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

Frank Hayer

▶ **To cite this version:**

Frank Hayer. 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. Ecotoxicologie. Université Paul Verlaine - Metz, 1997. Français. NNT : 1997METZ045S . tel-01777226

HAL Id: tel-01777226

https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01777226

Submitted on 24 Apr 2018

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

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

AVERTISSEMENT

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

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

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

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

LIENS

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

Remplace l'exemplaire précédent

Université de Metz

U.F.R. Sci. F.A.

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

UNIVERSITE DE METZ
TECHNOPOLE
BIBLIOTHEQUE

THESE

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

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE METZ

Mention : Sciences de la vie

Spécialité : Ecotoxicologie

par

Frank HAYER

BIBLIOTHEQUE UNIVERSITAIRE - METZ

N° inv.	19970945
Cote	S/Mz 97/45
Loc	Magasin

Titre

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.

Soutenue le 6 Novembre 1997 devant la commission d'examen :

Jean Claude PIHAN	Professeur à l'Université de Metz	Directeur de Thèse
François RAMADE	Professeur à l'Université de Paris Sud	Rapporteur
Léon DUVIVIER	Docteur en Chimie Laborelec Linkebeek	Rapporteur
Paule VASSEUR	Professeur à l'Université de Metz	Examinateur
Marc BABUT	Ingénieur à l'Agence de l'Eau Rhin-Meuse	Examinateur
Michel KHALANSKI	Ingénieur à la Direction des Etudes et Recherche d'EDF	Examinateur

DB120715

Université de Metz

U.F.R. Sci. F.A.

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

THESE

UNIVERSITE DE METZ
TECHNOPOLE
BIBLIOTHEQUE

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

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE METZ

Mention : Sciences de la vie

Spécialité : Ecotoxicologie

par

Frank HAYER

Titre

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.

Soutenue le 6 Novembre 1997 devant la commission d'examen :

Jean Claude PIHAN	Professeur à l'Université de Metz	Directeur de Thèse
François RAMADE	Professeur à l'Université de Paris Sud	Rapporteur
Léon DUVIVIER	Docteur en Chimie Laborelec Linkebeek	Rapporteur
Paule VASSEUR	Professeur à l'Université de Metz	Examinateur
Marc BABUT	Ingénieur à l'Agence de l'Eau Rhin-Meuse	Examinateur
Michel KHALANSKI	Ingénieur à la Direction des Etudes et Recherche d'EDF	Examinateur

Ce travail a été imprimé sur du papier recyclé, non blanchi au chlore.

A Corinne,

A mes parents,

A XX et XY (sous presse, à paraître mars 1998)

Remerciements

Le travail présenté dans ce mémoire a été réalisé au Laboratoire d'Ecotoxicologie du Centre de Recherches Ecologiques de l'Université de Metz. Il a été dirigé par le Professeur Jean Claude Pihan, et financé par l'Agence de l'Eau Rhin - Meuse.

Avant d'exposer les résultats de mes recherches, il m'est agréable de remercier tous ceux et celles qui m'ont apporté, à divers titres, leur aide et leur amitié dans la réalisation de ce travail.

J'aimerais tout d'abord exprimer ma profonde reconnaissance à Monsieur Jean Claude PIHAN, Professeur à l'Université de Metz, pour son accueil au Centre de Recherches Ecologiques, et pour la confiance qu'il m'a témoigné tout au long de la réalisation de ce travail.

Je suis très sensible à l'honneur que me font Monsieur François RAMADE, Professeur à l'Université de Paris Sud, et Monsieur Léon DUVIVIER, Docteur en Chimie et responsable du département chimie des eaux à Laborelec, en acceptant la lourde tache de rapporteurs. Qu'ils trouvent ici le témoignage de ma plus sincère reconnaissance.

Mes sincères remerciements à Monsieur Marc BABUT, Ingénieur d'études à l'Agence de l'Eau Rhin - Meuse, pour l'intérêt qu'il a porté à ce travail, et pour avoir accepté de participer au jury.

Je tiens également à remercier Mademoiselle Paule VASSEUR, Professeur à l'Université de Metz, et Monsieur Michel KHALANSKI, Ingénieur senior au Département Environnement de la Direction des Etudes et Recherche à EDF, pour leur participation au jury .

Je tiens à exprimer mes plus profonds remerciements à Monsieur Philippe WAGNER, Technicien au Centre de Recherches Ecologiques, pour son aide efficace et précieuse dans l'élaboration, la réalisation et la photographie de toutes les expérimentations de terrain, ainsi qu'à Madame Mireille OLLIVIER, Documentaliste au Centre de Recherches Ecologiques, pour son aide dans la documentation et la correction du manuscrit.

Merci à Danièle BEAUFILS, Catherine HERHAMMER, Nathalie KLEINEN, Marie Claire MICHEL, Etienne MORHAIN, Jean François POINSAINT et Philippe ROUSSELLE pour leur disponibilité, et qui ont contribué de diverses façons à ce travail, ainsi qu'à Michel RIBETTE pour les photographies des mollusques.

De manière générale, je tiens à remercier tout le personnel, étudiants, thésards et ex-thèsards que j'ai eu le plaisir de rencontrer au Centre de Recherches Ecologiques durant ces cinq dernières années.

SOMMAIRE

Liste des figures, tableaux, photos et abréviations 7

Introduction

13

Chapitre I : Analyse bibliographique

I.1. Les composés organo-halogénés 17

I.1.1. La formation naturelle de composés organo-halogénés 17

I.1.2. Les composés organo-halogénés d'origine anthropique 20

I.2. L'industrie de la pâte à papier 22

I.2.1. Généralités 22

I.2.2. Fabrication de la pâte à papier 22

I.2.2.1. Composition du bois 22

I.2.2.2. Les différentes pâtes à papier 24

I.2.2.3. Les pâtes chimiques et le procédé Kraft 24

I.2.3. Pollution par l'industrie papetière 29

I.2.3.1. Pollution de l'air 29

I.2.3.2. Pollution des sols 30

I.2.3.3. Pollution de l'eau 31

I.3. Effets des rejets des usine de pâte à papier sur l'écosystème aquatique 35

I.3.1. Effets sur la flore aquatique 35

I.3.2. Effets sur les invertébrés aquatiques 36

I.3.3. Effets sur les poissons 38

I.3.4. Effets sur les mammifères 42

I.4. Accumulation de composés organo-halogénés dans l'écosystème aquatique 43

I.4.1. Physico-chimie des organo-halogénés 43

I.4.2. Accumulation des organo-halogénés sur les matières en suspension et dans les sédiments 44

I.4.3. Accumulation de composés organo-halogénés dans les organismes aquatiques 47

I.5. Utilisation des paramètres de groupe pour la quantification des composés organo-halogénés 52

I.5.1. Généralités 52

I.5.2. Quantification des composés organo-halogénés dans l'eau 53

I.5.3. Quantification des composés organo-halogénés dans les sédiments et les sols 54

I.5.4. Quantification des composés organo-halogénés dans le matériel biologique 54

Chapitre II : Matériels et méthodes

II.1. Présentation du matériel biologique 57
II.1.1. L'anodonte cygne, *Anodonta cygnea* 57
II.1.1.1. Systématique - Morphologie 57
II.1.1.2. Répartition géographique - Habitat 59
II.1.1.3. Biologie - Ecologie 59
II.1.2. Les autres mollusques étudiés 60
II.1.2.1. *Unio pictorum* 60
II.1.2.2. *Dreissena polymorpha* 61
II.1.2.3. *Viviparus viviparus* 62
II.2. Collecte, conditionnement, transfert et exposition des mollusques 63
II.2.1. Collecte 63
II.2.2. Conditionnement au laboratoire 63
II.2.3. Transfert et exposition 64
II.3. Présentation du site d'étude 65
II.3.1. L'usine de pâte à papier de Harnoncourt 66
II.3.2. Les stations d'étude 67
II.4. Méthodes de dosage des composés organo-halogénés 69
II.4.1.Le dosage microcoulomètrique 69
II.4.1.1. Principe 69
II.4.1.2. Vérification et calibrage de la titration 71
II.4.2. Dosage des AOX dans l'eau 72
II.4.2.1. Prélèvement et traitement de l'échantillon 72
II.4.2.2. Adsorption et titration des composés organo-halogénés 72
II.4.2.3. Précautions à prendre 74
II.4.3. Dosage des AOX dans les sédiments 74
II.4.3.1. Prélèvement et traitement de l'échantillon 75
II.4.3.2. Adsorption et titration des composés organo-halogénés 75
II.4.3.3. Vérification de l'adsorption 75
II.4.4. Dosage des EOX dans les mollusques 76
II.4.4.1. Prélèvement et traitement des mollusques 76
II.4.4.2. Dissection des mollusques 77
II.4.4.3. Extraction et titration des composés organo-halogénés 77

Chapitre III : Etude de la contamination de l'eau et des sédiments

III.1. Introduction - Objectifs de l'étude 81

III.2. Etude spatiale : réalisation de profils longitudinaux de la concentration en AOX 82

III.2.1. Présentation des cours d'eau étudiés 82

III.2.2. Protocole de prélèvement 84

III.2.3. Résultats 84

III.2.3.1. La Moselle 84

III.2.3.2. La Meurthe 86

III.2.3.3. La Meuse 86

III.2.3.4. La Chiers 88

III.3. Etude temporelle : suivi de la concentration en AOX dans l'eau et les sédiments 88

III.3.1. Présentation des stations d'étude 88

III.3.2. Protocole de prélèvement 88

III.3.3. Résultats 90

III.3.3.1. Concentrations en AOX dans l'eau 90

III.3.3.2. Concentrations en AOX dans les sédiments 92

III.4. Discussion 95

III.5. Conclusions 97

Chapitre IV : Accumulation de micropolluants organo-halogénés et métalliques chez *Anodonta cygnea*

IV.1. Introduction - Objectifs de l'étude 99

IV.2. Protocole expérimental 100

IV.2.1. Collecte, conditionnement, transfert et exposition des anodontes 101

IV.2.2. Prélèvement et analyse de l'eau 101

IV.2.3. Prélèvement et analyse des sédiments 101

IV.2.4. Prélèvement et analyse des anodontes 101

IV.2.5. Etude statistique 102

IV.3. Résultats 102

IV.3.1. Résultats des analyses de l'eau 102

IV.3.1.1. Physico-chimie de l'eau 102

IV.3.1.2. Contamination de l'eau par les AOX 102
IV.3.2. Résultats des analyses des sédiments 104
IV.3.3. Résultats des analyses des anodontes 105
IV.3.3.1. Condition physiologique 105
IV.3.3.1.1. Mortalité -comportement 105
IV.3.3.1.2. Pourcentage de poids sec - pourcentage de poids de lipides 105
IV.3.3.2. Micropolluants métalliques dans les anodontes 107
IV.3.3.2. Micropolluants organo-halogénés dans les anodontes 107
IV.4. Discussion 110
IV.5. Conclusions 113

Chapitre V : Etude de l'accumulation de composés organo-halogénés extractibles chez quatre espèces de mollusques aquatiques

V.1. Introduction - Objectifs de l'étude 115
V.2. Protocole expérimental 116
V.2.1. Collecte, conditionnement, transfert et exposition de mollusques 116
V.2.2. Prélèvement et analyse de l'eau 117
V.2.3. Prélèvement et analyse des sédiments 117
V.2.4. Prélèvement et analyse des mollusques 117
V.2.5. Etude statistique 118
V.3. Résultats 118
V.3.1. Résultats de l'analyse de l'eau 118
V.3.1.1. Physico-chimie de l'eau 118
V.3.1.2. Contamination de l'eau par les AOX 119
V.3.2. Résultats de l'analyse des sédiments 121
V.3.3. Résultats de l'analyse des mollusques 123
V.3.3.1. Condition physiologique 123
V.3.3.1.1. Mortalité 123
V.3.3.1.2. Pourcentage de poids sec - pourcentage de lipides 124
V.3.3.2. Accumulation des EOX 124
V.3.3.3. Cinétiques d'accumulation des EOX par *A. cygnea* 132
V.4. Discussion 132
V.5. Conclusions 137

Chapitre VI : Etude de l'accumulation de composés organo-halogénés extractibles dans différents organes de *Anodonta cygnea*

VI.1. Introduction - Objectifs de l'étude 139

VI.2. Protocole expérimental 140

VI.2.1. Collecte, conditionnement, transfert et exposition des anodontes 140

VI.2.2. Prélèvement et analyse de l'eau 141

VI.2.3. Prélèvement et analyse des anodontes 141

VI.2.4. Etude statistique 141

VI.3. Résultats 142

VI.3.1. Résultats de l'analyse de l'eau 142

VI.3.1.1. Physico-chimie de l'eau 142

VI.3.1.2. Contamination de l'eau par les AOX 143

VI.3.2. Résultats de l'analyse des anodontes 144

VI.3.2.1. Caractéristiques morphologiques 144

VI.3.2.2. Paramètres physiologiques 145

VI.3.2.2.1. Mortalité 145

VI.3.2.2.2. Indice de condition 145

VI.3.3. Etude des différents organes de *Anodonta cygnea* 146

VI.3.3.1. Indices organiques 146

VI.3.3.2. Pourcentage de poids sec - pourcentage de lipides 148

VI.3.3.3. Accumulation des EOX 151

VI.3.4. Synthèse: l'organisme entier 159

VI.4. Discussion 161

VI.5. Conclusions 164

Chapitre VII : Etude du relargage de composés organo-halogénés extractibles chez *Anodonta cygnea*

VII.1. Introduction - Objectifs de l'étude 165

VII.2. Protocole expérimental 165

VII.2.1. Collecte, conditionnement et exposition des anodontes à la station contaminée 165

VII.2.2. Transfert et exposition des anodontes à la station non contaminée 166
VII.2.3. Prélèvement et analyse de l'eau 167
VII.2.4. Prélèvement et analyse des anodontes 167
VII.2.5. Etude statistique 167
VII.3. Résultats 167
VII.3.1. Résultats de l'analyse de l'eau 167
VII.3.2. Résultats de l'analyse des anodontes 168
VII.3.2.1. Condition physiologique 168
VII.3.2.1.1. Mortalité 168
VII.3.2.1.2. Indice de condition 169
VII.3.2.1.3. Pourcentage de poids sec- pourcentage de lipides 170
VII.3.2.2. Relargage des EOX 171
VII.4. Discussion 173
VII.5. Conclusions 175

Synthèse 177

Perspectives 185

Références bibliographiques 189

Annexes 201

Liste des figures

Figure 1.1 : Exemple de l'halogénation enzymatique de phénols.
Figure 1.2 : Formation de PCDDs et PCDFs par biohalogénation du 2,4,5-trichlorophénol (Svenson *et al.*, 1989).
Figure 1.3 : Quantités et flux de composés organo-halogénés (x 10^3 tonnes par an) dans l'environnement en Suède (Asplund, 1992).
Figure 1.4 : Constitution du bois.
Figure 1.5 : Chaîne de fabrication de la pâte et de papier selon le procédé Kraft (au sulfate).
Figure 1.6 : Formation de déchets lors de la fabrication de la pâte à papier selon le procédé Kraft..
Figure 1.7 : Formation d'AOX (en kilogrammes par tonne de pâte à papier) en fonction de la consommation totale de chlore élémentaire durant l'étape de blanchiment de la pâte à papier (Axegard, 1988).
Figure 1.8 : Quantités d'AOX produit par tonne de pâte aux Etat-Unis (Smith & Sprague, 1992).
Figure 1.9 : Concentrations en 2,3,7,8 TCDD (en nanogrammes par tonne de pâte à papier) générées lors du blanchiment de la pâte à papier (Smith & Sprague, 1992).
Figure 1.10 : Volume de *F. vesiculosus* (pourcentage par rapport au témoin) en fonction de la concentration de chlorate aprés 6 mois d'exposition (Rosemarin *et al.*, 1994).
Figure 1.11 : Croissance apicale de *F. vesiculosus* (pourcentage par rapport au témoin) en fonction de la concentration de chlorate aprés 6 mois d'exposition (Rosemarin *et al.*, 1994).
Figure 1.12 : Taux d'attaques de *S. entomon* en fonction de la concentration d'effluent d'une usine de pâte à papier (Leonardsson, 1993).
Figure 1.13 : Activité natatoire de *M. affinis* témoin et exposé à 656 µg $Cl.l^{-1}$ d'AOX (Kankaanpää *et al.*, 1995).
Figure 1.14 : Diversité et densités de poissons dans une zone soumise aux effluents d'une usine de pâte à papier (Bagge & Hakkari, 1992).
Figure 1.15 : Consommation journalière de TCDD-TEQ chez des personnes consommant du poisson contaminé (Law & Gudaitis, 1994).
Figure 1.16 : **a**, solubilité aqueuse ; **b**, coefficient de partage, en fonction de N (Nombre d'atomes de carbone + nombre d'atomes de chlore dans la molécule).
Figure 1.17 : Caractéristiques des AOX dans les EPKB en fonction de leur poids moléculaire et de leur lipophilie (Berry, 1992).
Figure 1.18 : Différentes interactions entre les micropolluants organiques et les substances humiques dans les phases aqueuses et solides (Rav-Acha & Rebhun, 1992).
Figure 1.19 : Concentrations en TCDD (TetraChloroDibenzo-p-Dioxines) dans les sédiments à proximité d'EPKB. Area 1, 2 : amont rejets ; Area 3-18 : aval rejets (Koistinen *et al.*, 1990).
Figure 1.20 : Schéma général des modalités d'action d'un micropolluant sur un écosystème (Ramade, 1992).
Figure 1.21 : Corrélation entre le facteur de bioaccumulation (Log BCF) et le coefficient de partage n-octano-eau (Log P) chez trois espèces de poissons d'eau douce (Veith *et al*, 1979, *in* Ramade, 1992)
Figure 1.22 : Modèle de bioaccumulation et de biomagnification du 2,3,7,8-TCDDioxine et du 2,3,7,8-TCDFurane dans une chaîne alimentaire à l'aval des rejets d'une usine de pâte à papier (Owens *et al.*, 1994).

Figure 2.1 : Localisation géographique des trois stations d'étude.
Figure 2.2 : Programmation en température du four de combustion.

Figure 3.1 : Localisation des quatre cours d'eau échantillonnés.
Figure 3.2 : Profils longitudinaux de la concentration en AOX dans l'eau de la Moselle en 1993 et 1996.

Figure 3.3 : Profils longitudinaux de la concentration en AOX dans l'eau de la Meurthe et 1994 et 1996.
Figure 3.4 : Profils longitudinaux de la concentration en AOX dans l'eau de la Meuse en 1994 et 1996.
Figure 3.5 : Profils longitudinaux de la concentration en AOX dans l'eau de la Chiers en 1993 et 1996.
Figure 3.6 : Localisation des stations de l'étude temporelle des concentrations en AOX.
Figure 3.7 : Evolution des concentrations en AOX dans l'eau en fonction du temps et des stations.
Figure 3.8 : Evolution des concentrations en AOX dans les sédiments en fonction du temps et des stations.

Figure 4.1 : Protocole expérimental de l'étude d'accumulation de micropolluants métalliques et organo-halogénés par *Anodonta cygnea*.
Figure 4.2 : Evolution de la concentration en AOX dans l'eau au niveau des deux stations.
Figure 4.3 : Evolution de la concentration en AOX, exprimée par rapport au poids sec, dans les sédiments au niveau des deux stations.
Figure 4.4 : Evolution de la concentration en AOX, exprimée par rapport à la matière organique, dans les sédiments au niveau des deux stations.
Figure 4.5 : Evolution des paramètres physiologiques mesurés dans les anodontes en fonction du temps et de la station d'exposition. **a)** pourcentage de poids sec par rapport au poids frais ; **b)** pourcentage lipides par rapport au poids sec. Les histogrammes représentent les moyennes, les barres verticales les écarts types (n=2 pour tous).
Figure 4.6 : Concentrations métalliques dans les anodontes ($\mu g.g^{-1}$ poids sec) en fonction du temps et de la station d'exposition. Les histogrammes représentent les moyennes, les barres verticales les écarts types (n=2 pour tous).
Figure 4.7 : Evolution des concentrations en EOX dans les anodontes en fonction du temps et de la station d'exposition. **a)** en fonction du poids frais, **b)** en fonction du poids sec, **c)** en fonction des lipides. Les histogrammes représentent les moyennes, les barres verticales les écarts types (n=2 pour tous).

Figure 5.1 : Protocole expérimental de l'étude d'accumulation d'EOX par quatre espèces de mollusques aquatiques.
Figure 5.2 : Evolution de la concentration en AOX dans l'eau au niveau des trois stations (l'intérruption du profil de la station 2 est due à un dysfonctionnement du préleveur automatique).
Figure 5.3a : Concentrations en AOX dans les sédiments ($\mu g\ Cl.g^{-1}$ PS) en fonction de la concentration en AOX dans l'eau.
Figure 5.3b : Concentrations en AOX dans les sédiments ($\mu g\ Cl.g^{-1}$ MO) en fonction de la concentration en AOX dans l'eau.
Figure 5.4 : Evolution du pourcentage de poids sec (/poids frais) en fonction du temps et de la station d'exposition chez les quatre espèces de mollusques. Les histogrammes représentent les moyennes, les barres verticales les écarts types (*A. cygnea*, n=4 ; *U. pictorum*, n=3 ; *D. polymorpha, V. viviparus*, n=2).
Figure 5.5 : Evolution du pourcentage de lipides (/poids sec) en fonction du temps et de la station d'exposition chez les quatre espèces de mollusques. Les histogrammes représentent les moyennes, les barres verticales les écarts types (*A. cygnea*, n=4 ; *U. pictorum*, n=3 ; *D. polymorpha, V. viviparus*, n=2).
Figure 5.6 : Evolution de la concentration en EOX ($\mu g\ Cl.g^{-1}$ PF) en fonction du temps et de la station d'exposition chez les quatre espèces de mollusques. Les histogrammes représentent les moyennes, les barres verticales les écarts types (*A. cygnea*, n=4 ; *U. pictorum*, n=3 ; *D. polymorpha, V. viviparus*, n=2).
Figure 5.7 : Evolution de la concentration en EOX (µg Cl.g-1 PS) en fonction du temps et de la station d'exposition chez les quatre espèces de mollusques. Les histogrammes représentent les moyennes, les barres verticales les écarts types (*A. cygnea*, n=4 ; *U. pictorum*, n=3 ; *D. polymorpha, V. viviparus*, n=2).

