par ses deux extrémités à deux piquets métalliques, puis implanté dans le courant de la rivière à une profondeur d'environ 50 cm, correspondant à la profondeur à laquelle les mollusques ont été ramassés.



## **2.3. Présentation du site d'études**

Les différentes expériences d'accumulation et de relargage des composés organo-halogénés, ainsi que celle de l'étude histopathologique des altérations cellulaires, réalisées au cours de ce travail ont toutes eu lieu au niveau du même site d'étude, à proximité de l'usine de pâte à papier de Harnoncourt, en Belgique. L'usine, ainsi que les différentes stations d'exposition sont décrites ci-dessous.

### **2.3.1. L'usine de pâte à papier de Harnoncourt**

L'usine de pâte à papier de Harnoncourt (anciennement Cellulose des Ardennes, CdA) est la seule usine de pâte à papier chimique en Belgique (Photo 3). Mise en service en 1964, elle produisait à l'origine environ 200 tonnes de pâte à papier par jour, mais suite à une demande croissante, sa production a progressivement été augmentée, et a atteint 668 tonnes en 1989. Depuis, de nombreux investissements et l'intégration d'une papeterie ont encore augmenté sa capacité qui est actuellement de l'ordre de 300.000 tonnes de pâte par an (Goris, 1989).

Photo 3 : Présentation de l'usine de pâte à papier.

La matière première utilisée est le bois de feuillu (hêtre, charme, bouleau et chêne), poussant dans un rayon de 200 kilomètres autour de l'usine, et dont 80 % viennent de France, 12 % de Luxembourg et 8 % de Belgique.

Le bois est transformé en pâte à papier selon le procédé Kraft, ou au sulfate, puis blanchie à l'aide de chlore sous forme de  $\text{Cl}_2$  et  $\text{ClO}_2$ , suivant la séquence C/D<sub>75/25</sub> - E<sub>1</sub> - D<sub>1</sub> - E<sub>2</sub> - D<sub>2</sub>.

Les eaux résiduaires résultant de la fabrication de la pâte à papier et de son blanchiment sont traitées dans une station d'épuration propre à l'usine d'une capacité d'environ 400.000 équivalents habitants, par le procédé des boues activées, avant d'être rejetées dans la rivière Ton. Les boues de la station d'épuration sont recyclées et utilisées comme fertilisants par les agriculteurs de la région. Selon un rapport de l'usine, ces boues ne sont que faiblement contaminées par les métaux lourds (Zn : 206 ; Cu : 24 ; Mn : 425 ; Pb : 68 ; Ni : 77 ; Cd : 6 ; Hg : 2 mg, par Kg de matière sèche). D'autre part, des analyses réalisées par Greenpeace en 1989, ont montré que les boues de la station d'épuration révélaient la présence de dioxines et de furanes à raison de 20 ng.kg<sup>-1</sup>, ainsi que des polychlorophénols à des concentrations de l'ordre du µg.g<sup>-1</sup>.

Les rejets de composés organo-chlorés peuvent être évalués à partir de la quantité de chlore utilisée lors du blanchiment de la pâte à papier (Axegard, 1988). Ainsi, en 1989, l'usine utilisait 28.9 Kg de  $\text{Cl}_2$  et 15.7 Kg de  $\text{ClO}_2$ , soit 37.2 Kg de chlore élémentaire par tonne de pâte à papier. Il existe une relation linéaire entre la quantité de chlore utilisée et la quantité de composés organo-halogénés générée, du type :

$$\text{AOX} = k * (\text{Cl}_2 + (\text{ClO}^-)/2 + (\text{ClO}_2)/5)$$

où la constante k dépend de la nature du bois, et équivaut à 0.108 pour du bois de type feuillu, tel qu'il est utilisé dans l'usine. La quantité d'AOX générée est donc de :

$$\text{AOX} = 0.108 * 37.2, \text{ soit } 3.94 \text{ Kg d'AOX par tonne de pâte à papier.}$$

Avec un rendement de la station d'épuration estimé à 35% pour les composés organo-halogénés, et une production journalière de pâte à papier de 668 tonnes, les rejets en AOX dans la rivière Ton sont donc de :

$$\text{AOX} = 3.94 * 0.35 * 668, \text{ soit } 1710 \text{ Kg d'AOX par jour.}$$

Cependant, étant donné que dans la méthode des AOX on ne considère que le poids des halogènes liés organiquement, il faut multiplier cette valeur par un coefficient 'x' (en général largement supérieur à 1) pour avoir le poids total d'organo-halogénés déversé chaque jour dans le Ton.

### 2.3.2. Les stations d'étude

Trois stations ont été sélectionnées en raison de leur situation géographique vis-à-vis de l'usine de pâte à papier de Harnoncourt, Belgique (Figure 1). Elles sont situées à des endroits protégés et difficiles d'accès à des personnes étrangères au site, pour éviter les actes de vandalisme sur le matériel.

Figure 1 : Localisation géographique des stations d'étude.

**La station 1**, correspond à la station « Ton-amont » étudiée lors du suivi de la concentration en AOX dans l'eau et les sédiments. Elle est située en Belgique, sur la rive droite du Ton à environ 3 Km en amont des rejets de l'usine. A ce niveau, le Ton a une profondeur maximale de 60 cm et le substrat est formé de petits graviers et de sable avec des zones de forte sédimentation à l'abri du courant. Des herbiers sont présents au milieu de la rivière.

**La station 2**, correspond à la station « Ecouviez » étudiée lors du suivi de la concentration en AOX dans l'eau et les sédiments. Elle est située en France, sur la rive droite du Ton à environ 5 Km en aval des rejets de l'usine. Le Ton traverse ici des champs où il s'encaisse de 1 à 2 mètres ; le substrat est du même type qu'à la station 1, mais les herbiers ont totalement disparu. Le débit moyen est de l'ordre de  $4 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ .

**La station 3**, est située en France, sur la rive droite de la Chiers, environ 6 Km en aval de la confluence avec le Ton, soit environ 13 Km en aval des rejets de l'usine. La station se situe dans l'enclos de la station de pompage de la CISE ; le fond de la rivière est vaseux et le débit moyen est de l'ordre de  $16 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ .

## **2.4. Dosage des composés organo-halogénés**

### **2.4.1. Dosage des AOX dans l'eau**

La méthode de dosage des AOX dans l'eau est celle décrite par la norme DIN 38409/18 (1985). Tous les récipients utilisés sont en verre de laboratoire, préalablement lavés avec un détergent, une solution d'acide nitrique à 5%, puis rincés trois fois à l'eau déminéralisée et séchés à 60°C à l'étuve.

#### **2.4.1.1. Prélèvement et traitement de l'eau**

L'eau est prélevée dans des flacons en verre fumé de 1 litre remplis à ras bord en évitant de faire des bulles. Cette précaution permet d'éviter le dégazage de certains composés organo-halogénés volatiles, et la sous-estimation de la concentration en AOX. Sur le lieu de prélèvement, on ajoute 10 ml de solution de sulfite de sodium ( $0.2 \text{ mol.l}^{-1}$ ) à l'échantillon, afin de consommer le chlore libre éventuellement présent. L'échantillon est acidifié à un pH compris entre 1.5 à 2 avec de l'acide nitrique concentré (69%) de façon à faciliter l'adsorption ultérieure des composés organo-halogénés sur le charbon actif. L'échantillon est ramené au laboratoire dans une glacière et conservé à l'obscurité et à 4°C en chambre froide. Il est généralement analysé dans les trois jours suivant le prélèvement, mais des tests ont montré que la concentration en AOX ne diminue pas de manière significative dans les sept jours suivant le prélèvement de l'échantillon, si celui-ci est acidifié.

#### **2.4.1.2. Adsorption et titration des composés organo-halogénés**

L'adsorption des molécules organo-halogénées sur le charbon actif peut s'effectuer selon deux modes opératoires : par agitation ou par passage sur colonnes. Lors des différents dosages nous avons toujours utilisé la méthode par agitation, plus facile à mettre en œuvre que la méthode par colonnes, et également employée pour le dosage des AOX dans les sédiments lors d'études précédentes (CREUM - AERM, 1995). Chaque échantillon est divisé en deux sous-échantillons qui sont traités et titrés de manière identique.

L'échantillon est ramené à température ambiante, et 100 ml sont placés dans un erlenmeyer à col rodé auquel on ajoute 5 ml d'une solution de nitrate de sodium ( $0.2 \text{ mol.l}^{-1}$ ) et 50 mg de charbon actif (Merck, indice d'iode  $> 1050 \text{ mg.g}^{-1}$ ). L'erlenmeyer est fermé et mis à agiter sur une table d'agitation pendant au moins une heure, puis la suspension est filtrée par aspiration sur une membrane filtrante en polycarbonate (Whatman, cyclopore, faible teneur en chlorures) ayant un diamètre de pore de  $0.4 \mu\text{m}$ . Le gâteau de filtre est lavé avec 25 ml d'une solution de nitrate de sodium ( $0.04 \text{ mol.l}^{-1}$ ) afin de déplacer

les chlorures inorganiques ayant pu être adsorbés sur le charbon actif. Le filtre et le gâteau de filtre humide sont transférés dans une nacelle de quartz, puis introduits dans le tube de pyrolyse à température programmable et incinérés à 950°C sous flux d'oxygène. La durée totale d'un titrage varie de 12 à 15 minutes, selon la concentration en AOX de l'échantillon. Les résultats sont exprimés en  $\mu\text{g}$  de chlore lié organiquement par litre d'échantillon ( $\mu\text{g Cl.l}^{-1}$ ).

La limite de détection donnée par le constructeur de l'analyseur (ERALY, Noisy-le-Roi, France) est de  $2 \mu\text{g.l}^{-1}$ , soit  $0.2 \mu\text{g}$  de chlore lié organiquement par échantillon de 100 ml. Toutefois, étant donné la variabilité de la valeur propre du charbon actif et des filtres utilisés, une limite de  $5 \mu\text{g.l}^{-1}$ , soit  $0.5 \mu\text{g}$  par échantillon de 100 ml nous paraît plus correcte.

Avant chaque série de dosage, la valeur à blanc et l'efficacité d'adsorption du charbon actif sont vérifiées par le dosage d'une solution étalon de chlorophénol dans les gammes de concentration les plus fréquemment rencontrées.

#### **2.4.2. Dosage des EOX dans les anodontes**

Il n'existe pas à l'heure actuelle de méthode normalisée pour l'extraction et le dosage des composés organo-halogénés extractibles dans les échantillons biologiques. Ainsi, au cours de ce travail les procédures et techniques de préparation et d'extraction en vue du dosage des EOX ont été quelque peu affinées et améliorées. Le protocole présenté est celui qui a été le plus utilisé et qui est considéré comme le plus performant. Il est basé sur celui décrit par Martinsen *et al.* (1988), et consiste en l'extraction des composés organo-halogénés par l'utilisation de deux solvants organiques, un polaire et un apolaire.

Tous les récipients utilisés sont en verre de laboratoire, préalablement lavés avec un détergent, une solution d'acide nitrique à 5%, rincés à l'eau déminéralisée, à l'acétone et au cyclohexane avant d'être séchés à l'étuve à 60°C. Tous les produits et solvants utilisés sont de qualité "pour analyse".

##### **2.4.2.1. Prélèvement et traitement des anodontes**

Les organismes prélevés sur le terrain sont ramenés au laboratoire dans des bocaux en verre contenant de l'eau du site de prélèvement. Au laboratoire, ils sont nettoyés sous l'eau courante pour éliminer les saletés accumulées sur les coquilles, puis mis à stabuler pendant 24 heures dans de l'eau déchlorée par passage sur du charbon actif et aérée par bullage. Cette phase de stabulation permet de vider le tractus digestif, et ainsi de ne doser que les micropolluants réellement accumulés par les mollusques. Ils sont essuyés et pesés, puis leur longueur, hauteur et épaisseur sont mesurés à l'aide d'un pied à coulisse électronique.

#### 2.4.2.2. Dissection des anodontes

Les anodontes sont ouverts par dissection des muscles adducteurs antérieurs et postérieurs à l'aide d'un scalpel en inox. Pour les études sur les individus entiers, la totalité des parties molles est retirée ; pour les études sur les organes, la valve gauche est retirée, l'animal est posé sur la valve droite et les organes sont disséqués progressivement. La coquille est séchée à l'aide d'un papier essuie-tout puis pesée. Toutes les parties molles (entières ou par organes) sont pesées, puis congelées dans des tubes en polypropylène à -18°C jusqu'au moment de l'analyse. Tous les échantillons d'une même étude sont conservés au congélateur jusqu'à la fin de celle-ci, puis préparés et analysés ensemble.

#### 2.4.2.3. Extraction et titration des composés organo-halogénés

Les échantillons (organismes entiers ou organes) sont décongelés puis broyés jusqu'à obtention d'une masse homogène. Le protocole d'extraction est le même pour les individus entiers et les organes.

Une masse de 5 à 10 grammes de tissus broyés et homogénéisés est pesée précisément dans un erlenmeyer en verre à col rodé auquel on ajoute 25 ml d'acétone. L'erlenmeyer est bouché et mis à agiter pendant 15 minutes sur une table d'agitation à 400 trs.min<sup>-1</sup>. Après ajout de 25 ml de cyclohexane, l'extraction est poursuivie pendant deux heures à la même vitesse. L'extrait est transvasé dans un tube à centrifuger en verre et centrifugé pendant 15 minutes à 2 000 g.. La phase organique surnageante est prélevée à l'aide d'une pipette Pasteur à usage unique et récupérée dans un deuxième erlenmeyer. L'homogénat est extrait une seconde fois avec 25 ml de cyclohexane pendant deux heures puis centrifugé à 2 000 g pendant 15 minutes. La phase organique surnageante est prélevée et combinée à la première. Le mélange de solvant est lavé afin d'éliminer les halogénures inorganiques (Wésen 1988). Pour ce faire on ajoute 25 ml d'eau acide (pH 2, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) au mélange de solvant contenu dans l'erlenmeyer qui est mis à agiter à 400 trs.min<sup>-1</sup> pendant une heure. La phase aqueuse est éliminée à l'aide d'une pipette Pasteur à usage unique, et le lavage est recommencé deux fois. Le mélange de solvant est alors séché sur du Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhydre, purifié par calcination à 500°C pendant deux heures. L'extrait est récupéré dans un troisième erlenmeyer, et évaporé sous vide à 40°C dans un rotavapor Büchi, jusqu'à disparition complète du solvant. Les matières grasses et les molécules organo-halogénées associées sont pesées puis repris dans 1 ml de cyclohexane dans un tube en verre, qui une fois bouché est conservé au réfrigérateur à 6°C jusqu'au moment du dosage. En raison de la quantité importante de vaisselle nécessaire et de la durée totale de préparation, d'extraction, et de purification, seuls 6 échantillons peuvent être traités par jour.

Parallèlement à l'extraction, une partie de la masse homogénéisée est pesée dans une boîte de Petri tarée puis séchée à 60°C à l'étuve pour déterminer le pourcentage de poids sec de l'échantillon.

Le dosage des EOX est réalisé par injection progressive de 8 à 20  $\mu\text{l}$  de solution dans le tube de combustion maintenu à 850°C et sous flux d'oxygène, du même analyseur que pour les AOX, et dont l'injection, la combustion et le titrage sont contrôlés par ordinateur. La durée totale d'une titration varie de 5 à 10 minutes, selon la concentration en EOX de l'échantillon.

Les résultats sont donnés en  $\mu\text{g}$  de chlore lié organiquement par  $\mu\text{l}$  de solution, puis exprimés en fonction du poids frais, du poids sec ou du poids de lipides.

Des essais à blanc sont inclus dans chaque série de dosage afin d'évaluer un éventuel apport d'EOX par le matériel et les produits chimiques ainsi que d'éventuelles contaminations survenues lors des manipulations. Le titrage est vérifié par dosage d'une solution d'étalon de chlorophénol dans du cyclohexane et l'efficacité de l'extraction par ajouts d'étalons internes de pentachlorophénol.

### 3. Etude de l'accumulation de composés organo-halogénés extractibles (EOX) chez *Anodonta cygnea* L., exposé *in situ* aux effluents d'une usine de pâte à papier blanchissant au chlore.

#### 3.1. Protocole expérimental

La figure 2 résume le protocole expérimental des prélèvements d'eau et d'anodontes lors de l'étude d'accumulation des EOX chez *Anodonta cygnea* L.

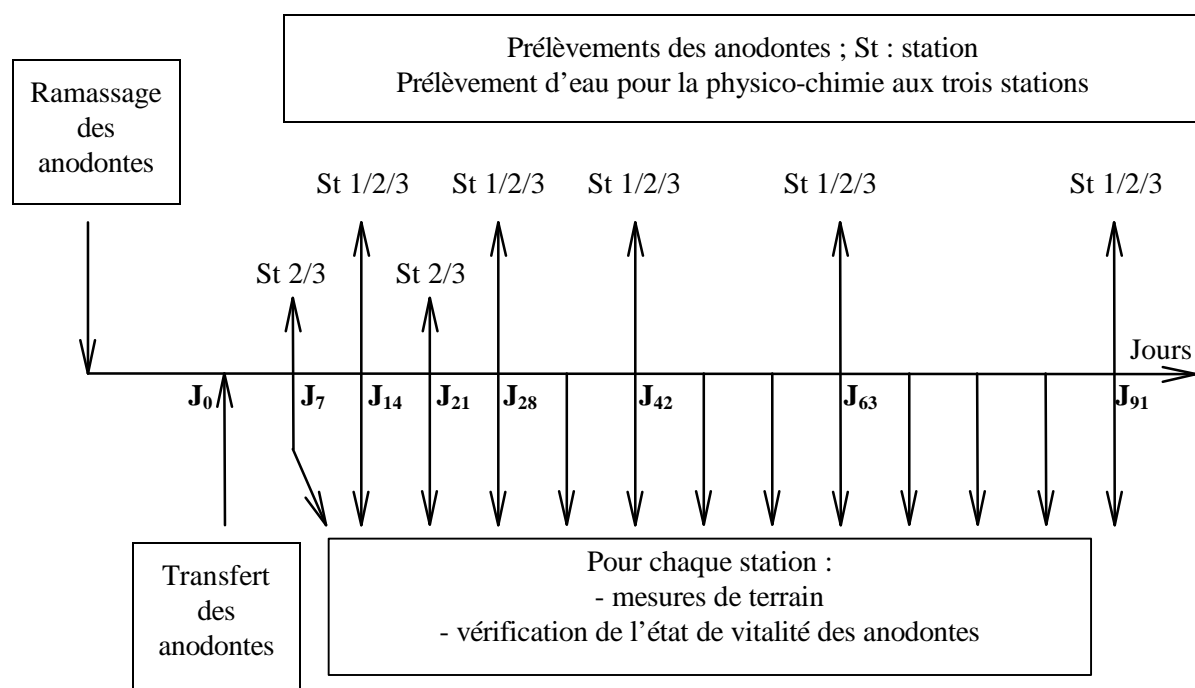


Figure 2 : Protocole expérimental de l'étude d'accumulation d'EOX dans différents organes de *Anodonta cygnea*.

