Accumulation de composés organo-halogénés extractibles (EOX) dans différents organes du bivalve d'eau douce, *Anodonta cygnea* L., exposé *in situ* aux effluents d'une usine de pâte à papier blanchissant au chlore

F. Hayer¹
J.-C. Pihan¹

Mots-clés : *Anodonta cygnea*, bioaccumulation, branchies, glande digestive, gonade, AOX, EOX.

Des bivalves d'eau douce, *Anodonta cygnea* L., ont été récoltés dans une station de référence et transférés sur trois stations situées en amont (1) et en aval (2) d'une usine de pâte à papier blanchissant au chlore. Durant les 91 jours de l'expérience, de l'eau et des anodontes sont prélevés régulièrement au niveau des trois stations et les micropolluants organo-halogénés sont déterminés à l'aide des paramètres de groupe AOX et EOX. La qualité générale de l'eau se dégrade à l'aval des rejets de l'usine et présente une contamination chronique par les AOX, dont les concentrations moyennes sont multipliées par un facteur 9 à 16 par rapport à la station amont. Les anodontes exposés au niveau de la station amont ne montrent pas de variations significatives des concentrations en EOX. Par contre, une accumulation progressive des EOX est observée dans les branchies, les glandes digestives et les gonades chez les anodontes exposés à l'aval des rejets. Les facteurs d'accumulation, calculés comme le rapport entre les concentrations finales et les concentrations initiales, varient de 3.5 à 7.4 selon l'organe et la station considérée.

Accumulation of extractable organic halogens (EOX) in different organs of the freshwater mussel, *Anodonta cygnea* L., exposed *in situ* to chlorine bleached pulp and paper mill effluents

Keywords : *Anodonta cygnea*, bioaccumulation, gills, digestive gland, gonad, AOX, EOX.

Freshwater mussels, *Anodonta cygnea* L., were collected at a reference site and transferred to three monitoring stations located upstream (one station) and downstream (two stations) of a chlorine bleaching pulp and paper mill. During the 91 days of the experiment, water and mussels were sampled regularly at the three stations and halogenated organic micropollutants were determined using the sum-parameters AOX and EOX. The general water quality decreased downstream of the effluent release and shows a chronic AOX contamination ; the mean AOX concentrations increased by 9 to 16 compared to the upstream station. The mussels exposed at the upstream station showed no significant variation in EOX concentrations. In contrast, a progressive EOX accumulation was observed in the gills, digestive glands and gonads of the mussels exposed at the two downstream sites. The accumulation factors, calculated as the ratio between the final and the initial EOX concentrations varied between 3.5 and 7.4 according to the considered organ and station.

1. Introduction

Les composés organo-halogénés entrent dans l'environnement aquatique par deux voies : naturelle et anthropique (Manninen & Häsänen 1992). Même si la production naturelle semble prendre une importance croissante dans l'estimation de la contamination de

l'environnement (Gribble 1994, Hoekstra & de Leer 1994), la contribution anthropique reste largement prédominante dans les régions fortement industrialisées. L'intérêt croissant que l'on porte à cette famille de composés est du au fait que beaucoup d'entre eux sont bioaccumulables, toxiques et difficilement dégradables (Martinsen et al. 1988). Les sources anthropiques comprennent, entre autre, la fabrication et l'utilisation de pesticides et de solvants, la combustion de déchets, la potabilisation de l'eau et la fabrication de la pâte à papier (Paasivirta et al. 1985). Dans les effluents d'usine de pâte à papier, représentant la source majeure

1. U.P.R.E.S.-E.B.S.E., Centre de Recherches Ecologiques de l'Université de Metz, Equipe de Recherche en Ecotoxicologie, 1 Rue des Récollets, B.P. 4116, F-57040 Metz Cedex 01, France.

re de pollution par les organo-halogénés en Finlande (Jokela et al. 1992), ces composés 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, guaiacols polychlorés) de la pâte (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 90 % (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.

Le concept de bioindication, développé dans les années 70 par Goldberg et al. (1978), a pour but de doser les micropolluants métalliques dans les tissus des moules marines du genre *Mytilus* des côtes nord américaines. Depuis, ce même concept a été repris en milieu d'eau douce, étant donné que la majorité des sources de pollution sont localisées à l'intérieur des terres. Différentes espèces de bivalves ont ainsi été utilisées comme bioindicateurs, aussi bien de la contamination métallique (*Anodonta cygnea*, Hemelraad et al. 1986 ; *Dreissena polymorpha*, Mersch 1993) que par les organo-halogénés (*Anodonta piscinalis*, Herve 1991, *Anodonta anatina*, Mäkelä 1995, *Eliptio complana*, Metcalfe & Charlton 1990).