Figure 5.8 : Evolution de la concentration en EOX (µg $Cl.g^{-1}$ lipides) en fonction du temps et de la station d'exposition chez les quatre espèces de mollusques. Les histogrammes représentent les moyennes, les barres verticales les écarts types (*A. cygnea*, n=4 ; *U. pictorum*, n=3 ; *D. polymorpha, V. viviparus*, n=2).

Figure 5.9 : Cinétiques d'accumulation d'EOX chez *Anodonta cygnea* exposés aux stations 2 et 3 (moyenne ± écart type ; n=4 pour tous).

Figure 6.1 : Protocole expérimental de l'étude d'accumulation d'EOX dans différents organes de *Anodonta cygnea*.

Figure 6.2 : Evolution de la concentration en AOX dans l'eau des trois stations.

Figure 6.3 : 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 écarts types (n=9).

Figure 6.4 : Evolution des indices organiques en fonction du temps et de la station d'exposition. Les histogrammes représentent les moyennes, les barres verticales les écarts types (n=9).

Figure 6.5 : 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 écarts types (n=3 pour tous).

Figure 6.6 : 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 écarts types (n=3 pour tous).

Figure 6.7 : Evolution de la concentration en EOX (µg $Cl.g^{-1}$ 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 écarts types (n=3 pour tous).

Figure 6.8 : Evolution de la concentration en EOX (µg $Cl.g^{-1}$ 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 écarts types (n=3 pour tous).

Figure 6.9 : Evolution de la concentration en EOX (µg $Cl.g^{-1}$ lipides) en fonction du temps et de la station d'exposition dans les différents organes. Les histogrammes représentent les moyennes, les barres verticales les écarts types (n=3 pour tous).

Figure 6.10a : Evolution du facteur de concentration dans les trois organes en fonction du temps à la station 2.

Figure 6.10b : Evolution du facteur de concentration dans les trois organes en fonction du temps à la station 3.

Figure 6.11 : Comparaison du facteur 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 6.12 : Evolution de la concentration en EOX dans les anodontes entiers en fonction de la station et du temps d'exposition. Les concentrations sont calculées 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 7.1 : Protocole expérimental de l'étude de relargage d'EOX par *Anodonta cygnea*.

Figure 7.2a : Evolution du pourcentage de poids sec chez les anodontes transférés et exposés à la station 1.

Figure 7.2b : Evolution du pourcentage de lipides chez les anodontes transférés et exposés à la station 1.

Figure 7.3 : Evolution de la concentration en EOX dans les anodontes après le 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).

Figure 8.1 : Synthèse des phases d'accumulation et de relargage des composés organo-halogénés extractibles par l'anodonte, *Anodonta cygnea*, exposé aux effluents d'une usine de pâte à papier blanchissant au chlore, puis transférés au niveau d'une station non contaminée.

Figure 8.2 : Schéma récapitulitif des processus d'accumulation et de relargage de composés organo-halogénés par l'anodonte, *Anodonta cygnea*.

Liste des tableaux

Tableau 1.1 : Exemples de composés organo-halogénés rencontrés dans la nature (NCASI, 1992).
Tableau 1.2 : Estimation de la production naturelle de composés organo-halogénés en milieu marin (NCASI, 1992).
Tableau 1.3 : Comparaison de la consommation de chlore entre une usine électrique et une station d'épuration (Abarnou & Moissec, 1992).
Tableau 1.4 : Consommation de papier par habitant et par pays en 1989 (Forss & Jokinen, 1990).
Tableau 1.5 : Composition de différentes essences de bois (GTZ, 1990).
Tableau 1.6 : Emissions de SO_2 et NO_2, en millions de tonnes par an, par les usines de pâte à papier aux Etats-Unis (Pinkerton, 1993).
Tableau 1.7 : Consommation d'eau et rejets de Demande Chimique en Oxygène (DCO) et de Matières En Suspension (MES) lors de la fabrication du papier ; n.i. = non indiqué (Rintala & Puhakka, 1994).
Tableau 1.8 : Exemples de molécules organiques générées lors du blanchiment de la pâte à papier (Suntio *et al.*, 1988).
Tableau 1.9 : Changements physiologiques chez la perche, *Perca fluviatilis*, exposée aux effluents d'une usine de pâte à papier. Le + ou le - indique une augmentation ou une diminution significative par rapport à des individus non exposés. 0 indique une absence de changement et ( ) un changement non significatif (Andersson *et al.*, 1987).

Tableau 2.1 : Noms communs et scientifiques des deux espèces d'anodontes et de *pseudoanodonta*.
Tableau 2.2 : Composition de la solution de titrage.
Tableau 2.3 : Etalonnage du microcoulomètre avec une solution HCl 0.1 M (F=96487).
Tableau 2.4 : Vérification de la capacité d'adsorption du chlorophénol sur le charbon actif.
Tableau 2.5 : Pourcentage de recouvrement du dosage des AOX dans les sédiments par ajouts dosés de penta-chlorophénol (Hoffmann *et al.*, 1988).
Tableau 2.6 : Titrage de la solution étalon de chlorophénol à 90.4 mg dans 100ml de cyclohexane.

Tableau 3.1 : Localisation des stations de prélèvement sur les quatre cours d'eau étudiés (les affluents sont en italiques)
Tableau 3.2 : Stations de l'étude temporelle des concentrations en AOX dans l'eau et les sédiments.
Tableau 3.3 : Concentrations moyennes, minimales et maximales AOX dans l'eau ($\mu g\ Cl.l^{-1}$).
Tableau 3.4 : Pourcentages moyens et extrêmes en matière organique dans les sédiments (% du PS).
Tableau 3.5 : Concentrations moyennes et extrêmes en AOX dans les sédiments ($\mu g\ Cl.g^{-1}$ PS).
Tableau 3.6 : Concentrations moyennes et extrêmes en AOX dans les sédiments ($\mu g\ Cl.g^{-1}$ MO).

Tableau 4.1 : Physico-chimie de l'eau des deux stations (* : différence significative entre la station 1 et la station 2 ; n.s. : différence non significative).
Tableau 4.2 : Concentrations en AOX (moyenne ± écart type), et pourcentage de matière organique dans les sédiments (* : différence significative entre la station 1 et la station 2 ; n.s. : différence non significative).
Tableau 4.3 : Pourcentages de poids sec et pourcentage de lipides chez les anodontes témoins et exposés aux deux stations (moyenne ± écart type).
Tableau 4.4 : Concentrations moyennes en micropolluants métalliques dans les anodontes témoins et exposés aux deux stations (moyenne ± écart type).
Tableau 4.5 : Concentrations moyennes en EOX dans les anodontes témoins et exposés aux deux stations (moyenne ± écart type).

Tableau 5.1 : Physico-chimie de l'eau des trois stations (moyenne ± écart type ; * : différence significative entre deux stations ; n.s. : différence non significative).
Tableau 5.2 : Concentrations moyennes et extrêmes en AOX dans l'eau au niveau des trois stations.

Tableau 5.3 : Composition en matière organique et concentrations moyennes en AOX dans les sédiments (moyenne ± écart type ; n = 5).
Tableau 5.4 : Concentrations en AOX dans l'eau et les sédiments provenant des rejets de l'usine de pâte à papier, et facteurs d'accumulation.
Tableau 5.5 : Taux de mortalité (nombre d'individus morts/nombre d'individus transférés * 100) pour les quatre espèces de mollusques, en fonction de la durée (7, 14, 21 et 28 jours) et de la station d'exposition (T : mortalité totale durant l'exposition).
Tableau 5.6 : Pourcentages moyens (± écart type) de poids sec et de lipides dans les quatre espèces de mollusques.
Tableau 5.7 : Concentrations initiales (témoins) et finales (stations 1, 2 et 3) en EOX (µg $Cl.g^{-1}$ lipides ; moyenne ± écart type) chez les quatre espèces de mollusques.
Tableau 5.8 : Facteurs de pollution ([EOX] station d'exposition / [EOX] témoins) des quatre espèces de mollusques en fonction de la station d'exposition, calculés pour les concentrations exprimées par rapport au poids de lipides, après 28 jours d'exposition.
Tableau 5.9 : Facteurs de bioaccumulation des mollusques après 28 jours d'exposition à la station 2 et à la station 3, calculés à partir des concentrations exprimées par rapport au poids frais..

Tableau 6.1 : Caractéristiques physico-chimiques (moyenne ± écart type) de l'eau des trois stations. (* : différence significative entre deux stations ; n.s. : différence non significative).
Tableau 6.2 : Concentrations minimales, moyennes et maximales en AOX au niveau des trois stations.
Tableau 6.3 : Caractéristiques morphologiques des anodontes utilisés dans cette étude (n=180).
Tableau 6.4 : Pourcentages relatifs (par rapport au poids frais total) des trois composantes principales des anodontes (n=180).
Tableau 6.5 : Poids relatif des trois organes par rapport au poids frais des parties molles (n=180).
Tableau 6.6 : Pourcentages moyens de poids sec et de poids de lipides dans les trois organes étudiés et dans les restes (n=60).
Tableau 6.7 : Concentrations en EOX dans les trois types d'organes chez les anodontes témoins (moyenne ± écart type ; n=3).
Tableau 6.8 : Concentrations en EOX dans les organes des anodontes exposés durant 91 jours à la station 2 et à la station 3 (moyenne ± écart type ; n=3).
Tableau 6.9 : 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 6.10 : Facteur de concentration dans les anodontes ayant été exposés durant 91 jours au niveau des trois stations.

Tableau 7.1 : Physico-chimie de l'eau des deux stations (* différence significative entre la station 1 et la station 2 ; n.s. : diffférence non significative).
Tableau 7.2 : Mortalité des anodontes durant les deux phases d'exposition.
Tableau 7.3 : Evolution de l'indice de condition des anodontes.
Tableau 7.4 : 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 aprés le transfert (moyenne ± écart type).
Tableau 7.4 : Concentrations en EOX chez les anodontes témoinse, exposés à la station 2 (durant 91 et 147 jours), et à la station 1, 42 jours aprés le transfert (moyenne ± écart type).

Liste des photos

Photo 2.1 : L'anodonte, *Anodonta cygnea* (Photo : M. Ribette).
Photo 2.2 : *Unio pictorum* (Photo : M. Ribette).
Photo 2.3 : La moule zebrée, *Dreissena polymorpha* (Photo : M. Ribette).
Photo 2.4 : *Viviparus viviparus* (Photo : M. Ribette).
Photo 2.5 : Cage d'exposition (ouverte) des bivalves unionidés, *Anodonta cygnea* et *Unio pictorum*, et de la moule zebrée, *Dreissena polymorpha*, fixée sous le couvercle (Photo : P. Wagner).
Photo 2.6 : Cages d'exposition (ouverte) des bivalves unionidés, *Anodonta cygnea* et *Unio pictorum*, et du gastéropode, *Viviparus viviparus*, fixée sur le couvercle (Photo : P. Wagner).
Photo 2.7 : Présentation de l'usine de pâte à papier (Photo : P. Wagner).
Photo 2.8 : La station 1, située sur le Ton, en amont des rejets d'EPKB (Photo : P. Wagner).
Photo 2.9 : La station 2, située sur le Ton, en aval des rejets d'EPKB (Photo : P. Wagner).
Photo 2.10 : La station 3, située sur la Chiers, en aval de la confluence avec le Ton (Photo : P. Wagner).
Photo 2.11 : Confluence entre le Ton et la Chiers (Photo : P. Wagner).
Photo 2.12 : Dissection de *Anodonta cygnea* L. (Photo : M. Ribette).

Liste des abréviations

AOX : composés Organo-Halogénés Adsorbables
EOX : composés Organo-Halogénés Extractibles
EPKB : Effluents d'usines de Pâte à papier Kraft Blanchissant au chlore
FP : Facteur de Pollution
FP = concentrations au niveau des station aval / concentration au niveau de la station amont
FC : Facteur de Concentration
FC = concentration dans les sédiments / concentrations dans l'eau
FB : Facteur de Bioconcentration
FB = concentrations dans les organismes / concentrations dans l'eau

Introduction

Depuis la révolution industrielle et chimique à la fin du XIX^{ème} - début du XX^{ème} siècle, le nombre de molécules organiques d'origine anthropique a dramatiquement augmenté. Dans son *Précis d'écotoxicologie*, Ramade (1992) indique que jusqu'au milieu des années 1980, quelques 5 millions de composés organiques différents avaient déjà été synthétisés, dont environ 70 000 faisaient l'objet d'un usage quotidien. Parmi cette multitude de composés, auxquels il faut ajouter un millier de substances nouvelles commercialisées annuellement, l'attention de ces dernières années, voire décennies, s'est essentiellement porté sur ceux de la famille des organo-halogénés, c'est à dire comportant un ou plusieurs atomes de fluor, de chlore, de brome et/ou d'iode.

Les composés organo-halogénés d'origine anthropique pénètrent dans l'environnement, et plus particulièrement dans le milieu aquatique, soit sous forme de molécules synthétisées intentionnellement, soit en tant que sous produits de divers processus industriels et chimiques. Le DDT (dichlorodibenzotrichloroéthane) et ses dérivés, les différents isomères du HCH (hexachlorocyclohexane), ainsi que les PCBs (biphényls polychlorés) sont autant de composés de synthèse que l'on retrouve fréquemment dans les listes de polluants prioritaires, telles que la liste I, ou « liste noire », de la directive européenne de base du 4 mai 1976. A coté de ces molécules facilement identifiables, car connues, se trouve un grand nombre de molécules inconnues, représentant selon Quentin (1984), 75 à 90 % des composés organo-halogénés présents dans le milieu aquatique. Elles sont soit le résultat de la dégradation ou de la transformation des molécules précédentes, soit des sous produits générés, par exemple, lors de la potabilisation de l'eau, de la désinfection de circuits de réfrigération, ou du blanchiment de la pâte à papier par le chlore.

Malgré les grands efforts réalisés ces dernières années dans le but de réduire les rejets de composés organiques, l'industrie de la pâte à papier reste une des sources dominantes de ce type de polluants dans le milieu aquatique. Parmi les 242 molécules organiques inventoriées par Suntio *et al.* (1988) dans les effluents d'usines de pâte à papier Kraft blanchissant au chlore, 180 font partie de la famille des organo-halogénées, essentiellement organo-chlorées. En raison du caractère hydrophobe et lipophile de la plus part de ces molécules, elles ont tendance à s'accumuler dans de nombreux organismes aquatiques, et à se concentrer au fur et à mesure que l'on progresse dans la chaîne alimentaire.

Afin de pallier les problèmes analytiques de l'identification et de la quantification individuelle de la multitude de composés organo-halogénés, généralement présents à des concentrations individuelles faibles dans l'environnement aquatique, différents paramètres de groupe ont été développés. Parmi ceux-ci, les paramètres AOX (composés organo-halogénés adsorbables) et EOX (composés organo-halogénés extractibles), basés respectivement sur l'adsorption (sur du charbon actif ou de la résine XAD) et l'extraction (par des solvants polaires et apolaires), des composés organo-halogénés, se sont rapidement imposés à travers le monde.

Cependant, si les paramètres de groupe permettent de résoudre les problèmes analytiques, ils ne rendent pas compte de certaines difficultés méthodologiques. D'une part, se pose le problème de la représentativité de l'échantillonnage, dû à la grande variabilité temporelle et spatiale des concentrations dans l'eau, suite à des rejets industriels non constants ou à des changements de conditions hydrologiques. D'autre part, si l'analyse de l'eau permet de mesurer la quantité totale de polluant, elle ne donne aucune indication sur la fraction biodisponible, qui est celle qui risque d'avoir un effet écotoxicologique sur l'écosystème.

L'utilisation d'organismes aquatiques, dits sentinelles, permet de répondre aux difficultés énoncées ci-dessus. En effet, en raison de leur caractère lipophile, les composés organo-halogénés sont continuellement accumulés dans les organismes, fournissant ainsi une indication intégrée dans le temps de la fraction de polluant biodisponible.

De part leur mode de filtration pour l'alimentation et l'oxygénation, les mollusques bivalves sont constamment en contact étroit avec leur environnement aquatique. Ceci, et le fait qu'ils soient faciles à collecter, à manipuler et à exposer, en font des organismes sentinelles adéquats pour la surveillance active de la contamination du milieu aquatique par les micropolluants. En fonction de l'étude de la littérature et de nos premiers résultats, notre choix s'est plus particulièrement porté sur une espèce de bivalve de la famille des unionidés, *Anodonta cygnea* L., pour plusieurs raisons : (1) une grande abondance dans le milieu dulcicole du Nord-Est de la France, (2) une bonne résistance lors d'expériences de transfert, notamment à proximité de rejets d'effluents d'usines de pâte à papier blanchissant au chlore, (3) une forte capacité d'accumulation de composés organo-halogénés et (4) une taille suffisamment grande pour permettre des analyses sur des organismes individuels.

En 1993, le Centre de Recherches Ecologiques de l'Université de Metz, avec l'appui de l'Agence de l'Eau Rhin-Meuse, décide de lancer un programme de recherche sur les composés organo-halogénés totaux (AOX - EOX) présents dans le bassin Rhin-Meuse. Les premières étapes de ce programme consistaient en l'acquisition d'un analyseur AOX-EOX, et en la mise au point des

différentes méthodes de dosages, jusqu'à là non pratiquées dans le Centre. Tous les problèmes techniques rencontrés durant ces étapes ne seront pas présentés dans ce travail. Ils furent cependant nombreux et variés, allant de l'anecdote, telle qu'éviter de laver de la salle de préparation et de dosage à l'eau de Javel, à des problèmes plus graves, tels que l'explosion du four de combustion !

Aux problèmes analytiques et de maîtrise des nouvelles méthodologies, se sont ajoutées des contraintes de terrain liées aux rejets de l'usine de pâte à papier. En effet, au moment où les techniques de prélèvement, de préparation et de dosage des composés organo-halogénés dans l'eau et les sédiments étaient maîtrisées, et que les premières études d'accumulation chez les mollusques aquatiques commençaient, l'usine de pâte à papier de Harnoncourt a fait faillite. Ce n'est qu'après 8 mois de fermeture que les activités ont redémarré au début du mois de mars 1994.

Dans un premier temps, nous avons appliqué la méthode des AOX à l'eau et aux sédiments de différents cours d'eau du Nord-Est de la France. L'objectif de ce travail est d'avoir un aperçu des niveaux de concentrations et des sources potentielles d'AOX, aussi bien dans des zones urbanisées et industrialisées, qu'en amont de rejets anthropiques. De plus, il permet de confirmer l'existence d'une importante source anthropique de composés organo-halogénés : une usine de pâte à papier utilisant le chlore pour le blanchiment de la pâte.

Dans un deuxième temps, le présent travail est consacrée aux rejets des effluents de l'usine de pâte à papier citée ci-dessus. Les objectifs concernent d'une part les effets de tels rejets sur la physico-chimie générale de l'eau du milieu récepteur, et d'autre part le devenir et les effets des micropolluants organo-halogénés sur différents compartiments de l'écosystème aquatique : l'eau, les sédiments et les mollusques aquatiques, dont principalement le bivalve *Anodonta cygnea* L.

Chapitre I
Analyse bibliographique

I.1. Les composés organo-halogénés

Les composés organo-halogénés sont des molécules organiques dont un ou plusieurs atomes d'hydrogène ont été substitués par un ou plusieurs atomes halogènes : le fluor (F), le chlore (Cl), le brome (Br) ou/et l'iode (I). Ils entrent dans l'environnement aquatique par deux voies : naturelle et anthropique (Manninen & Häsänen, 1992).

I.1.1. La formation naturelle de composés organo-halogénés

Il a généralement été admis que les composés organo-halogénés sont d'origine anthropique, et ne se retrouvent pas naturellement dans l'environnement. Lorsqu'en 1968, Fowden inventorie quelques 30 composés organo-halogénés, dont majoritairement des organo-chlorés, il écrit « ...les informations actuelles suggèrent que les composés organiques comportant des liaisons covalentes avec des atomes halogènes ne sont que très rarement présents dans les organismes vivants..... ». Depuis lors, de nombreux travaux ont été menés et le nombre de composés nouveaux n'a cessé d'augmenter (Engvild, 1986 ; Neidleman & Geigert, 1987). De nos jours près de 2 000 composés organo-halogénés d'origine naturelle ont pu être identifiés (Gribble, 1994). Une revue complète de ces composés a été réalisée par le NCASI (National Council of the Paper Industry for Air and Stream Improvement, Inc) en 1992. Un bref aperçu des différentes familles de composés avec un exemple de molécule et son origine est présenté dans le tableau 1.1.

Il existe deux voies différentes de formation naturelle de composés organo-halogénés : la combustion de matière organique en présence d'ions halogénures ou de toute autre source d'halogènes, et la biohalogénation. Peu de choses sont actuellement connues sur le premier procédé, si ce n'est que la combustion d'organismes vivants (animaux et végétaux) contenant naturellement du chlore, entraîne inévitablement la formation de composés organo-chlorés (Gribble, 1994). Les éruptions volcaniques et les feux de forêts sont ainsi d'importantes sources d'organo-halogénés dans l'environnement.

D'autre part, des enzymes de type haloperoxidase ont été mises en évidence dans de nombreux organismes vivants (Mehrtens, 1994) ainsi que dans le sol (Asplund *et al.*, 1993). Ces enzymes sont capables de catalyser l'halogénation de matières organiques diverses en présence de peroxyde d'hydrogène et d'un halogénure (figure 1.1).