#### 3.1.1. Collecte, conditionnement et transfert des anodontes

Environ 250 anodontes, de taille comprise entre 70 et 100 mm ont été ramassés dans la Moselle au niveau du plan d'eau de la ville de Metz, et ramenés au laboratoire dans des glacières contenant de l'eau du site. Au laboratoire, les anodontes sont triés selon leur longueur, et 230 individus de taille homogène (74.5 à 97.8 mm de longueur, moyenne :  $85.4 \pm 4.9$  mm) sont retenus, et conditionnés selon le protocole décrit au § 2.2., avant d'être transférés. Le nombre d'individus transférés et exposés dépend de la station :

- station 1 (amont) : 60 anodontes,
- stations 2 et 3 (aval) : 80 anodontes.



Le jour du transfert, 9 individus sont retirés, disséqués et les organes sont congelés à -18°C jusqu'au moment de l'analyse, qui a lieu pour tous les échantillons à la fin de l'étude.

### **3.1.2. Prélèvement et analyse de l'eau**

La température, la conductivité, le pH et la concentration en oxygène dissous sont mesurés une fois par semaine au niveau des trois stations. Des prélèvements d'eau pour l'analyse physico-chimiques sont effectués au niveau des trois stations, le jour du transfert des anodontes, puis après 14, 28, 42, 63 et 91 jours d'exposition.

Des préleveurs automatiques d'eau (ISCO et SIGMA), pour l'analyse des AOX (cf. § 2.4.1.), sont installés au niveau des trois stations. La fréquence de prélèvement est de un flacon par jour, rempli par trois pompages successifs, espacés de 8 heures. Les préleveurs sont vidés une fois par semaine et les flacons vides sont remplacés par des flacons propres.

### **3.1.3. Prélèvement et analyse des anodontes**

Au niveau de la station 1, les anodontes sont prélevés après 14, 28, 42, 63 et 91 jours d'exposition. Au niveau des stations 2 et 3, les prélèvements d'anodontes sont effectués après 7, 14, 21, 28, 42, 63 et 91 jours d'exposition. A chaque campagne de prélèvement, l'état de vitalité de tous les animaux est vérifié, et les individus morts sont comptabilisés et retirés des cages.

Lors de chaque prélèvement, neuf individus sont prélevés au hasard dans les cages, et ramenés au laboratoire dans des bocaux en verre contenant de l'eau de la station. Après une période de 24 heures de stabulation dans de l'eau déchlorée par passage sur du charbon actif, et aéré par bullage, les neuf anodontes sont mesurés et pesés, puis répartis en trois lots homogènes de trois individus. Les anodontes sont disséqués et le poids des branchies, des gonades, des glandes digestives, ainsi que des parties molles restantes (restes) est mesuré. Les organes identiques des trois individus de chaque lot sont mélangés et congelés à -18°C dans des tubes en polypropylène, et conservés jusqu'au moment de l'analyse. A la fin de l'étude, les échantillons sont décongelés, puis préparés et titrés selon le protocole décrit au § 2.4.2.

### **3.1.4. Etude statistique**

Les résultats physico-chimiques et les concentrations en AOX dans l'eau des trois stations sont comparés à l'aide du test T de Student, au seuil de 0.05. L'homogénéité des caractéristiques morphologiques des anodontes, les paramètres physiologiques et les concentrations en EOX dans les différents organes et les anodontes entiers sont comparés à l'aide d'une analyse de variance, suivi d'une comparaison multiple par la méthode H.S.D. de Tuckey et par le test T de Student au seuil de 0.05.

## 3.2. Résultats

### 3.2.1. Résultats de l'analyse de l'eau

#### 3.2.1.1. Physico-chimie de l'eau

Le tableau 2 regroupe les principales caractéristiques physico-chimiques de l'eau du Ton et de la Chiers au niveau des trois stations d'étude. Comme lors des études précédente (CREUM-AERM, 1995), la qualité générale de l'eau du Ton se dégrade fortement en aval des rejets de l'usine de pâte à papier, se traduisant notamment par une augmentation de la conductivité, essentiellement due à l'augmentation des concentrations en  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{Na}^+$  et  $\text{Ca}^{2+}$ , provenant du blanchiment (Cl) et des circuits annexes (chaux et liqueur blanche) de l'usine. La température moyenne augmente de  $5.2^\circ\text{C}$  directement à l'aval des rejets, et même 13 km à l'aval, elle est encore supérieure de  $1.6^\circ\text{C}$  par rapport à la station amont.

Tableau 2 : Caractéristiques physico-chimiques (moyenne  $\pm$  écart type) de l'eau des trois stations. La significativité des différence est indiqué dans les dernières colonnes (St : station ; n.s. : différence non significative ; \* : différence significative).

Paramètre	Unité	Station 1	Station 2	Station 3	n	St <sub>1/2</sub>	St <sub>1/3</sub>	St <sub>2/3</sub>
<b>pH</b>		8.1 $\pm$ 0.1	8.0 $\pm$ 0.1	8.1 $\pm$ 0.1	14	*	n.s.	*
<b>Conductivité</b>	$\mu\text{S.cm}^{-1}$	379 $\pm$ 10	651 $\pm$ 59	621 $\pm$ 43	14	*	*	n.s.
<b>Température</b>	$^\circ\text{C}$	5.0 $\pm$ 1.6	10.2 $\pm$ 1.5	6.6 $\pm$ 1.8	14	*	*	*
<b>Oxygène dissous</b>	$\text{mg.l}^{-1}$	9.6 $\pm$ 1.0	8.4 $\pm$ 0.9	9.2 $\pm$ 0.9	14	*	n.s.	*
<b>M.E.S.</b>	$\text{mg.l}^{-1}$	6.0 $\pm$ 1.3	21.2 $\pm$ 9.9	11.5 $\pm$ 4.1	6	*	*	n.s.
<b>DCO</b>	$\text{mg.l}^{-1}$	12.3 $\pm$ 2.8	33.2 $\pm$ 5.3	21.7 $\pm$ 2.7	6	*	*	*
<b>Cl<sup>-</sup></b>	$\text{mg.l}^{-1}$	15.4 $\pm$ 3.6	47.2 $\pm$ 12.9	40.5 $\pm$ 11.3	6	*	*	n.s.
<b>F<sup>-</sup></b>	$\text{mg.l}^{-1}$	0.1 $\pm$ 0.0	0.2 $\pm$ 0.0	0.2 $\pm$ 0.0	6	n.s.	*	*
<b>Br<sup>-</sup></b>	$\text{mg.l}^{-1}$	0.0 $\pm$ 0.0	2.9 $\pm$ 2.2	0.9 $\pm$ 1.3	6	*	n.s.	n.s.
<b>K<sup>+</sup></b>	$\text{mg.l}^{-1}$	2.4 $\pm$ 0.1	5.1 $\pm$ 0.6	5.4 $\pm$ 0.3	6	*	*	n.s.
<b>Na<sup>+</sup></b>	$\text{mg.l}^{-1}$	7.4 $\pm$ 1.4	61.2 $\pm$ 15.7	38.3 $\pm$ 5.5	6	*	*	*
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	$\text{mg.l}^{-1}$	86.1 $\pm$ 3.3	100.7 $\pm$ 8.7	110.9 $\pm$ 2.8	6	*	*	*
<b>Mg<sup>2+</sup></b>	$\text{mg.l}^{-1}$	3.4 $\pm$ 0.2	3.4 $\pm$ 0.2	4.4 $\pm$ 0.3	6	n.s.	*	*
<b>N Total</b>	$\text{mg.l}^{-1}$	0.36 $\pm$ 0.01	0.60 $\pm$ 0.04	0.57 $\pm$ 0.04	6	*	*	n.s.
<b>P Total</b>	$\text{mg.l}^{-1}$	0.16 $\pm$ 0.01	0.20 $\pm$ 0.02	0.23 $\pm$ 0.02	6	*	*	*
<b>SO<sub>4</sub><sup>2-</sup></b>	$\text{mg.l}^{-1}$	29.1 $\pm$ 3.1	102.6 $\pm$ 31.0	89.5 $\pm$ 15.2	6	*	*	n.s.

Parallèlement on constate une diminution de la concentration en oxygène dissous, et une augmentation des concentrations en éléments nutritifs (N et P total), des matières en suspension et de la demande chimique en oxygène (DCO). Mis à part pour les fluorures et le magnésium, tous les paramètres sont significativement différents entre la station 1 et la station 2. Après confluence avec la Chiers, la qualité de l'eau s'améliore quelque peu mais la plus part des paramètres mesurés à la station 3 sont toujours significativement différents de ceux mesurés en amont. Il en est de même entre la station 2 et la station 3.

### 3.2.1.2. Contamination de l'eau par les AOX

La figure 3 montre l'évolution des concentrations en AOX dans l'eau des trois stations. En raison des températures extrêmement froides, les préleveurs automatiques d'eau n'ont pas pu être utilisés lors des 15 derniers jours de l'étude. En effet, lors des prélèvements, l'eau a gelé dans les tuyaux, empêchant le pompage. Durant cette période, des prélèvements ponctuels hebdomadaires sont réalisés aux trois stations.

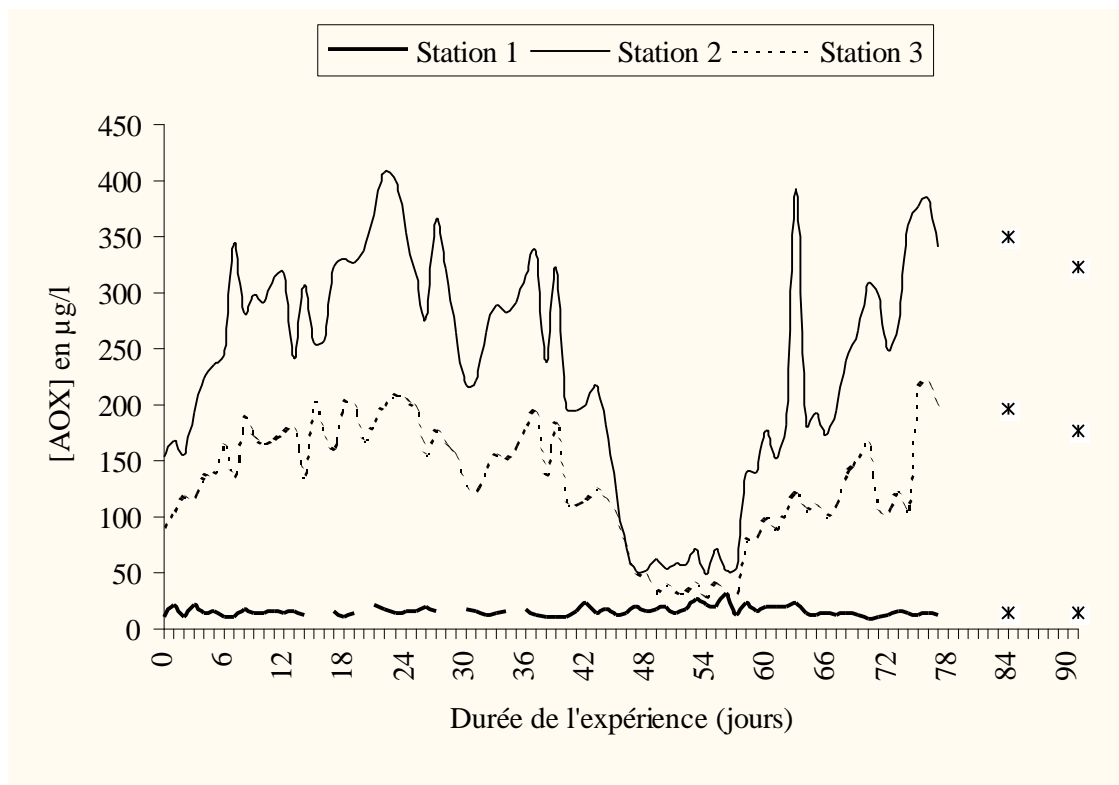


Figure 3 : Evolution de la concentration en AOX dans l'eau des trois stations.

Les concentrations en AOX dans l'eau de la station 1 sont faibles et varient peu au cours de 91 jours de l'étude (Tableau 3). Au niveau de la station 2, les concentrations en AOX augmentent fortement, et la moyenne est multipliée par un facteur x 16 par rapport à la station 1. De même, au

niveau de la station 3, la concentration moyenne en AOX est multipliée par un facteur x 9 par rapport à la station 1. Contrairement à la station 1, les concentrations fluctuent fortement au cours du temps, au niveau des deux stations aval, avec notamment une période de faibles concentrations entre le 46<sup>ème</sup> et le 57<sup>ème</sup> jour d'exposition, correspondant à un arrêt provisoire de l'usine durant les vacances de Noël.

Tableau 3 : Concentrations minimales, moyennes et maximales en AOX au niveau des trois stations.

[AOX] µg Cl.l <sup>-1</sup>	Station 1	Station 2	Station 3
<b>Moyenne</b>	14.8	234.7	132.5
<b>Ecart type</b>	4.1	101.6	52.6
<b>N</b>	74	80	80
<b>Coefficient de variation</b>	27.7 %	43.3 %	39.7 %
<b>Minimum</b>	9.6	48.1	27.5
<b>Maximum</b>	31.3	408.0	219.5

### 3.2.2. Résultats de l'analyse des anodontes

#### 3.2.2.1. Caractéristiques morphologiques

Tous les anodontes utilisés dans ce travail ont été sélectionnés selon leur taille, et plus particulièrement selon la longueur de leur coquille. Les 20 lots de 9 anodontes (1 lot témoin, 5 lots amont et 2 x 7 lots aval) ne présentent pas de différences significatives de leur longueur, ni de leur hauteur, ni de leur épaisseur. Cependant, malgré une taille homogène (tableau 4), le poids frais total des anodontes varie plus fortement (coefficient de variation > 20%), et présente des différences significatives entre certains lots.

Tableau 4 : Caractéristiques morphologiques des anodontes utilisés dans cette étude (n=180).

		Moyenne	Ecart type	C.V. (%)	Minimum	Maximum
<b>Longueur</b>	mm	85.4	4.9	5.7	74.5	97.8
<b>Hauteur</b>	mm	50.3	2.8	5.6	44.8	58.6
<b>Épaisseur</b>	mm	30.0	2.5	8.3	24.1	36.4
<b>Poids frais total</b>	g	54.0	11.1	20.6	32.9	86.5

Lorsque l'on considère les trois composantes principales des anodontes, à savoir la coquille, les parties molles et les liquides internes, il apparaît que les fortes variations du poids frais total sont essentiellement dues aux différences dans le poids des liquides internes (tableau 5). Cependant, aucune différence statistiquement significative est observée entre les 20 lots, ni pour le poids de la coquille, ni pour le poids des parties molles, ni pour le poids des liquides internes.

Tableau 5 : Pourcentages relatifs (par rapport au poids frais total) des trois composantes principales des anodontes (n=180).

<b>% du poids frais total</b>	<b>Moyenne</b>	<b>Ecart type</b>	<b>C.V. (%)</b>	<b>Minimum</b>	<b>Maximum</b>
<b>Coquille</b>	42.9	4.8	11.2	31.0	55.3
<b>Parties molles</b>	25.4	3.6	14.2	17.7	34.7
<b>Liquides internes</b>	31.7	6.8	21.4	14.4	50.2

### 3.2.2.2. Paramètres physiologiques des anodontes

#### \* Mortalité

La mortalité est restée faible durant les 91 jours d'exposition des anodontes, et ce au niveau des trois stations :

- station 1 : 0 morts,
- station 2 : 3 morts, respectivement le 28<sup>ème</sup>, 42<sup>ème</sup> et 63<sup>ème</sup> jour d'exposition,
- station 3 : 2 morts, respectivement le 14<sup>ème</sup> et le 42<sup>ème</sup> jour d'exposition.

La mortalité totale est donc de respectivement 3.8 et 2.5 % à la station 2 et à la station 3.

#### \* Indice de condition

Afin de rendre compte de l'état physiologique des anodontes, nous avons utilisé l'indice de condition (IC), décrit par Haukioja & Hakala (1978), défini par :

$$IC = \frac{\text{Poids frais des parties molles (g)}}{\text{Longueur coquille}^3 \text{ (cm)}} \times 100$$

La figure 4 montre l'évolution de l'indice de condition moyen chez les anodontes témoins et exposés au niveau des trois stations. Globalement on constate que pour presque tous les anodontes exposés l'indice de condition est légèrement différent de celui des anodontes témoins. Cependant, aucune différence statistiquement significative n'existe entre les différents lots.

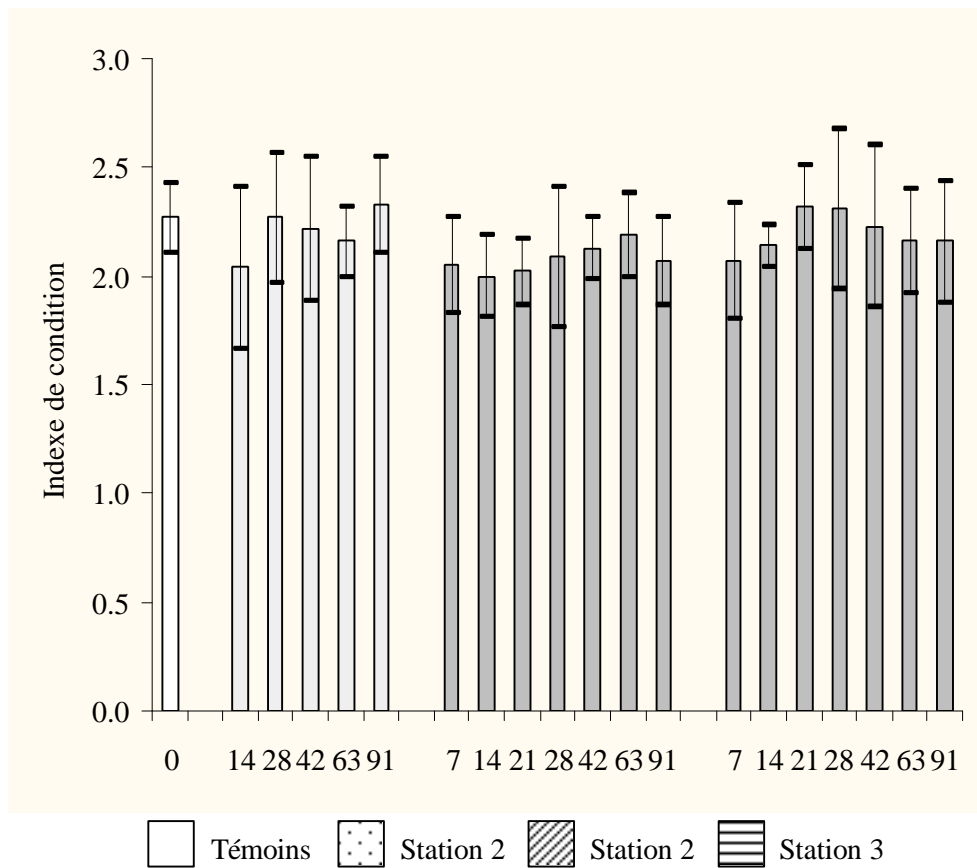


Figure 4 : Evolution de l'indice de condition en fonction du temps et de la station d'exposition. Les histogrammes représentent les moyennes, les barres verticales les écart-types (n=9).