Dans le cas d'effluents aussi complexes que ceux de la fabrication de la pâte à papier blanchie au chlore, un autre paramètre de groupe a été introduit pour doser les composés organo-halogénés hydrophobes dans les échantillons biologiques. La méthode des EOX (composés Organo-Halogénés Extractibles) permet de quantifier la concentration totale de composés organo-halogénés lipophiles dans les organismes aquatiques, après extraction à l'aide d'un mélange de solvants organiques.

Après avoir comparé l'accumulation d'EOX chez quatre espèces de mollusques aquatiques : *Anodonta cygnea*, *Dreissena polymorpha*, *Unio pictorum* et *Viviparus viviparus* (Hayer et al. 1996), notre choix s'est porté sur l'anodonte pour plusieurs raisons : le plus fort taux d'accumulation, une bonne résistance vis-à-vis de effluents de l'usine de pâte à papier, et une taille suffisamment grande pour permettre l'étude sur des organismes individuels. D'autre part, l'étude de la cinétique d'accumulation chez l'anodonte a permis de montrer que celle-ci se fait de manière progressive et montre une corrélation positive avec le temps et les concentrations d'exposition (Hayer & Pihan 1996).

Le but de ce travail est d'étudier l'accumulation et la répartition des EOX au niveau de différents organes, les branchies, la glande digestive et la gonade, du bivalve, *Anodonta cygnea*, exposé *in situ* aux effluents d'une usine de pâte à papier blanchissant au chlore.

2. Matériel et méthodes

2.1. Site d'étude

Le site d'étude choisi est localisé dans le nord-est de la France, à proximité de la frontière franco-belge et de l'usine de pâte à papier de Harnoncourt. Cette usine utilise comme matière première le bois de feuillus (hêtre, charme, bouleau et chêne) ; elle produit environ 668 tonnes de pâte à papier par jour en utilisant le procédé au sulfate, plus connu sous le nom de procédé Kraft. La pâte à papier est blanchie en cinq séquences successives : C/D_{75/25} - E₁ - D₁ - E₂ - D₂, en utilisant du chlore sous forme de Cl₂ et de ClO₂ (Goris 1989). Les effluents sont traités dans une station d'épuration propre à l'usine par le procédé des boues activées, avant d'être évacués dans la rivière Ton. Trois stations ont été sélectionnées en fonction de leur situation géographique vis-à-vis de cette usine : deux sur la rivière Ton, respectivement à 3 km en amont (station 1) et 5 km en aval (station 2) des rejets de l'usine, et une sur la rivière Chiers, à 6 km de la confluence avec la rivière Ton et 13 km en aval des rejets de l'usine. Une cartographie détaillée de la localisation de l'usine et des stations a été présentée précédemment (Hayer 1997).

2.2. Ramassage, conditionnement et transfert des anodontes

Environ 250 bivalves de la famille des unionidés, *Anodonta cygnea* L., ont été récoltés 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. Ce site de prélèvement a été choisi pour deux raisons : d'une part la faible concentration en EOX qui a

été mesurée dans les anodotes lors d'une étude précédente ([EOX] = 7.96 ± 0.72 à 11.15 ± 0.13 $\mu\text{g Cl.g}^{-1}$ poids sec, Hayer 1997), et d'autre part la forte abondance et la facilité de collecte de ces animaux.

Au laboratoire, les animaux sont triés et 230 individus de taille homogène, comprise entre 74.5 et 97.8 mm ($\bar{M}$: 85.4 ± 4.9 mm), sont retenus. Leur coquille est nettoyée sous l'eau courante afin d'éliminer les saletés, algues et dreissènes qui y sont fixées, puis les anodotes sont placés dans des bacs en plastique contenant de l'eau déchlorée par passage sur charbon actif, et aérée par bullage continu. Durant dix jours les anodotes sont nourris quotidiennement avec une solution d'algues (*Chlorella vulgaris*), et l'eau déchlorée est changée tous les jours pour éliminer les fèces. Toute nourriture est arrêtée trois jours avant le transfert des anodotes. Le jour de l'exposition 9 individus sont retirés du lot, disséqués et les organes sont congelés à -18°C jusqu'au moment de l'analyse.

Les anodotes sont placés dans des cages en plastique de dimension 60 x 40 x 20 cm. Des perforations de 2 cm de diamètre dans le couvercle et le tiers supérieur des cotés permettent une libre circulation de l'eau, tout en évitant l'accumulation de feuilles et de branches. Le fond est recouvert d'une couche de 2-3 cm de sédiment de la station d'exposition sur lequel sont déposés les anodotes. Les cages fermées sont alors fixées à deux piquets métalliques et immergées dans le courant de la rivière à une profondeur d'environ - 50 cm, correspondant à celle du site de récolte. 60 animaux sont exposés à la station 1, et 80 animaux dans les stations 2 et 3.

2.3. 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-chimique sont effectués le jour du transfert des anodotes, puis après 14, 28, 42, 63 et 91 jours d'exposition.