Famille	Molécule	Organisme	Auteurs
Alcanes simples	Chlorométhane	*Endocladia muricata* (algue)	Wuosmaa & Hager, 1990
Terpènes	Kylinone	*Laurencia pacifica* (algue)	Selover & Crews, 1980
Non-terpènes	Bactobolin B	*Pseudomonas sp.* (bactérie)	Ueda *et al.*, 1980
Acides aminés et peptides	Dysidine	*Dysidea herbacea* (éponge)	Hofheinz & Oberhänsli, 1977
Alcaloïdes	Acutumidine	*Sinomenium acutum* (plante sup.)	Tomita *et al.*, 1967
Stéroïdes	Jaborochlorodiol	*Jaborosa magellanica* (plante sup.)	Nittala *et al.*, 1981
Acides gras	Acide fluoroacétique	*Dichapetalum toxicarium* (plante sup.)	Peters & Hall, 1959
Indoles	Nortopsentin A	*Spongosorites ruetzerli* (éponge)	Sakemi & Sun, 1991
Carbazoles	3-chlorocarbazole	Urine de bovin	Luk *et al.*, 1983
Carbolines	Eudistomidine E	*Eudistoma olivaceum* (tunicier)	Murata *et al.*, 1991
Indolocarbazoles	Rebeccamycine	*Nocardia aerocolonigenes* (microbe du sol)	Bush *et al.*, 1987
Quinolines	Virantmycine	*Streptomyces nitrosporeus* (champignon)	Nakagawa *et al.*, 1981
Furanes	2-bromofurane	*Dendrilla sp.* (éponge)	Sullivan & Faulkner, 1984
Thiophènes	Thiophènes chlorés	*Pterocaulon virgatum* (plante sup.)	Bohlmann *et al.*, 1981
Acides nucleïques	Nucléocidine	*Streptomyces calvus* (champignon)	Morton *et al.*, 1969
Composés aromatiques	1,2,3,4 tétrachlorobenzène	*Juncus roemerianus* (plante supr.)	Mils *et al.*, 1973
Acides aminés	Thyroxine	Mammifères	Harington, 1926
Anthraquinones	5 chlorodermolutein	*Dermocybe sp.* (champignon)	Steglich *et al.*, 1969

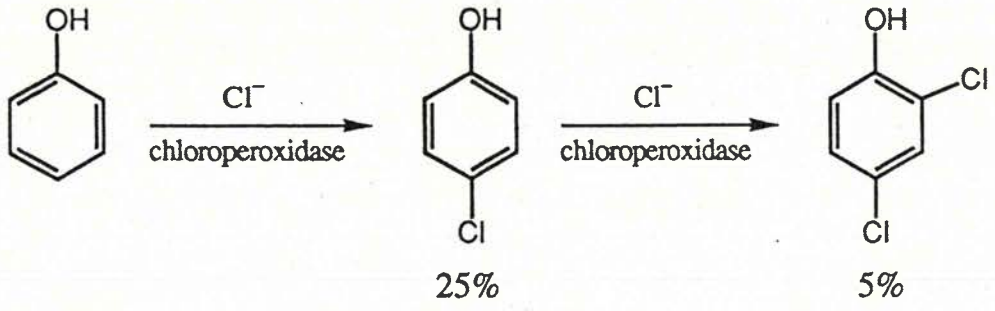


Figure 1.1 : Exemple de l'halogénation enzymatique de phénols

La mise en évidence de composés organo-halogénés dans les acides fulviques isolés d'eaux souterraines vieilles de plus de 5000 ans (Asplund *et al.*, 1989), et dans des sédiments datés du 13ème siècle (Paasivirta *et al.*, 1988) prouve que la formation naturelle de composés organo-halogénés existe depuis longtemps. En plus de leur caractère ubiquiste dans l'environnement, la concentration de ces composés produits naturellement n'est pas négligeable (tableau 1.2), pouvant dans certains cas même dépasser les niveaux anthropiques. Ainsi, la production anthropique mondiale de chlorométhane est estimée à 26 000 tonnes par an, et les émissions naturelles à environ 5 000 000 tonnes par an (Gribble, 1994).

Tableau 1.2 : Estimation de la production naturelle de composés organo-halogénés en milieu marin (NCASI, 1992).

	CH_3Cl		CH_3Br		CH_3I	
	Macroalgue	Océans	Macroalgue	Océans	Macroalgue	Océans
Tonnes par an	2 000	4 900 000	100	300 000	200	500 000

De récents travaux ont permis de montrer que les dioxines, considérées comme les produits chimiques les plus toxiques jamais conçus par l'homme et classées dans les substances cancérigènes en février 1997, sont également produites de manière naturelle (Travis & Hattenmer-Frey, 1989, *in* Gribble, 1994). Scheffield (1985) estime que près de 60 Kg de PCDDs sont formés chaque année lors des feux de forêts au Canada, équivalant à 10 fois la quantité émise lors de l'accident de Seveso en 1976. D'autre part, Svenson *et al.* (1989) ont montré que les chlorophénols pouvaient être transformés naturellement en PCDDs et PCDFs, par biohalogénation de chlorophénols grâce à la peroxydase horse-radish, HRP (figure 1.2).

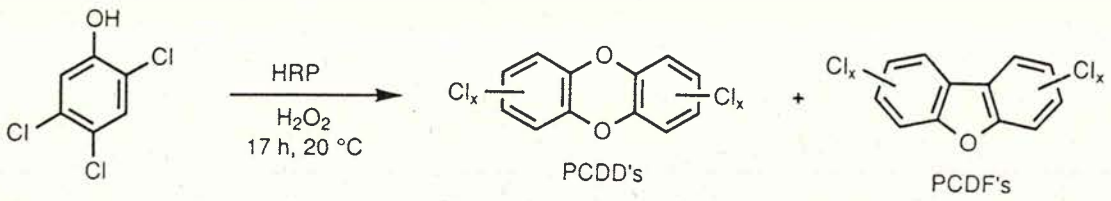


Figure 1.2 : Formation de PCDDs et PCDFs par biohalogénation du 2,4,5 trichlorophénol (Svenson *et al.*, 1989).

I.1.2. Les composés organo-halogénés d'origine anthropique

Les sources anthropiques de composés organo-halogénés sont multiples et peuvent être classées en deux grandes catégories : celles dont la fabrication d'organo-halogénés est délibérée et représente le stade final de production, et celles dont les organo-halogénés sont générés par inadvertance et représentent des produits secondaires de fabrication (Suntio *et al.*, 1988). Cependant, la distinction entre les deux catégories est souvent difficile car la synthèse de produits organo-halogénés génère également une grande quantité d'organo-halogénés indésirés.

Globalement la première catégorie regroupe l'industrie des solvants organiques halogénés, tels que le chloroforme, le tétrachlorure de carbone, le trichloréthylène, etc. (Amaral *et al.*, 1996), l'industrie des pesticides organo-chlorés, tels que le DDT et ses dérivés, les isomères alpha, bêta et gamma de l'hexachlorocyclohexane (lindane), l'hexachlorobenzène, etc.. (Gallissot, 1988), l'industrie des PCBs. Même si pour une grande partie de ces composés, la production et l'utilisation sont aujourd'hui réduites, voire interdites, ils persistent souvent pour de longues périodes dans l'environnement. Ainsi, Horn et *al.* (1979, *in* Gallissot, 1988), estiment que même après plusieurs curages, les sédiments de la rivière Hudson, contaminés durant 30 ans par des rejets industriels, contiennent encore près de 300 t de PCBs.

D'autre part, les halogènes et plus particulièrement le chlore, sont largement utilisés dans beaucoup de procédés industriels en raison de leur fort pouvoir oxydant (Doré, 1989). La potabilisation de l'eau par chloration est connue depuis le début du $XX^{ème}$ siècle (Cantor, 1994), et c'est en 1974 que Rook y signale pour la première fois la présence de composés organo-halogénés. Parmi ces composés, les trihalométhanes, tels que le chloroforme, le dichlorobromométhane, le dibromochlorométhane et le bromoforme représentent 5 à 20 % des organo-halogénés totaux (Christman *et al*, 1983). Ils sont formés par réaction entre le chlore et les acides humiques (Sanchez-Jimenez *et al.*, 1993 ; Alawi *et al.*, 1994) ou la fraction organique des sédiments (Martin *et al.*, 1993). D'autres composés de poids moléculaire plus élevé peuvent être formés soit par chloration directe, tels que les 5-méthyl, 5-hydroxyfuranones chlorés (Franzen & Kronberg, 1994), soit par chloration suivi de méthylation microbiologique, tels que le 2,4,6 trichloroanisole (Karlsson *et al.*, 1995).

Le chlore est également utilisé en tant qu'agent antifouling dans les aéroréfrigérants, à des doses de l'ordre du mg par litre. Duvivier (1993), préconise même l'usage des chloramines en tant qu'agent d'antifouling dans les centrales électronucléaires. A titre d'exemple, la consommation journalière d'une centrale électrique de 1000 MW (tableau 1.3) est du même ordre de grandeur que celle qu'aurait une station d'épuration pour 2.6 millions équivalent habitants. Le bilan des flux des composés organo-halogénés adsorbables (AOX) dans le bassin versant de la Ruhr en Allemagne (56 tonnes par an) montre que $^1/_5$, provient de stations d'épuration urbaines et $^1/_3$ d'une seule usine de pâte à papier (Klopp & Kornatzki, 1987).

Tableau 1.3 : Comparaison de la consommation de chlore entre une usine électrique et une station d'épuration (Abarnou & Miossec, 1992).

	Usine électrique	Station d'épuration urbaine
Flux	30 $m^3.s^{-1}$ (1000 MWe)	0.2 $m^3.j^{-1}$éq. habitant)
Dose de chlore	1 $mg.l^{-1}$	5 $mg.l^{-1}$
Consommation de chlore	2.6 tonnes par jour	1 g par jour

Les usines de pâte à papier utilisant le chlore sous forme de Cl_2 et OCl_2 pour le blanchiment de la pâte sont responsables du rejet de grandes quantités de composés organo-halogénés. En Finlande, elles représentent la plus grande source de ces composés dans l'environnement (Jokela *et al.*, 1992).

La figure 1.3 illustre les quantités et les flux de composés organo-halogénés en Suède (Asplund, 1992).

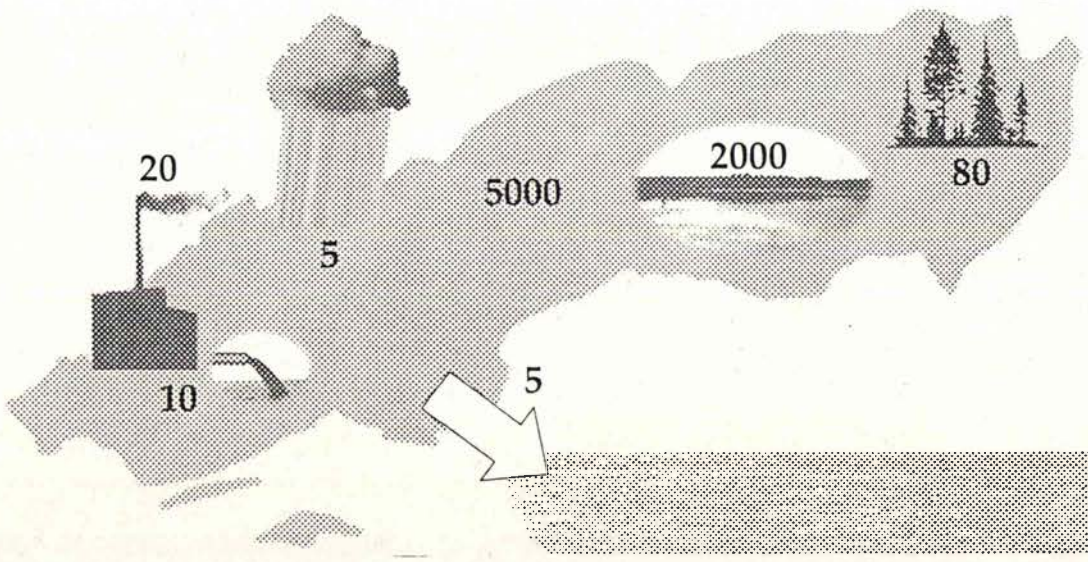


Figure 1.3 : Quantités et flux de composés organo-halogénés (x 10^3 tonnes par an) dans l'environnement en Suède (Asplund, 1992).

I.2. L'industrie de la pâte à papier

I.2.1. Généralités

Contrairement aux prévisions, qui annoncaient une diminution de la consommation de papier grâce au développement du traitement informatique, la demande en papier et en pâte à papier ne cesse d'augmenter. Ainsi la production mondiale a augmenté de 4.8 % entre 1984 et 1989, et rien qu'en France, elle est passée de 1 990 000 tonnes en 1974 à 2 200 000 tonnes en 1990, représentant un chiffre d'affaires annuel de plus de 7.5 milliards de francs (Quid, 1994). Les principaux consommateurs sont les pays occidentaux (Europe, Amérique du Nord), le Japon, la Chine et l'ex-URSS (tableau 1.4).

Tableau 1.4 : Consommation de papier par habitant et par pays en 1989 (Forss & Jokinen, 1990).

Pays	Consommation par habitant (Kg)	Population (x1000)	Consommation par pays (tonnes)
Etats Unis	303.9	249 900	75 944 610
R.F.A.	209.7	62 400	13 085 280
R.D.A.	85.6	16 500	1 412 400
Finlande	212.0	4 961	1 051 732
Suède	229.1	8 354	1 913 901
Japon	222.7	123 260	27 450 002
Ex-URSS	35.9	285 951	10 265 641
Brésil	28.6	147 850	4 228 510
Chine	12.6	1 111 910	14 010 066

Il nous a donc paru intéressant de présenter rapidement les différents procédés de fabrication de la pâte à papier, actuellement les plus employés dans le monde.

I.2.2. Fabrication de la pâte à papier

I.2.2.1. Composition du bois

Le bois, ou xylème ne se rencontre que dans les plantes vasculaires, où il est essentiellement composé de 4 grands éléments, dont la part relative dépend de la nature du bois (tableau 1.5), que sont:
- les substances extractibles, notamment les huiles volatiles, telles que les terpènes et la térébenthine,

- la cellulose, haut polymère du glucose avec une structure cristalline et un poids moléculaire élevé,
- les hémicelluloses, complexes de différents polysaccharoses, de cristallinité et de poids moléculaire plus bas que ceux de la cellulose,
- la lignine, qui a une structure de polymère aromatique et représente dans le bois tout ce qui n'est pas glucidique.

Tableau 1.5 : Composition de différentes essences de bois (GTZ, 1990).

	Epicéa	**Pin**	**Hêtre**	**Paille**
Cellulose	57.8 %	54.3 %	53.5 %	35 - 45 %
Lignine	28.3 %	26.4 %	22.5 %	25 %
Pentosanes	11.3 %	11 %	24.9 %	25 %
Résines, graisses, cires	2.3 %	3.5 %	1.8 %	-
Cendres	0.8 %	0.4 %	1.2 %	1 - 6 %

Dans le bois, plusieurs chaînes de cellulose collées les unes contre les autres forment un filament, élément papetier essentiel de caractère fibreux (figure 1.4). Les fibres du bois sont constituées de plusieurs filaments orientés dans le sens de la longueur, et enrobées par la lamelle mitoyenne composée essentiellement de lignine et d'hémicelluloses.

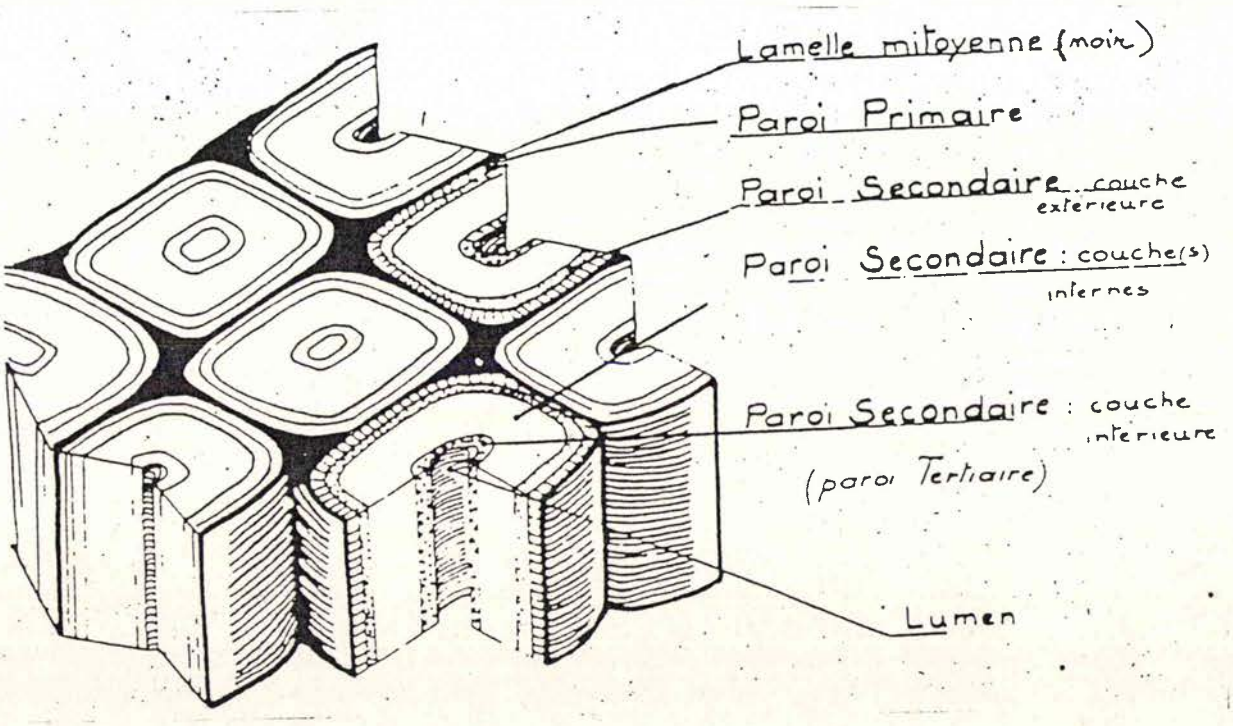


Figure 1.4 : Constitution du bois.

I.2.2.2. Les différentes pâtes à papier

L'étape essentielle dans la fabrication de la pâte à papier est la dissolution de la lamelle mitoyenne pour récupérer les fibres de cellulose. Il existe actuellement trois moyens techniques pour obtenir les fibres individuelles du bois, correspondant aux trois types de pâtes à papier :

- les pâtes chimiques : elles sont obtenues par dissolution chimique de la lamelle mitoyenne, soit à l'aide d'un mélange de $NaOH/Na_2S$ (procédé Kraft ou au sulfate développé par Dahl en 1878), soit à l'aide de H_2SO_3 (procédé au bisulfite développé par Mitscherlich en 1874).
- les pâtes mécaniques : mises au point en 1867 par Voelter, elles sont obtenues par une désintégration mécanique du bois, utilisant la chaleur, pour ramollir la lignine.
- les pâtes mi-chimiques : elles sont obtenues en alliant les deux procédés précédents, à savoir un traitement chimique pour dissoudre la lamelle mitoyenne, suivi d'un traitement mécanique pour séparer les fibres.

Chacun de ces moyens techniques présente des avantages comme des inconvénients par rapport aux deux autres, et la préférence d'utilisation dépend essentiellement de la nature de la matière première utilisée. Actuellement, 85 % des rondins sont destinés à la fabrication de pâtes chimiques qui resteront prédominantes dans un futur proche avec au moins 75 % des rondins en l'an 2000 (NSEPB, 1989).

I.2.2.3. Les pâtes chimiques et le procédé Kraft

Les pâtes chimiques sont actuellement les plus fabriquées dans le monde, représentant près de 50 % de la production mondiale de pâtes à papier. Ce procédé est utilisé par l'usine de pâte à papier située à Harnoncourt en Belgique, où ont été réalisées les différentes études de ce travail. C'est donc le seul procédé qui sera détaillé ici.

Les diverses opérations de fabrication de la pâte à papier par le procédé Kraft peuvent être réparties en trois grands secteurs d'activités :

- le traitement du bois et des fibres
- la combustion et la régénération des produits de cuisson,
- les installations annexes

On s'intéressera plus particulièrement au secteur du traitement du bois et des fibres car il comporte notamment les ateliers de préparation du bois et de la pâte écrue, et celui du blanchiment de la pâte (figure 1.5).

A leur arrivée à l'usine, les rondins sont stockés dans le parc à bois de l'usine, ou directement conditionnés dans l'atelier de mise en copeaux. Dans ce cas, ils sont écorcés dans un tambour écorceur

puis déchiquetés et triés avant d'être stockés sous forme de copeaux en grands tas à l'extérieur de l'usine. Le bois, sous forme de copeaux, subit trois opérations successives, que sont la cuisson, le lavage et l'épuration de la pâte.

La première opération consiste à solubiliser la lignine à l'aide d'une liqueur alcaline, afin de libérer les fibres de cellulose. Les copeaux sont introduits dans de grandes autoclaves et mis sous pression vapeur de 1.5 bar, chassant ainsi l'air contenu dans le bois. Les matières pectiques du bois, extrêmement volatiles, sont entraînées avec le flux de dégazage vers un condenseur, puis récupérées sous forme d'essence de térébenthine. Après le dégazage, les copeaux sont introduits dans la tour d'imprégnation du lessiveur où ils sont imprégnés profondément et uniformément par la liqueur de cuisson, aussi appelée liqueur blanche composée de NaOH et de Na_2S. Le milieu est à une température de 110°C et à une pression hydrostatique de 10 bars ; la durée de rétention est de 40 minutes. Les copeaux descendent par gravité dans la tour d'imprégnation et sont véhiculés à leur sortie vers la tour de cuisson proprement dite. Des l'entrée des copeaux dans celle-ci, la température est augmentée de manière progressive jusqu'à 160-170°C, puis stabilisée durant environ 1h30 à 2h, à une pression de 10 bars.