### 3.2.2.3. Indice organiques

Les indices de branchies, de glandes digestives et de gonades représentent la part relative du poids de ces différents organes par rapport au poids frais total des parties molles. Au niveau des branchies (figure 5a), on observe peu de variations au cours du temps et entre les stations, et aucun lot ne diffère significativement d'un autre. La part relative du poids des gonades est plus élevée chez les anodonte exposés que chez les anodonte témoins (figure 5b), sans pour autant que ces différences ne soient significatives. Seul l'indices de glandes digestives présente des différences significatives entre les anodonte témoins et ceux exposés durant les premiers jours au niveau des deux stations aval (figure 5c). Cependant, au cours des 91 jours de l'étude, l'indice de glande digestive diminue au niveau de ces deux stations et les valeurs finales ne sont plus significativement différentes de celles des témoins.

Le poids des trois organes représente à peu près trois parts égales par rapport au poids frais total des parties molles, avec respectivement 13 % pour les glandes digestives, 14.6 % pour les branchies et 14.8 % pour les gonades (tableau 6).



Tableau 6 : Poids relatif des trois organes par rapport au poids frais des parties molles (n=180).

<b>% du poids des parties molles</b>	<b>Moyenne</b>	<b>Ecart type</b>	<b>C.V. (%)</b>	<b>Minimum</b>	<b>Maximum</b>
<b>Branchies</b>	14.6	2.5	17.1	7.5	22.0
<b>Glandes digestives</b>	13.0	2.3	17.7	7.8	20.2
<b>Gonades</b>	14.8	2.4	16.2	8.1	22.7

\* Pourcentage de poids sec - pourcentage de lipides

Le pourcentage de poids sec moyen des branchies des anodontes exposés est plus faible que celui mesuré dans les témoins, et varie légèrement au cours du temps et en fonction des stations d'exposition (figure 6a). Cependant, aucune des différences observées n'est statistiquement significative. Il en est de même au niveau des gonades (figure 6b), où les variations au cours du temps et entre les stations sont également faibles, et restent généralement non significatives. Le pourcentage de poids sec des glandes digestives (figure 6c) et des restes (figure 6d) est stable au cours de l'exposition, et ne présente pas de différences significatives entre les témoins et les exposés.

Le pourcentage de lipides, exprimé par rapport au poids sec, varie faiblement dans les branchies (figure 7a) et les gonades (figure 7b), au cours de l'exposition, aussi bien au niveau de la station amont que des deux stations aval. Il varie plus fortement dans les glandes digestives (figure 7c), mais pour les trois organes, aucune différence statistiquement significative n'est observée, ni au cours du temps, ni entre les stations.

Le pourcentage de poids sec moyen est significativement différent dans les trois organes, ainsi que dans les restes, avec un maximum dans les branchies et un minimum dans les restes (tableau 7). Le pourcentage de lipides moyen est significativement différent dans les trois organes, avec un minimum dans les branchies et un maximum dans les glandes digestives.

Tableau 7 : Pourcentages moyens de poids sec et de poids de lipides dans les trois organes étudiés et les restes (n=60).

	<b>% poids sec/poids frais</b>	<b>% lipides/poids sec</b>
<b>Branchies</b>	16.7 ± 3.6	4.7 ± 1.3
<b>Gonades</b>	13.3 ± 2.3	6.1 ± 1.5
<b>Glandes digestives</b>	10.7 ± 1.6	12.1 ± 2.5
<b>Restes</b>	9.5 ± 1.2	4.7 ± 0.5







Ces différences entre les organes, essentiellement dans le pourcentage de lipides, sont importantes à signaler, car elles influencent directement la quantité de composés organo-halogénés lipophiles bioaccumulables dans les matières grasses au niveau de ces organes.

### 3.2.3. Etude de l'accumulation des EOX

#### 3.2.3.1. Accumulation des EOX dans les organes de l'anodonte

Les concentrations en EOX dans les différents organes et les restes sont exprimés en fonction du poids frais (figure 8), en fonction du poids sec (figure 9) et en fonction du poids de lipides (figure 10).

Les anodontes témoins prélevés dans la Moselle au niveau du plan d'eau de la ville de Metz présentent déjà des concentrations en EOX non négligeables dans les trois organes étudiés (tableau 8). Lorsque ces concentrations sont exprimées par rapport au poids frais, elles ne diffèrent pas de manière significative entre les organes. En revanche, des différences significatives apparaissent lorsqu'elles sont exprimées par rapport au poids sec et au poids de lipides, en raison des différences dans les paramètres physiologiques constatés auparavant (pourcentage de poids sec et pourcentage de lipides).

Tableau 8 : Concentrations en EOX dans les trois types d'organes chez les anodontes témoins (moyenne  $\pm$  écart-type ; n=3)

	[EOX] $\mu\text{g Cl.g}^{-1}$ poids frais	[EOX] $\mu\text{g Cl.g}^{-1}$ poids sec	[EOX] $\mu\text{g Cl.g}^{-1}$ lipides
<b>Branchies</b>	1.5 $\pm$ 0.3	7.6 $\pm$ 0.7	238.8 $\pm$ 12.5
<b>Gonades</b>	2.1 $\pm$ 0.2	13.0 $\pm$ 2.0	298.5 $\pm$ 10.4
<b>Glandes digestives</b>	2.1 $\pm$ 0.2	19.6 $\pm$ 1.3	176.2 $\pm$ 20.0

Chez les anodontes exposés au niveau de la station 1, située en amont des rejets de l'usine de pâte à papier, les concentrations en EOX varient peu dans les trois organes. L'analyse de variance ne montre pas de différences significatives dans les gonades et les glandes digestives, entre les anodontes témoins et exposés. Au niveau des branchies, quelques différences apparaissent, sans pour autant que l'on puisse définir une tendance à la hausse ou à la baisse.

Au niveau des stations 2 et 3, situées en aval des rejets de l'usine, les concentrations en EOX augmentent progressivement dans les trois organes de *Anodonta cygnea*. Cependant, les vitesses d'accumulation et les taux d'accumulation ne sont pas les mêmes selon l'organe et la station considérée.







#### \* Les branchies

Dans les branchies, l'accumulation des EOX se fait rapidement durant les premiers jours, et les concentrations mesurées dans les anodontes des stations 2 et 3 sont significativement différentes de celles des témoins dès le 7<sup>ème</sup> jour d'exposition. L'accumulation d'EOX se fait progressivement au niveau des deux stations et tend à se stabiliser à partir du 63<sup>ème</sup> jour d'exposition, étant donné que les concentrations mesurées le 63<sup>ème</sup> et le 91<sup>ème</sup> jour ne diffèrent pas de manière significative à la station 2. Une brusque diminution du pourcentage de lipides dans les branchies des anodontes de la station 3, fait qu'au niveau de cette station la différence entre les prélèvements de ces deux dates est significative lorsque les concentrations sont exprimées par rapport aux lipides. Cependant, cette différence n'est pas significative lorsque les concentrations sont exprimées par rapport au poids sec.

#### \* Les glandes digestives

Dans les glandes digestives, l'accumulation des EOX se fait de manière plus progressive au cours du temps. Les concentrations mesurées dans les anodontes exposés sont significativement différentes de celles des témoins dès le 7<sup>ème</sup> jour au niveau de la station 2, et à partir du 14<sup>ème</sup> jour au niveau de la station 3. Au niveau de la station 2, elles augmentent alors plus rapidement que dans les branchies. A partir du 42<sup>ème</sup> jour les concentrations se stabilisent et ne diffèrent pas significativement de celles mesurées après 63 et 91 jours d'exposition. Au niveau de la station 3, l'accumulation se fait moins rapidement qu'au niveau de la station 2, et les concentrations ne se stabilisent qu'à partir du 63<sup>ème</sup> jour.

#### \* Les gonades

Dans les gonades, l'accumulation d'EOX se fait de manière beaucoup moins constante que dans les branchies et les glandes digestives. Les concentrations ne deviennent significativement différentes de celles des témoins que après, respectivement 21 et 28 jours d'exposition à la station 2 et à la station 3. Elles tendent à se stabiliser en fin d'exposition, et les concentrations mesurées après 63 jours ne diffèrent pas de manière significative de celle mesurées après 91 jours, ni à la station 2, ni à la station 3.

Le tableau 9 récapitulent les concentrations finales en EOX mesurées dans les trois organes des anodontes exposés au niveau des stations 2 et 3.

Tableau 9 : Concentrations en EOX dans les organes des anodontes exposés durant 91 jours à la station 2 et à la station 3.

	[EOX] µg Cl.g-1 poids frais	[EOX] µg Cl.g-1 poids sec	[EOX] µg Cl.g-1 lipides
<b>Station 2</b>			
<b>Branchies</b>	8.3 ± 0.8	46.5 ± 1.1	947.9 ± 137.5
<b>Gonades</b>	7.4 ± 1.4	65.4 ± 16.5	912.4 ± 213.7
<b>Glandes digestives</b>	15.4 ± 0.7	145.9 ± 9.3	1061.0 ± 100.2
<b>Station 3</b>			
<b>Branchies</b>	6.5 ± 0.2	36.3 ± 1.7	1165.3 ± 85.8
<b>Gonades</b>	5.3 ± 1.0	45.4 ± 16.5	755.8 ± 146.0
<b>Glandes digestives</b>	8.5 ± 0.5	100.8 ± 12.8	777.5 ± 33.2

Le calcul du facteur de pollution ([EOX] dans les organes des anodontes exposés / [EOX] dans les organes des anodontes témoins) permet de suivre le taux d'accumulation d'EOX dans les différents organes en fonction du temps et de la station.

En raison des variations plus importantes dans le pourcentage de lipides dans les glandes digestives (cf paramètres physiologiques), nous ne représenterons ici que l'évolution du facteur de concentration calculé en fonction du poids sec (figure 11). Au niveau de la station 2, située sur la rivière Ton en aval des rejets de l'usine, l'accumulation d'EOX se fait rapidement dans les branchies durant les 7 premiers jours d'exposition, augmentant d'un facteur x2.6, puis ralentie légèrement, et se stabilise à partir du 63<sup>ème</sup> jour. Après 91 jours d'exposition, le facteur de concentration dans les branchies est de respectivement x6.1 et x4.8, à la station 2 et à la station 3. En revanche, au niveau des glandes digestives, l'accumulation d'EOX se fait plus lentement durant la première semaine (x1.7), puis augmente fortement à partir du 21<sup>ème</sup> jour, et ce jusqu'au 42<sup>ème</sup> jour d'exposition, où elle commence à se stabiliser. A la fin de l'étude, le facteur de concentration dans les glandes digestives est de respectivement x7.4 et x5.1 à la station 2 et à la station 3. Dans les gonades, l'augmentation est beaucoup plus lente et irrégulière. Au bout de 21 jours d'exposition le facteur de pollution n'est que de respectivement x1.8 et x1.2 au niveau des stations 2 et 3.

Le calcul du facteur de concentration en fonction du poids sec après 91 jours d'exposition, résume l'accumulation d'EOX dans les trois organes étudiés. Il apparaît que les glandes digestives accumulent plus que les branchies, elles même accumulant plus que les gonades (figure 12). De plus, l'accumulation d'EOX dans les différents organes est nettement plus importante au niveau de la station 2 qu'au niveau de la station 3.





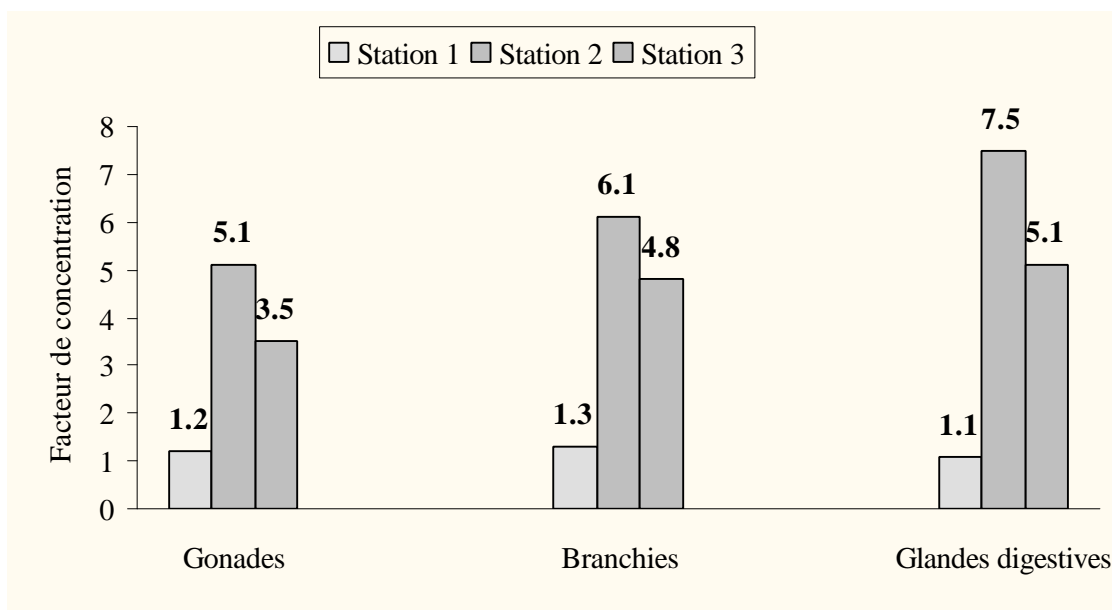


Figure 12 : Comparaison des facteurs de concentrations dans les différents organes de *Anodonta cygnea* exposé durant 91 jours au niveau des trois stations (calculés à partir des concentrations en EOX exprimées par rapport au poids sec).

Le facteur de bioaccumulation des composés organo-halogénés extractibles issus des EPKB, dans les organes des anodontes exposés durant 91 jours peut être calculé selon la formule :

$$FB = \frac{[EOX]_{91j} \text{ organe aval} - [EOX]_{91j} \text{ organe amont}}{([AOX]_{\text{eau aval}} - [AOX]_{\text{eau amont}}) * 0.02}$$

Le tableau 10 regroupe les valeurs du FB dans les trois organes des anodontes exposés au niveau des deux stations aval, calculés à partir des concentrations en EOX après 91 jours d'exposition, exprimées par rapport au poids frais des mollusques.

Tableau 10 : Facteur de bioaccumulation dans les trois organes des anodontes exposés durant 91 jours au niveau de la station 2 et de la station 3.

Organe	Station 2	Station 3
Branchies	1455	1917
Gonade	1182	1292
Glande digestive	2864	2375



Le facteur de bioaccumulation est le plus élevé dans les glandes digestives, suivi des branchies et des gonades. Dans les branchies, le facteur de bioaccumulation est plus important au niveau de la station 3 qu'au niveau de la station 2, alors que dans les gonades il est à peu près similaire au niveau des deux stations. Par contre, dans les glandes digestives, il est plus élevé au niveau de la station la plus contaminée.

### 3.2.3.2. Accumulation dans l'anodonte entier

Afin de pouvoir suivre l'évolution dans l'organisme entier, les concentrations totales en EOX dans les anodontes sont calculés à partir des paramètres physiologiques et des concentrations individuelles en EOX dans les différents organes et les restes. De plus, l'exposition des anodontes au niveau de la station la plus contaminée (station 2), est prolongée de 56 jours pour atteindre une durée totale de 147 jours.

Les figures 13 (a, b et c) présentent les concentrations moyennes en EOX calculées pour les anodontes entiers exposés au niveau des trois stations au cours de 91 jours. Comme dans les organes individuels, les concentrations en EOX ne varient pas significativement dans les anodontes entiers exposés au niveau de la station 1. Au niveau des deux stations aval, les concentrations en EOX augmentent progressivement, et plus rapidement au niveau de la station la plus contaminée (station 2). Contrairement à ce que l'on a observé pour les organes pris individuellement, il ne semble pas y avoir de plateau d'équilibre lorsque les concentrations sont ramenées aux anodontes entiers. Effectivement, les concentrations mesurées le 63<sup>ème</sup> jour d'exposition sont significativement différentes de celles mesurées le 91<sup>ème</sup> jour, et ce au niveau des deux stations aval. Les valeurs du facteur de concentration total après 91 jours d'exposition au niveau des trois stations sont regroupées dans le tableau 11.

Tableau 11 : Facteur de concentrations dans les anodontes ayant été exposés durant 91 jours au niveau des trois stations.

	<b>Station 1</b>	<b>Station 2</b>	<b>Station 3</b>
<b>FC par rapport au poids frais</b>	1.3	4.6	3.3
<b>FC par rapport au poids sec</b>	1.2	4.9	3.6
<b>FC par rapport aux lipides</b>	1.1	4.0	3.2

Les figures 14 (a, b, c) montrent l'évolution des concentrations moyennes en EOX dans les anodontes exposés durant 147 jours au niveau de la station 2. L'absence de plateau d'équilibre des concentrations observé durant les 91 premiers jours se confirme, et la vitesse et le taux d'accumulation des EOX semblent même être plus rapides après le 91<sup>ème</sup> jour d'exposition.



### 3.3 Discussion

Comme lors des études précédentes (CREUM - AERM, 1995), l'exposition aux EPKB, même prolongée à 91 jours, ne semble pas affecter de manière significative l'état de vitalité des anodontes, se traduisant par un taux de mortalité inférieur à 5 % au niveau des deux stations aval. L'indice de condition, qui selon Widdows & Johnson (1988) reflète les réserves nutritionnelles de l'animal ne varie pas significativement au cours de l'exposition. Cependant, comme le précise Mäkelä (1995), la sensibilité de cet indice est relativement faible en raison des fortes variations interindividuelles, et seuls des changements drastiques, tels qu'un jeûne prolongé, seraient nécessaires pour observer des variations significatives. Ainsi, Haynes *et al.* (1995), observent même des indices de condition supérieurs chez des moules marines, *Mytilus edulis*, exposés à des EPKB, par rapport à ceux d'individus témoins issus d'une mytiliculture de référence. Malgré un échantillonnage homogène du point de vue de la taille (longueur, hauteur, épaisseur), le poids des anodontes varie considérablement, notamment en raison des grandes différences dans le volume, et donc le poids, des liquides internes. Ces variations peuvent s'expliquer par une rétention plus ou moins importante d'eau chez les anodontes avant leur dissection. Contrairement à *Anodonta anatina*, chez qui la coquille, les parties molles et les liquides internes représentent à peu près trois parts égales, avec respectivement 30%, 32% et 38% du poids frais total (Mäkelä & Oikari, 1990), le pourcentage relatif des parties molles de *Anodonta cygnea* est plus faible (25.4%) que celui des deux autres composantes (coquille : 42.9% ; liquides internes : 31.7%). Ceci est en accord avec les résultats de Foulquier (1972), qui montre que le pourcentage des parties molles de *Anodonta cygnea*, prélevés dans le sud de la France, n'est que de 18.8%, alors que les liquides internes à eux seuls représentent plus de 50%.