Des préleveurs automatiques d'eau pour l'analyse des AOX 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 le dosage des AOX est réalisé selon la norme ISO (1989).

2.4. Prélèvement et analyse des anodotes

Au niveau de la station 1, les anodotes sont prélevés après 14, 28, 42, 63 et 91 jours d'exposition. Au niveau des stations 2 et 3, les prélèvements sont effectués

après 7, 14, 21, 28, 42, 63 et 91 jours d'exposition. A chaque prélèvement l'état de vitalité de tous les anodotes est regardé en vérifiant la fermeture des valves ; les individus morts sont comptés et retirés des cages.

Neuf individus sont sélectionnés au hasard et ramenés au laboratoire dans des bocaux en verre contenant de l'eau de la station. Ils sont nettoyés et mis à stabuler pendant 24 heures dans de l'eau déchlorée et aérée, afin de purger leur tractus digestif, et ainsi de ne quantifier que les composés organo-halogénés réellement accumulés dans les tissus. Tous les individus sont pesés et leur longueur, hauteur et largeur sont mesurées. Les anodotes sont ouverts par section des muscles adducteurs antérieur et postérieur à l'aide d'un scalpel. Les différents organes (branchies, gonade et glande digestive) sont disséqués, pesés et repartis en 3 lots de 3 organes identiques, puis congelés à -18°C jusqu'au moment de l'analyse. Tous les échantillons sont maintenus congelés jusqu'à la fin de l'expérience et analysés en même temps. Ceci permet d'utiliser pour toutes les extractions les solvants et autres produits chimiques issus du même lot et ainsi de réduire un éventuel écart dû à la différence de qualité des produits.

Après décongélation, les lots formés de 3 organes identiques sont broyés et homogénéisés, puis repartis en deux sous échantillons, l'un pour la détermination du poids sec (35°C pendant 72 heures), l'autre pour le dosage des composés organo-halogénés. Le protocole d'extraction et de dosage des EOX est basé sur celui décrit par Martinsen et al. (1988), légèrement modifié (Hayer 1997). Les résultats sont exprimés en μg de chlore lié organiquement par gramme de poids sec ($\mu\text{g Cl.g}^{-1}$ PS).

2.5. 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 5 %. Les paramètres physiologiques et les concentrations en EOX dans les différents organes des anodotes sont comparés par le test T de Student, au seuil de 5 % ou à l'aide d'une analyse de variance, suivie d'une comparaison multiple par la méthode H.S.D. de Tuckey.

3. Résultats

3.1. Eau

3.1.1. Physico-chimie

Le tableau 1 présente les principales caractéristiques physico-chimiques de l'eau du Ton et de la Chiers au niveau des trois stations d'étude. Mis à part pour les fluorures et le magnésium, tous les paramètres sont si-

Tableau 1. Caractéristiques physico-chimiques (moyenne $\pm$ écart type) de l'eau des trois stations. La significativité des différences (Test T de Student, $p = 0.05$) est indiqué dans les dernières colonnes (St : station ; n.s. : différence non significative ; * : différence significative).

Table 1. Physico-chemical characteristics (mean $\pm$ standard deviation) of the water from the three sites. The significance of the differences (Student T Test, $p = 0.05$) is indicated in the last column (St : site ; n.s.: no significant difference ; * : significant difference).

Paramètre	Unité	Station 1	Station 2	Station 3	n	St1/2	St1/3	St2/3
pH		8.1 $\pm$ 0.1	8.0 $\pm$ 0.1	8.1 $\pm$ 0.1	14	*	n.s.	*
Conductivité	$\mu\text{S}/\text{cm}$	379 $\pm$ 10	651 $\pm$ 59	621 $\pm$ 43	14	*	*	n.s.
Température	$^{\circ}\text{C}$	5.0 $\pm$ 1.6	10.2 $\pm$ 1.5	6.6 $\pm$ 1.8	14	*	*	*
Oxygène dissous	mg/l	9.6 $\pm$ 1.0	8.4 $\pm$ 0.9	9.2 $\pm$ 0.9	14	*	n.s.	*
M.E.S.	mg/l	6.0 $\pm$ 1.3	21.2 $\pm$ 9.9	11.5 $\pm$ 4.1	6	*	*	n.s.
DCO	mg/l	12.3 $\pm$ 2.8	33.2 $\pm$ 5.3	21.7 $\pm$ 2.7	6	*	*	*
Cl ⁻	mg/l	15.4 $\pm$ 3.6	47.2 $\pm$ 12.9	40.5 $\pm$ 11.3	6	*	*	n.s.
F ⁻	mg/l	0.1 $\pm$ 0.0	0.2 $\pm$ 0.0	0.2 $\pm$ 0.0	6	n.s.	*	*
Br ⁻	mg/l	0.0 $\pm$ 0.0	2.9 $\pm$ 2.2	0.9 $\pm$ 1.3	6	*	n.s.	n.s.
K ⁺	mg/l	2.4 $\pm$ 0.1	5.1 $\pm$ 0.6	5.4 $\pm$ 0.3	6	*	*	n.s.
Na ⁺	mg/l	7.4 $\pm$ 1.4	61.2 $\pm$ 15.7	38.3 $\pm$ 5.5	6	*	*	*
Ca ²⁺	mg/l	86.1 $\pm$ 3.3	100.7 $\pm$ 8.7	110.9 $\pm$ 2.8	6	*	*	*
Mg ²⁺	mg/l	3.4 $\pm$ 0.2	3.4 $\pm$ 0.2	4.4 $\pm$ 0.3	6	n.s.	*	*
N Total	mg/l	0.36 $\pm$ 0.01	0.60 $\pm$ 0.04	0.57 $\pm$ 0.04	6	*	*	n.s.
P Total	mg/l	0.16 $\pm$ 0.01	0.20 $\pm$ 0.02	0.23 $\pm$ 0.02	6	*	*	*
SO ₄ ²⁻	mg/l	29.1 $\pm$ 3.1	102.6 $\pm$ 31.0	89.5 $\pm$ 15.2	6	*	*	n.s.