Le mécanisme de dissolution de la lignine reste mal connu. On pense que la soude réagit avec les groupements hydroxyles, acides ou esters de la lignine selon les réactions suivantes :

$$L\text{-}OH + NaOH \rightarrow L\text{-}ONa + H_2O$$

$$L\text{-}COOH + NaOH \rightarrow L\text{-}COONa + H_2O$$

$$L\text{-}COOR + NaOH \rightarrow L\text{-}COONa + ROH$$

Les groupements hydroxyles supplémentaires peuvent être libérés par hydrolyse alcaline des méthoxyles:

$$L\text{-}OCH_3 + NaOH \rightarrow L\text{-}ONa + CH_3OH$$

Par ailleurs, la liqueur alcaline, riche en ions OH permet l'hydrolyse des liaisons entre les unités de lignine ou entre lignine et hydrates de carbone. Le sulfure de sodium est fortement réducteur en milieu alcalin, ce qui élimine dès le début de la cuisson toutes les possibilités de dégradation oxydante qui pourraient être néfastes à la fraction hydrate de carbone. Le sulfure de sodium est transformé par hydrolyse aqueuse :

$$S^{2-}/2Na^+ + H_2O \rightarrow SH^- + 2Na^+ + OH^-,$$

dont l'équilibre dépend de la concentration en ions OH^- du milieu, Na_2S intervient comme réserve de soude. Il a sensiblement la même action que la soude sur la lignine, en donnant des thiolignines plus solubles en milieu alcalin. Cependant leur formation reste également mal connue, et on pense que la délignification se fait en deux temps. Le remplacement des groupes hydroxyles par des groupements mercaptans alcalins instables qui seraient transformés en sulfure organique, la lignine restant à l'état soluble. D'autre part, une rupture par hydrolyse alcaline de la molécule de lignine avec formation de groupements hydroxyles rendant la lignine plus soluble.

Chaîne de fabrication du papier

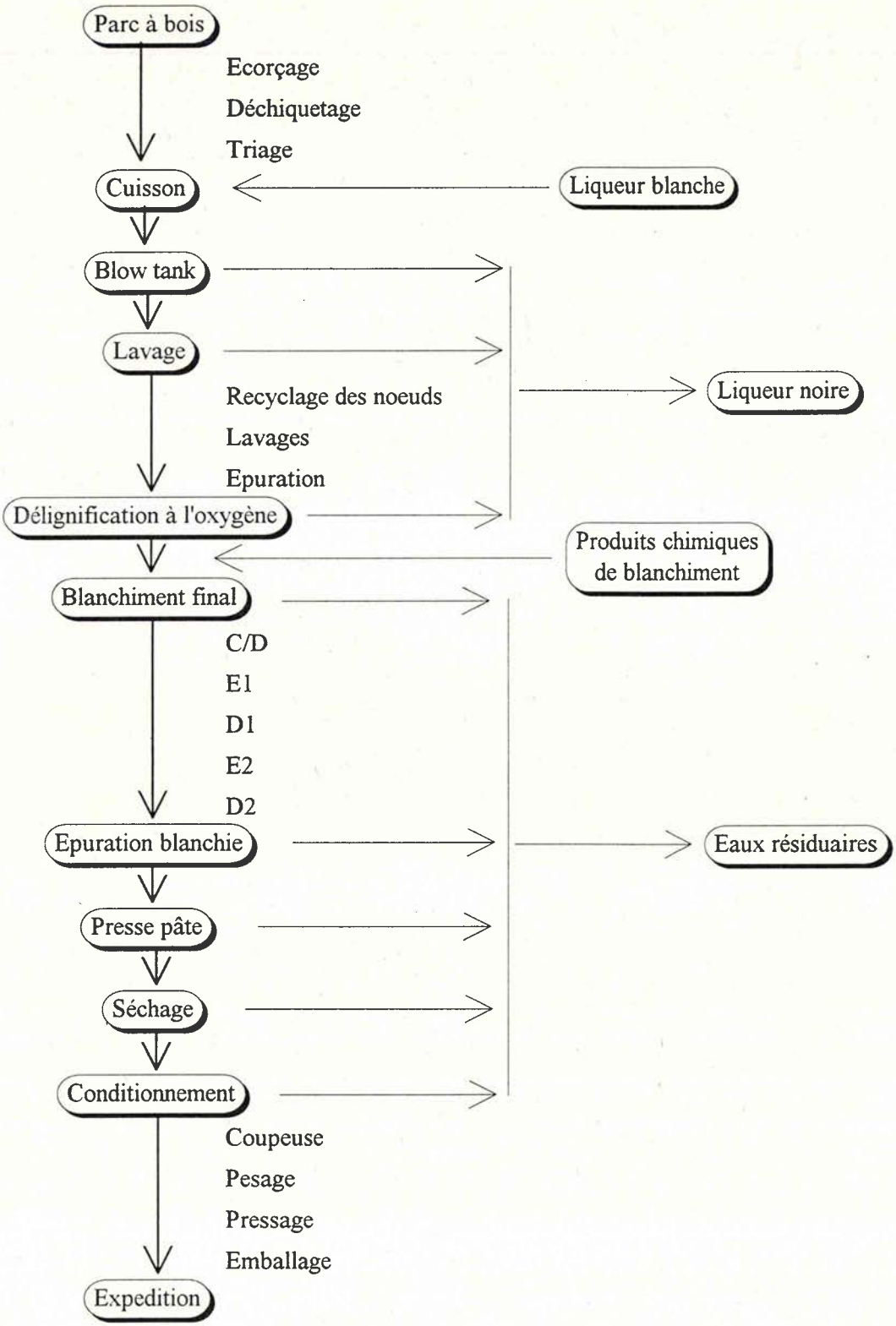


Figure 1.5 : Chaîne de fabrication de pâte et de papier selon le procédé Kraft (au sulfate).

La liqueur chargée en particules de dissolution (matières minérales et organiques) est dirigée dans deux séparateurs en série, et les copeaux arrivent dans la zone de lavage sans avoir perdu leur forme d'origine. Pour provoquer l'interruption de la cuisson, la pâte est refroidie par un courant de liqueur qui concourt à un premier lavage. La liqueur de lavage est injectée dans le fond du lessiveur refroidissant la pâte. Une partie de cette liqueur remonte et est extraite pour être réchauffée à 120-130°C, pour le lavage de la pâte. La liqueur remonte à contre courant des copeaux délignifiés, puis la pâte est soufflée du lessiveur vers le diffuseur qui constitue la dernière étape de lavage. La pâte est stockée et la liqueur de lavage, aussi appelée liqueur noire, contenant les constituants du bois dégradé tels que la lignine, est acheminée vers l'étape de recyclage en circuit annexe. Les gaz provenant du dégazage de l'imprégnateur sont fortement odorants et composés essentiellement d'hydrogène sulfuré, de méthyl-mercaptans, de diméthyl-sulfure et de diméthyl-disulfure. Ces gaz malodorants (forte odeur de choux) seraient dus à l'action de Na_2S sur les groupements OCH_3 de la lignine :

$$L\text{-}OCH_3 + Na_2S \rightarrow L\text{-}ONa + CH_3SNa,$$

$$L\text{-}(OCH_3)_2 + Na_2S \rightarrow L(ONa)_2 + (CH_3)_2S$$

La pâte lavée est triée de manière à ce que les noeuds et les copeaux non cuits soient recyclés dans le lessiveur, tandis que les bûchettes subissent un défibrage mécanique avant d'être réintroduits dans le circuit. La pâte épurée est ensuite stockée avant d'être blanchie.

Le blanchiment a pour but d'appliquer successivement sur la pâte des réactifs qui achèvent la délignification, tout en la blanchissant progressivement. Il s'effectue en plusieurs étapes selon la séquence $C/D\text{-}E_1\text{-}D_1\text{-}E_2\text{-}D_2$ correspondant à :

- délignification. Le premier stade, C/D, du nom des réactifs appliqués, Dioxyde de chlore et Chlore, contribue à un complément de délignification. En effet, si pendant la cuisson la délignification était surtout localisée à l'extérieur des fibres, la chloration permet la délignification à l'intérieur même de la fibre. Le deuxième stade, E_1, comme Extraction alcaline, consiste à solubiliser les constituants de la lignine dégradée et autres produits résultants de l'action du chlore dans le stade précédent, par application d'une solution de soude.
- blanchiment. Les trois stades suivants, à savoir D_1, comme Dioxyde, E_2 et D_2 permettent d'élever la blancheur à un très haut niveau.

A la sortie du blanchiment, la pâte subit une nouvelle épuration afin d'être débarrassée de ses impuretés fines. Puis se succèdent la mise en feuille (égouttage, pressage, séchage et découpage) et le conditionnement (pesage, pressage).

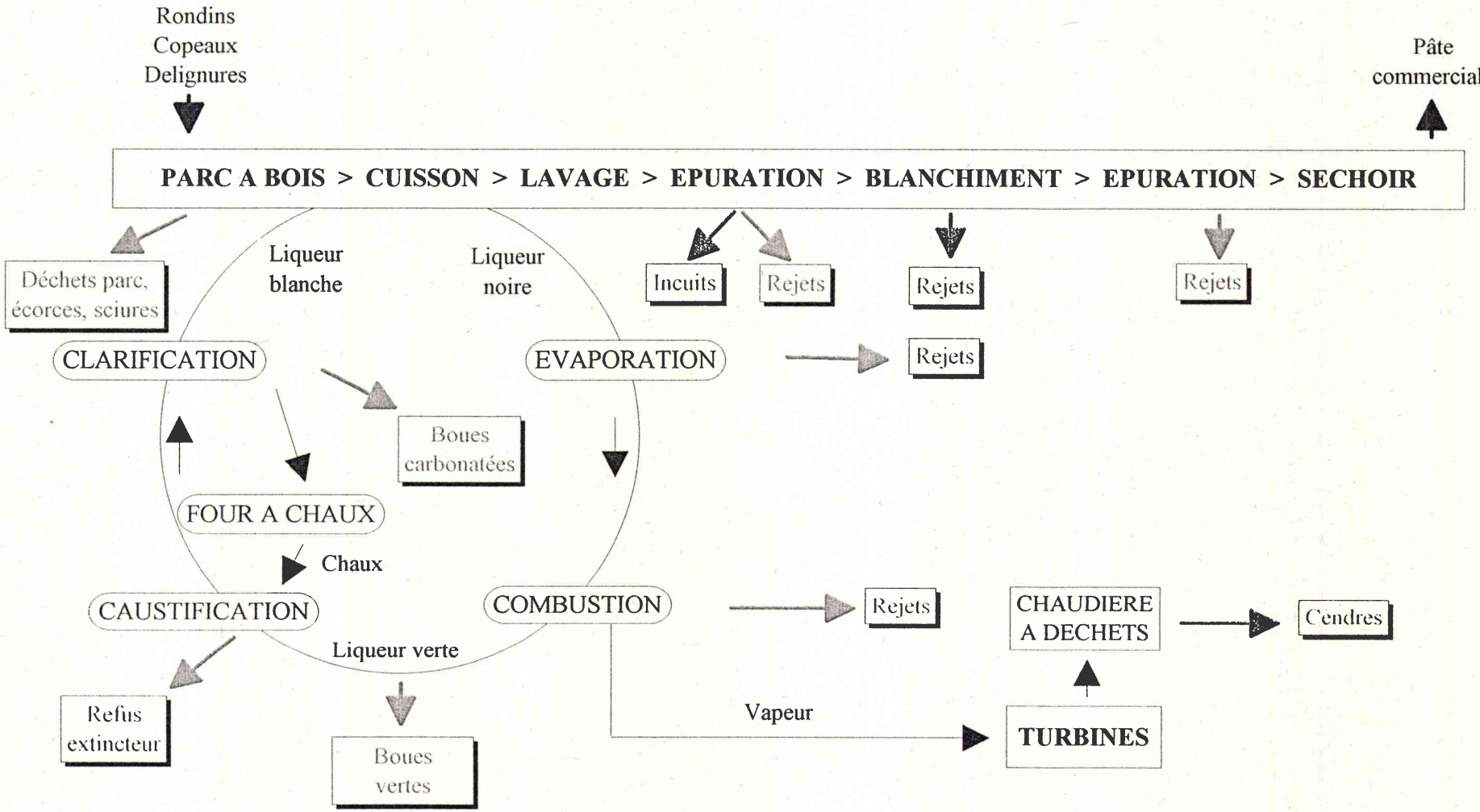


Figure 1.6 : Formation de déchets lors de la fabrication de la pâte à papier par le procédé Kraft (d'après Centre Technique du Papier, 1995).

I.2.3. Pollution par l'industrie papetière

L'industrie papetière se subdivise en deux grandes branches, à savoir l'industrie des produits semi-finis tels que la pâte à papier, et l'industrie papetière proprement dite, qui transforme les produits semi-finis en papier, carton, etc. Suivant la branche considérée et le procédé employé, l'industrie papetière engendre différents types de pollution qui sont rejetés dans l'air, dans les sols et dans l'eau. Toutefois, on se contentera ici de décrire les principales pollutions engendrées par les usines de pâtes à papier au sulfate (procédé Kraft), utilisant du chlore pour le blanchiment (figure 1.6).

I.2.3.1. Pollution de l'air

La pollution de l'air par les usines de pâte à papier au sulfate représente la pollution la plus perceptible. L'utilisation de soufre sous forme de Na_2S lors de la préparation de la pâte (cf. § 2.2.3) entraîne la formation de grandes quantités de composés sulfurés malodorants, dont notamment le sulfite d'hydrogène (H_2S), le méthyl-mercaptan (CH_3SH), le diméthyl-sulfite (CH_3-S-CH_3) et le diméthyl-disulfite (CH_3-S-S-CH_3). Ces constituants majeurs du TRS (Total Reduced Sulfide, Sulfate Réduit Total) sont présents dans les environs des usines de pâte à papier à des concentrations individuelles moyennes de 2 à 8 $\mu g.m^{-3}$, et peuvent périodiquement monter jusqu'à plus de 100 $\mu g.m^{-3}$ (Partti-Pellinen *et al.*, 1996). L'exposition prolongée à ces molécules entraîne généralement des symptômes persistants, tels que l'irritation des yeux et des voies respiratoires ou les maux de tête et migraines chroniques chez les personnes habitant à proximité (Marttila *et al.*, 1994). A titre d'exemple, une usine de pâte à papier au sulfate avec une production annuelle de 170 000 tonnes, rejette en moyenne 618 tonnes de SO_2, dont 48 tonnes de TRS par an, auxquels il faut ajouter 540 tonnes de SO_2 générés par la combustion de combustibles fossiles, nécessaires à la production de vapeur et d'énergie.

Une étude menée par Pinkerton (1993) du NCASI (National Council of the Paper Industry for Air and Stream Improvement, Inc.) aux Etats-Unis a montré que les quelques 200 usines de pâte à papier américaines produisaient de grandes quantités de SO_2 et de NO_2, provenant aussi bien de la fabrication de la pâte que de la production d'énergie (tableau 1.6). Ainsi, malgré une diminution de 30% en 10 ans, la quantité de SO_2 émise en 1990 par les usines de pâte à papier est de 600 millions de tonnes par an, dont 72.2 % proviennent de la production d'énergie, 22.3 % des procédés au sulfate, 2.3% des procédés au sulfite et 0.2 % des autres procédés. De plus, les rejets de NO_2 ont augmenté de 12.5% en 10 ans, représentant 306 millions de tonnes en 1990, dont 75.5 % proviennent de la production d'énergie, 22.2 % des procédés au sulfate, 1.6 % des procédés au sulfite et 0.7 % des autres procédés.

Tableau 1.6 : Emissions de SO_2 et de NO_2, en millions de tonnes par an, par les usines de pâte à papier aux Etats-Unis (Pinkerton, 1993).

	1980	1985	1990
SO2 total	**896**	**699**	**600**
Chaudières	740	510	452
Procédés au sulfate	133	166	134
Procédés au sulfite	22	22	13
Autres procédés	1	1	1
NO2 total	**272**	**303**	**306**
Chaudières	204	228	231
Procédés au sulfate	66	73	68
Procédés au sulfite	2	2	5
Autres procédés	-	-	2

Lors de la fabrication de la pâte à papier, les terpènes, constituants naturels du bois sont extraits et rejetés en grande quantité et diversité dans l'atmosphère. Quatorze monoterpènes, dont majoritairement le α-pinène et le 3-carène, ainsi que divers sesquiterpènes (entre autres le longifolène et le α-muuroène) ont été identifiés à des concentrations totales de 140 à 540 $\mu g.m^{-3}$ dans les panaches de fumées d'une usine utilisant le pin, *Pinus sylvestris* et l'épicéa, *Picea abies*, comme matière première (Strömvall & Petersson, 1993).

De nombreux composés organo-halogénés, principalement organo-chlorés, sont émis dans l'atmosphère, soit directement lors de l'étape de blanchiment, soit par volatilisation à partir de l'eau des stations d'épuration et des effluents (Juuti *et al.*, 1996). Ce sont essentiellement des composés de faible poids moléculaire, généralement appelés VOC ou VOCC (composés organo-chlorés volatiles) ou VOX (composés organo-halogénés volatiles), tels que le chloroforme, l'acide dichloro-acétique et le 2,5 dichlorothiophène (Comba *et al.*, 1994 ; Juuti *et al.*, 1993).

I.2.3.2. Pollution des sols

La pollution des sols a lieu par l'intermédiaire de l'épandage des boues des stations d'épuration des usines de pâte à papier sur les terres agricoles. Selon Kyllönen *et al.* (1988), ces boues se composent essentiellement de protéines (22-52%), de lignine (20-58%), d'hydrates de carbone (0-25%),

de lipides (2-10 %) et de cellulose (2-8 %), mais comportent également des AOX et différents chlorophénols (Gergov *et al.*, 1988).

I.2.3.3. Pollution de l'eau

La production de pâte à papier à partir de bois comporte plusieurs étapes et chacune engendre un type différent d'eaux usées (tableau 1.7).

Les eaux usées provenant de l'écorçage des arbres contiennent essentiellement des produits naturels du bois, tels que les tanins, les phénols monomériques, les hydrates de carbone simples et les résines, pouvant résulter en une DCO de 1000 $mg.l^{-1}$ dans l'effluent (Field *et al.*, 1988).

Tableau 1.7: Consommation d'eau et rejets de Demande Chimique en Oxygène (DCO) et de Matières En Suspension (MES) lors de la fabrication du papier ; n.i. = non indiqué (Rintala & Puhakka, 1994).

	Consommation d'eau m^3 par tonne de pâte	**DCO Kg par tonne de pâte**	**MES Kg par tonne de pâte**
Ecorçage	5 - 25	5 - 20	n.i.
Cuisson de base	10 - 15	15 - 32	n.i.
Traitement mécanique			
non blanchi	10 - 30	40 - 60	10 - 40
blanchi	10 - 30	50 - 120	10 - 40
Traitement mi-chimique			
non blanchi	10 - 15	70 - 120	20 - 50
blanchi	10 - 15	100 - 180	20 - 50
Traitement chimique au sulfate			
non blanchi	40 - 60	40 - 60	10 - 20
blanchi	60 - 90	100 - 140	10 - 40
Traitement chimique au sulfite			
non blanchi	40 - 100	60 - 120	10 - 50
blanchi	150 - 180	120 - 180	20 - 60
Papeterie	10 - 50	n.i.	n.i.

Durant la cuisson de la pâte par le procédé Kraft, environ 55 % du poids total du bois, essentiellement des produits de dégradation des constituants naturels du bois, tels que la lignine, les polysaccharides et les substances extractibles, sont dissoutes et se retrouvent dans la liqueur noire. La récupération chimique de celle-ci, dont une grande partie sert de combustible pour la production

d'énergie de l'usine, engendre la libération de condensats, tels que méthanol, éthanol, terpènes, kétones, phénols, acides gras, résines et produits sulfatés (Rintala & Puhakka, 1994).

Lors de l'étape de blanchiment, les 5 à 10 % de lignines restantes sont oxydés par le chlore, devenant ainsi solubles pour être éliminés lors du lavage de la pâte au NaOH. Les quantités et les caractéristiques de produits rejetés dépendent de la nature du bois, de la séquence ainsi que des agents utilisés pour le blanchiment. La réaction du chlore avec les composants organiques du bois engendre la formation de nombreuses molécules organo-halogénées qui ont été revues par différents auteurs dont Voss *et al.* (1980), Kringstad & Lindström (1984).

Selon Axegard (1988), la quantité d'AOX formée dépend de l'essence de bois utilisé, et est directement proportionnelle à la quantité de chlore élémentaire utilisée et/ou au taux de substitution du chlore par le bioxyde de chlore (figure 1.7).

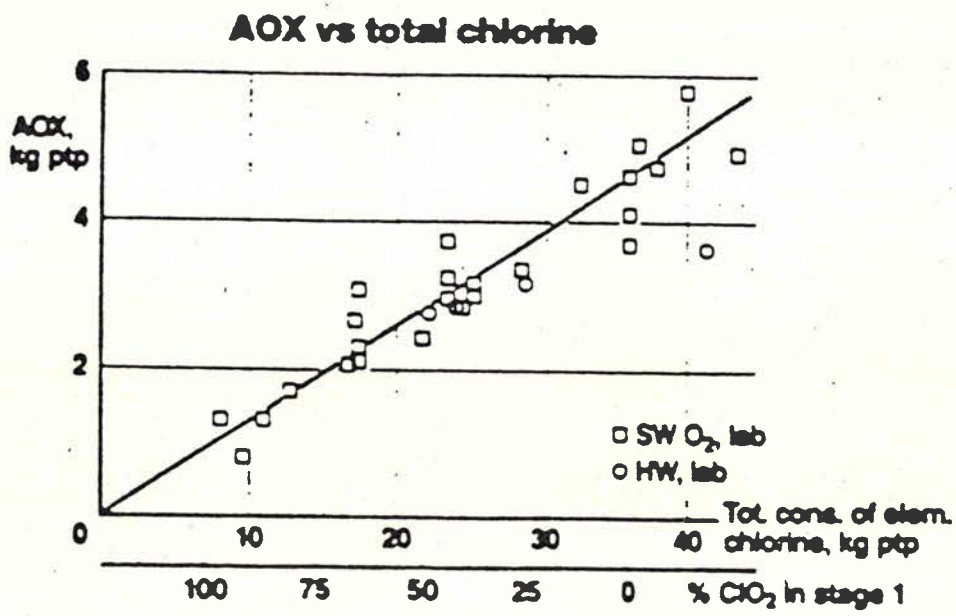


Figure 1.7 : Formation d'AOX (en kilogrammes par tonne de pâte à papier) en fonction de la consommation totale de chlore élémentaire durant l'étape de blanchiment de la pâte à papier (Axegard, 1988).