Les trois organes étudiés représentent plus de 40% du poids frais total des parties molles de *Anodonta cygnea*, avec respectivement 14,6%, 13,0% et 14,8% pour les branchies, la glande digestive et les gonades. Parmi les indices organiques, seul l'indice de la glande digestive des anodontes exposés au niveau des stations 2 et 3 est légèrement supérieur à celui mesuré dans les témoins. Mais cette différence, déjà observée par Mäkelä *et al.* (1992), n'est significative que durant les premières semaines d'exposition, puis diminue à un niveau semblable à celui des anodontes témoins et exposés à la station amont. D'un point de vue physiologique, ni le pourcentage de poids sec, ni le pourcentage de lipides ne varient significativement dans les trois organes étudiés, renforçant le fait que les anodontes ne semblent pas être affectés par les EPKB durant les 91 jours d'exposition.

A notre connaissance, peu de travaux se sont intéressés à l'accumulation de composés organo-halogénés présents dans les EPKB au niveau d'organes spécifiques de mollusques aquatiques, rendant les comparaisons difficiles.

Chez les anodontes témoins, les concentrations en EOX ne diffèrent pas de manière significative entre les organes lorsqu'elles sont exprimées par rapport au poids frais. Par contre, lorsqu'elles sont exprimées par rapport au poids sec, les concentrations augmentent avec le pourcentage de lipides de l'organe considéré, en concordance avec le caractère lipophile des composés organo-halogénés. Elles sont significativement plus élevées dans les glandes digestives, suivies des gonades et des branchies.

Au niveau des deux stations aval, les concentrations en EOX augmentent de manière significative dans les trois organes étudiés. Cependant, en fonction de leur localisation, de leurs fonctions et de leur composition lipidique, les trois types d'organes n'accumulent pas les mêmes quantités d'EOX, ni ne présentent les mêmes cinétiques d'accumulation.

Comme dans le cas du cadmium (Hemelraad *et al.*, 1986), l'accumulation d'EOX semble se faire en deux phases dans les branchies de *Anodonta cygnea*. En effet, durant la première semaine d'exposition, la concentration en EOX augmente fortement, respectivement d'un facteur 2.6 et 2.0 au niveau des stations 2 et 3, puis plus progressivement jusqu'au 91<sup>ème</sup> jour de l'étude. Le ralentissement de la vitesse d'accumulation à partir du 7<sup>ème</sup> jour d'exposition pourrait correspondre à un début d'élimination des composés organo-halogénés qui sont transportés vers les organes de détoxification. Après 91 jours d'exposition, la quantité totale d'EOX accumulée dans les branchies est d'autant plus élevée que la concentration en organo-halogénés dans l'eau est importante, se traduisant par un facteur de pollution (FP) plus élevé à la station 2 (FP=6.1) qu'à la station 3 (FP=4.8). Cependant, l'accumulation relative à la concentration dans l'eau est plus importante à la station 3 qu'à la station 2, puisque le facteur de bioaccumulation (FB) y est plus élevé (FB station 3=1917 ; FB station 2=1455). Plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour expliquer ces différences. Comme nous l'avons vu dans l'analyse bibliographique, les EPKB contiennent un grand nombre de composés organo-halogénés différents, dont le comportement dans l'environnement aquatique dépend essentiellement de leur propriétés physico-chimiques (solubilité, Kow). Les branchies sont le premier lieu de contact entre l'organisme et le milieu environnant, et en raison de leur rôle dans l'alimentation et la respiration, elles représentent un lieu d'échange privilégié. L'hypothèse d'une accumulation rapide d'EOX par diffusion passive à travers les membranes des branchies, implique que les molécules organo-halogénées soient présentes sous forme dissoute, et non liées aux matières en suspension ou autres composés organiques de poids moléculaire élevé, tels que les chlorolignines (Björk, 1995). A l'aval immédiat des rejets d'EPKB, les concentrations en organo-halogénés dans l'eau sont importantes, mais leur biodisponibilité

est fortement diminuée en raison des concentrations élevées de matières organiques (Kukkonen, 1992). Ceci explique une accumulation totale (FP) plus importante, et une accumulation relative (FB) plus faible à la station 2 qu'à la station 3. D'autre part, les fortes concentrations en matières en suspension influent sur le comportement des bivalves, pouvant réduire leur activité de filtration, et donc leur contact avec le milieu extérieur contaminé (Sprung & Rose, 1988).

Dans les glandes digestives, l'accumulation d'EOX semble aussi se faire en deux phases. Contrairement aux branchies, la concentration en EOX augmente faiblement durant les premières semaines d'exposition, puis fortement à partir du 21<sup>ème</sup> jour. Il semblerait que dans les glandes digestives, l'accumulation d'EOX se fasse surtout de manière active, par digestion et absorption des composés organo-halogénés associés aux matières en suspension et autres composés organiques. Dans ce cas, l'accumulation d'EOX est d'autant plus importante que la concentration totale d'organo-halogénés dans l'eau est élevée, et se traduit aussi bien par un facteur de pollution (station 2 : 7.5 ; station 3 : 5.1), que par un facteur de bioaccumulation (station 2 : 2864 ; station 3 : 2375), plus élevé à la station 2 qu'à la station 3. D'autre part, la glande digestive est un des sites principaux de défense de l'organisme contre les micropolluants. Dans le cas d'une contamination métallique, elle est capable de synthétiser des protéines particulières, les métallothionéines, qui se complexent aux métaux polluants et inhibent ainsi leur effets toxiques (Henry, 1987). La forte augmentation des concentrations à partir du 21<sup>ème</sup> jour pourrait également être due au transport des composés organo-halogénés et de leurs métabolites, depuis les organes périphériques (tels que les branchies, voir ci-dessus), jusqu'à la glande digestive.

Dans les gonades, l'accumulation d'EOX se fait lentement et les concentrations ne deviennent significativement différentes de celles des témoins qu'après respectivement 21 et 28 jours d'exposition à la station 2 et à la station 3. Etant donné que les gonades, contrairement aux branchies et aux glandes digestives, ne sont pas en contact direct avec le milieu extérieur, l'augmentation des concentrations ne peut être due qu'à des phénomènes de transport entre les organes, via le milieu intérieur et les cellules circulantes. Ainsi les gonades présentent les concentrations en EOX les plus faibles parmi les organes étudiés. Elles sont plus importantes au niveau de la station la plus contaminée (FP station 2 : 5.1 ; FP station 3 : 3.5), et les facteurs de bioaccumulation sont du même ordre de grandeur au niveau des deux stations (FB station 2 : 1182 ; FB station 3 : 1292).

En raison du caractère hydrophobe et lipophile des composés organo-halogénés, la plus forte accumulation chez les anodontes exposés à l'aval des rejets d'EPKB, est observée dans les organes présentant le pourcentage de lipides le plus élevé, c'est à dire la glande digestive. Des expériences de



laboratoire ont montré que chez *Anodonta anatina*, le pentachlorophénol et le 3, chloroguaiacol s'accumulent plus fortement dans les organes à forte teneur en lipides, tels que la glande digestive avec des facteurs de bioaccumulation variant de 275 à 637 (Mäkelä & Oikari, 1990). Haynes *et al.* (1994) ont montré qu'il existait une corrélation hautement significative ( $p < 0.001$ ) entre le pourcentage de lipides (exprimé par rapport au poids sec) et les concentrations en EOX (exprimées par rapport au poids sec) chez la moule marine, *Mytilus edulis*, exposées à des EPKB. De ce fait, les concentrations en EOX dans la moule sont corrélées de manière linéaire selon qu'elles sont exprimées en fonction du poids sec ou du poids de lipides, de sorte que :  $\text{Log}_{10}[\text{EOX}]_{\text{poids sec}} = \text{Log}_{10}[\text{EOX}]_{\text{lipides}} - 1.236$ , ( $r^2=0.914$ ). Une relation similaire a été observé dans la présente étude pour les concentrations en EOX chez *Anodonta cygnea*, avec :  $\text{Log}_{10}[\text{EOX}]_{\text{poids sec}} = 1.08 * \text{Log}_{10}[\text{EOX}]_{\text{lipides}} - 1.444$ , ( $r^2=0.91$ ,  $n=20$ ).

Cependant, en raison de ces fortes différences dans la composition lipidique des trois organes, les différences dans les concentrations disparaissent lorsque ces dernières sont exprimées en fonction du poids de lipides.

### 3.4. Conclusion

Les trois types d'organes étudiés, les branchies, les glandes digestives et les gonades, de *Anodonta cygnea* exposés durant 91 jours aux effluents de l'usine de pâte à papier blanchissant au chlore, accumulent les composés organo-halogénés. Cette accumulation se fait de manière différente selon les organes, et augmente avec le taux de lipides de l'organe considéré. Ainsi, les facteurs de pollution sont, dans l'ordre croissant : Glandes digestives > branchies > gonades. Il semblerait que les molécules organo-halogénées accumulées ne sont pas les mêmes selon l'organe considéré. En effet, dans les branchies, l'accumulation d'EOX semble se faire essentiellement de manière passive, par diffusion des molécules dissoutes à travers les membranes. Par contre, dans les glandes digestives, elle semble aussi se faire de manière active, par digestion et absorption des molécules organo-halogénées associées aux matières en suspension et aux molécules organiques, telles que les chlorolignines. De plus, en tant qu'organe de détoxification, la glande digestive accumule également les composés organo-halogénés transportés depuis les autres organes. Le calcul des concentrations totales dans les anodontes montre qu'après 91 jours d'exposition aux EPKB, il n'existe pas de plateau d'équilibre des concentrations dans les organismes considérés dans leur totalité.

## 4. Etude du relargage des composés organo-halogénés extractibles chez *Anodonta cygnea*

### 4.1. Protocole expérimental

La figure 15 résume le protocole des prélèvements d'eau et d'anodotes après l'exposition de 147 jours à la station 2 et le transfert à la station 1.

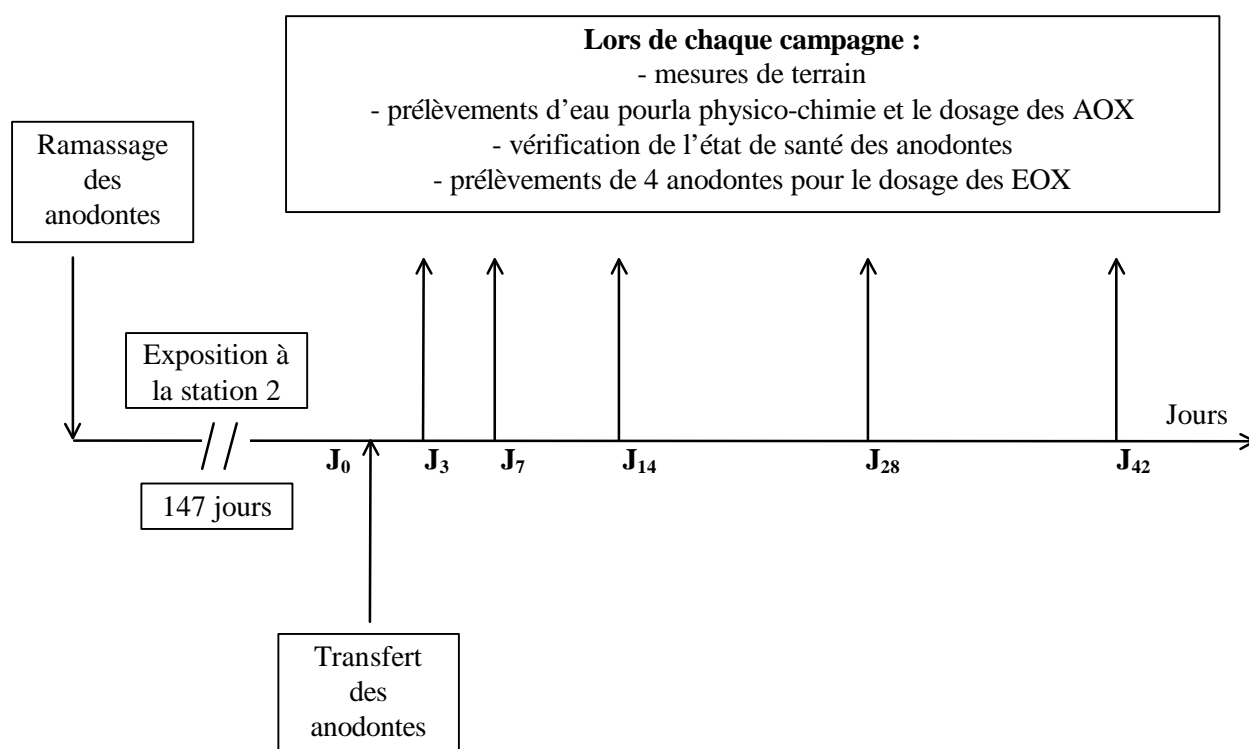


Figure 15 : Protocole expérimental de l'étude de relargage d'EOX par *Anodonta cygnea*.

#### 4.1.1. Collecte, conditionnement et transfert des anodotes à la station contaminée

Soixante dix anodotes de taille homogène, comprise entre 67.4 et 77.6 mm (moyenne :  $73.1 \pm 2.8$  mm) ont été ramassés dans le plan d'eau au niveau de la ville de Metz. Ils sont ramenés au laboratoire et conditionnés selon le protocole décrit au § 2.2. Durant la phase de conditionnement, un anodote est mort, et seuls 69 individus sont donc transférés et exposés au niveau de la station 2, située

en aval des rejets de l'usine de pâte à papier. Le transfert a lieu dans les mêmes conditions et le même jour que pour les anodontes utilisés lors de l'étude d'accumulation des EOX par différents organes de *Anodonta cygnea* (cf. § 3).

#### **4.1.2. Transfert et exposition des anodontes à la station non contaminée**

Après 147 jours d'exposition au niveau de la station 2, les cages d'exposition sont sorties de l'eau et l'état de vitalité de tous les animaux est contrôlé. Les individus morts sont comptabilisés et retirés des cages. Les anodontes vivants sont placés dans des glacières contenant de l'eau de la station 2, et immédiatement transportés à la station 1, distante d'environ 10 kilomètres. Les cages d'exposition sont vidées de leur sédiments et nettoyées à l'aide d'une brosse afin d'éliminer toutes les saletés qui s'y sont fixées. Une couche de 2 à 3 cm de sédiments de la station 1 est déposée au fond des cages, et les anodontes sont déposés sur celui-ci. Les cages fermées sont alors fixées dans le courant de la rivière comme décrit précédemment.

#### **4.1.3. Prélèvement et analyse de l'eau**

Lors des précédentes études (CREUM-AERM, 1995 ; § 3 de la présente étude), nous avons constaté que les différents paramètres physico-chimiques et la concentration en AOX de la station 1 ne varient pas beaucoup au cours du temps. Aussi, des prélèvements d'eau pour l'analyse physico-chimique et la détermination de la concentration en AOX sont réalisés le jour du transfert, et après 3, 7, 14, 28 et 42 jours d'exposition.

#### **4.1.4. Prélèvement et analyse des anodontes**

Un lot d'anodontes est prélevé le jour du transfert, puis aux mêmes dates que les échantillons d'eau, soit après 3, 7, 14, 28 et 42 jours d'exposition. A chaque prélèvement, l'état de santé des anodontes est vérifié et les individus morts sont comptabilisés et retirés des cages d'exposition.

Quatre anodontes sont prélevés au hasard et ramenés au laboratoire dans des bocaux en verre contenant de l'eau du site, puis préparés et dosés selon le protocole décrit au § 2.4.2.

#### **4.1.5. Etude statistique**

Les différents paramètres physico-chimiques et les concentrations en AOX des deux stations sont comparés à l'aide du test T de Student, au seuil de 0.05. L'évolution des paramètres physiologiques et des concentrations en EOX dans les anodontes est testée par une analyse de variance, suivi d'une comparaison multiple à l'aide de la méthode H.S.D de Tuckey, au seuil de 0.05.

## 4.2. Résultats

### 4.2.1. Résultats de l'analyse de l'eau

Le tableau 12 résume la qualité physico-chimique de l'eau de la station 2, durant les 147 jours d'exposition aux EPKB, et de la station 1, durant les 42 jours ayant suivi le transfert. Parmi les paramètres physico-chimiques de terrain, seule la conductivité est significativement différente entre les deux stations, due à des concentrations en  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{Na}^+$  et  $\text{Ca}^{2+}$  plus faibles en amont des rejets de l'usine de pâte à papier. La température de l'eau des deux stations est du même ordre de grandeur, proche de 10°C. Cependant, les saisons d'exposition ne sont pas les mêmes étant donné que la station 2 a été échantillonnée de novembre à février, et la station 1 de mars à mai. Globalement, la qualité de l'eau est meilleure au niveau de la station 1 qu'au niveau de la station 2.

Tableau 12 : Physico-chimique de l'eau des deux stations (\* : différence significative entre la station 1 et la station 2 ; n.s. : différence non significative).

Paramètre	Unité	Avant transfert		Après transfert		
		Station 2	N	Station 1	N	
<b>pH</b>		8.0 ± 0.1	14	8.1 ± 0.1	6	n.s.
<b>Température</b>	°C	10.2 ± 1.5	14	9.8 ± 2.9	6	n.s.
<b>Conductivité</b>	$\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$	651 ± 59	14	366 ± 10	6	*
<b>Oxygène dissous</b>	$\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$	8.4 ± 0.9	14	9.0 ± 0.5	6	n.s.
<b>F<sup>-</sup></b>	$\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$	0.16 ± 0.04	6	0.11 ± 0.02	6	*
<b>Cl<sup>-</sup></b>	$\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$	47.2 ± 12.9	6	16.9 ± 2.8	6	*
<b>Br<sup>-</sup></b>	$\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$	2.95 ± 2.16	6	0.01 ± 0.02	6	*
<b>SO<sub>4</sub><sup>2-</sup></b>	$\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$	102.6 ± 31.0	6	26.4 ± 3.2	6	*
<b>K<sup>+</sup></b>	$\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$	5.1 ± 0.6	6	2.7 ± 0.1	6	*
<b>Na<sup>+</sup></b>	$\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$	61.2 ± 15.7	6	7.8 ± 0.9	6	*
<b>Mg<sup>2+</sup></b>	$\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$	3.4 ± 0.2	6	3.4 ± 0.3	6	n.s.
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	$\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$	100.7 ± 8.7	6	79.3 ± 2.2	6	*
<b>N total</b>	$\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$	0.60 ± 0.04	6	2.13 ± 0.37	6	*
<b>P total</b>	$\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$	0.20 ± 0.02	6	0.19 ± 0.05	6	n.s.
<b>Matières en suspension</b>	$\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$	21.2 ± 9.9	6	5.8 ± 0.8	6	*
<b>DCO</b>	$\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$	33.2 ± 5.3	6	12.9 ± 1.5	6	*
<b>AOX</b>	$\mu\text{g Cl}\cdot\text{l}^{-1}$	237.2 ± 101.8	80	16.9 ± 2.1	6	*

La concentration en AOX diffère significativement entre les deux stations, avec une moyenne de 237.2  $\mu\text{g Cl.l}^{-1}$  au niveau de la station 2, et de 16.9  $\mu\text{g Cl.l}^{-1}$  au niveau de la station 1.