gnificativement différents entre la station 1 et la station 2. L'arrivée de l'effluent de l'usine de pâte à papier dans le Ton se traduit notamment par une augmentation de la conductivité, essentiellement due à l'augmentation des concentrations en Cl⁻, SO₄²⁻, Na⁺ et Ca²⁺, éléments provenant de l'étape de blanchiment de la pâte (Cl) et des circuits annexes (chaux : CaO, et liqueur blanche : NaOH et Na₂S) de l'usine. La température moyenne augmente de 5.2 $^{\circ}\text{C}$ directement à l'aval du rejet, et même jusqu'à 13 km à l'aval, elle est encore supérieure de 1.6 $^{\circ}\text{C}$ par rapport à la station amont. Parallèlement, on observe une diminution de la concentration en oxygène dissous, et une augmentation des éléments nutritifs (N et P total), des matières en suspension et de la DCO. Après la confluence avec la Chiers, la qualité de l'eau s'améliore quelque peu, mais la plupart des paramètres de la station 3 diffèrent toujours significativement de ceux de la station 1.

3.1.2. Suivi des concentrations en AOX

La figure 1 montre l'évolution des concentrations en AOX dans l'eau du Ton et de la Chiers au niveau des trois stations. En raison du gel, les préleveurs automatiques d'eau n'ont pu être utilisés lors des 15 derniers jours de l'étude. Durant cette période, des prélèvements ponctuels hebdomadaires ont alors été réalisés. Dans la station 1, les concentrations en AOX varient peu avec une moyenne de 14.8 $\mu\text{g Cl.l}^{-1}$. Dans la station 2, située sur le Ton, la concentration en AOX est multipliée par 16 par rapport à la station 1, avec une moyenne de 234.7 $\mu\text{g Cl.l}^{-1}$. De même à la station 3, sur la Chiers, la concentration en AOX est multipliée par 9 par rapport à l'amont avec une moyenne de 132.5 $\mu\text{g Cl.l}^{-1}$. Contrairement à la station amont, les concentrations varient fortement au cours du temps au niveau des deux stations aval, avec notamment une période de faibles concentrations entre le 46^{ème} et le 57^{ème} jour

Fig. 1. Evolution des concentrations en AOX dans l'eau des trois stations.

Fig. 1. Variation of AOX concentration in water at the three sites.

d'exposition, qui correspond à un arrêt provisoire de l'usine (Vacances de Noël).

3.2. Anodontes

3.2.1. Paramètres physiologiques

3.2.1.1. Mortalité

La mortalité est restée faible durant les 91 jours d'exposition des anodontes, et ce au niveau des trois stations : station 1 : 0 mort ; station 2 : 3 morts, respectivement le 28^{ème}, 42^{ème} et 63^{ème} jour d'exposition ; station 3 : 2 morts, respectivement le 14^{ème} et le 42^{ème} jour d'exposition.

3.2.1.2. Caractéristiques morphologiques - Indice de condition

Tous les anodontes utilisés pour cette étude ont été sélectionnés selon leur taille et, plus particulièrement, selon leur longueur totale. Cependant, pour un lot d'animaux de taille homogène ($CV < 10\%$ pour la longueur, la hauteur et l'épaisseur), le poids frais total des différents individus peut varier fortement ($CV > 20\%$). Lorsque l'on considère les constituants principaux 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 fortes variations du volume des liquides internes. Les grandes variations de poids rencontrées dans une mêm-

me population d'anodontes ont mené à la définition de différents indices en exprimant le poids (frais ou sec) des parties molles par rapport à la longueur de la coquille, du poids ou du volume de l'animal. Ces indices sont étroitement corrélés avec les réserves nutritionnelles, et rendent ainsi compte de l'état physiologique de l'animal. Dans cette étude nous avons calculé l'indice de condition décrit par Haukioja & Hakala (1978) :

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

Globalement, on constate que chez presque tous les anodontes exposés, l'indice de condition est légèrement inférieur à celui des anodontes témoins, mais il n'existe aucune différence statistiquement significative entre les lots (Fig. 2).