Ainsi, aux Etats-Unis, la quantité d'AOX générée varie de 0.5 à 9 Kg par tonne de pâte à papier (figure 1.8), avec une moyenne de 2.2 kg par tonne (Smith & Sprague, 1992), identique à celle observée en Finlande (Jokela & Salinkoja-Salonen, 1992). Pour une production mondiale de pâte à papier estimée à 261 millions de tonnes en 1992, et un rejet moyen de 2.2 kg d'AOX par tonne de pâte, cela représente 574 200 tonnes d'AOX déversées dans le milieu aquatique.

Dans leur revue bibliographique sur les effluents d'usines de pâte à papier, Suntio *et al.* (1988) inventorient 242 molécules organiques, dont 180 molécules organo-chlorées (sans compter les

isomères), répartis en trois familles : les composés acides, les composés phénoliques et les composés neutres (tableau 1.8).

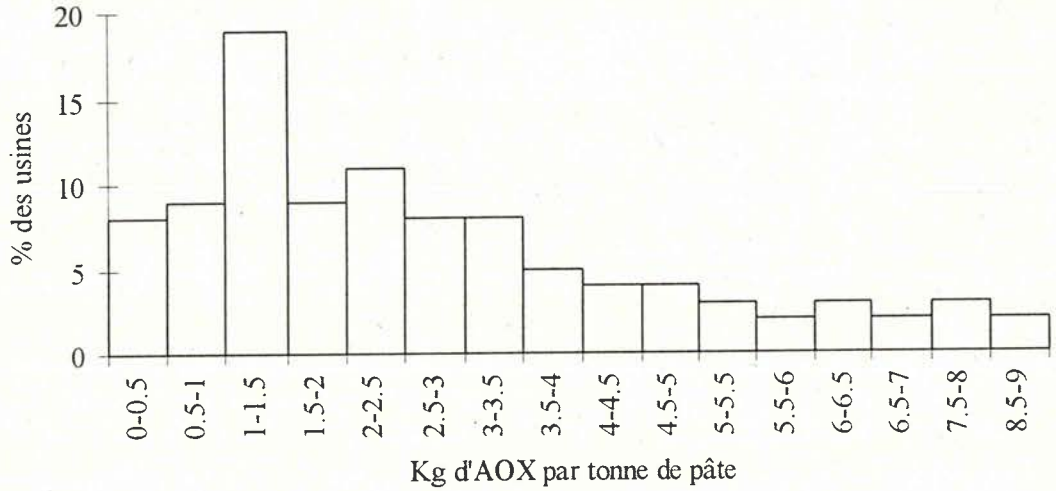


Figure 1.8 : Quantité d'AOX produit par tonne de pâte aux Etats Unis (Smith & Sprague, 1992).

Tableau 1.8 : Exemples de molécules organiques générées lors du blanchiment de la pâte à papier (Suntio *et al.*, 1988).

	Composés acides	**Composés phénoliques**	**Composés neutres**
Nbre total	79	55	108
Nbre d'organochlorés	37	53	90
Plus petit composé			
Nom	acide formique	guaiacol	méthanol
Poids moléculaire	46.03	124.15	32.04
Formule brute	CH_2O_2	$C_7H_8O_2$	CH_4O
Plus grand composé			
Nom	ac. ichlorodehydroabietic	alc.trichlorodehydroconiferyl	heptachlorohexatriène
Poids moléculaire	370.32	281.52	321.24
Formule brute	$C_{20}H_{27}O_2Cl_2$	$C_{10}H_7O_3Cl_3$	C_6HCl_7

Parmi les composés organochlorés, les plus fréquemment rencontrés sont ceux de la famille des composés phénoliques, à savoir les chlorophénols et leurs dérivés chloroguaiacols et chlorocatechols. Ils proviennent soit de la conservation du bois (*e.g.* 2,4,6 trichlorophénol ; 2,3,4,6 tétrachlorophénol ; pentachlorophénol), soit sont formés lors du blanchiment (*e.g.* dichlorophénols ; 2,4,5 trichlorophénol ; polychloroguaiacols) de la pâte (Herve *et al.*, 1988).

Malgré le grand nombre de molécules connues et les efforts perpétuels pour identifier de nouvelles molécules (Lunde *et al.*, 1991 ; Sinkkonen *et al.*, 1994 ; Smith *et al.*, 1993, 1994 a, b, c), la grande majorité de la charge en organochlorés reste non identifié et seul 10 % des composés de faible poids moléculaire ont pu être identifiés à ce jour (Rintalla & Puhakka, 1994). La distribution de taille des molécules reste également mal connue. Ainsi, selon Kringstad & Lindström (1984), 70 à 95 % des organochlorés sont des dérivés chlorés de la lignine et d'autres composés aliphatiques, de haut poids moléculaire, mais de plus récents travaux (Jokela & Salkinoja-Salonen, 1992), montrent qu'au contraire, 85 à 95 % ont un poids moléculaire inférieur à 1000 $gmol^{-1}$.

Depuis quelques années l'existence de PCDDs (Poly Chlorinated Dibenzo-p-Dioxins) et de PCDFs (Poly Chlorinated Dibenzo Furanes), plus connus sous le nom global de dioxines, a été montrée dans les effluents d'usines de pâte à papier (figure 1.9). Leur présence ne serait pas seulement dûe aux dépôts atmosphériques, mais également, et pour la plus grande partie, à une synthèse à partir de pentachlorophénol ou d'autres fongicides chlorés présents dans le bois (Luthe, 1996).

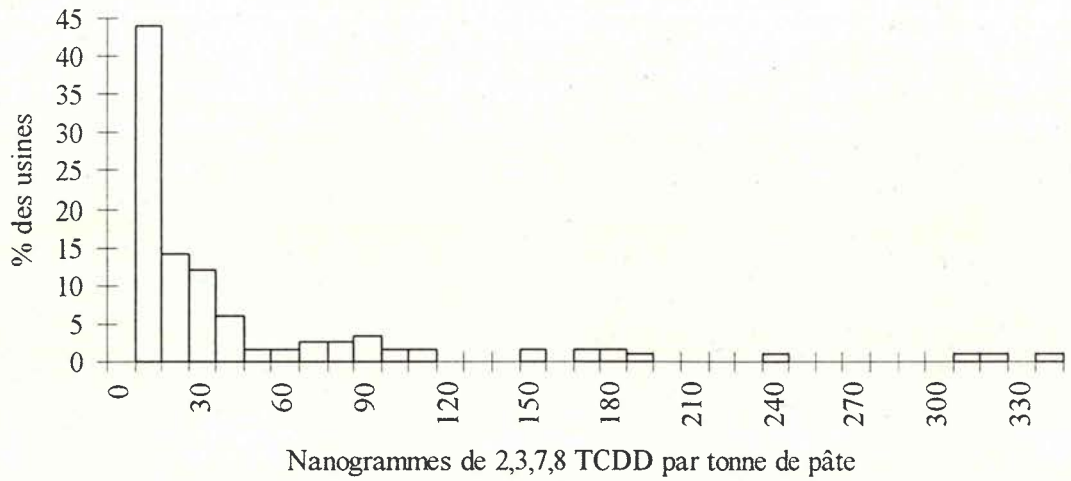


Figure 1.9 : Concentrations en 2,3,7,8 TCDD (en nanogrammes par tonne de pâte à papier) générées lors du blanchiment de la pâte à papier (Smith & Sprague, 1992).

A coté des pollutions « classiques » par les organochlorés, l'industrie du papier et de la pâte à papier rejette de grandes quantités d'éléments nutritifs pouvant être à la base de problèmes d'eutrophisation dans les milieux aquatiques récepteurs. Ainsi la contribution de l'industrie papetière finlandaise et suédoise à la charge totale de phosphore et d'azote dans le golfe de Bothnie est respectivement de 3 % et de 1 %, soit 270 et 2300 tonnes par an (Enell & Haglind, 1994).

I.3. Effets des rejets des usine de pâte à papier sur l'écosystème aquatique

I.3.1. Effets sur la flore aquatique

Les quelques travaux réalisés pour montrer les effets des effluents d'usine de pâte à papier sur la flore aquatique ont permis de mettre en évidence une réduction importante, pouvant aller jusqu'à une inhibition totale, de la production primaire (Stockner & Cliff, 1976 ; Moore & Love, 1977). Selon ces auteurs, la cause principale en serait la diminution de la luminosité dans l'eau, due à la couleur brune et à la turbidité engendrée par les fibres de celluloses présentes dans les effluents. D'importantes régressions de communautés végétales, essentiellement algales, ont été décrites par Kautsky *et al.* (1988) à proximité d'usines de pâte à papier, où la transparence de l'eau dépasse rarement 10 cm. Les biomasses végétales, normalement réparties sur une profondeur allant jusqu'à 8 mètres, y passent de plus de 200 g de poids sec par m^2 (station de référence), à moins de 5 g de poids sec par m^2 répartis sur les premiers mètres de profondeur (Kautsky, 1992). Le nombre de taxons y est également fortement réduit et dominé par une espèce d'algue verte, *Cladophora aegagrophila*. Les algues brunes marines, et plus spécifiquement *Fucus vesiculosus*, semblent être particulièrement sensibles à ce type d'effluents. Ainsi, dans les années 80 cette algue a totalement disparu sur une aire de 12 Km^2 dans la mer Baltique, où elle est normalement abondante, à proximité d'une usine de pâte à papier rejetant entre autre du chlorate à une concentration moyenne de 53 $mg.l^{-1}$ (Lehtinen *et al.*, 1988). Le chlorate (ClO_3), très utilisé comme herbicide dans les années 30 à 50, est également un sous produit généré lors du blanchiment de la pâte à papier par le dioxyde de chlore ClO_2. Des études menées en Suède ont montré qu'après 6 mois d'exposition à des concentrations de chlorate variant de 20 à 288 $\mu g.l^{-1}$, le biovolume de *F. vesiculosus* diminue fortement (figure 1.10), avec une EC_{50} (concentration à laquelle le biovolume a diminué de 50 % par rapport aux témoins) moyenne de l'ordre de 80 $\mu g.l^{-1}$ (Rosemarin *et al.*, 1994).

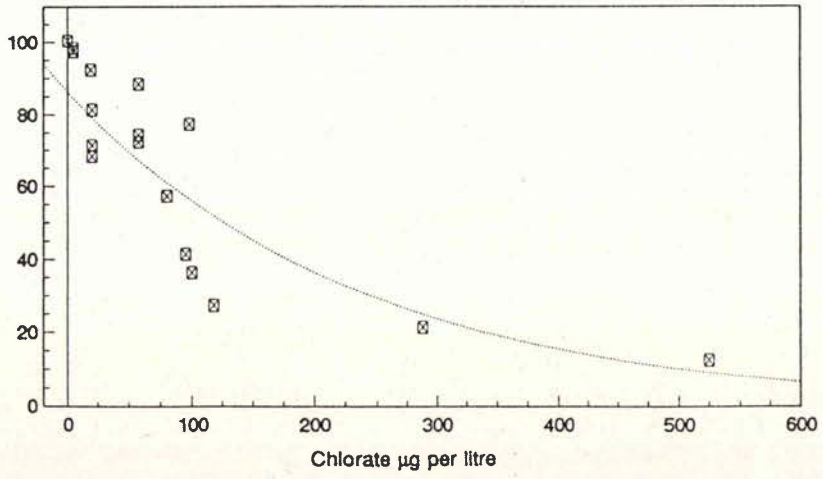


Figure 1.10 : Volume de *F. vesiculosus* (pourcentage par rapport au témoin) en fonction de la concentration de chlorate après 6 mois d'exposition (Rosemarin *et al.*, 1994).

Chez cette espèce, les premiers signes de toxicité sont le ralentissement de la croissance apicale qui est déjà significative à des concentrations inférieures à 20 $\mu g.l^{-1}$ (figure 1.11). Cependant, selon Aberg (1947 *in* Rosemarin *et al.*, 1994), le chlorate en soi ne serait pas toxique pour les plantes, mais en tant qu'analogue du nitrate, le deviendrait par réduction en chlorite grâce à la nitrate réductase.

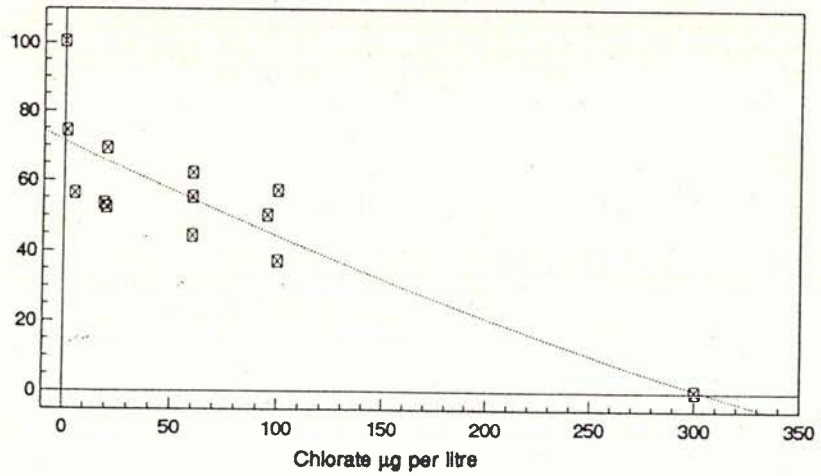


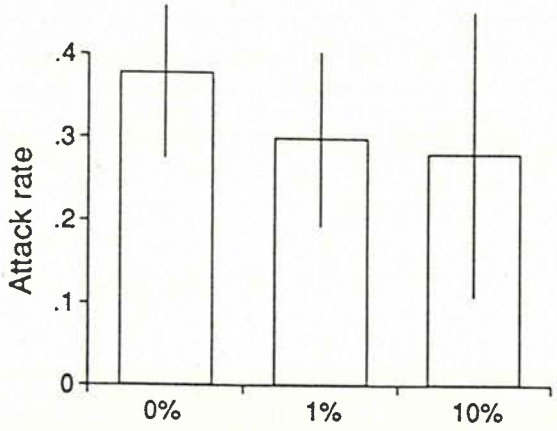
Figure 1.11 : Croissance apicale de *F. vesiculosus* (pourcentage par rapport au témoin) en fonction de la concentration de chlorate après 6 mois d'exposition (Rosemarin *et al.*, 1994).

L'effet négatif observé chez *F. vesiculosus*, et plus particulièrement chez tous les phaeophytes ne se retrouve pas chez d'autres familles d'algues, qui sont soit indifférentes (rhodophytes), soit stimulées dans leur croissance (certains cyanophytes et certains chlorophytes) par le chlorate (Rosemarin *et al.*, 1994).

I.3.2 Effets sur les invertébrés aquatiques

Les invertébrés aquatiques des cours d'eau vivent, pour la plupart d'entre eux, à l'interface eau-sédiment et sont ainsi exposés à la fois aux polluants de l'eau environnante et à ceux accumulés dans les sédiments. Dans le cas d'effluents aussi complexes que ceux d'usines de pâte à papier blanchissant au chlore, il est souvent difficile de mettre en évidence le ou les facteurs responsables du déséquilibre de l'écosystème. Kautsky *et al.* (1988) constatent une forte diminution des populations benthiques (en diversité et en densité) à proximité de tels effluents, qu'ils expliquent de deux façons. Les grandes quantités de matières organiques (cellulose, lignines) présentes dans les effluents sont dégradées par des bactéries dont les densités sont fortement augmentées par les apports d'éléments nutritifs, entraînant ainsi un important déficit en oxygène dissous à proximité du sédiment. D'autre part, ces matières organiques accumulées sur le fond colmatent les interstices du sédiment, détruisant les habitats de la faune benthique (Vogel & Chovanec, 1989) et empêchant la fixation de végétaux (cf. § 3.1.) servant également d'habitat à certains invertébrés (Kautsky, 1992). Selon Mayack &

Waterhouse (1983), les espèces principalement touchées sont surtout les trichoptères filtreurs et les éphémères brouteurs. De plus, les concentrations plus ou moins importantes en composés organo-halogénés ont des effets négatifs sur les invertébrés. Des études de laboratoire ont montré que chez le crustacé isopode prédateur, *Saduria entomon*, l'exposition durant 24 heures à différentes concentrations d'effluent ([AOX] de 0 à 10400 µg $Cl.l^{-1}$) se traduit par une diminution du taux d'attaques et du nombre de proies consommées (figure 1.12), parallèlement à une augmentation de la mortalité (Leonardsson, 1993).



Effluent à 100 % :
Chlorate : 51 $mg.l^{-1}$
DCO : 1470 $mg.l^{-1}$
AOX : 26 mg $Cl.l^{-1}$

Figure 1.12 : Taux d'attaques de *S. entomon* en fonction des concentrations d'effluent d'une usine de pâte à papier (Leonardsson, 1993).

Chez le crustacé, *Monoporeia affinis*, l'activité natatoire est fortement réduite (figure 1.13) lorsque celui-ci est exposé en laboratoire à des concentrations en AOX de 656 µg.l^{-1} (Kankaanpää *et al.*, 1995). Dans cette étude, le faible taux de mortalité observé durant les 40 jours d'exposition ne peut pas être affecté aux effluents de pâte à papier.

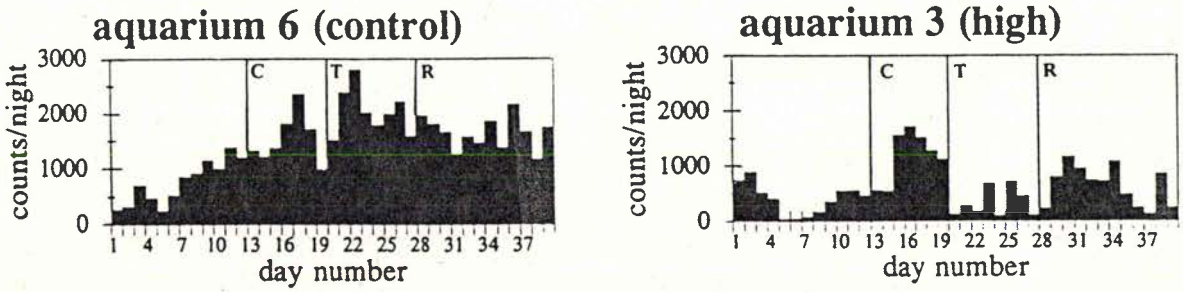


Figure 1.13 : Activité natatoire de *M. affinis* témoin et exposé à une concentration de 656 µg $Cl.l^{-1}$ d'AOX (Kankaanpää *et al.*, 1995).

En fait, la toxicité aiguë des effluents d'usines de pâte à papier blanchissant au chlore et la relation entre toxicité et concentrations en AOX et EOX, varient pour chaque espèce ; selon Craig *et al.* (1990), il n'existe pas de corrélation directe. Des tests de génotoxicité en laboratoire ont montré que le taux d'anormalités nucléaires, exprimées par le micronucleus, augmente d'un facteur de 2.3 et

2.6 chez des moules, *Mytilus edulis*, exposées durant 14 jours à des concentrations en AOX de respectivement 30 et 150 $\mu g.l^{-1}$ (Wrisberg & van der Gaag, 1992). Dans une étude en microcosme, Sudelin (1988) observe une forte augmentation du nombre d'oeufs malformés et une diminution du taux d'éclosion et de survie du crustacé *Pontoporeia affinis*, ainsi qu'une augmentation de la mortalité et des déformations valvaires chez le bivalve *Macoma balthica*. Chez le bivalve *Anodonta anatina*, exposé durant 4 mois, les effluents d'usines de pâte à papier blanchissant au chlore ne semblent pas présenter de toxicité puisque la mortalité (inférieure à 10 %) n'est pas plus élevée à l'aval qu'à l'amont des rejets (Mäkelä *et al.*, 1992). Bien au contraire, l'augmentation des éléments nutritifs et des bactéries provenant de la station d'épuration ont un effet positif sur la croissance et la prise de poids de ces bivalves. Ainsi, l'exposition de *A. anatina* à 20 $\mu g.l^{-1}$ de 2,4,6 trichlorophénol n'affecte pas son activité de filtration, mais le temps d'ouverture des valves augmente en présence d'acides humiques ou d'algues vertes, telles que *Selenastrum capricornutum* (Englund & Heino, 1996)

I.3.3. Effets sur les poissons

Comme dans beaucoup d'autres domaines de l'écotoxicologie, les poissons sont certainement les organismes aquatiques les plus étudiés dans le cadre des émissions d'Effluents d'usines de Pâte à papier Kraft Blanchissant au chlore (EPKB).

Les populations de poissons diminuent fortement, aussi bien en densité qu'en diversité, à proximité des rejets d'usines de pâte à papier (figures 1.14). Ainsi, dans le lac Päijänne (Finlande) le nombre de corégones, *Coregonus albula* et *C. lavaretus*, passe de 5.34 individus par m^2 (site de référence) à moins de 0.1 individus par m^2 (Hakkari & Bagge, 1992), et le nombre d'espèces de poissons de 9 à 5 (Bagge & Hakkari, 1992) à proximité de tels effluents.