#### 4.2.2. Résultats de l'analyse des anodontes

##### 4.5.2.1. Condition physiologique

###### \* Mortalité

Durant les 147 jours d'exposition à la station 2, plus d'un tiers, soit 36 %, des anodontes (25 individus) sont morts. Etant donné que l'état de vitalité des anodontes n'est vérifié que le jour du transfert, et pas durant cette phase d'exposition, il n'est pas possible de dire à quel moment les différents individus sont morts. Cependant, comme nous l'avons vu au chapitre précédent, la mortalité est restée très faible au niveau de la station 2 durant les 91 premiers jours d'exposition. Après le transfert en amont des rejets, et durant les 42 jours de la phase d'exposition au niveau de la station 1, d'autres individus sont morts (tableau 13). Ainsi, durant les 189 jours de l'étude, 41 anodontes sont morts, soit un taux de mortalité cumulé de 60 %.

Tableau 13 : Mortalité des anodontes durant les deux phases d'exposition

	<b>Mortalité</b>	<b>Mortalité cumulée</b>
	<b>Nombre d'anodontes</b>	<b>(% du lot transféré)</b>
<b>Exposition à la station 2 : 69 anodontes</b>		
<b>à 147 jours</b>	25	36 %
<b>Exposition à la station 1 : 44 anodontes</b>		
<b>à 3 jours</b>	6	45 %
<b>à 7 jours</b>	4	51 %
<b>à 14 jours</b>	2	54 %
<b>à 28 jours</b>	2	57 %
<b>à 42 jours</b>	2	60 %

###### \* Indice de condition

Les résultats du calcul de l'indice de condition, défini dans le chapitre précédent (poids frais des parties molles (g) / longueur totale de la coquille (cm)<sup>3</sup> x 100), sont donnés dans le tableau 14.

Tableau 14 : Evolution de l'indice de condition des anodontes.

Temps d'exposition	Moyenne	Ecart type	CV (%)	Minimum	Maximum
<b>0 jours</b>	0.93	0.58	62.0	0.49	1.77
<b>3 jours</b>	1.58	0.70	44.4	0.73	2.34
<b>7 jours</b>	1.20	0.15	12.9	1.05	1.41
<b>14 jours</b>	0.99	0.49	49.9	0.47	1.41
<b>28 jours</b>	1.45	0.83	59.4	0.45	2.50
<b>42 jours</b>	0.88	0.64	71.9	0.37	1.81

L'indice de condition varie fortement, aussi bien au cours du temps qu'entre les individus prélevés à une même date, sans que l'on puisse définir une tendance claire à la hausse ou à la baisse. En raison des fortes variations (coefficient de variation de 12.9 à 71.9 %), aucune des différences n'est statistiquement significative.

\* Pourcentage de poids sec - pourcentage de lipides

Le pourcentage de poids sec en fonction du poids frais (Figure 16 a), ainsi que les pourcentages de lipides en fonction du poids sec (Figure 16 b), augmentent au cours du temps après le transfert de la station aval vers la station amont. Pour le pourcentage de poids sec, la différence devient statistiquement significative après 28 jours d'exposition, alors que pour le pourcentage de lipides la différence est déjà significative après 7 jours.

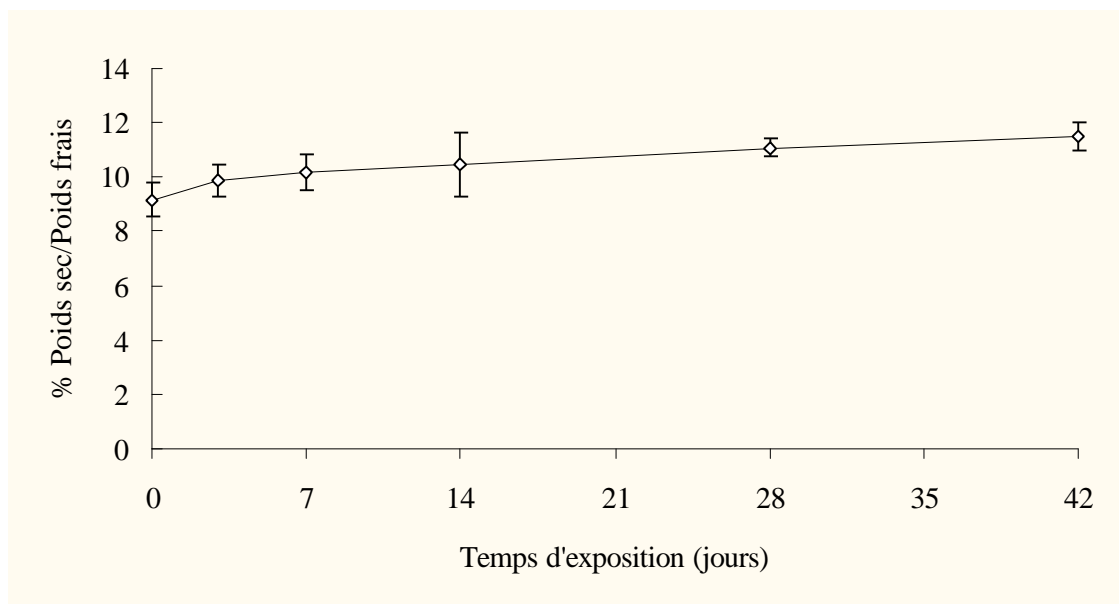


Figure 16 a : Evolution du pourcentage de poids sec chez les anodontes transférés et exposés à la station 1.

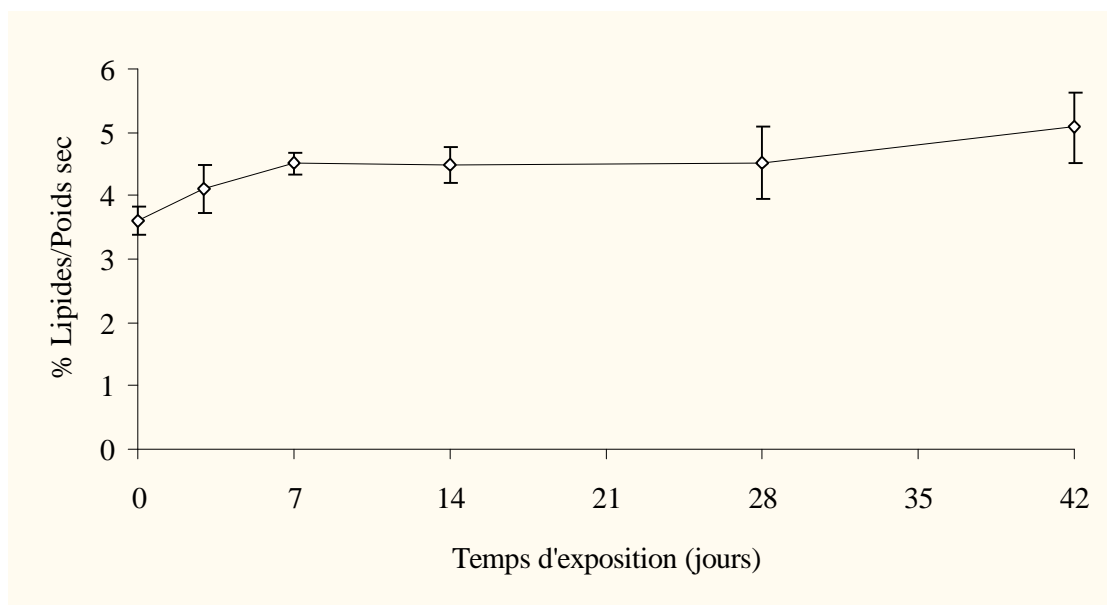


Figure 16b : Evolution du pourcentage de lipides chez les anodontes transférés et exposés à la station 1.

Tous les paramètres physiologiques mesurés chez les anodontes exposés au niveau de la station 2, durant 147 jours sont significativement inférieurs à ceux mesurés chez les témoins et chez les anodontes exposés durant 91 jours (tableau 15). Cependant, après le transfert, les anodontes survivants ont tendance à se rétablir, et après 42 jours d'exposition au niveau de la station 1, aucun des paramètres n'est plus significativement différent de ceux des témoins.

Tableau 15 : Evolution des différents paramètres physiologiques chez les anodontes témoins, exposés à la station 2 (durant 91 et 147 jours), et à la station 1, 42 jours après le transfert (moyenne  $\pm$  écart type).

	% de poids sec/poids frais	% lipides/poids sec
<b>Témoins (n=3)</b>	12.06 $\pm$ 0.83	4.94 $\pm$ 0.30
<b>Station 2 J<sub>91</sub> (n=3)</b>	10.91 $\pm$ 0.16	6.08 $\pm$ 0.53
<b>Station 2 J<sub>147</sub> (n=4)</b>	9.17 $\pm$ 0.63	3.61 $\pm$ 0.22
<b>Station 1 J<sub>189</sub> (n=4)</b>	11.50 $\pm$ 0.53	5.08 $\pm$ 0.55

#### 4.2.2.2. Relargage des EOX

Les concentrations en EOX dans les anodontes transférés à la station amont, exempte de pollution par les EPKB, évoluent de façon similaire, qu'elles soient exprimées en fonction du poids frais (Figure 17a), du poids sec (Figure 17b) ou du poids de lipides (Figure 17c). En effet, quel que soit le mode d'expression des résultats, le relargage des EOX semble se faire en deux phases : une rapide et une lente.





La phase de relargage rapide commence immédiatement après le transfert de la station contaminée à la station amont, et dure jusqu'au 7<sup>ème</sup> jour d'exposition. La diminution, statistiquement significative, des concentrations en EOX est d'environ 50 % par rapport à la concentration initiale, représentant une perte quotidienne de 0.5 µg Cl.g<sup>-1</sup> PF, soit 6.6 µg Cl.g<sup>-1</sup> PS, soit 222 µg Cl.g<sup>-1</sup> lipides.

La phase de relargage lent, entre le 7<sup>ème</sup> et le 28<sup>ème</sup> jour suivant le transfert, se caractérise par une diminution, toujours statistiquement significative, des concentrations en EOX d'environ 25 % par rapport à la concentration initiale, représentant une perte quotidienne beaucoup plus faible, de 0.1 µg Cl.g<sup>-1</sup> PF, soit 1.3 µg Cl.g<sup>-1</sup> PS, soit 28 µg Cl.g<sup>-1</sup> de lipides.

Entre le 28<sup>ème</sup> et le 42<sup>ème</sup> jour d'exposition à la station amont, les concentrations en EOX ne diminuent plus significativement, et ce quelle que soit la manière dont sont exprimés les résultats.

Les concentrations en EOX continuent d'augmenter après le 91<sup>ème</sup> jour d'exposition et, comme nous le laissions présumer les résultats obtenus, il ne semble pas y avoir de plateau d'équilibre dans les concentrations en EOX, et ce même après 147 jours d'exposition aux EPKB

En effet, puisque les concentrations en EOX mesurées le 147<sup>ème</sup> jour sont significativement plus élevées que celle mesurées le 91<sup>ème</sup> jour d'exposition à la station 2. D'autre part, les concentrations en EOX atteintes à la fin de la phases de relargage sont significativement plus élevées que celles mesurées dans les témoins, montrant que la totalité des composés organo-halogénés accumulés n'est pas relargué durant les 42 jours ayant suivi le transfert de la station 2 à la station 1 (tableau 16).

Tableau 16 : Concentrations en EOX chez les anodontes témoins, exposés à la station 2 (durant 91 et 147 jours), et à la station 1, 42 jours après le transfert (moyenne ± écart type).

	[EOX] µg Clg <sup>-1</sup> P. frais	[EOX] µg Cl.g <sup>-1</sup> P. sec	[EOX] µg Cl.g <sup>-1</sup> lipides
<b>Témoins (n=3)</b>	1.2 ± 0.1	10.4 ± 1.6	208.8 ± 23.3
<b>Station 2 J<sub>91</sub> (n=3)</b>	5.5 ± 0.2	50.6 ± 2.2	834.5 ± 57.6
<b>Station 2 J<sub>147</sub> (n=4)</b>	8.9 ± 1.2	97.0 ± 9.1	2689.4 ± 284.5
<b>Station 1 J<sub>189</sub> (n=4)</b>	2.5 ± 0.7	21.6 ± 6.2	427.2 ± 117.7

### 4.3. Discussion

Contrairement aux observations faites jusqu'ici pour des expositions ne dépassant pas 91 jours, une exposition prolongée (147 jours) affecte sévèrement la physiologie de *Anodonta cygnea*, se traduisant par une mortalité élevée et une diminution significative des paramètres physiologiques mesurés. Même si après le transfert à la station 1, les paramètres physiologiques tendent vers des valeurs normales (celles des témoins), la physiologie des anodontes reste fortement perturbée. En effet,

plus de 30 % des anodontes meurent durant les 42 jours d'exposition à la station 1, et les individus survivants présentent des indices de condition très variables.

Après le transfert des anodontes de la station contaminée à la station amont, les concentrations en EOX diminuent en deux phases : une rapide durant les 7 premiers jours, et une lente entre le 7<sup>ème</sup> et le 28<sup>ème</sup> jour. Le  $T^{1/2}$ , correspondant au temps nécessaire pour diminuer la concentration en EOX de 50 % est de l'ordre de 7 jours. Plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour expliquer ce phénomène.

La première est basée sur les propriétés physico-chimiques des composés organo-halogénés présents dans les EPKB. En effet, comme pour les PCB (Calambokidis *et al.*, 1979), le temps de rétention, et donc de relargage, des composés organo-halogénés augmente avec leur taille et le nombre de molécules halogénées, qui influent directement sur le coefficient de partage octanol-eau (Log Kow), et donc sur la liposolubilité de ces molécules (Suntio *et al.*, 1988). Etant donné que le paramètre EOX est un paramètre global, il ne permet pas de faire la différence entre la nature des molécules organo-halogénées. Ainsi, la phase de relargage rapide pourrait correspondre à l'élimination des composés de faible poids moléculaire et ayant un Log Kow faible. En effet, dans une étude de laboratoire, Mäkelä *et al.* (1991), montrent que la dépuration de différents chlorophénols et chloroguaiacols se fait rapidement chez *Anodonta anatina*, avec un  $T^{1/2}$  inférieur à 24 heures. La phase de relargage lente pourrait quand à elle correspondre à l'élimination des composés organo-halogénés de poids moléculaire élevé et ayant un Log Kow plus élevé, tels que les dioxines et les furanes (Log Kow > 6), et dont le  $T^{1/2}$  varie de 18 à 58 jours chez *Mytilus edulis*, selon l'isomère considéré (Hektoen *et al.*, 1994). Ceci est confirmé par une expérience de laboratoire, dans laquelle Pellinen *et al.* (1993), montrent que chez *Anodonta anatina* exposé durant 7 jours à des EPKB ([AOX] variant de 320 à 910  $\mu\text{g Cl.l}^{-1}$ ), l'élimination des EOX de poids moléculaire inférieur à 1000  $\text{g.mol}^{-1}$  est quasiment totale en 5 jours, alors qu'elle n'est que de 50 % pour les molécules de plus fort poids moléculaire.

Une autre explication possible est basée sur la théorie de Spacie & Hamelink (1982), qui assimilent l'organisme aquatique à un modèle à deux compartiments : un central et un périphérique. Selon ces auteurs, la dépuration se fait rapidement depuis le compartiment central, alors que le relargage lent correspond à une mobilisation lente des composés organo-halogénés accumulés dans le compartiment périphérique, et qui transitent par le compartiment central avant d'être éliminés.

D'autre part, on sait qu'en raison de leur caractère lipophile, les composés organo-halogénés s'accumulent préférentiellement dans les organes présentant de fortes teneurs en lipides, tels que la glande digestive, les gonades puis les oeufs. Les anodontes utilisés dans cette étude ont été exposés aux EPKB durant l'hiver, alors que les femelles incubaient les glochidies issues de la reproduction de l'été précédent. Les glochidies, larves d'anodontes, sont riches en lipides et accumulent donc fortement les EOX. Etant donné que les anodontes ont été exposés durant tout l'hiver à des températures supérieures aux normales saisonnières (température moyenne à la station 2 :  $10.2 \pm 1.5$  °C), la maturation des

glochidies a été plus rapide qu'en temps normal. Ainsi, au moment du transfert à la station 1 (fin mars), et en raison d'une amélioration de la qualité générale de l'eau, les glochidies ont pu être relâchées, emportant avec elles une grande quantité des EOX accumulés dans les anodontes. Ceci a également été observé chez les brochets, *Esox lucius*, chez qui les concentrations en PCB et pesticides organo-chlorés sont plus faibles chez les femelles après la ponte, que chez les mâles (Larsson *et al.*, 1993). Chez cette espèce, les oeufs présentent un taux de lipides, ainsi qu'une concentration en micropolluants organo-halogénés 10 fois plus élevés que les muscles des adultes. Chez *Anodonta anatina*, exposé en laboratoire à de fortes concentrations en cadmium, les glochidies contiennent jusqu'à 5 % du cadmium total accumulé par les bivalves (Winter, 1996).

Entre le 28<sup>ème</sup> et le 42<sup>ème</sup> jour, la concentration en EOX dans les anodontes continue de diminuer, mais la différence n'est pas statistiquement significative. Ceci peut s'expliquer de deux façons : soit le temps d'épuration pour les molécules ayant un Log Kow élevé n'est pas assez long, soit il existe une fraction de micropolluant résiduel qui n'est pas métabolisable et donc pas relargable par l'anodonte. Effectivement, comme nous l'avons vu ci-dessus, des molécules telles que les dioxines ou les furanes ont un  $T^{1/2}$  variant de 18 à 58 jours, et sont encore présentes à des concentrations élevées dans la moule, *Mytilus edulis*, après 90 jours de dépuración (Hektonen *et al.*, 1994). Le bivalve, *Unio pictorum*, exposés durant 12 semaines à une concentration de 50  $\mu\text{g.l}^{-1}$  de cadmium, accumulent fortement ce métal (Jenner *et al.*, 1991), et durant une phase de dépuración de 29 semaines suivant l'exposition, les teneurs en cadmium ne diminuent que de 50 % dans les branchies, de 30 % dans la glande digestive, et pas du tout dans le rein. De même, après 840 heures de stabulation, Salanki & Balogh (1989) n'observent pas de dépuración significative de cuivre et de plomb dans les branchies de *Anodonta cygnea* ayant été contaminé par ces deux métaux.

#### 4.4. Conclusions

L'exposition prolongée de 5 mois aux rejets chroniques d'EPKB affecte fortement la physiologie de *A. cygnea*, et se traduit par une mortalité importante ainsi que par une diminution significative du poids sec et du poids de lipides. Contrairement aux résultats obtenus dans le chapitre précédent, l'accumulation d'EOX se prolonge après 3 mois d'exposition, et n'atteint pas de plateau d'équilibre au bout de 147 jours. Après le transfert au niveau de la station amont, non contaminée par les EPKB, la mortalité reste importante, même si la physiologie des anodontes survivants semble s'améliorer. Le relargage d'EOX chez les anodontes transférés se fait en deux phases, une rapide et une lente, sans que les concentrations finales, après 42 jours, n'atteignent le niveau des concentrations mesurées dans les témoins.