3.2.1.3. Pourcentage de poids sec - Pourcentage de lipides

Le pourcentage de poids sec et le pourcentage de lipides dans les trois organes étudiés varient légèrement au cours du temps et ce, au niveau des trois stations (Tableau 2).

Ainsi, par rapport aux témoins, le pourcentage de poids sec diminue chez les anodontes exposés (sauf dans les glandes digestives de la station 1). Cependant,

Fig. 2. Evolution de l'indice de condition en fonction du temps et de la station d'exposition. Les histogrammes représentent la moyenne, les barres verticales les écart-types ($n = 9$ pour tous).

Fig. 2. Variation of the condition index as a function of time and exposition site. The histograms are the mean values, the vertical bars the standard deviation ($n = 9$ for all).

hormis pour les gonades de la station 2 et les glandes digestives de la station 3, aucune différence statistiquement significative (Test de Student au seuil de 5 %) n'est observée.

A l'opposé, le pourcentage de lipides est généralement plus élevé dans les organes des anodonte exposés aux trois stations que dans les témoins. Toutefois, seules les branchies et les gonades de la station 2 présentent des différences statistiquement significatives (Test de Student au seuil de 5 %) par rapport aux témoins.

3.2.2. Accumulation des EOX

La figure 3 présente l'évolution des concentrations en EOX dans les trois organes des anodonte témoins et exposés au niveau des trois stations de l'étude.

Les anodonte témoins, prélevés dans la Moselle présentent des concentrations non négligeables dans les trois organes étudiés : 7.6 ± 0.7 , 19.6 ± 1.3 et $13.0 \pm 2.0 \mu\text{g Cl.g}^{-1}$ PS, respectivement dans les branchies, les glandes digestives et les gonades.

Chez les anodonte de la station 1, les concentrations en EOX varient peu au cours du temps dans les trois

organes. L'analyse de variance ne montre pas de différences significatives dans les gonades et les glandes digestives, entre les anodonte 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, les concentrations en EOX augmentent progressivement dans les trois organes de *Anodonta cygnea*. Cependant, les vitesses d'accumulation et les taux d'accumulation varient selon l'organe et la station considérée.

Dans les branchies (Fig. 3a), l'accumulation des EOX se fait rapidement durant les premiers jours, et les concentrations mesurées dans les anodonte des stations 2 et 3 sont significativement différentes de celles des témoins, dès le 7^{ème} jour d'exposition. L'accumulation d'EOX se fait progressivement au niveau des deux stations et tend à se stabiliser à partir du 63^{ème} jour d'exposition, étant donné que les concentrations mesurées le 63^{ème} et le 91^{ème} jour ne diffèrent pas de manière significative à la station 2. Les concentrations finales sont de 46.5 ± 1.1 et $36.3 \pm 1.7 \mu\text{g Cl.g}^{-1}$ PS, respectivement aux stations 2 et 3.

Tableau 2. Pourcentages de poids sec et pourcentages de lipides des anodontes témoins et exposés durant 91 jours au niveau des trois stations (n = 3 ; * : différence significative, Test T de Student, p = 0.05).

Table 2. Dry and lipid weight of the reference mussels and the mussels exposed during 91 days at the three sites (n = 3) ; * : significant difference, Student T Test, p : 0.05).

	Pourcentage de poids sec / poids frais				Pourcentage de lipides / poids sec			
	Témoins	Station 1	Station 2	Station 3	Témoins	Station 1	Station 2	Station 3
Branchies	19.8 ± 2.6	18.8 ± 2.0	17.8 ± 1.5	18.0 ± 1.1	3.2 ± 0.4	5.9 ± 2.2	5.0 ± 0.6*	3.1 ± 0.3
Gonades	16.1 ± 2.2	13.7 ± 1.0	11.5 ± 1.2*	12.3 ± 2.9	4.5 ± 0.8	6.3 ± 1.5	7.2 ± 0.5*	5.9 ± 1.4
G. digestives	10.9 ± 0.5	13.0 ± 2.8	10.6 ± 1.1	8.5 ± 0.7*	11.2 ± 1.7	10.1 ± 2.7	13.9 ± 2.2	12.9 ± 1.1

Dans les glandes digestives (Fig. 3b), 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^{ème} jour pour la station 2, et à partir du 14^{ème} 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^{ème} jour les concentrations se stabilisent et ne diffèrent pas significativement de celles mesurées après 63 et 91 jours d'exposition ($145.9 \pm 9.3 \mu\text{g Cl.g}^{-1}$ PS). Pour la station 3, l'accumulation se fait moins rapidement que pour la station 2, et les concentrations ne se stabilisent qu'à partir du 63^{ème} jour, et atteignent $100.8 \pm 12.8 \mu\text{g Cl.g}^{-1}$ PS.