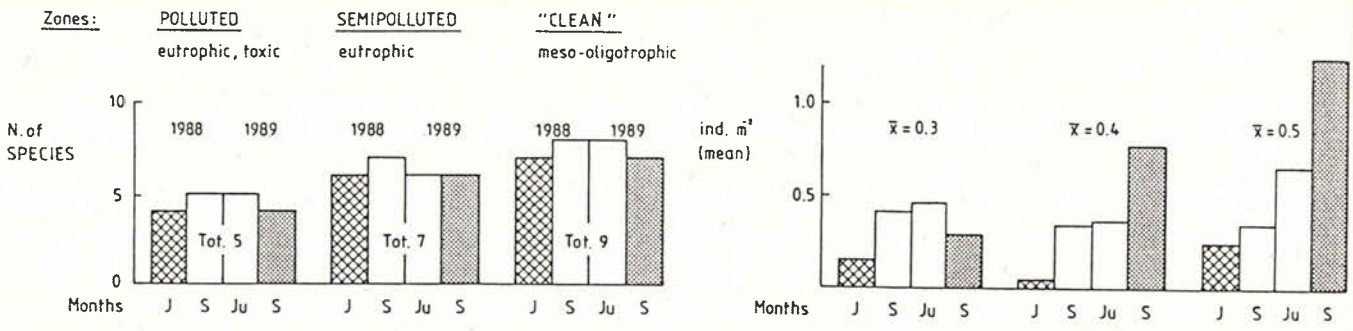


Figure 1.14 : Diversité et densités de poissons dans une zone soumise aux effluents d'une usine de pâte à papier (Bagge & Hakkari, 1992).

Cependant, certaines espèces semblent être plus résistantes que d'autres aux EPKB. Dans le golfe de Bothnie le nombre d'espèces passe de 20 à 11 au fur et à mesure que la distance aux points

de rejets de EPKB diminue, et la densité de perches, normalement abondantes dans ce milieu, diminue rapidement alors que celle des gardons augmente. Cette espèce, plus tolérante vis-à-vis des composés organo-halogénés (Jeney *et al.*, 1996) profite de l'eutrophisation engendrée par les rejets, au détriment de la perche.

Depuis quelques années, le nombre de travaux concernant les malformations de poissons exposés aux effluents d'usines de pâte à papier blanchissant au chlore a fortement augmenté, notamment au Canada et en Finlande. De nombreuses espèces de poissons présentent des déformations squelettiques ou morphologiques du crâne, de la colonne vertébrale ou des opercules. Cependant, dans les populations naturelles le nombre de ces malformations est très faible et ne dépasse généralement pas 1 à 3 % (Lindesjöö & Thulin, 1992).

L'exposition chronique de *Myoxocephalus quadricornis* aux effluents d'une usine de pâte à papier se traduit par des déformations sévères de la colonne vertébrale (Bengtsson, 1988). Lindesjöö & Thulin (1992), observent des déformations squelettiques du crâne de brochet, touchant essentiellement la partie antérieure du parasphénoïde ainsi que les os frontaux, et se traduisant par une incurvation de la mâchoire vers le haut. Selon les auteurs, ces malformations, dont 35 % de la population sont victimes, seraient en partie dues aux composés organo-halogénés présents dans les effluents, mais également à un déficit de la concentration en oxygène dissous. 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 de raccourcissement de la partie distale (Lindesjöö *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 déformations squelettiques est la carence en acide ascorbique, essentiel à la formation du collagène. Cependant, chez de nombreux organismes, la vitamine C intervient également en tant que co-facteur de 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 à proximité de tels rejets (Lindesjöö & Thulin, 1990). Barker *et al.* (1994 a, b) observent la même pathologie chez *Pleuronectus americanus* et *Myxocephalus* spp.. Selon, les auteurs, ces poissons benthiques sont exposés chroniquement aux organo-halogénés accumulés dans les sédiments, expliquant ainsi les nécroses observées même après un changement drastique du traitement des effluents.

Plus de 20 % des corégones, *Coregonus clupeaformis*, du lac Supérieur, exposés aux EPKB présentent des entailles sur les flancs, pénétrant profondément la cavité corporelle des poissons (Munkittrick *et al.*, 1992).

D'un point de vue physiologique et biochimique, des poissons exposés aux EPKB se caractérisent généralement par une inhibition de la croissance des gonades, une hypertrophie du foie, une induction importante des enzymes de détoxification, un déréglement métabolique général et une altération du système immunitaire (NSEPB, 1989). Toutes ces manifestations sont plus ou moins liées entre elles, en réponse à la présence de xénobiotiques dans le milieu environnant. L'augmentation de la taille du foie (Hodson *et al.*, 1992 ; Munkittrick *et al.*, 1992, 1994) est liée à l'activité de détoxification des xénobiotiques, qui se traduit notamment par une augmentation de l'activité EROD-P 450 dépendante (Gagnon *et al.*, 1994, 1995 ; Munkittrick *et al.*, 1994 ; Servizi *et al.*, 1993), ainsi que par l'augmentation de la concentration du co-facteur de détoxification (acide ascorbique, cf. ci-dessus) dans le foie (Larsson *et al.*, 1988). Cependant, l'induction par les substances lipophiles (*e.g.* organo-halogénés) entraîne aussi la formation de métabolites électrophiles et de substances carcinogènes, pouvant être biologiquement plus actif que les substances d'origine (NSEPB, 1989). De plus, l'induction de la détoxification entraîne un dérèglement du métabolisme des substances endogènes, telles que les hormones stéroïdiennes qui sont un substrat naturel pour ces enzymes (Payne *et al.* 1987, *in* Munkittrick *et al.*, 1991). La diminution d'hormones sexuelles telles que la testostérone, la 11, kéto-testostérone ou le 17, bêta oestradiol, entraîne un ralentissement de la maturation des gonades et se traduit par une hypotrophie des gonades (Munkittrick *et al.*, 1991 ; Hodson *et al.*, 1992), un âge de maturation sexuelle plus avancé (Munkittrick *et al.*, 1992 ; Gagnon *et al.*, 1995) et une diminution des performances reproductives telles qu'une diminution de la mobilité des spermatozoïdes et une croissance post-éclosion plus lente (McMaster *et al.*, 1992). Le dérèglement de l'équilibre hormonal entraîne également des changements métaboliques, tels que l'hyperglycémie sanguine, l'hyperlactémie sanguine ou la synthèse de protéines par le reticulum endoplasmique du foie (Jeney *et al.*, 1996). L'augmentation du nombre de globules rouges (Larsson *et al.*, 1988) est due à une stimulation de la production de cellules sanguines afin de pouvoir subvenir aux besoins croissants en oxygène, nécessaire à la détoxification. La diminution du nombre de lymphocytes et des immunoglobulines (Jokinen *et al.*, 1995) est également une réaction secondaire suite au dérèglement général du système hormonal et traduit une détérioration du système immunitaire, pouvant en partie expliquer la forte fréquence de signes pathologiques. Le tableau 1.9 récapitule les principaux changements physiologiques et biochimiques observés dans le cas de la perche, *Perca fluviatilis*, dans le golfe de Bothnie, à proximité de rejets de EPKB.

Tableau 1.9 : Changements physiologiques chez la perche, *Perca fluviatilis*, exposée aux effluents d'une usine de pâte à papier. Le + ou le - indiquent une augmentation ou une diminution significative par rapport à des individus non exposés. 0 indique une absence de changement et ( ) un changement non significatif (Andersson *et al.*, 1987).

	Distance au rejet de l'usine de pâte à papier blanchissant au chlore		
	2 Km	4.5 Km	8 Km
Facteur de dilution	166 x	330 x	1040 x
Taille des gonades	- - -	- - -	- - -
Taille du foie	+ +	+ +	+ +
Activité EROD	+ + +	+ + +	+ +
Acide ascorbique	+ +	+ +	(+)
Glycogène du foie	(+)	+ +	+ + +
Glycogène des muscles	0	0	0
Glucose du sang	+ + +	+ + +	+ +
Lactate du sang	+ +	0	+ +
Chlorures du plasma	- - -	- - -	0
Potassium du plasma	(+)	0	0
Calcium du plasma	+	0	0
Magnésium du plasma	+	+ +	+
Hématies	+ + +	+ +	+ +
Hématocrite	+ +	+	+
Hémoglobine	+ +	0	+
Lymphocytes	- - -	- - -	- - -

Il est à préciser que l'amplitude des effets sur la dynamique des populations, la morphologie, la physiologie et la biochimie des poissons varie en fonction des espèces considérées, sachant que certaines sont plus sensibles aux EPKB que d'autres. D'autre part, en raison de la complexité des effluents, il est difficile d'attribuer un effet spécifique à un paramètre, une molécule ou une famille de molécules précises. Mais la faible fréquence, voire l'absence, de la majorité de ces pathologies chez des poissons exposés au laboratoire, ou *in situ* à des effluents d'usines de pâte à papier ne blanchissant pas au chlore, tend à confirmer l'hypothèse d'une action principalement due aux composés organo-halogénés, et principalement organo-chlorés.

I.3.4. Effets sur les mammifères

Malgré leur position importante dans la chaîne trophique en tant que prédateur ou consommateur de haut niveau, peu de travaux ont actuellement été faits sur les mammifères. A la fin des années 50, une étude réalisée sur des bovins exposés durant 8 mois, via l'eau d'alimentation, aux effluents d'une usine de pâte à papier blanchissant au chlore, n'a pas permis de mettre en évidence d'effets sur la croissance et la gestation des adultes, ni sur la survie des veaux (McCormick, 1959 in Smits *et al.*, 1995). Des résultats similaires ont été observés en laboratoire sur le vison, *Mustela vison*, exposé à de tels effluents via l'eau d'alimentation et la nourriture (poissons) provenant de sites contaminés (Smits *et al.*, 1995). Les seules manifestations constatées chez les visons exposés sont un agrandissement de la taille du foie, révélant une activité de détoxification accrue, confirmée par une augmentation d'un facteur de 1.8 à 2.0 de l'activité EROD hépatique, et une altération du système immunitaire se traduisant par une augmenation du nombre d'anticorps circulants (Smits *et al.*, 1996). Dans une étude sur la santé humaine, Law & Gudaitis (1994), montrent que le risque de cancer augmente significativement chez des personnes ayant une consommation moyenne quotidienne de 15 grammes de poissons issus de cours d'eau recevant les effluents d'une usine de pâte à papier. Ce risque (2.4 pour 1000 habitants) est calculé en fonction des concentrations de dioxines et de furanes mesurés dans les poissons. La quantité de TCDD-TEQ (quantité équivalente toxique de 2,3,7,8 tétrachlorodibenzo-p-dioxine) augmente essentiellement chez les jeunes enfants (figure 1.15) et dépasse souvent la TDI (consommation journalière tolérable).

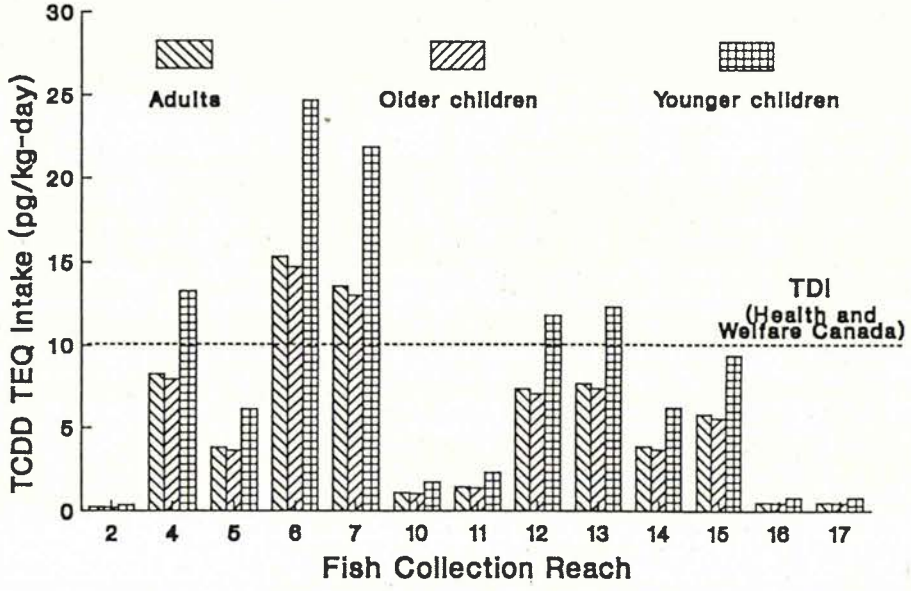


Figure 1.15 : Consommation journalière de TCDD-TEQ chez des personnes consommant du poisson contaminé (Law & Gudaitis, 1994).

I.4. Accumulation de composés organo-halogénés dans l'écosystème aquatique

I.4.1. Physico-chimie des organo-halogénés

Afin de comprendre le comportement et le devenir des composés organo-halogénés dans le milieu aquatique, il est indispensable de connaître certaines de leurs propriétés physico-chimiques. Parmi celles-ci on s'intéressera plus particulièrement à leur constante d'équilibre (Ka), leur coefficient de solubilité dans l'eau (Cs) et leur coefficient de partage n-octanol-eau (Kow), qui donnent des informations sur la forme (ionique ou non), la solubilité aqueuse et la liposolubilité des composés considérés (Suntio *et al.*, 1988).

La solubilité des composés organo-halogénés dans l'eau diminue fortement lorsque le poids moléculaire et le nombre d'atomes d'halogènes substitués augmente (figure 1.16a), passant de 86300 $mg.l^{-1}$ pour l'acide dichloroacétique, à environ 10 $mg.l^{-1}$, voir 0.004 $mg.l^{-1}$, respectivement pour le pentachlorophénol et l'hexachlorobenzène. D'autre part, la solubilité des composés organo-halogénés est fonction de différents groupements chimiques des molécules, tels que les groupements hydroxyles.

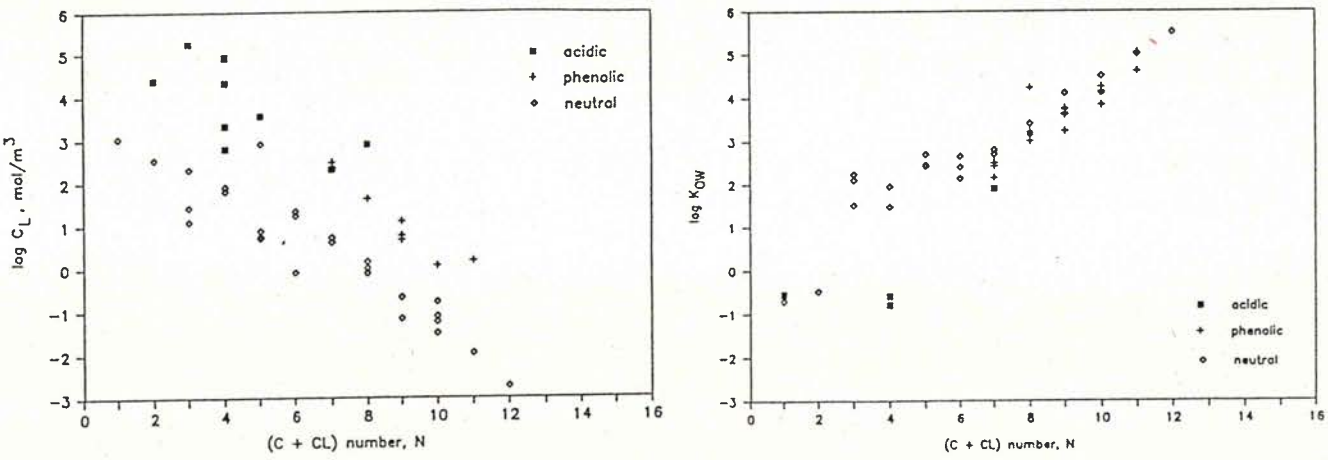


Figure 1.16 : **a**, solubilité aqueuse ; **b**, coefficient de partage, en fonction de N (Nombre d'atomes de carbone + nombre d'atomes de chlore dans la molécule).

Contrairement, le coefficient de partage n-octanol-eau (exprimé en Log(Kow)) augmente en même temps que le poids moléculaire et le degré de substitution par les halogènes (figure 1.16b), passant de 2.17 pour le chlorophénol à plus de 5 pour le pentachlorophénol et l'hexachlorobenzène.

Selon Berry (1992), les AOX de faible poids moléculaire (20% des AOX totaux) rencontrés dans les EPKB, peuvent être divisés en deux groupes : les molécules plutôt hydrophiles et les molécules plutôt lipophiles. Ces dernières, potentiellement bioaccumulables, peuvent être divisées

selon leur coefficient de partage, sachant que celles dont le Log(Kow) est supérieur à 3 sont fortement lipophiles et donc extrêmement bioaccumulables (figure 1.17). Parmi celles-ci on trouve essentiellement des composés phénoliques et leurs dérivés ayant un taux de substitution par le chlore supérieur à 2 (tri-, tétrachloro-phénols, -catéchols et -guaiacols, pentachlorophénol), ainsi que des composés neutres tels que les polychlorobenzènes. D'autre part, les différents isomères de PCDD (dibenzo-p-dioxines poly chlorés) et de PCDF (dibenzo furanes poly chlorés), ayant des Log(Kow) variant de 6 à 8 sont également très lipophiles et fortement bioaccumulables.

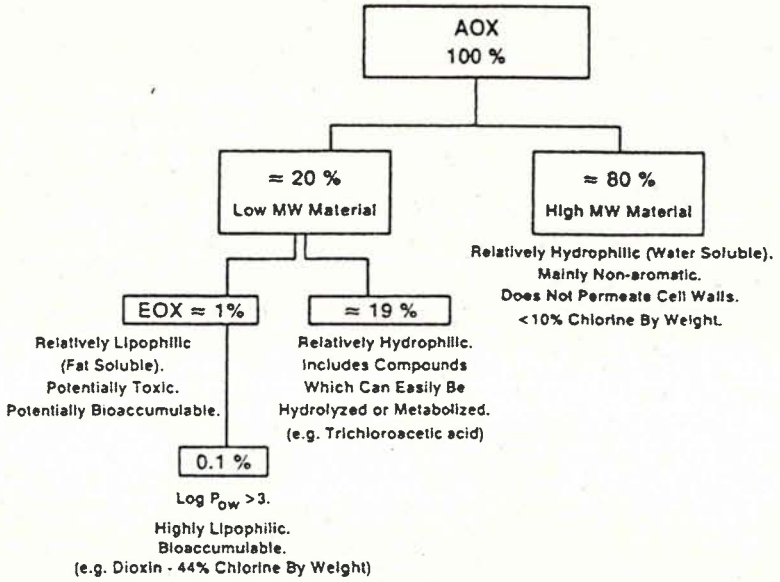


Figure 1.17 : Caractéristiques des AOX dans les EPKB en fonction de leur poids moléculaire et de leur lipophilie (Berry, 1992).

I.4.2. Accumulation des organo-halogénés sur les matières en suspension et dans les sédiments

Dans les eaux naturelles, les micropolluants organiques hydrophobes, dont notamment les composés organo-halogénés lipophiles, ont tendance à se fixer sur les substances humiques, constituants majeurs de la matière organique aussi bien dans la phase aqueuse que dans la phase solide. Selon Rav-Acha & Rebhun (1992), il existe cinq types d'interactions entre les micropolluants, les sorbants et les substances humiques (figure 1.18) :

- l'adsorption des micropolluants organiques sur les minéraux solides (1),
- l'adsorption des micropolluants sur les complexes minéraux-substances humiques (2),
- la liaison des micropolluants organiques avec les substances humiques (3),
- l'adsorption du complexe micropolluant organique-substance humique sur les minéraux solides (4),
- la solubilisation (désorption) du micropolluant par les substances humiques (5).

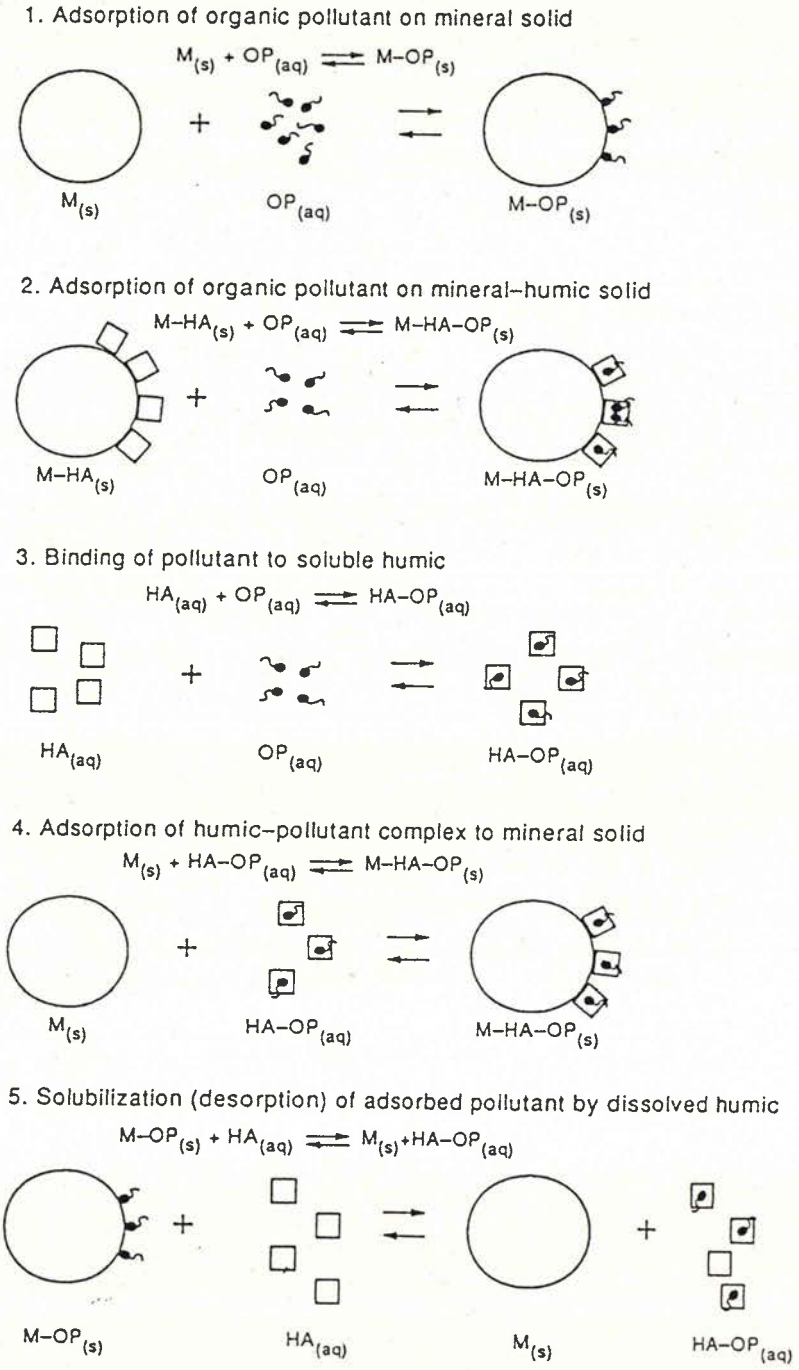


Figure 1.18 : Différentes interactions entre les micropolluants organiques et les substances humiques dans les phases aqueuses et solides (Rav-Acha & Rebhun, 1992).