## **5. Etude des éventuelles altérations histologiques chez *Anodonta cygnea* L., exposé *in situ* aux effluents d'une usine de pâte à papier blanchissant au chlore**

Après avoir étudié l'accumulation et le relargage de composés organo-halogénés chez le mollusque bivalve, *Anodonta cygnea* L., le but de ce travail est de rendre compte d'un éventuel impact des effluents d'une usine de pâte à papier blanchissant au chlore sur la structure histologique de certains organes de l'anodonte. Divers travaux scientifiques, essentiellement scandinaves, font état de modifications morphologiques et histologiques chez des organismes aquatiques vivant dans des écosystèmes recevant des effluents de l'industrie papetière (Bengtsson & Bengtsson, 1983 ; Barker *et al.*, 1994 ; Khan *et al.*, 1994 ; Lindesjö & Thulin, 1994 ; Lindesjö *et al.*, 1994 ; Sharpless *et al.*, 1994). Cependant, la plus grande majorité de ces études porte sur des poissons, et peu se sont intéressés au mollusques. De plus, les organismes sont généralement autochtones et prélevés *in situ*, et peu de travaux font appel à la méthode de transfert, ou biomonitoring actif.

Une première expérience a été réalisée en exposant les anodontes pendant 28 jours en amont et en aval des rejets de l'usine de pâte à papier. Durant cette expérience préliminaire, la mortalité des anodontes est restée très faible, et aucune modification histologique significative n'a pu être mise en évidence. A la vue de ces résultats, et afin de ne pas tirer de conclusions trop hâtives, une deuxième expérience, sur une durée d'exposition plus longue aux mêmes stations, a été réalisée.

### **5.1. Protocole expérimental**

#### **5.1.1. Collecte, exposition et prélèvement des anodontes**

Les anodontes utilisés pour cette étude ont été ramassés au niveau du plan d'eau de la ville de Metz, et transportés au laboratoire dans des glacières contenant de l'eau du site. Au laboratoire ils sont mis à stabuler durant quelques jours dans de l'eau déchlorée et aérée par bullage continu, afin de vérifier leur état de vitalité. Les animaux sont nourris quotidiennement avec une solution d'algues, *Chlorella vulgaris*. Les anodontes n'ayant pas filtré ou ouvert leurs valves durant la période de stabulation sont écartés du lot.

Le jour de l'exposition, les anodontes sont transférés dans des glacières contenant de l'eau déchlorée et aérée. Ils sont exposés au niveau de deux stations situées en amont (station 1) et en aval

(station 2) des rejets de l'usine de pâte à papier. L'exposition se fait dans les mêmes cages qu'auparavant (cf. § 2.2.3.).

Après dix semaines d'exposition, les anodontes sont sortis des cages et leur état de vitalité est vérifié. Ils sont ramenés au laboratoire et 5 individus de chaque station sont préparés pour l'étude histologique.

### **5.1.2. Préparation des anodontes pour les observations histologiques**

Les parties molles des anodontes sont séparés des coquilles par dissection des muscles adducteurs antérieurs et postérieurs. Les anodontes sont disséqués, puis les branchies, les glandes digestives et les gonades sont fixés dans du liquide de Bouin fraîchement préparé selon la formulation :

- Acide picrique saturé : 75 %
- Formol : 20 %
- Acide acétique : 5%

Après quelques jours de fixation dans le liquide de Bouin, les organes disséqués sont rincés plusieurs fois avec de l'eau déminéralisée changée régulièrement sur une période de 24 heures, afin d'éliminer au maximum le liquide de Bouin n'ayant pas pénétré dans les tissus. Les échantillons sont alors placés dans de l'alcool à 70 % durant 24 heures avant d'être déshydratés progressivement dans 5 bains d'alcool successifs (95 %, 15 mn ; 95 %, 15 mn ; 100 %, 30 mn ; 100 %, 30 mn ; 100 %, 30 mn). Après 3 bains de 15 mn dans du toluène, les échantillons sont placés successivement dans deux bains de paraffine liquide durant 2 heures, avant d'être inclus définitivement dans de la paraffine filtrée. Les blocs de paraffine sont séchés à température ambiante, puis découpés au microtome. Après la fixation sur les lames et la coloration, les échantillons sont observés au microscope.

### **5.2. Résultats - discussion**

Les photos 4 à 15 illustrent les observations histologiques faites sur les échantillons de branchies (photos 4 à 7), les gonades (photos 8 à 11) et les glandes digestives (photos 12 à 15) des anodontes exposés durant 10 semaines en amont et en aval des rejets de l'usine de pâte à papier. Comme lors de l'expérience préliminaire de 4 semaines d'exposition, aucune différence notable n'a pu être mise en évidence entre les anodontes exposés au niveau des deux stations. Deux hypothèses principales peuvent être avancées pour expliquer ces observations.















D'une part, l'absence de modifications histologiques pourrait être due à une absence d'effets histopathologiques des effluents d'usines de pâte à papier blanchissant au chlore au niveau des organes étudiés. Cependant, à la vue de la littérature scientifique internationale, cette hypothèse semble peu probable, et l'hypothèse la plus vraisemblable serait une durée d'exposition trop courte pour engendrer des altérations visibles au microscope. De fait, la majorité des études *in situ* est réalisée sur des organismes autochtones et stationnaires, essentiellement des poissons, vivant à proximité des rejets d'usines de pâte à papier, et par conséquent en contact permanent avec les micropolluants présents dans ce genre d'effluents. Malheureusement, la plus part de ces travaux s'intéresse uniquement aux malformations morphologiques visibles à l'œil nu, dont certaines sont citées ci-dessous à titre d'exemples.

L'exposition chronique de *Myoxocephalus quadricornis* aux effluents d'une usine de pâte à papier se traduit par des malformations sévères au niveau de la colonne vertébrale (Bengtsson, 1988). Lindesjö & Thulin (1992) observent des déformations squelettiques du crâne de brochet, touchant essentiellement la partie antérieure du parashénoïde ainsi que les os frontaux, se traduisant par une incurvation importante de la mâchoire vers le haut. Selon les auteurs, ces malformations, dont 35 % de la population est victime, seraient en partie dues aux composés organo-halogénés présents dans les effluents, mais également à un déficit de la concentration en oxygène dissous, résultant de la diminution de la transparence de l'eau suite aux fortes concentrations des matières en suspension. Dans la même région (mer Baltique et Golfe de Bothnie), 34 % et 20 % des perches présentent respectivement des cratères sur les opercules et des déformations operculaires sous forme d'un raccourcissement de la partie distale (Lindesjö *et al.*, 1994). Des observations similaires ont été faites en Nouvelle Zélande par Sharples *et al.* (1994) sur le poisson rouge, *Carassius auratus*, où 60 % de la population exposée est atteinte. Chez certains individus de cette espèce, la régression de la partie distale de l'opercule est telle que les branchies sont mises à nu. Une des causes principales de déformation squelettiques est la carence en acide ascorbique, essentielle à la formation du collagène. Cependant, chez de nombreux organismes, la vitamine C intervient également en tant que co-facteur de la détoxification de xénobiotiques organo-halogénés, et la compétition entre métabolisme du collagène et détoxification semble être en faveur de cette dernière.

Un autre type de malformation fréquemment rencontré chez les poissons à proximité des EPKB est la nécrose des nageoires, concernant 80 % des perches vivant dans les écosystèmes aquatiques recevant de tels rejets (Lindesjö & Thulin, 1990). Barker *et al.* (1994) observent la même pathologie chez *Pleuronectus americanus* et *Myoxocephalus sp.*. Selon les auteurs, ces poissons benthiques sont exposés chroniquement aux organo-halogénés accumulés dans les sédiments expliquant ainsi les multiples nécroses observées même après un changement drastique du traitement des EPKB et une diminution importante du rejet de composés organo-halogénés.

### **5.3. Conclusion**

En conclusion, il apparaît qu'une période d'exposition de 10 semaines aux effluents de l'usine de pâte à papier n'est pas suffisante pour mettre en évidence des altérations histopathologiques au niveau des branchies, de la gonades et de la glande digestive de *Anodonta cygnea*. Il serait intéressant de reconduire ce genre d'expérimentation sur une durée d'exposition plus longue, ou d'utiliser des organismes autochtones et sédentaires, lorsque ceux-ci sont présents, prélevés directement dans le Ton en aval des rejets de l'usine.

## **6. Etude de l'accumulation de certaines molécules organo-chlorées spécifiques chez *Anodonta cygnea* L., exposé *in situ* aux effluents d'une usine de pâte à papier blanchissant au chlore**

### **6.1. Exposition et prélèvement des anodontes**

Environ 50 anodontes de taille comprise entre 50 et 100 mm sont ramassés dans le plan d'eau de la ville de Metz, et ramenés au laboratoire dans des glacières contenant de l'eau du site. Au laboratoire, les anodontes sont triés selon leur longueur, et 43 individus de taille comprise homogène (69.8 à 82.4 mm de longueur, moyenne :  $75.1 \pm 3.8$  mm) sont retenus et conditionnés selon le protocole décrit au § 2.2.2. avant d'être transférés. Durant la phase de conditionnement 4 anodontes sont mortes. Le jour du transfert, 5 individus sont retirés, disséqués et les parties molles sont congelées à  $-18^{\circ}\text{C}$  jusqu'au moment de l'analyse. Les 34 anodontes restants sont répartis en deux lots homogènes dont le nombre d'individus dépend de la station d'exposition, en raison de la plus forte mortalité observée au niveau des stations situées en aval des rejets de l'usine durant les études antérieures :

- station 1 (amont) : 12 anodontes
- station 2 (aval) : 22 anodontes.

Les anodontes sont transférés sur les deux sites d'étude dans des glacières contenant de l'eau déchlorée et aérée à l'aide d'un bulleur à piles. Ils sont exposés durant 10 semaines au niveau des deux stations dans les mêmes cages que celles utilisées durant les études antérieures (cf. § 2.2.3.). L'état de vitalité de tous les individus est vérifié une fois par semaine durant la période d'exposition ; les individus morts sont comptabilisés et retirés des cages.

A la fin de la durée d'exposition, tous les anodontes encore vivants sont ramenés au laboratoire dans des bocaux en verre contenant de l'eau de la station. Après une période de 24 heures de stabulation dans de l'eau déchlorée, cinq individus des deux lots sont choisis au hasard et disséqués puis les parties molles sont congelées à  $-18^{\circ}\text{C}$  jusqu'au moment de l'analyse. Les individus restants sont remis dans la Moselle au niveau du plan d'eau de la ville de Metz.

### **6.2. Analyse des anodontes**

Les cinq individus de chaque lot sont préparés et analysés individuellement. Les parties molles des anodontes sont décongelées puis broyées à l'aide d'un mixeur jusqu'à obtention d'une masse homogène. Une fraction de celle-ci est pesée dans une boîte de Petri tarée, puis séchée à  $60^{\circ}\text{C}$  à l'étuve afin de déterminer le pourcentage de poids sec des anodontes. Le protocole d'extraction des

chlorophénols est alors identique à celui utilisé pour l'extraction des composés organo-halogénés extractibles décrit auparavant (cf. § 2.4.2.3.).

Après avoir déterminé le pourcentage de lipides des échantillons, les extraits sont repris dans 1 ml de cyclohexane et les chlorophénols sont dérivatisés afin d'être analysés par chromatographie en phase gazeuse.

L'extrait de cyclohexane contenant les chlorophénols est introduit dans un tube à centrifuger en verre de 20 ml contenant 5 ml d'eau nanopure, 1 ml d'anhydride acétique et 1 g de tétraborate de sodium. La solution est agitée vigoureusement durant 2 minutes au Vortex de manière à augmenter la surface de contact entre les différents composés et ainsi d'augmenter la vitesse de dérivatisation. Le tube est centrifugé à 4000 trs.min<sup>-1</sup> durant 5 minutes, puis le cyclohexane surnageant, contenant les chlorophénols dérivatisés est prélevé à l'aide d'une pipette Pasteur à usage unique.

Les chlorophénols sont dosés par chromatographie en phase gazeuse (Perkin Elmer, Modèle 8300) équipé d'un détecteur à capture d'électrons (ECD) dont la source radioactive est le Nickel 63 (Ni63 = 50 mCi). Les injections se font à l'aide d'une seringue SGE de 1 µl. La colonne utilisée est de type capillaire (J & W Scientific) dont les caractéristiques sont :

Phase	: DB - 5
Longueur	: 30 mètres
Ø intérieur	: 0.25 mm
Epaisseur du film	: 0.25 µm

La programmation en température de la colonne est :

palier de 1 minute à 100°C  
augmentation à 10°C par minute jusqu'à 250°C  
1 minute à 250°C.

Température de l'injecteur : 280°C

Température du détecteur : 380°C

Compte tenu des difficultés à disposer d'un étalon interne n'interférant avec aucun pic de chlorophénols, et ne connaissant pas les temps de rétention, ni les concentrations susceptibles d'être rencontrées dans les échantillons d'anodontes, l'utilisation d'une méthode de quantification par étalonnage externe a été retenue pour quantifier les chlorophénols. De plus, pour s'assurer que l'intégration des pics s'effectue dans la gamme linéaire du détecteur, une droite d'étalonnage a été réalisé pour chaque chlorophénol utilisé. Les exemples du 2,6 dichlorophénol et du pentachlorophénol sont présentés respectivement par les tableaux 17 et 18 ainsi que les figures 18 et 19.

Tableau 17 : Etude de la gamme de linéarité du 2,6-Dichlorophénol.

Concentration (ng/ml)	Aire du pic (unité de surface)
0.504	7.5
1.080	9.3
5.040	40.0
7.560	54.4
10.800	77.7
21.600	162.4

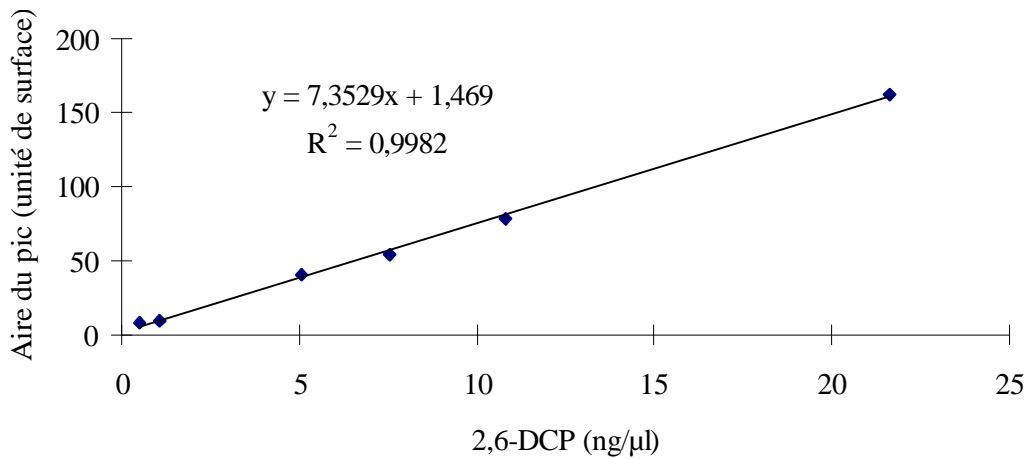


Figure 18 : Droite d'étalonnage du 2,6-Dichlorophénol.

Tableau 18 : Etude de la gamme de linéarité du Pentachlorophénol.

Concentration (ng/ml)	Aire du pic (unité de surface)
0.285	2.8
0.570	3.3
2.850	5.7
5.700	10.7
28.500	

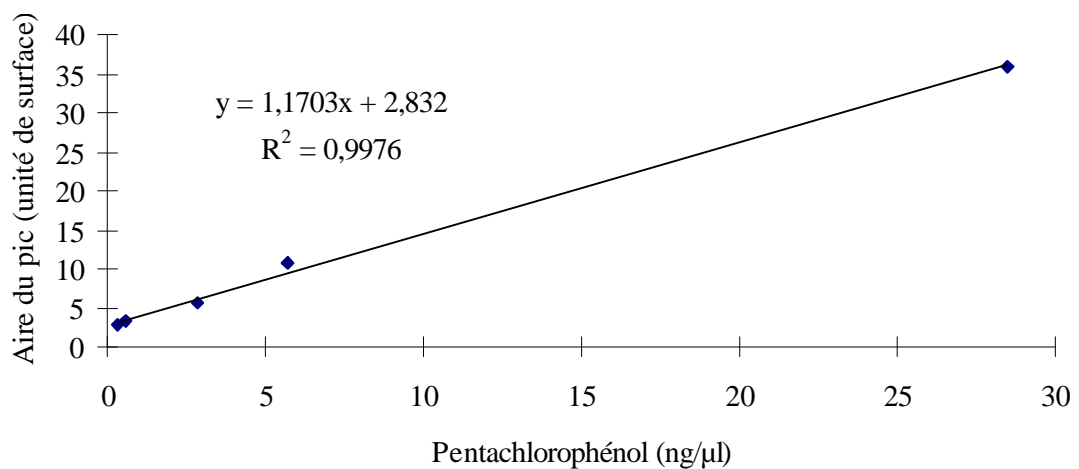


Figure 19 : Droite d'étalonnage du Pentachlorophénol.



Sept composés de la famille des chlorophénols ont été choisis, qui selon Suntio *et al.* (1988) font parti des molécules fréquemment rencontrées dans les effluents d'usines de pâte à papier blanchissant au chlore. Ces molécules peuvent être classées en deux grands groupes (Herve, 1991) :

- les chlorophénols provenant essentiellement de produits de protection et de traitement du bois ; ce sont le 2,4,6-Trichlorophénol (**2,4,6-TCP**) et le Pentachlorophénol (**PCP**),
- les chlorophénols essentiellement synthétisés lors de l'étape de blanchiment de la pâte à papier ; ce sont le 2,4-Dichlorophénol (**2,4-DCP**) et le 2,6-Dichlorophénol (**2,6-DCP**).

D'autre part, trois monochlorophénols que l'on ne peut pas classer préférentiellement dans un des deux groupes ont été suivis ; ce sont le 2-Chlorophénol (**2-CP**), le 3-Chlorophénol (**3-CP**) et le 4-Chlorophénol (**4-CP**). Les principales caractéristiques physico-chimiques de ces molécules sont regroupées dans le tableau 19.

Tableau 19 : Principales caractéristiques physico-chimiques des chlorophénols suivis dans cette étude (n.i. : non indiqué ; dans Suntio *et al.*, 1988).