Dans les gonades (Fig. 3c), 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 21 (st. 2) et 28 jours (st. 3) d'exposition. Elles tendent à se stabiliser en fin d'exposition, et les concentrations après 63 jours ne diffèrent pas de manière significative de celles mesurées après 91 jours, aux stations 2 et 3. Les concentrations finales sont de 65.4 ± 16.5 et $45.4 \pm 16.5 \mu\text{g Cl.g}^{-1}$ PS.

Le calcul du facteur d'accumulation ($FA = [\text{EOX}]_{\text{finale}} / [\text{EOX}]_{\text{témoins}}$) après 91 jours d'exposition, résume l'accumulation totale 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 (Fig. 4). De plus, l'accumulation d'EOX dans les différents organes est nettement plus importante à la station 2 qu'à la station 3.

Selon Berry (1992), les concentrations en EOX dans les effluents d'usines de pâte à papier blanchissant au chlore sous forme de ClO_2 et de Cl_2 , représentent 1 à 3 % des concentrations en AOX ($M = 2$ %). Ceci permet de calculer le facteur de bioaccumulation, FB,

dans les trois organes des anodontes exposés dans les deux stations aval par la formule :

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

Ce facteur (Tableau 3) est plus élevé dans les glandes digestives que dans les branchies et les gonades. Dans les branchies, ce facteur est plus important à la station 3 qu'à la station 2, alors que dans les gonades il est à peu près similaire pour les deux stations. Par contre, dans les glandes digestives, il est plus élevé au niveau de la station la plus contaminée.

4. Discussion

Comme lors des précédentes études (Hayer & Pihan 1996, Hayer et al. 1996), l'exposition aux effluents de l'usine de pâte à papier, même prolongée à 91 jours, n'affecte pas de manière significative l'état de vitalité des anodontes, avec un taux de mortalité inférieur à 5 % dans les deux stations aval. Cela renforce l'hypothèse que de tels effluents ne peuvent pas être directement corrélés à une toxicité aiguë et létale pour les organismes aquatiques (Craig et al. 1990, Pellinen & Soimasuo 1993). Cela peut aussi s'expliquer par la bonne résistance des mollusques bivalves unionidés aux effluents, comme elle a été décrite chez *Anodonta piscinalis* (Herve 1991) et *Anodonta anatina* (Mäkelä 1995). Cette bonne résistance se traduit également par l'absence de différences significatives des autres paramètres physiologiques mesurés, tels que le pourcentage de poids sec, le pourcentage de lipides et l'indice de condition. Ce dernier, 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 des changements

Fig. 3. Evolution des concentrations en EOX ($\mu\text{g Cl.g}^{-1}$ PS) en fonction du temps et de la station d'exposition dans les différents organes : a) branchies ; b) glande digestive ; c) gonade. Les histogrammes représentent la moyenne, les barres verticales les écart-types ($n = 3$ pour tous).

Fig. 3. EOX concentrations in the three organs as a function of time and exposition site : a) gills ; b) digestive glands ; c) gonads. The histograms are the mean values, the vertical bars the standard deviation ($n = 9$ for all).

Fig. 4. Comparaison des facteurs d'accumulation dans les organes de *Anodonta cygnea* exposé durant 91 jours au niveau des trois stations.

Fig. 4. Comparison of the accumulation factors in the organs of *Anodonta cygnea* exposed during 91 days at the three sites.

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

Table 3. Bioaccumulation factors in the three organs of the mussels exposed during 91 days at site 2 and site 3.

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

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*, exposées à des effluents d'usine de pâte à papier, que chez des individus témoins issus d'une mytiliculture de référence.

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, qui augmentent avec le pourcentage de lipides de l'organe considéré, en concordance avec le caractère lipophile des composés organo-halogénés. Elles sont significati-

vement plus élevées dans les glandes digestives, suivies des gonades et des branchies. Deux hypothèses principales peuvent être avancées pour expliquer les teneurs en EOX mesurées dans les témoins. Tout d'abord le fait que malgré le choix d'un site aussi propre que possible, une contamination faible mais constante dans le temps ne peut être totalement exclue. Cependant, l'hypothèse la plus probable est celle d'un «bruit de fond biologique», résultant d'une production naturelle par les anodontes, comme elle a été décrite chez la perche, *Perca fluviatilis* (NSEPB 1989) et le saumon, *Salmo salar* (Pellinen et al. 1993), issus de lacs de référence suédois et finlandais. Des concentra-

tions de référence, variant de 29 à 71 μg et de 16.8 à 35.8 $\mu\text{g Cl.g}^{-1}$ poids sec ont été mesurées respectivement dans des moules marines, *Mytilus edulis* (Haynes et al. 1995) et des anodontes, *Anodonta anatina* (Pellinen et al. 1994).