La part relative de ces différentes interactions dépend de beaucoup de facteurs, tels que les concentrations en micropolluant et/ou en substances humiques, les propriétés physico-chimiques des micropolluants (solubilité, Kow), la température, le pH, etc...

Lors de la fabrication de la pâte à papier par le procédé kraft, des quantités importantes de lignines et de chlorolignines sont produites et rejetées dans le milieu aquatique. Ces macromolécules hydrophiles, de poids moléculaire supérieur à 1000 $g.mol^{-1}$ ont des caractéristiques chimiques

semblables aux composés humiques (Knuutinen *et al.*, 1988). Les nombreux groupements carboxyles et hydroxyles (Sagfors & Starck, 1988) permettant l'établissement de liaisons hydrophobes avec les micropolluants organiques, et là diminution de leurs concentrations dissoutes dans l'eau. Ainsi, parmi 23 composés phénoliques chlorés mesurés dans une rivière recevant des EPKB, seule la 6,chlorovanilline a pu être détectée dans la phase aqueuse, alors que 15 des composés sont présents dans les matières en suspension à des concentrations variant de 0.83 $\mu g.g^{-1}$ à 230 $\mu g.g^{-1}$ (Owens *et al.*, 1994). La 6,chlorovanilline, présente dans l'eau à une concentration de 0.031 $\mu g.l^{-1}$, se retrouve dans les matières en suspension à 32 $\mu g.g^{-1}$, soit avec un facteur de concentration de l'ordre de 1 000 000.

L'accumulation des composés organo-halogénés dans les sédiments se fait soit directement sur les substances humiques de celui-ci (comme pour les matières en suspension), soit par sédimentation des matières en suspension ayant fixé les organo-halogénés. Selon Owens *et al.* (1994), cette deuxième alternative est majoritaire en raison de la plus grande surface d'adsorption spécifique des matières en suspension dans l'eau. Dans le golfe de Bothnie, la sédimentation annuelle de composés organo-halogénés totaux à proximité des rejets d'EPKB dépasse 2000 mg par m^2, correspondant à une concentration moyenne dans les sédiments de l'ordre de 200 $\mu g.g^{-1}$ de poids sec (Palm & Lammi, 1995). L'accumulation directe des organo-halogénés dans les sédiments dépend de la nature de celui-ci, et plus particulièrement de sa teneur en matières organiques. Ainsi, à proximité de deux rejets d'EPKB semblables, les concentrations en organo-halogénés totaux sont de 340 $\mu g.g^{-1}$ de poids sec et de 9600 $\mu g.g^{-1}$ de poids sec, dans des sédiments ayant une teneur en matière organique de respectivement 8.3 % et 55.0 % (Maatela *et al.*, 1990). Comme pour la phase aqueuse, les chlorophénols liés dans les sédiments sont présents à des concentrations jusqu'à 1000 fois plus élevées que les chlorophénols libres (Palm & Lammi, 1995). Selon Särkkä *et al.* (1993), ceci peut en partie s'expliquer par une plus grande photo- et/ou bio- dégradation des molécules libres avant la sédimentation. La présence de chlorophénols typiquement produits lors de la fabrication de la pâte à papier blanchie au chlore (tels que les chloroguaiacols) dans des couches de sédiment datées de plus de 30 ans montre leur grande rémanence dans l'environnement, mais aussi de possibles migrations de ces molécules dans le sédiment (Palm & Lammi, 1995).

La fixation de composés organo-halogénés hydrophobes sur les matières en suspension est également responsable d'une large distribution géographique de ces dernières (Paasivirta *et al.*, 1990). Ainsi, dans le golfe de Finlande, les sédiments prélevés à plus de 30 Km des rejets d'EPKB contiennent encore des concentrations significatives d'organo-halogénés (Kankaanpää *et al.*, 1997). Ceci est d'autant plus vrai pour des molécules fortement lipophiles, telles que les dioxines, qui, absentes à l'amont, sont présentes à des concentrations supérieures à 800 $pg.g^{-1}$ de poids sec dans les sédiments à 30 Km à l'aval des rejets d'EPKB, et à des concentrations supérieures à 100 $pg.g^{-1}$ de poids sec à plus de 50 km (figure 1.19)

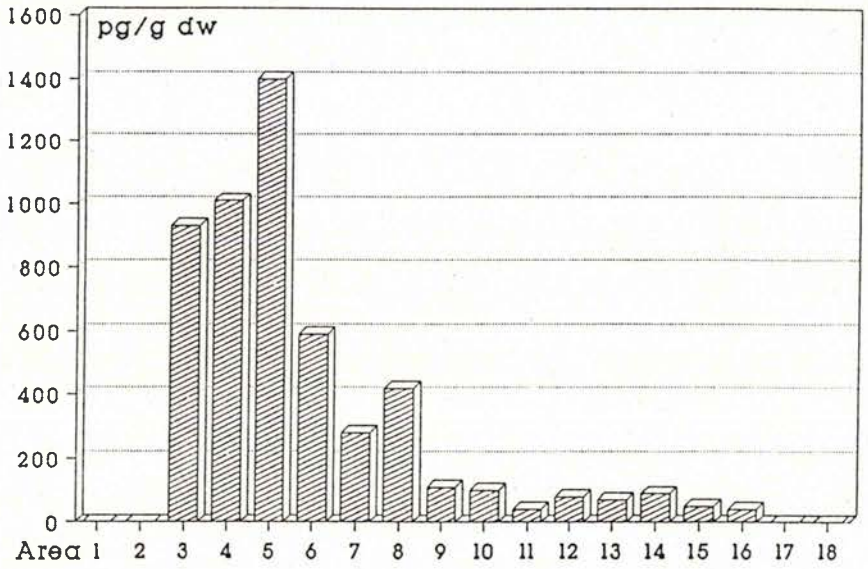


Figure 1.19 : Concentrations en TCDD (TétraChloroDibenzo-p-Dioxines) dans les sédiments à proximité d'EPKB. Area 1,2 : amont rejets ; Area 3-18 : aval rejets (Koistinen *et al.* 1990).

I.4.3. Accumulation de composés organo-halogénés dans les organismes aquatiques

Les voies biochimiques de l'absorption, de la détoxification et du relargage des micropolluants par les organismes aquatiques sont complexes et variées. Contrairement au cas des oligoéléments métalliques essentiels, pour lesquels l'organisme est constamment confronté à l'ambiguïté 'besoin physiologique - neutralisation de la toxicité' (Mersch, 1993), dans le cas des composés organo-halogénés, son rôle se limite à la détoxification et à l'élimination du xénobiotique.

L'accumulation de composés organo-halogénés par les organismes aquatiques peut se faire selon trois voies principales :

- par prise directe depuis le milieu environnant, essentiellement au niveau des branchies et/ou de la peau,
- par ingestion de particules ayant fixé des xénobiotiques (bioaccumulation ou bioconcentration),
- par l'intermédiaire de la chaîne alimentaire (biomagnification).

La part relative de ces trois voies d'accumulation dans les organismes varie selon les espèces, et dans tous les cas, le transfert des composés organo-halogénés du milieu extérieur vers le milieu intracellulaire des organismes dépend de nombreux facteurs biotiques et abiotiques, souvent dépendants les uns des autres.

L'accumulation de composés organo-halogénés ne se traduit pas toujours par des effets directes sur l'organisme, mais des réactions complexes peuvent en découler, constituant un risque potentiel pour la survie de l'espèce. Ainsi, même en l'absence de toxicité aiguë ou chronique, la bioaccumulation et la biomagnification de composés organo-halogénés doivent être considérés en tant que critères écotoxicologiques à part entière, étant donné que leurs effets peuvent n'être révélés que dans une phase ultérieure de la vie de l'organisme ou de la structure et de la dynamique des populations, des communautés, voire de l'écosystème (Figure 1.20).

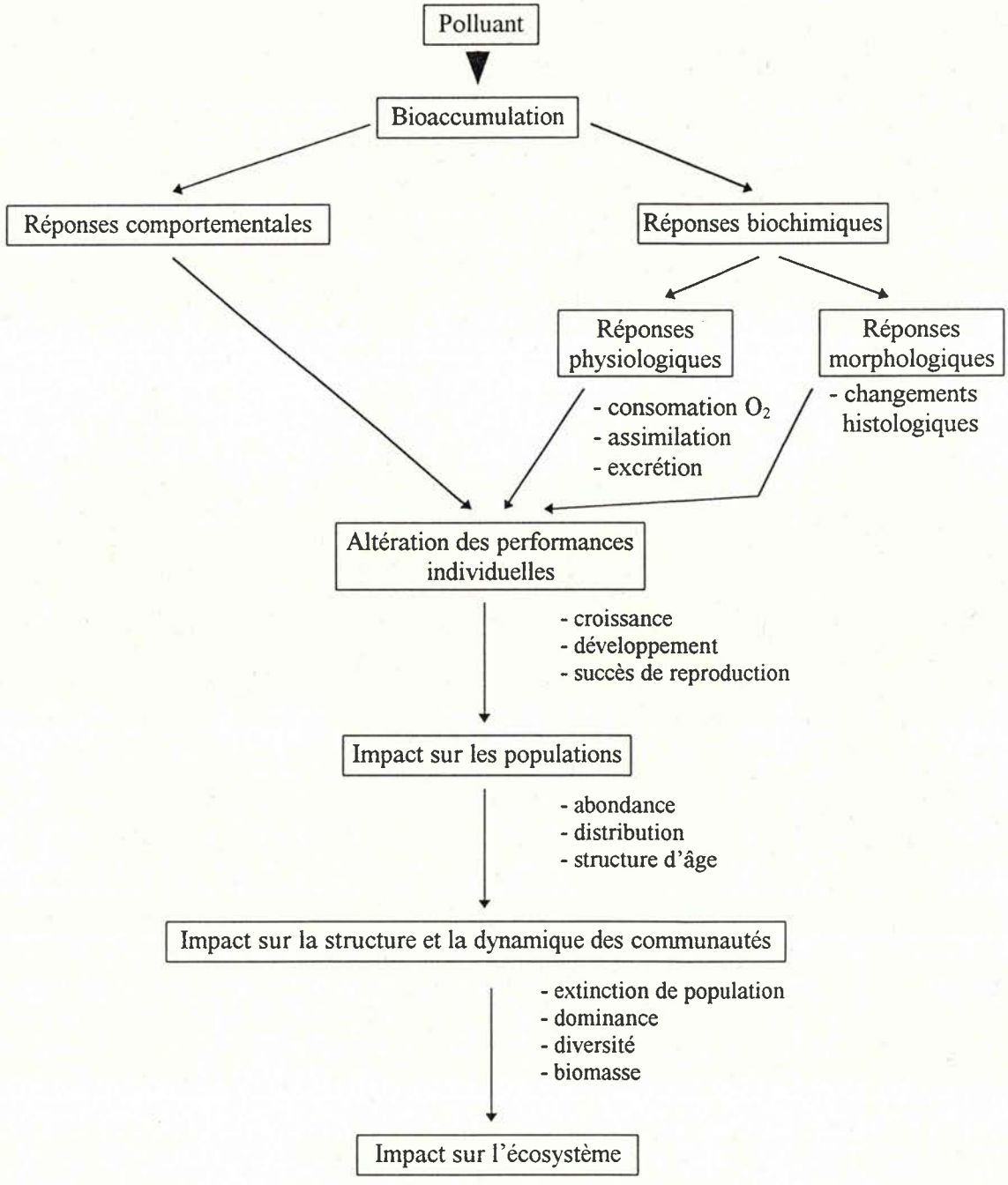


Figure 1.20 : Schéma général des modalités d'action d'un polluant sur un écosystème (Ramade, 1992).

En raison des grands efforts, aussi bien en temps qu'en moyens (entre autres le matériel biologique), nécessaires aux études de bioaccumulation, une méthode d'estimation de la probabilité de bioaccumulation à été mise au point, basée sur les propriétés physico-chimiques et structurales des micropolluants. De nos jours, le potentiel de bioaccumulation d'un composé organique, et plus particulièrement organo-halogéné, est estimé à l'aide du coefficient de partage n-octanol-eau, sous sa forme logarithmique, Log(Kow). De nombreux travaux ont en effet montré qu'il existait une bonne corrélation entre le coefficient de partage n-octanol-eau et le facteur de bioconcentration, FBC ([micropolluant] dans l'organisme / [micropolluant] dans l'eau), selon la relation :

$$\text{Log(FBC)} = a * \text{Log(Kow)} + b.$$

Selon Mackay (1982), dans les poissons cette relation peut s'écrire : FBC = 0.048 * Kow, soit Log(FBC) = Log(Kow) - 1.320. Ainsi, plus le coefficient de partage n-octanol-eau d'un composé organo-halogéné est élevé, plus sa probabilité d'être bioaccumulé est élevée. Veith *et al.* (1979, *in* Ramade, 1982), ont montré une relation hautement significative entre ces deux paramètres dans l'étude d'accumulation de différentes substances hydrophobes par trois espèces de poissons d'eau douce (Figure 1.21).

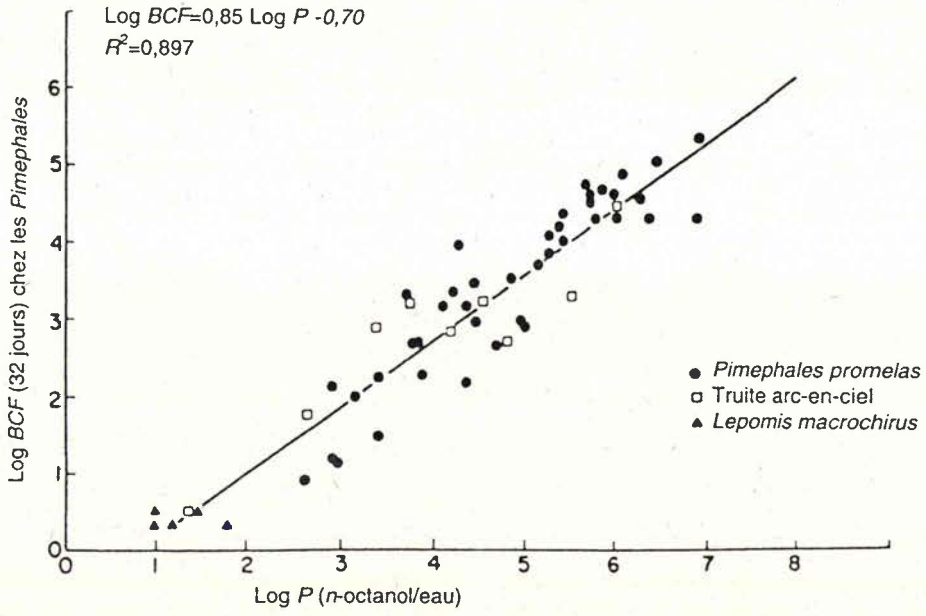


Figure 1.21 : Corrélation entre le facteur de bioconcentration (Log BCF) et le coefficient de partage n-octanol-eau (Log P) chez trois espèces de poissons d'eau douce (Veith *et al.*, 1979, *in* Ramade, 1992).

Il est généralement admis que les composés ayant un Log(Kow) supérieur ou égal à 3, sont potentiellement bioaccumulables, même si cette valeur limite peut être plus faible chez des composés

(tels que certains pesticides), présentant une tension de surface inférieure ou égale à 50 $nM.m^{-1}$ à une concentration inférieure ou égale à 1 $g.l^{-1}$ (Franke *et al.*, 1994). De plus certains composés, tels que les phyréthroïdes insecticides, ayant un Log(Kow) supérieur ou égal à 3, présentent un potentiel de bioaccumulation faible, en raison de leur caractère fortement hydrolysable et biodégradable.

Si cette approche permet d'avoir une première idée sur le potentiel de bioaccumulation des micropolluants, elle ne reflète pas forcément les phénomènes complexes ayant lieu dans le milieu aquatique *in situ*. En effet, elle stipule comme hypothèses que les composés étudiés sont hydrophobes, peuvent diffuser librement à travers les membranes cellulaires, et ne s'accumulent que dans la fraction lipidique de l'organisme (simulé par la phase n-octanol), sans tenir compte des nombreux facteurs intrinsèques et extrinsèques pouvant influencer la bioaccumulation de composés organo-halogénés. En raison de leurs fortes interdépendances, ces deux types de facteurs sont difficilement séparables, car les variations chez les uns entraînent souvent des variations chez les autres.

Parmi les facteurs intrinsèques, les lipides jouent un rôle fondamental dans la bioaccumulation de composés organo-halogénés, qui en raison de leur caractère hydrophobe et lipophile, s'y accumulent préférentiellement. Après les protéines, les lipides sont le deuxième plus grand constituant biochimique de l'organisme, et beaucoup de paramètres influencent aussi bien leur quantité totale que leur nature, et par ce biais l'accumulation de composés organo-halogénés (Phillips, 1980). La quantité totale de lipides varie avec la saison, liée à la température de l'eau, au régime alimentaire et au cycle sexuel des organismes aquatiques. En effet, elle augmente en général durant le développement de gonades, puis diminue après l'émission des gamètes. Pour cette même raison, la quantité totale de lipides augmente en général avec l'âge des organismes, et la taille relative des gonades. Chez le brochet, *Esox lucius*, l'accumulation de composés organo-halogénés est directement liée à ces variations de lipides, et Larsson *et al.* (1993) observent les plus fortes concentrations en PCB, DDT et HCH dans des individus avant leur ponte. De grandes différences de lipides totaux sont observées entre les organes d'une même espèce, et Schell *et al.* (1993), ont montré qu'il existait une forte corrélation entre les concentrations en TCDD et le contenu en lipides des organes de différentes espèces de poissons exposés aux effluents d'une usine de pâte à papier blanchissant au chlore. Ainsi, les gonades de *Amia calva*, ayant un pourcentage de lipides de 13.7%, contiennent 3 fois plus de TCDD (46.1 $ng.g^{-1}$) que le foie (18.6 $ng.g^{-1}$), dont le pourcentage de lipides n'est que de 6.1%. En plus de la quantité totale de lipides, leur composition spécifique peut varier avec l'âge, la température de l'eau et l'espèce. Ainsi, les poissons d'eau douce ont généralement des acides gras insaturés courts, tels que 18:2, 18:3 ou 18:4, alors que les poissons marins présentent une grande majorité de chaînes longues, telles que 20:5 et 22:6 (Phillips, 1980). Boryslawskyj *et al.* (1988), ont montré que chez le bivalve *Sphaerium corneum*, une diminution de la

température dans l'eau des bacs d'exposition entraîne une augmentation de la part relative des chaînes polyinsaturées, aussi bien dans les phospholipides que dans les lipides neutres.

Les facteurs extrinsèques, tels que les propriétés physico-chimiques (Kow), ont une influence majeure sur la biodisponibilité et ainsi sur les voies d'accumulation des composés organo-halogénés vis-à-vis des organismes aquatiques. En effet, selon que les composés organo-halogénés sont sous forme dissoute ou sous forme associée à des particules, les mécanismes d'accumulation ne sont pas les mêmes. Lorsque la concentration en particules dissoutes dans l'eau est faible, la voie principale d'accumulation est par les branchies, c'est-à-dire par filtration et assimilation directe des composés organo-halogénés dissous (Björk, 1995). Cependant, en raison du caractère hydrophobe des composés organo-halogénés (cf § I.4.2) et des fortes concentrations en matières en suspension dans les effluents d'usines de pâte à papier (cf § I.2.2.3), ceux ci se trouvent en majorité sous forme particulaire, associés aux lignines et aux autres matières en suspension (Kukkonen, 1992). Ainsi, selon Owens *et al.* (1994), la bioaccumulation et la biomagnification de composés organo-halogénés, issus du blanchiment de la pâte à papier par le chlore, dans la chaîne alimentaire se font principalement de manière active à partir des composés associés aux matières en suspension, et peu de manière passive à partir des composés dissous dans la colonne d'eau (Figure 1.22).