Chlorophénols	Poids moléculaire g.mol <sup>-1</sup>	Constante de dissociation PKa	Solubilité dans l'eau (20°C ; pH 5.1) Mg.l <sup>-1</sup>	Coefficient de partage octanol-eau Log K <sub>ow</sub>
<b>2-Chlorophénol</b>	128.56	8.49 - 8.52	28500	2.15
<b>3-Chlorophénol</b>	128.56	8.52 - 8.85	26000	2.5
<b>4-Chlorophénol</b>	128.56	9.18 - 9.37	27100	2.42
<b>2,4-Dichlorophénol</b>	166.00	7.68	4500	3.2
<b>2,6-Dichlorophénol</b>	163.00	6.8	n.i.	3
<b>2,4,6-Trichlorophénol</b>	197.45	5.99 - 7.42	434	3.75
<b>Pentachlorophénol</b>	266.34	4.74 - 4.92	14 (à 25°C)	5.05

## 6.3. Résultats

### 6.3.1. Etude statistique

Les résultats de l'étude des paramètres physiologiques ainsi que des concentrations en chlorophénols entre les anodontes témoins et exposés au niveau des deux stations sont comparés à l'aide du test T de Student au seuil de 0.05.

### 6.3.2. Mortalité et paramètres physiologiques

#### \* Mortalité

La mortalité des anodontes a été élevée durant toute la durée de l'étude, aussi bien durant la phase de stabulation précédant le transfert que lors de l'exposition au niveau des deux stations. Le tableau 20 résume la mortalité hebdomadaire ; la mortalité totale est de 41.6 % et 63.6 %, respectivement au niveau de la station 1 de la station 2.

Tableau 20 : Mortalité observée durant les 70 jours au niveau des deux stations.

	Nombre initial	Temps d'exposition (jours)										Nombre final
		7	14	21	28	35	42	49	56	63	70	
<b>Station 1</b>	12	1	2	0	1	0	0	1	0	0	0	7
<b>Station 2</b>	22	3	2	3	2	2	1	1	0	0	0	8

#### \* Paramètres physiologiques

Trois paramètres physiologiques ont été suivis lors de la présente étude afin de rendre compte de l'état physiologique des anodontes lors de leur exposition au niveau des deux stations : l'indice de condition, défini par le rapport entre le poids frais des parties molles et la longueur de la coquille au cube (cf. § 3.2.2.2.), le pourcentage de poids sec par rapport au poids frais, et le pourcentage de lipides par rapport au poids sec. Le tableau 21 résume les moyennes  $\pm$  écart types de ces différents paramètres dans les anodontes témoins et exposés durant 70 jours au niveau des deux stations.

Tableau 21 : Paramètres physiologiques (indice de condition, pourcentage de poids sec et de lipides ; n = 5 pour tous ; Test T de Student au seuil de 5% : \* : différence significative entre le lot témoin et les lots exposés ; + : différence significative entre les lots des stations 1 et 2)

	Témoins	Station 1	Station 2
<b>Indice de condition</b>	2.38 $\pm$ 0.21	2.30 $\pm$ 0.19	2.12 $\pm$ 0.08* <sup>+</sup>
<b>% poids sec / poids frais</b>	10.58 $\pm$ 0.73	10.44 $\pm$ 0.66	9.46 $\pm$ 0.45* <sup>+</sup>
<b>% lipides / poids sec</b>	6.32 $\pm$ 0.35	5.98 $\pm$ 0.24	5.04 $\pm$ 0.24* <sup>+</sup>

Les indices de condition calculés pour les trois lots d'anodontes sont du même ordre de grandeur que ceux observés lors de l'étude d'accumulation d'EOX dans les différents organes de *Anodonta cygnea* (cf. §3.2.2.2.). Ils diminuent légèrement au cours des 70 jours d'exposition au niveau des deux stations. Cependant, la diminution n'est statistiquement significative que chez les individus de la station 2, et ce aussi bien vis-à-vis du lot témoin que vis-à-vis du lot de la station 1.

De même que pour l'indice de condition, le pourcentage de poids sec présente des valeurs similaires à celles observées durant les études précédentes. Il diminue également durant l'exposition aux deux stations, mais la diminution n'est statistiquement significative que pour le lot d'anodontes exposé à la station aval.

Le pourcentage de lipides présente la même évolution que les deux autres paramètres physiologiques avec une diminution dans les lots d'anodontes exposés sur le terrain. Cette diminution reste faible et non significative pour le lot de la station 1, alors qu'elle est importante et significative pour celui de la station 2.

### 6.3.3. Accumulation des chlorophénols

Les résultats de la quantification des chlorophénols dans les lots d'anodontes témoins et exposés durant 70 jours aux deux stations sont présentés dans le tableau 22.

Tableau 22 : Concentrations (moyenne  $\pm$  écart-type en  $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$  de lipides) en chlorophénols dans les anodontes témoins et exposés (n.d. : non détecté ; C.V. : coefficient de variation ; n = 5 pour tous ; Test T de Student au seuil de 5% : \* : différence significative entre le lot témoin et les lots exposés ; + : différence significative entre les lots des stations 1 et 2)

ng.g <sup>-1</sup> de lipides	Témoins		Station 1		Station 2	
	Moy. $\pm$ E.t.	CV	Moy. $\pm$ E.t.	CV	Moy. $\pm$ E.t.	CV
<b>2-Chlorophénol</b>	75.3 $\pm$ 21.7	28.7	51.8 $\pm$ 17.3	33.4	91.8 $\pm$ 20.7 <sup>+</sup>	22.5
<b>3-Chlorophénol</b>	53.8 $\pm$ 15.9	29.5	49.3 $\pm$ 11.1	22.5	86.7 $\pm$ 13.8 <sup>+*</sup>	15.9
<b>4-Chlorophénol</b>	n.d.		n.d.		n.d.	
<b>2,4-Dichlorophénol</b>	n.d.		n.d.		137.3 $\pm$ 37.6 <sup>+*</sup>	27.4
<b>2,6-Dichlorophénol</b>	n.d.		n.d.		98.3 $\pm$ 28.7 <sup>+*</sup>	29.2
<b>2,4,6-Trichlorophénol</b>	n.d.		n.d.		475.3 $\pm$ 121.7 <sup>+*</sup>	25.6
<b>Pentachlorophénol</b>	815 $\pm$ 128	15.7	737 $\pm$ 182	24.7	1443 $\pm$ 228 <sup>+*</sup>	15.8

Parmi les 7 chlorophénols suivi dans ce travail, 3 (2-CP, 3-CP et PCP) sont présents dans les anodontes témoins à des concentrations moyennes variant de  $53.8 \pm 15.9$  à  $815 \pm 128$  ng.g<sup>-1</sup> lipides, respectivement pour le 3-CP et le PCP.

Ces trois molécules se retrouvent également dans les anodontes ayant été exposés au niveau de la station 1, en amont des rejets de l'usine de pâte à papier. Leur concentration moyenne diminue au cours des 70 jours d'exposition, sans pour autant que cette diminution ne soit statistiquement significative.

Mis à part le 4-CP, qui n'a été déterminé dans aucun individu, que ce soit en amont ou en aval des rejets, tous les chlorophénols sont présents dans les anodontes exposés en aval des rejets de l'usine de pâte à papier. Leur concentration moyenne varie de  $86.7 \pm 13.8$  à  $1443 \pm 228$  ng.g<sup>-1</sup> lipides, respectivement pour le 3-CP et le PCP. De plus, pour tous les chlorophénols la concentration moyenne augmente de façon significative, que ce soit vis-à-vis des témoins ou vis-à-vis des anodontes de la station 1 :

2-Chlorophénol : x 1.2

3-Chlorophénol : x 1.6

Pentachlorophénol : x 1.8

Comme lors des étude d'accumulation des EOX réalisée précédemment, on constate une forte variabilité interindividuelle, se traduisant par un coefficient de variation généralement supérieur à 20 %.

## 6.4. Discussion

La présence de certains chlorophénols (2-CP, 3-CP et PCP) dans les tissus des anodontes témoins prélevés au niveau du plan d'eau de la ville de Metz peut s'expliquer par une faible contamination de l'eau de la Moselle à cet endroit. Selon Herve (1991), ces composés, et plus particulièrement le pentachlorophénol, sont essentiellement d'origine anthropique, soit sous forme de produits secondaires indésirés issus de processus de combustion ou de chloration, soit par leur utilisation délibérée. De fait, même si en France le décret du 27 juillet 1994 interdit la mise sur le marché de produits contenant plus de 0.1 % (en masse) de PCP, des dérogations sont prévues dans certaines installations, notamment pour la conservation du bois, l'imprégnation de certaines fibres et textiles, et comme agent de synthèse ou de transformation dans des procédés industriels.

La diminution des concentrations en chlorophénols observée dans les tissus des anodontes exposés au niveau de la station située en amont des rejets de l'usine de pâte à papier est le résultat de la

métabolisation de ces composés qui se fait de manière plus rapide pour le 2-chlorophénol (- 31 %) que pour le 3-chlorophénol (- 8%) et le pentachlorophénol (- 9.5%) durant les 70 jours d'exposition.

Mis à part pour le 4-chlorophénol, tous les chlorophénols suivis dans cette étude sont présents dans les tissus des anodontes exposés au niveau de la station située en aval des rejets de l'usine de pâte à papier. Selon Herve (1991), ces composés proviennent aussi bien de la conservation du bois (essentiellement le pentachlorophénol) que de l'utilisation du chlore lors de l'étape de blanchiment de la pâte à papier (dichlorophénols). Le taux d'accumulation augmente avec la valeur du coefficient de partage octano-eau, en concordance avec la liposolubilité des composés (Suntio *et al.*, 1988). Ainsi, la concentration moyenne en pentachlorophénol (Log Kow = 5.05) augmente d'un facteur 1.8 alors que celle du 2-chlorophénol (Log Kow = 2.15) et du 3-chlorophénol (Log Kow = 2.5) n'augmente que respectivement d'un facteur 1.2 et 1.3. Selon Mäkelä (1995), l'accumulation se fait de manière plus importante dans les organes présentant les plus fortes teneurs en lipides ; cet auteur montre que lors d'une exposition en laboratoire de *Anodonta anatina* à différentes concentrations de pentachlorophénol, plus de 30 % du composé sont accumulés par la glande digestive des mollusques, alors que seuls 13 % se retrouvent dans le manteau et le pied des anodontes et 2 % dans l'hémolymphe.

## 6.5. Conclusion

Les rejets de l'usine de pâte à papier blanchissant au chlore contiennent une large gamme de composés organo-chlorés parmi laquelle on rencontre la quasi totalité des chlorophénols et de leurs dérivés chloro-guaiacols et chloro-catéchols. Ces composés fortement hydrophobes s'accumulent plus ou moins fortement dans les tissus des organismes aquatiques, en relation avec leur caractéristiques physico-chimiques (surtout le coefficient de partage octano-eau) et les conditions du milieu, telles que la température (Mäkelä, 1995). Dans une expérience en laboratoire, Mäkelä & Oikari (1990) observent un plateau d'équilibre entre les concentrations en chlorophénols dans l'eau des bacs d'exposition et les tissus de *Anodonta anatina* en 24 heures. En raison du protocole expérimental utilisé (un seul prélèvement après 70 jours d'exposition), ce phénomène n'a pas pu être observé dans la présente étude. Une étude de terrain complémentaire, combinant des prélèvements d'eau ainsi que des prélèvements d'anodontes à des intervalles de temps plus courts serait intéressante et permettrait de mettre en évidence un éventuel plateau d'équilibre dans l'accumulation des chlorophénols par *Anodonta cygnea*.

## 7. Synthèse et conclusion générale

L'utilisation du paramètre de groupe AOX dans l'estimation de la contamination du milieu aquatique par les composés organo-halogénés présente de nombreux avantages. Le premier atout est le fait qu'il permet de pallier à notre manque de connaissance actuel sur la nature d'un grand nombre de ces composés, aussi bien d'origine anthropique que d'origine naturelle, dont seuls 10 à 25 % ont été identifiés. Un autre avantage de cette méthode réside dans l'adsorption des composés organo-halogénés sur du charbon actif, permettant de concentrer les nombreuses molécules présentes à des concentrations individuelles faibles et proches des limites de détection. En revanche, le désavantage d'une approche globale est la perte des informations concernant les molécules identifiables, par exemple au moyen de méthodes chromatographiques, même si ces dernières donnent en général une information par défaut ; puisque d'une part, l'utilisation de solvants pour l'extraction limite l'identification aux composés hydrophobes passant dans la phase organique, et que d'autre part, la détermination et la quantification se limitent aux composés de nature connue, et dont la vaporisation n'entraîne pas leur décomposition. L'utilisation de ce paramètre de groupe dans le cas d'effluents d'usines de pâte à papier blanchissant au chlore est d'autant plus approprié que ces derniers comportent un mélange complexe de composés organo-halogénés dont les effets sur le milieu aquatique ne peuvent pas être quantifiés individuellement.

Le premier objectif de l'étude précédente a été l'acquisition et la maîtrise de la technologie et de la méthodologie d'analyse des composés organo-halogénés adsorbables, nouvelle pour le Centre de Recherches Ecologiques. Après une période expérimentale de mise au point et d'optimisation, la méthode analytique du dosage des AOX a été appliquée à l'eau et aux sédiments de quatre cours d'eau du nord-est de la France (CREUM - AERM, 1995 ; Hayer & Pihan, 1998 - AGH TM - en annexe).

L'échantillonnage mensuel d'eau au niveau de 8 stations différentes durant 18 mois, ainsi que la réalisation de profils longitudinaux des rivières Moselle, Meurthe, Meuse et Chiers, nous a fourni une gamme élargie des niveaux de concentrations en AOX, aussi bien dans des régions plus ou moins fortement influencées par les activités anthropiques, que dans des régions situées en tête de bassin versant. Les différentes stations échantillonnées peuvent être classées, selon les valeurs guides établies par l'association des services utilisateurs d'eau du Rhin et de la Meuse (RIWA), dans trois classes :

- les stations amont, pour lesquelles l'influence anthropique est modérée, voire négligeable, et dont la concentration moyenne en AOX est inférieure à  $25 \mu\text{g Cl.l}^{-1}$ ,
- les stations intermédiaires, situées en aval d'agglomérations, avec une concentration moyenne en AOX comprise entre 25 et  $50 \mu\text{g Cl.l}^{-1}$ , résultant d'une influence anthropique significative,
- les stations fortement influencées par les activités anthropiques, situées en aval de zones industrialisées, et présentant une concentration moyenne en AOX supérieure à  $50 \mu\text{g Cl.l}^{-1}$ .

Le caractère ubiquiste des composés organo-halogénés se retrouve également dans les sédiments des différentes stations étudiées, mais leur origine n'est pas la même (Hayer *et al.*, 1996 - Chemosphere - en annexe). De fait, si les concentrations élevées en AOX rencontrées à l'aval des rejets de l'usine de pâte à papier s'expliquent par des phénomènes d'accumulation, leur présence dans les sédiments des stations amont renforce l'hypothèse de processus de biohalogénéation naturels, comme ils ont pu être observés dans les pays scandinaves. Les concentrations naturelles rencontrées dans le nord-est de la France sont du même ordre de grandeur que celles rencontrées dans le Golfe de Botnie, mais nettement plus faibles que celles mesurées dans le Golfe de Finlande. Ces différences peuvent en partie s'expliquer par des concentrations élevées en ions chlorures dans les sédiments marins, ions qui peuvent interférer sur le dosage des composés organo-halogénés. De plus, de part leurs propriétés physico-chimiques, les composés organo-halogénés s'accumulent préférentiellement dans la partie organique des sédiments. La composition de ces derniers, et plus particulièrement de la fraction organique, est sujet à de fortes variations aussi bien dans l'espace que dans le temps. Pour ces différentes raisons, il est important d'exprimer les concentrations en AOX dans les sédiments de deux manières : par rapport au poids sec et par rapport au poids de matière organique du sédiment. Dans le cas de l'usine de pâte à papier, les concentrations en AOX dans les sédiments répondent rapidement à l'évolution des teneurs en AOX dans l'eau. Lorsque l'usine fonctionne normalement, et que les rejets d'EPKB sont chroniques, il existe une bonne corrélation entre les concentrations en AOX dans l'eau et celles dans les sédiments. La significativité de cette corrélation est plus élevée lorsque les concentrations sont exprimées par rapport au poids de matière organique, soulignant l'importance de la prise en compte de la nature du sédiment.

Ainsi, les sédiments sont de bons indicateurs de la contamination de composés organo-halogénés par les usines de pâte à papier blanchissant au chlore. Cependant, si la mesure des AOX permet de quantifier la totalité des composés organo-halogénés présents dans les sédiments, elle ne donne pas d'informations sur la fraction biodisponible, qui est celle qui représente un risque écotoxicologique pour l'écosystème.

L'utilisation de paramètres de groupe dans l'estimation des effets écotoxicologiques des EPKB sur les organismes aquatiques a souvent été critiquée en raison de l'absence directe entre les concentrations et la toxicité. En effet, l'exposition de quatre espèces de mollusques, *Anodonta cygnea*, *Unio pictorum*, *Dreissena polymorpha* et *Viviparus viviparus*, durant 28 jours, montre une bonne résistance de ces organismes aux effluents de l'usine de pâte à papier. Même lorsque l'exposition est prolongée jusqu'à 75 et 91 jours, le taux de mortalité de *Anodonta cygnea* reste faible et inférieur à 10%. Ceci semble confirmer les affirmations d'autres auteurs, selon les quels les EPKB, malgré une grande diversité de composés organo-halogénés et des concentrations en AOX élevées, ne présentent pas de toxicité aiguë pour les organismes aquatiques. Cette hypothèse est renforcée par les résultats des

études histologiques sur différents organes de *Anodonta cygnea* exposés durant 28 et 70 jours aux EPKB, et qui ne montrent pas d'effets marquants au niveau de la structure des branchies, des glandes digestives et des gonades.

Toutefois, à la vue globale des résultats de toutes nos études, une autre hypothèse peut être avancée. En effet, avec une mortalité supérieur à 35% après 147 jours d'exposition au niveau de la station polluée par les composés organo-halogénés, et se poursuivant même après le transfert à la station exempte de pollution, il semble que les EPKB soient toxiques à moyen terme pour les mollusques, et notamment pour *Anodonta cygnea*.

Cette hypothèse tient compte de la capacité des mollusques aquatiques de s'isoler du milieu environnant lorsque les conditions extérieures deviennent défavorables, voire toxiques. L'exposition prolongée de *Anodonta cygnea* peut alors être divisée en deux phases : une phase initiale et une phase finale (figure 20).

Durant la phase initiale, suivant directement le transfert et l'exposition aux EPKB, l'anodonte s'isole du milieu environnant contaminé par la fermeture de ses valves. En effet, des périodes de moindre filtration, variant de 5 à 66 jours, ont pu être observées chez différentes espèces d'unionidés exposés à des micropolluants. Pendant cette période, l'anodonte ne filtre que rarement, assurant un renouvellement minimal de l'eau de la cavité palléale, et réduit ainsi fortement son temps de contact avec les composés organo-halogénés, expliquant la faible mortalité observée lors d'exposition allant jusqu'à 91 jours. Cependant, l'anodonte ne peut pas rester sans échange avec le milieu, et dans la phase finale, il se trouve confronté à un état d'asphyxie déclenchant la reprise de filtration ; l'exposition prolongée se traduit par une augmentation importante de la mortalité.