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 pour le 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 x2.6 et x2.0 pour les stations 2 et 3 puis, plus progressivement, jusqu'au 91^{ème} jour de l'étude. Le ralentissement de la vitesse d'accumulation à partir du 7^{ème} 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 d'accumulation (FA) plus élevé à la station 2 (6.1) qu'à la station 3 (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 (st. 3 = 1917 ; st. 2 = 1455). Deux hypothèses peuvent être avancées pour expliquer ces différences. Tout d'abord, la qualité générale de l'eau, qui influe directement sur l'ouverture des valves et l'activité de filtration des anodontes (Sprung & Rose 1988). De fait, la qualité de l'eau fortement dégradée à la station 2, les anodontes filtrent moins et moins en contact direct avec leur environnement contaminé ; cela se traduit par une accumulation relativement plus faible qu'à la station 2, mais qui reste plus élevée dans l'absolu. L'autre hypothèse est liée au comportement physico-chimique des composés organo-halogénés dans le milieu aquatique. En effet, une grande partie des composés organo-halogénés fortement hydrophobes s'accumule sur les macromolécules de lignines, de chlorolignines et sur les matières en suspension dans l'eau, diminuant ainsi fortement leur biodisponibilité vis-à-vis des organismes aquatiques à proximité immédiate des rejets d'EPKB (Kukkonen 1992). Ces molécules sont désorbées lorsque leur concentration dissoute diminue dans l'eau, et redeviennent alors biodispo-

nibles à des distances éloignées de la source de pollution. Ceci est confirmé par les facteurs de bioaccumulation plus élevés à la station 3 qu'à la station 2.

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^{ème} 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 (st.2 : 7.5 ; st. 3 : 5.1), que par un facteur de bioaccumulation (st. 2 : 2864 ; st.3 : 2375), plus élevé à la station 2 qu'à la station 3. D'autre part, les glandes digestives, telles qu'elles sont considérées ici, comprennent aussi l'hépto-pancréas des anodontes, organes de détoxification des bivalves. Ainsi, la forte augmentation des concentrations à partir du 21^{ème} jour pourrait également être due au transport des composés organo-halogénés et de leurs métabolites, depuis les organes périphériques (tels que les branchies), 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 21 (st. 2) et 28 jours (st. 3) d'exposition. 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. 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 st. 2 : 5.1 ; FP st. 3 : 3.5), et les facteurs de bioaccumulation sont du même ordre de grandeur au niveau des deux stations (FB st. 2 : 1182 ; FB st. 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'effluents de l'usine de pâte à papier, 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 le bivalve *Anodonta anatina*, le pentachlorophénol et le 3, chloroguaia-cols s'accumulent plus fortement dans les organes à forte teneur en lipides, tels que glande digestive et le rein, 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 entre le pourcentage de lipides (exprimé par rapport au poids sec) et les concentrations en EOX (exprimées par rapport au poids sec) chez des moules marines, *Mytilus edulis*, exposées à de tels effluents. De ce fait, les concentrations en EOX dans ces moules sont corrélées de manière linéaire selon qu'elles sont exprimées en fonction du poids sec ou du poids de lipides, de sorte que : $\text{Log}_{10}[\text{EOX}]_{\text{lipides}} = \text{Log}_{10}[\text{EOX}]_{\text{poids sec}} - 1.236$ ($r^2 = 0.914$). Une relation similaire a été observée dans la présente étude pour les concentrations en EOX chez *Anodonta cygnea*, avec : $\text{Log}_{10}[\text{EOX}]_{\text{lipides}} = 1.08 * \text{Log}_{10}[\text{EOX}]_{\text{poids sec}} - 1.444$ ($r^2 = 0.91$; $n = 20$)

5. Conclusion

Les trois types d'organes étudiés, branchies, glandes digestives et gonades de *Anodonta cygnea* exposés durant 91 jours aux effluents de l'usine de pâte à papier, accumulent les composés organo-halogénés. Cette accumulation se fait de manière différente selon les organes, et augmente selon 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 effluents d'usine de pâte à papier blanchissant au chlore, il n'existe pas de plateau d'équilibre des concentrations dans les organismes.

Remerciements

Les auteurs tiennent à remercier Mireille Ollivier pour son aide dans la recherche bibliographique et Philippe Wagner pour son aide précieuse sur le terrain. Ce travail a été financé par l'Agence de l'Eau Rhin-Meuse.

Travaux cités

Berry R. 1992. — Adsorbable organically bound halogen - an overview. *Pulp and Paper World Technology* : 51-55.