Même si durant la phase initiale l'anodonte ne filtre que par intermittence, il accumule les composés organo-halogénés de manière linéaire en fonction du temps d'exposition. La filtration intermittente des anodontes peut varier fortement d'un individu à l'autre, ce qui peut expliquer les grandes différences interindividuelles observées dans l'accumulation des EOX. Le fait que la qualité générale de l'eau s'améliore au niveau de la station 3 par rapport à la station 2, contribue à expliquer les différences d'accumulation observées entre ces deux stations. En effet, au niveau de la station 3, l'anodonte filtre plus souvent qu'au niveau de la station 2, ce qui se traduit par un facteur de bioaccumulation plus élevé. Cependant, en termes de quantités réellement accumulées, le facteur de pollution reste plus élevé chez les anodontes exposés au niveau de la station la plus contaminée, c'est à dire la station 2.

A ces différences biologiques et comportementales de l'anodonte, il convient d'ajouter les différences physico-chimiques des composés organo-halogénés, et notamment leur solubilité et leur coefficient de partage n-octanol-eau. En effet, la plupart des composés organo-halogénés sont





hydrophobes et s'accumulent rapidement dans les sédiments et les matières en suspension. Ces dernières étant très abondantes directement en aval des rejets de l'usine de pâte à papier, il y a une diminution importante de la biodisponibilité des composés organo-halogénés au niveau de la station 2. Ces différences de propriétés chimiques peuvent également expliquer en partie les différentes modalités d'accumulation observées dans les branchies, les glandes digestives et les gonades de *Anodonta cygnea*. En effet, il semble que les composés organo-halogénés qui s'accumulent dans ces trois types d'organes ne soient pas de même nature, et dépendent de la localisation et des fonctions de l'organe considéré. Au niveau des branchies, l'accumulation semble se faire essentiellement par diffusion passive, ce qui implique que les composés organo-halogénés accumulés soient sous forme dissoute, ce qui explique un facteur de bioconcentration plus important à la station 2 qu'à la station 3. En revanche, au niveau des glandes digestives, l'accumulation d'EOX serait essentiellement due à la digestion et à l'absorption des composés organo-halogénés associés aux particules en suspension, ce qui se visualise aussi bien par un facteur de bioconcentration que par un facteur de pollution plus élevés au niveau de la station 2. Quant aux gonades, qui ne sont pas en contact direct avec le milieu environnant contaminé, l'accumulation des composés organo-halogénés ne peut s'expliquer que par des phénomènes de transport entre les organes, c'est pourquoi les concentrations en EOX augmentent avec la cinétique la plus lente dans cet organe. D'autre part, la nature, et plus particulièrement la composition lipidique des organes influence l'accumulation des composés organo-halogénés. En effet, en raison de leur caractère lipophile, ces derniers s'accumulent préférentiellement dans les lipides ; ainsi les plus forts taux d'accumulation sont observés dans les glandes digestives, qui présentent le plus fort pourcentage en lipides.

Durant la phase finale, avec l'asphyxie, l'anodonte reprend sa filtration, et par conséquent les temps de contact avec les composés organo-halogénés augmentent. Les répercussions d'une activité de filtration sont multiples, et se traduisent par une augmentation de la mortalité due à la toxicité des rejets chroniques d'EPKB, par une augmentation importante des concentrations en EOX dans les anodontes et des variations interindividuelles plus faibles.

De même que lors de la cinétique d'accumulation, le relargage des composés organo-halogénés accumulés par *Anodonta cygnea* semble se faire en deux phases : une phase rapide et une phase lente, qui dépendent d'une part de la nature et des propriétés physico-chimiques des molécules accumulées, et d'autre part du lieu d'accumulation de ces derniers. Il est à noter qu'après une exposition de 42 jours au niveau de la station exempte de contamination par les composés organo-halogénés, la totalité des EOX accumulés n'a pas été relarguée par l'anodonte. Ceci peut s'expliquer soit par une période de dépuración trop courte, soit par l'existence d'une fraction de composés organo-halogénés non métabolisables et donc non relargable par l'anodonte. La figure 21 tente de résumer les différentes phases d'accumulation et de relargage des composés organo-halogénés issus des EPKB chez *Anodonta cygnea* L.



## Références bibliographiques

- Adams W.**, 1960. Mollusques. Tome I - Mollusques terrestres et dulcicoles. Bruxelles, Institut royal des Sciences Naturelles de Belgique. 402 pages.
- Axegard P.**, 1988. Improvement of bleach plant effluent by cutting back on Cl<sub>2</sub> - International pulp bleaching conference, april 1988. *Tappi proceedings*, pp. 69-76.
- Barker D.E., Khan R.A., Lee E.M., Hooper R.G. & Ryan K.**, 1994. Anomalies in sculpins (*Myoxocephalus* spp.) sampled near a pulp and paper mill. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 26, pp. 491-496.
- Bengtsson B.-E.**, 1988. Effects of pulp mill effluents on skeletal parameters in fish - a progress report. *Water Science and Technology*, 20, pp. 87-94.
- Bengtsson A. & Bengtsson B.-E.**, 1983. A method to registrate spinal and vertebral anomalies in fourhorn sculpin, *Myoxocephalus quadricornis* L. (Pisces). *Aquilo Ser. Zoology*, 22, pp. 61-64.
- Berry R.**, 1992. Adsorbable organically bound halogen - an overview. *Pulp and Paper World Technology*, pp. 51-55.
- Björk M.**, 1995. Bioavailability and uptake of hydrophobic organic contaminants in bivalve filter-feeders. *Annales Zoologici Fennici*, 32, pp. 237-345.
- Broman D., Lindqvist L., Lundberg I.**, 1991. Cadmium and zinc in *Mytilus edulis* L. from the Bothnian sea and the northern Baltic proper. *Environmental Pollution*, 74, pp. 227-244.
- Calambodikis J., Mowrer J., Beug M.W. & Herman S.G.**, 1979. Selective retention of polychlorinated biphenyl components in the mussel, *Mytilus edulis*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 8, pp. 299-308.
- CREUM - AERM**, 1995. Evaluation de la capacité bioaccumulatrice d'organismes aquatiques vis-à-vis de composés organo-halogénés. 18714 RM, 51 pages.
- DIN** (Deutsches Institut für Normung e.V.), 1985. Bestimmung des adsorbierbaren, organisch gebundenen Halogene (AOX). DIN 38 409, Teil 14, Summarische Wirkungs- und Stoffkenngrößen (Gruppe H). Beuth Verlag, Berlin, 11 pages.
- Englund V.P.M. & Heino M.P.**, 1996. The freshwater mussel (*Anodonta anatina*) in monitoring of 2,4,6-trichlorophenol : behaviour and environmental variation considered. *Chemosphere*, 32, pp. 391-403.
- Foulquier L.**, 1972. Méthodologie pour la recherche d'un indicateur biologique en radioécologie (Exemple : le césium 137 et un mollusque d'eau douce *Anodonta cygnea* L.). Centre d'Etudes Nucléaires de Cadarache, Rapport CEA R 4373, 275 pages.
- Glöer P. & Meier-Brock C.**, 1994. Süßwassermollusken. Deutscher Jugendbund für Naturbeobachtung. 73 pages.
- Goldberg E.D.**, 1975. The mussel watch - a first step in marine monitoring. *Marine Pollution Bulletin*, 6, pp. 111.
- Goldberg E.D., Bowen V.T., Farrington J.W., Harvey G., Martin J.H., Parker P.L., Risebrough R.W., Robertson W., Scheider E. & Gamble E.**, 1978. The mussel watch. *Environmental Conservation* 5, pp. 101-125.
- Goris K.**, 1989. Investigation des possibilités de diminuer les rejets d'organo-chlorés par l'adoption d'une technologie propre dans l'usine de pâte à papier « la cellulose des Ardennes » (B). Mém. Rech. D.E.S.E., Arlon, 164 pages.
- Haas F.**, 1969. Superfamilia Unionacea. In : Das Tierreich. 663 pages
- Hanson J.M., MacKay W.C. & Prepas E.E.**, 1988. The effects of water depth and density on the growth of an unionid clam. *Freshwater Biology*, 19, pp. 346-355.
- Haukioja E. & Hakala T.**, 1978. Measuring growth from shell rings in populations of *Anodonta piscinalis* (Pelecypoda, Unionidae). *Annales Zoologici Fennici*, 15, pp. 60-65.

- Hayer F. & Pihan J.C.**, 1996. Accumulation of extractable organic halogens (EOX) by the freshwater mussel, *Anodonta cygnea* L., exposed to chlorine bleached pulp and paper mill effluents. *Chemosphere*, 32, pp. 791-803.
- Hayer F., Wagner P. & Pihan J.C.**, 1996. Monitoring of extractable organic halogens (EOX) in chlorine bleaching pulp and paper mill effluents using four species of aquatic mollusks. *Chemosphere*, 33, pp. 2321-2334.
- Haynes D., Mosse P. & Levay G.**, 1995. The use of transplanted cultured mussels (*Mytilus edulis*) to monitor pollutants along the Ninety Mile beach, Victoria, Australia - I. Extractable organohalogens (EOX). *Marine Pollution Bulletin*, 30, pp. 463-469.
- Heard W.H.**, 1975. Sexuality and other aspects of reproduction in *Anodonta* (Pelecypoda, Unionidae). *Malacologia*, 15, pp. 81-103.
- Hektoen H., Berge J.A., Ingebrigtsen K., Knutzen J. & Oehme M.**, 1994. Elimination of polychlorinated dibenzofurans and dibenzo-p-dioxins from blue mussel (*Mytilus edulis*) and tissue distribution of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (2,3,7,8-TCDD). *Chemosphere*, 29, pp. 1491-1499.
- Hemelraad J., Kleinveld H.A., de Roos A.M., Holwerda D.A. & Zandee D.I.**, 1987. Cadmium kinetics in freshwater clams. III. Effect of zinc on uptake and distribution of cadmium in *Anodonta cygnea*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 16, pp. 95-101.
- Henry M.**, 1987. La glande digestive de la palourde méditerranéenne *Ruditapes decussatus* L. Recherche ultrastructurales, cytochimiques, écophysiologicals et écotoxicologiques. Th. doct.: Sciences, Aix-Marseille, 439 pages.
- Herve S.**, 1991. Mussel incubation method for monitoring organochlorine compounds in freshwater recipients of pulp and paper industry. Academic Dissertation for the Degree of Doctor of Philosophy, Jyväskylä, Finland. ISBN 951-680-548-5. 145 pages.
- Hodson P.V., Efler S., Wilson J.Y., El-Shaarawi A., Maj M. & Williams T.G.**, 1996. Measuring the potency of pulp mill effluents for induction of hepatic mixed-function oxygenase activity in fish. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 49, pp. 101-128.
- Illies J.**, 1978. Limnofauna europea. Ed. Swets & Zeitlinger, B.V., Amsterdam, pp. 135-137.
- Jenner H.A., Hemelraad J., Marquenie J.M. & Noppert F.**, 1991. Cadmium kinetics in freshwater clams (unionidae) under field and laboratory conditions. *The Science of the Total Environment*, 108, pp. 205-214.
- Khan R.A., Barker D.E., Hooper R., Lee E.M., Ryan K. & Nag K.**, 1994. Histopathology in winter flounder (*Pleuronectes americanus*) living adjacent to a pulp and paper mill. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 26, pp. 95-102.
- Koenig B.G. & Metcalfe C.D.**, 1990. The distribution of PCB congeners in bivalves, *Elliptio complanata*, introduced in the Ontonabee River Peterborough, Ontario. *Chemosphere*, 21, pp. 1441-1449.
- Kovacs T.G., Gibbons J.S., Tremblay L.A., O'Connor B.I., Martel P.H. & Voss R.H.**, 1995. The effects of a secondary-treated bleached kraft mill effluent on aquatic organisms as assessed by short-term and long-term laboratory tests. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 31, pp. 7-22.
- Kraak M.H.S., Scholten M.C.T., Peeters W.H.M. & de Kock W.C.**, 1991. Biomonitoring of heavy metals in the western European rivers Rhine and Meuse using the freshwater mussel *Dreissena polymorpha*. *Environmental Pollution*, 74, pp. 101-114.
- Kukkonen J.**, 1992. Effects of lignin and chlorolignin in pulp mill effluents on the binding and bioavailability of hydrophobic organic pollutants. *Water Research*, 26, pp. 1523-1532.
- Larsson P., Okla L. & Collvin L.**, 1993. Reproductive status and lipid content as factors in PCB, DDT and HCH contamination of a population of pike (*Esox lucius* L.). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 12, pp. 855-861.

- Léglize L. & Crochard C.**, 1987. Vérification expérimentale du choix de *Dreissena polymorpha* Pallas (lamelibranche) comme bioindicateur de la pollution métallique. *Nat. Can. (Rev. Ecol. Syst.)*, 114, pp. 315-322.
- Lindesjö E. & Thulin J.**, 1990. Fin erosion of perch *Perca fluviatilis* and ruffle *Gymnocephalus cernua* in a pulp mill effluent area. *Diseases of Aquatic Organisms*, 8, pp. 119-126.
- Lindesjö E. & Thulin J.**, 1992. A skeletal deformity of northern pike (*Esox lucius*) related to pulp mill effluents. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 49, pp. 166-172.
- Lindesjö E. & Thulin J.**, 1994. Histopathology of skin and gills of fish in pulp mill effluents. *Diseases of Aquatic Organisms*, 18, pp. 81-93.
- Lindesjö E. & Thulin J., Bengtsson B-E. & Tjärnlund U.**, 1994. Abnormalities of a gill cover bone, the operculum, in perch *Perca fluviatilis* from a pulp mill effluent area. *Aquatic Toxicology*, 28, pp. 189-207.
- Mäkelä P.**, 1995. Freshwater mussel monitoring : the duck mussel *Anodonta anatina* in water quality assessment. Thèse de doctorat. Univ. Joensuu. Simola H. (ed). 47 pages + 6 publications.
- Mäkelä P. & Oikari A.O.J.**, 1990. Uptake and body distribution of chlorinated phenolics in the freshwater mussel, *Anodonta anatina* L. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 20, pp. 354-362.
- Mäkelä T.P., Petänen T., Kukkonen J. & Oikari A.O.J.**, 1991. Accumulation and depuration of chlorinated phenolics in the freshwater mussel (*Anodonta anatina* L.). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 22, pp. 153-163.
- Mäkelä T.P., Lindström-Seppä P. & Oikari A.O.J.**, 1992. Organochlorine residues and physiological condition of the freshwater mussel *Anodonta anatina* caged in river Pielinen, eastern Finland, receiving pulp mill effluents. *Aqua Fennica*, 22, pp. 49-58.
- Martinsen K., Kringstad A. & Carlberg G.E.**, 1988. Methods for determination of sum parameters and characterization of organochlorine compounds in spent bleach liquors from pulp mills and water, sediment and biological samples from receiving waters. *Water Science and Technology*, 20, pp. 13-24.
- Mersch J.**, 1993. Modalités d'utilisation de la moule d'eau douce *Dreissena polymorpha* en tant qu'indicateur biologique de la contamination des écosystèmes aquatiques par les métaux lourds. Comparaison avec un autre type d'organisme sentinelle : les mousses aquatiques. Th. doct. : Sci. vie, Ecotoxicol.: Metz, 210 pages.
- Metcalf J.L. & Charlton M.N.**, 1990. Freshwater mussels as biomonitors for organic industrial contaminants and pesticides in the St. Lawrence river. *The Science of the Total Environment*, 97/98, pp. 595-615.
- Negus C.L.**, 1966. A quantitative study of growth and reproduction of unionidae mussels in the river Thames at Reading. *Journal of Animal Ecology*, 35, pp. 513-532.
- Pekkarinen M.**, Annual ring formation in some unionid shells in the river Vantaanjoki (Southern Finland). *Bivalve studies in Finland*, 1, pp. 311-321.
- Pellinen J., Kukkonen J., Herb A., Mäkelä P. & Oikari A.**, 1993. Bioaccumulation of pulp mill effluent-related compounds in aquatic animals. *The Science of the Total Environment*, Supplement 1993, pp. 499-510.
- Pellinen J., Ruokolainen M., Mäkelä P. & Taskinen J.**, 1994. Organic halogen compounds, EOX, in mussels from a clean lake and a pulp mill recipient. *Chemosphere*, 29, pp. 1515-1526.
- Phillips D.J.H.**, 1977. The use of biological indicator organisms to monitor trace metal pollution in marine and estuarine environments : a review. *Environmental Pollution*, 13, pp. 281-317.
- Salanki J. & V-Balogh K.**, 1989. Physiological background for using freshwater mussels in monitoring copper and lead pollution. *Hydrobiologia* 188/189, pp. 445-454.
- Sharples A.D., Campin D.N. & Evans C.W.**, 1994. Fin erosion in a feral population of goldfish, *Carassius auratus* (L.), exposed to bleached kraft mill effluent. *Journal of Fish Diseases*, 17, pp. 483-493.
- Soimasuo R., Aaltonen T., Nikinmaa M., Pellinen J., Ristola T. & Oikari A.**, 1995. Physiological toxicity of low-chlorine bleached pulp and paper mill effluents on whitefish (*Coregonus*

- lavaretus* L. s.l.) : a laboratory exposure simulating lake pollution. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 31, pp. 228-237.
- Spacie A. & Hamelink J.L.**, 1982. Alternative models for describing bioconcentration of organics in fish. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 1, pp. 309-320.
- Sprung M. & Rose U.**, 1988. Influence of food size and food quantity on the feeding of the mussel *Dreissena polymorpha*. *Oecologia*, 77, pp. 526-532.
- Stevens A.A., Dressman R.C., Sorrell R.K. & Brass H.J.**, 1985. Organic halogen measurements : current uses and future prospects. *Journal of American Water Works Association*, 77, pp 146-154.
- Suntio L.R., Ying Shiu W. & Mackay D.**, 1988. A review of the nature and properties of chemicals present in pulp mill effluents. *Chemosphere*, 17, pp. 1249-1290.
- Vogel W.R. & Chovanec A.**, 1989. Belastung von Fließgewässern durch die Zellstoff- und Papierindustrie in Österreich. Umweltbundesamt Wien - Autriche. 115 pages.
- Wesén C.**, 1988. Determination of the inorganic chloride contribution to the extractable, organically bound chlorine in fish. *Vatten*, 44, pp. 213-216.
- Widdows J. & Johnson D.**, 1988. Physiological energetics of *Mytilus edulis* : scope for growth. *Marine Ecology Progress Series*, 46, pp. 113-121.
- Winter S.**, 1996. Cadmium uptake kinetics by freshwater mollusc soft body under hard and soft water conditions. *Chemosphere*, 32, pp. 1937-1948.
- Zatta P., Gobbo S., Rocco P., Perazzolo M. & Favarato M.**, 1992. Evaluation of heavy metal pollution in the Venetian lagoon by using *Mytilus galloprovincialis* as biological indicator. *The Science of the Total Environment*, 119, pp. 29-41.