- Craig G.R., Orr P.L., Robertson J.L. & Vrooman W.M. 1990. — Toxicity and bioaccumulation of AOX and EOX. *Pulp & Paper Canada*, 91 : 39-45.
- 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. *Environ. Cons.*, 5 : 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 p.
- Gribble G.W. 1994. — The natural production of chlorinated compounds. *Environ. Sci. Technol.*, 28 : 310-319.
- Haukioja E. & Hakala T. 1978. — Measuring growth from shell rings in populations of *Anodonta piscinalis* (Pelecypoda, Unionidae). *Ann. Zool. Fenn.*, 15 : 60-65.
- Hayer F. 1997. — Etude 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. Thèse doctorat : Sci. vie, Ecotoxicol., Metz : 220 p.
- 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 : 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 : 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 organohalogenes (EOX). *Mar. Poll. Bull.*, 30 : 463-469.
- Hemelraad J., Kleinveld H.A., de Roos A.M., Holwerda D.A. & Zandee D.I. 1986. — Cadmium kinetics in freshwater clams. III. Effect of zinc on uptake and distribution of cadmium in *Anodonta cygnea*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 16 : 95-101.
- Herve S. 1991. — Mussel incubation method for monitoring organochlorine compounds in freshwater recipients of pulp and paper industry. Academic Dissertation Doctor of Philosophy, Jyväskylä, Finland. : 145 p.
- Hoekstra E.J. & de Leer E.W.B. 1994. — AOX levels in the river Rhine : fifty percent of natural origin ?! *Wat. Sci. Technol.*, 29 : 133-136.
- ISO (Organisation internationale de normalisation) 1989. — Qualité de l'eau - dosage des halogènes des composés organiques adsorbables (AOX). Norme ISO 9562. Genève : 8 p.
- Jokela J., Salkinoja-Salonen M. & Elomaa E. 1992. — Adsorbable organic halogens (AOX) in drinking water and the aquatic environment in Finland. *J. Water SRT Aqua*, 41 : 4-12.
- Kukkonen J. 1992. — Effects of lignin and chlorolignin in pulp mill effluents on the binding and bioavailability of hydrophobic organic pollutants. *Wat. Res.* 26 : 1523-1532.
- 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 Fenn.*, 22 : 49-58.
- Mäkelä P. 1995. — Freshwater mussel monitoring : the duck mussel *Anodonta anatina* in water quality assessment. Thèse Doctorat. Univ. Joensuu. Simola H. (ed). 47 p + 6 publ.
- Mäkelä P. & Oikari A.O.J. 1990. — Uptake and body distribution of chlorinated phenolics in the freshwater mussel, *Anodonta anatina* L. *Ecotox. Environ. Saf.*, 20 : 354-362.
- Manninen P.K.G. & Häsänen E. 1992. — Total organochlorine and organobromine in Finnish water courses. *Hydrobiologia* 243/244 : 475-479.

- 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. *Wat. Sci. Technol.*, 20 : 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 typz d'organisme sentinelle : les mousses aquatiques. Thèse doctorat : Sci. vie, Ecotoxicol.; Metz : 210 p.
- Metcalf J.L. & Charlton M.N. 1990. — Freshwater mussels as bio-monitors for organic industrial contaminants and pesticides in the St. Lawrence river. *Sci. Tot. Environ.*, 97/98 : 595-615.
- NSEPB (National Swedish Environmental Protection Board) 1989. — Biological effects of bleached pulp mill effluents. Report 3558. Ed. Anders Södergren : 139 p.
- Paasivirta J., Heinola K., Humppi T., Karjalainen A., Knuutinen J., Mäntykoski K., Paukku R., Piilola T., Surma-Aho K., Tarhanen J., Welling L., Vihonen H. & Särkkä J. 1985. — Polychlorinated phenols, guaiacols and catechols in environment. *Chemosphere*, 14 : 469-491.
- Pellinen J. & Soimasuo R. 1993. — Toxicity of sediments polluted by the pulp and paper industry to a midge (*Chironomus riparius* Meigen). *Sci. Tot. Environ.*, Suppl. 1993 : 1247-1256.
- Pellinen J., Kukkonen J., Herb A., Mäkelä P. & Oikari A. 1993. — Bioaccumulation of pulp mill effluent-related compounds in aquatic animals. *Sci. Tot. Environ.*, Suppl. 1993 : 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 : 1515-1526.
- Sprung M. & Rose U. 1988. — Influence of food size and food quantity on the feeding of the mussel *Dreissena polymorpha*. *Oecologia*, 77 : 526-532.
- Stevens A.A., Dressman R.C., Sorrell R.K. & Brass H.J. 1985. — Organic halogen measurements : current uses and future prospects. *J. A. W. W. A.*, 77 : 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 : 1249-1290.
- Widdows J. & Johnson D. 1988. — Physiological energetics of *Mytilus edulis* : scope for growth. *Marine Ecology Progress Series*, 46 : 113-121.