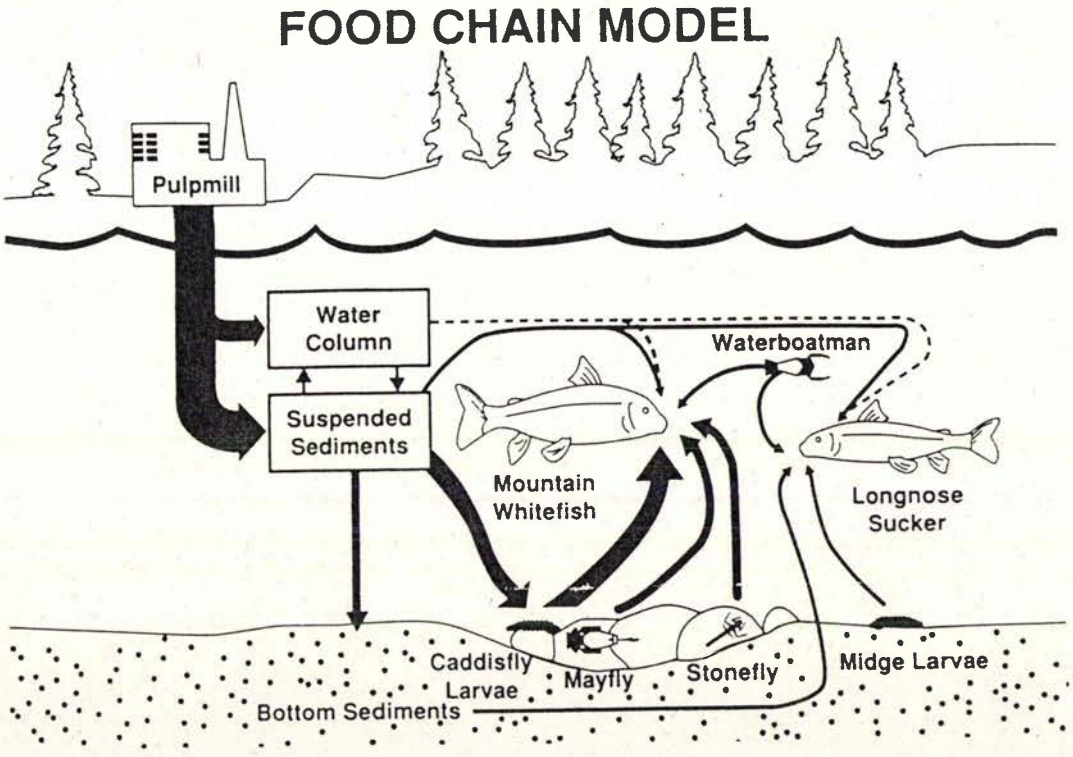


Figure 1.22 : Modèle de bioaccumulation et de biomagnification du 2,3,7,8-TCDDioxine et du 2,3,7,8-TCDFurane dans une chaîne alimentaire à l'aval des rejets d'une usine de pâte à papier (Owens *et al.*, 1994).

Ceci est également observé par Herve *et al.* (1991) qui comparent l'accumulation de composés organo-halogénés, présents dans les EPKB, entre le bivalve *Anodonta piscinalis* et une membrane de dialyse contenant du n-hexane, simulant la fraction lipidique de l'organisme. Après quatre semaines d'incubation, les concentrations en différents chlorophénols et dérivés (guaiacols et catéchols) sont 40 à 140 fois plus élevées dans les anodontes que dans les membranes, indiquant que l'accumulation de ces composés se fait préférentiellement par voie active, via l'ingestion de particules contaminées, que par voie passive, via diffusion à travers les membranes.

I.5. Utilisation des paramètres de groupe pour la quantification des composés organo-halogénés dans l'environnement

I.5.1. Généralités

La complexité et la nature très variable des composés organo-halogénés présents dans le milieu aquatique, qu'il soit ou non sujet aux rejets industriels et/ou urbains, ont été vues dans la première partie de l'analyse bibliographique. Afin de pallier les problèmes analytiques de l'identification et de la quantification individuelle des composés de cette famille chimique, dont la majorité sont présents à de très faibles concentrations, plusieurs paramètres de groupes ont été élaborés.

La première approche de détermination des composés organo-halogénés totaux dans l'eau est la méthode du chlore organique total (TOCl, Total Organically bound Chlorine), développée au début des années 70 par Kühn et Sontheimer (1973, 1975) à l'institut Engler-Bunte de l'université de Karslruhe (Allemagne). Dans cette méthode, 1 gramme de charbon actif est ajouté à 10 litres d'eau, puis mis à agiter pendant 1 heure. Après séparation et récupération du charbon actif par floculation, sédimentation et filtration, l'eau est récupérée et l'adsorption est renouvelée. Le charbon actif est pyrolysé de façon à transformer les molécules organo-chlorées en acide chlorhydrique. Durant la pyrolyse, de la vapeur surchauffée et de l'oxygène traversent deux fours placés en série ayant un tube de combustion en commun. Le premier four augmente progressivement la température à 700°C alors que le deuxième est maintenu à 1000°C. L'acide chlorhydrique formé est collecté par condensation de la vapeur et les chlorures sont mesurés à l'aide d'une électrode ionique spécifique à membrane solide. Pour tenir compte de l'adsorption des chlorures inorganiques sur le charbon actif, un autre échantillon est traité de la même façon mais le charbon actif est ensuite lavé avec une solution de nitrate de sodium pendant un minimum de 6 heures. Au cours de cette phase, les nitrates déplacent les chlorures inorganiques qui sont récupérés

et mesurés par une électrode ionique spécifique. La différence entre les deux résultats permet de déterminer la concentration de chlore lié organiquement, appelée TOCl.

Même si depuis ces premiers essais de nombreux travaux ont été menés pour affiner la méthode et faciliter sa mise en oeuvre, le principe de base est resté le même. Ainsi, les halogénures inorganiques de l'échantillon d'eau sont exclus de l'adsorption par ajout de nitrates sous forme d'une solution de nitrate de sodium, permettant également une plus grande précision et répétabilité. La mesure des chlorures est réalisée au moyen d'un micro-coulomètre, augmentant la sensibilité d'un facteur 100 et diminuant le volume de l'échantillon à 100 ml, voire moins, en fonction de la charge de celui-ci. D'autre part, les résultats ne sont plus définis comme TOCl, mais comme composés organo-halogénés adsorbables, AOX (Adsorbable Organo-Halogens), étant donné que les bromures et les iodures organiques, même s'ils ne sont généralement présents qu'à de très faibles concentrations, sont également pris en compte lors de l'adsorption. Il est à noter qu'en raison de leur forte solubilité dans l'électrolyte, les ions fluorures, et par compte les composés organo-fluorés, ne peuvent pas être détectés par micro-coulométrie.

I.5.2 Quantification des composés organo-halogénés dans l'eau

De nombreuses normes nationales (entres autres, DIN, 1985 ; ÖNORM, 1987 ; ASTM, 1989) et internationales (ISO, 1989) ont été établies. La méthode utilisée dans le présent travail sera décrite plus en détail dans le chapitre suivant. Selon Sontheimer & Schnitzler (1982), la méthode des AOX permet de quantifier 90 à 100 % des composés organo-halogénés dans l'eau, avec un taux de recouvrement supérieur à 95 % (Stevens *et al.*, 1985)

Depuis quelques années, le paramètre AOX fait partie des paramètres physico-chimiques fréquemment utilisés pour la surveillance des eaux de surface en Allemagne (Klopp & Kornatzki, 1987 ; Keller, 1989), en Autriche (Chovanec & Winkler, 1994), en Suède (Enell & Wennberg, 1991) et en France, notamment dans les milieux recevant les eaux usées de l'industrie du bois et de la pâte à papier. En Allemagne, les AOX font partie des paramètres de redevance depuis 1990, sachant que le déversement quotidien de 2 kg d'AOX correspond à une unité de pollution.

En France, l'entrée dans les textes relatifs aux redevances et aux aides financières de l'Agence de l'Eau Rhin-Meuse datent de 1994. La redevance par kg d'AOX déversé par jour est passé de 2516,54 F en 1994, à 2618,02 F en 1995 et à 2929,80 F en 1996 (AERM, 1993).

Dans un travail fondé sur la surveillance des grands cours d'eau de Bavière (Allemagne), Hoffmann (1986), propose une grille de qualité comportant quatre classes en fonction de l'influence industrielle :

- influence négligeable : 5 µg $Cl.l^{-1}$ > [AOX]
- influence modérée : 20 µg $Cl.l^{-1}$ > [AOX] > 5 µg $Cl.l^{-1}$
- influence significative : 40 µg $Cl.l^{-1}$ > [AOX] > 20 µg $Cl.l^{-1}$
- influence importante : [AOX] > 40 µg $Cl.l^{-1}$

La RIWA (association des services d'eau de la Meuse et du Rhin), (1992) propose deux valeurs guides pour la potabilisation de l'eau :

- 25 µg $Cl.l^{-1}$ (RIWA A) : « concentration pour laquelle il est possible de produire de l'eau potable de qualité irréprochable par des méthodes d'épuration simples et à caractère essentiellement naturel »,
- 50 µg $Cl.l^{-1}$ (RIWA B) : « concentration pour laquelle il est possible de produire de l'eau potable de qualité irréprochable par la constitution de bassins de réserve et/ou l'application de techniques d'épuration sophistiquées ».

Ces mêmes valeurs guides sont actuellement employées par l'Agence de l'Eau Rhin-Meuse pour définir l'état de contamination des eaux de surface du bassin.

I.5.3. Quantification des composés organo-halogénés dans les sédiments et les sols

A la fin des années 80, Hoffmann *et al.* (1988), ont mis au point une procédure permettant de quantifier les composés organo-halogénés totaux dans les boues de stations d'épuration et les sédiments. En Allemagne, cette méthode a fait l'objet d'une normalisation en 1989 (DIN, 1989) ; elle sera décrite plus en détail dans le chapitre suivant. Comme pour l'eau, cette méthode s'est rapidement répandue et, est actuellement largement utilisée pour l'évaluation de la charge en AOX dans les sédiments dulcicoles et marins (Maatela *et al.*, 1990 ; Kankaanpää & Masuku, 1992 ; Palm & Lammi, 1995). De plus, un élargissement de la méthode par Asplund *et al.* (1989) permet son application aux sols en milieu terrestre. Dans ce cas, certains auteurs (Asplund *et al.*, 1994), font la différence entre les paramètres AOX et LOX (Leachable Organic Halogens, Organo Halogénés Lessivables), ce dernier permettant de quantifier les organo-halogénés susceptibles d'être relargués du sol par lessivage.

I.5.4. Quantification des composés organo-halogénés dans le matériel biologique

Comme dans le cas de l'eau et des sédiments, la complexité et la difficulté de l'analyse individuelle des composés organo-halogénés, a nécessité l'établissement de paramètres de groupes pour faciliter leur quantification dans le matériel biologique. Hansen (1992) propose de mesurer les AOX

dans le mollusque bivalve, *Dreissena polymorpha*, par la même méthode que dans l'eau et les sédiments. Cependant, cette méthode, basée sur la désorption des organo-halogénés du matériel biologique, suivi de leur adsorption sur du charbon actif, n'a pas été retenue. De nos jours, les méthodes les plus couramment utilisées (NSEPB, 1989 ; Pellinen *et al.*, 1994 ; Mäkelä, 1995) sont dérivées de celle décrite par Martinsen *et al.* (1988), et basées sur l'extraction des organo-halogénés à l'aide de solvants polaires et apolaires. C'est également la méthode ayant servi lors de ce travail, elle sera décrite plus en détail dans le chapitre suivant.

Chapitre II
Matériels et méthodes

II.1. Présentation du matériel biologique

Comme nous l'avons précisé dans l'introduction, le choix du matériel biologique s'est porté sur le bivalve *Anodonta cygnea* L., pour plusieurs raisons, à savoir : une grande abondance, une facilité d'échantillonnage et de manipulation, une bonne résistance vis-à-vis d'effluents d'usines de pâte à papier blanchissant au chlore, une forte capacité d'accumulation de composés organo-halogénés, ainsi qu'une taille suffisamment grande pour permettre des dosages sur des organismes individuels. De plus, lors de notre travail, nous avons également comparé l'accumulation de composés organo-halogénés chez trois autres espèces de mollusques aquatiques, qui seront décrit brièvement à la suite de l'anodonte.

II.1.1. L'anodonte cygne, *Anodonta cygnea* L.

II..1.1.1. 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 2.1).

Tableau 2.1 : Noms communs et scientifiques des deux espèces d'anodontes et de pseudoanodonta.

Anodonta cygnea L.	*Anodonta anatina* L.	*Pseudoanodonta complanata* R.
Mytilus cygneus	*Mytilus anatinus*	*Pseudoanodonta minima*
Anodonta cygneus	*Anodonta anatinus*	*Anodonta complanata*
	Anodonta avonesis	
	Anodonta intermedia	
	Anodonta incrassata	
	Anodonta piscinalis	
Moule cygne	Moule canard	*Pseudoanodonta*
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 ovalaire, 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 2.1). 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).

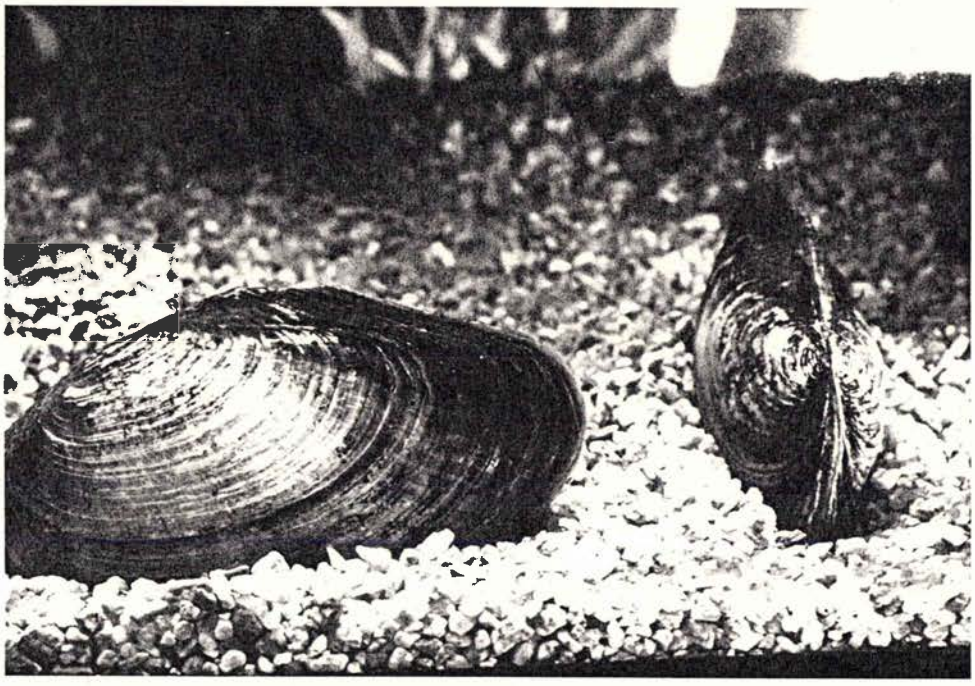


Photo 2.1 : L'anodonte, *Anodonta cygnea*

II.1.1.2. 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.

II.1.1.3. 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 4-6ème 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^{-2} à 60 individus.m^{-2} 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^{-2} pour *Anodonta cygnea* et *Anodonta anatina* (Bachmann, communication personnelle).

II.1.2. Les autres mollusques étudiés

II.1.2.1. *Unio pictorum* L. (Photo 2.2)

L'unio est également un mollusque aquatique eulamellibranche dont la position systématique est:

Classe : Bivalve
Famille : *Unionidae*
Genre : *Unio* (Philipsson, 1788)
Espèce : *Unio pictorum* (Linné, 1758)

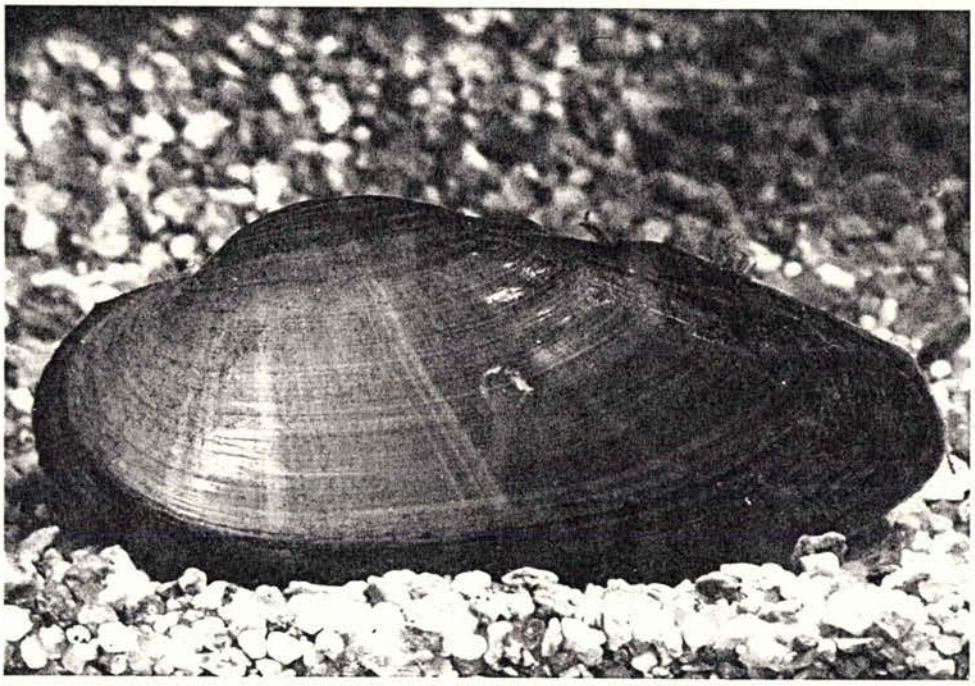


Photo 2.2 : *Unio pictorum.*

On rencontre *Unio pictorum* de préférence dans les eaux stagnantes ou à faible courant, telles que les rivières, ruisseaux, canaux et étangs où il vit plus ou moins enfoncé dans le sédiment comme l'anodonte.

L'unio se distingue de l'anodonte par une coquille beaucoup plus longue que haute, de couleur jaunâtre, et dont les sommets sont fortement renflés.

II.1.2.2. *Dreissena polymorpha* P. (Photo 2.3)

La moule zébrée, originaire de la mer Caspienne, préfère les eaux douces à faible courant telles que les rivières et les canaux. A l'âge adulte elle se fixe à l'aide de son byssus à des substrats durs tels que les pierres, le bois, la coque de bateaux ou d'autres coquilles. Comme l'indique son nom, la coquille de *Dreissena polymorpha* est de forme très variable, globalement mytiliforme et zébrée de bandes en Z irrégulières noires sur fond crème.

La position systématique de la moule zébrée est la suivante :

Classe : Bivalve
Famille : *Dreissenidae*
Genre : *Dreissena* (Van Beneden, 1835)
Espèce : *Dreissena polymorpha* (Pallas, 1771)

Photo 2.3 : la moule zébrée, *Dreissena polymorpha*.

II.1.2.3. *Viviparus viviparus* L. (Photo 2.4)

Parallèlement aux trois espèces de bivalves, nous avons également étudié un gastéropode, *Viviparus vivparus*, afin de pouvoir comparer l'accumulation de composés organo-halogénés. Les vivipares vivent dans les eaux calmes et stagnantes des rivières et les canaux. Ils se nourrissent essentiellement par broutage d'algues et de détritus. *Viviparus viviparus* a une coquille globuleuse, pourvue d'un ombilic étroit ou fermé et de 4 à 6 tours de spires assez convexes. De couleur jaunâtre à brunâtre, son test est épais et orné de trois bandes spirales foncées.

La position systématique de *Viviparus viviparus* est :

Classe : Gastéropodes
Famille : *Viviparidae*
Genre : *Viviparus* (Monfort, 1810)
Espèce : *Viviparus viviparus* (Linné, 1758)

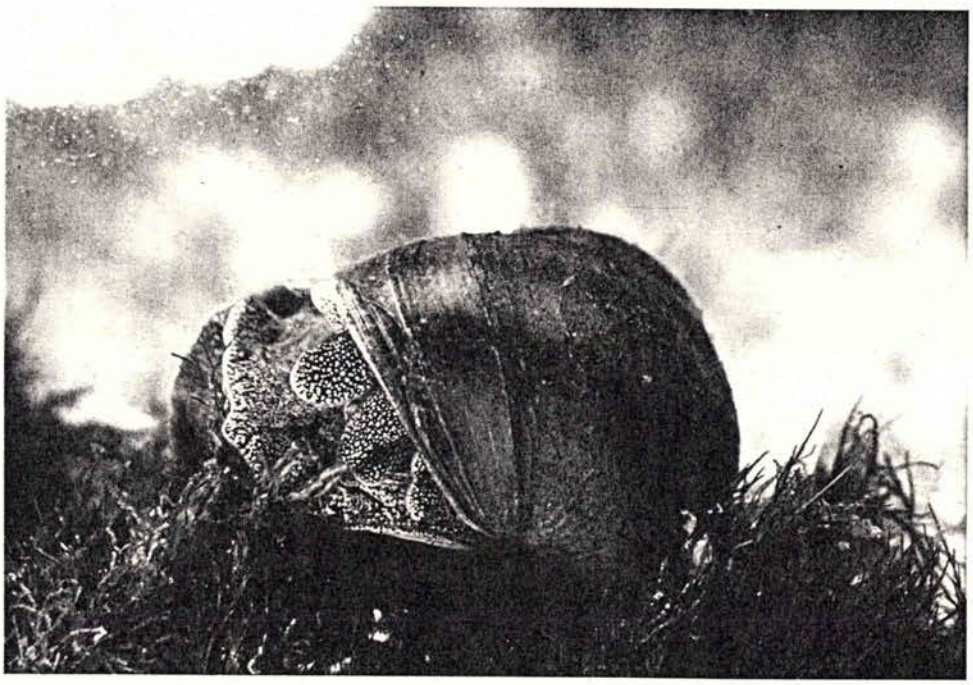


Photo 2.4 : *Viviparus viviparus*.

II.2. Collecte, conditionnement, transfert et exposition des mollusques

II.2.1. Collecte

Les anodontes utilisés pour les différentes expériences réalisées au cours de ce travail ont été prélevés au niveau de trois sites différents situés sur la Meuse et la Moselle. Plusieurs critères de sélection ont dicté le choix de ces sites de prélèvement à savoir :

- une contamination aussi faible que possible 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 unios et les vivipares sont prélevés de la même manière que les anodontes. Pour les unios, seuls les individus dont la longeur est comprise entre 60 et 80 mm sont retenus. Pour les vivipares, le critère de sélection est la hauteur de la coquille, et seuls les individus compris entre 22 et 28 mm sont utilisés. Les dreissènes, de longueur comprise entre 18 et 22 mm, sont prélevées sur des pierres, en sectionnant délicatement leur byssus à l'aide d'un scalpel en inox.

Tous les mollusques sont ramenés au laboratoire dans des glacières contenant de l'eau du site de prélèvement. Lorsque le site de prélèvement est loin du laboratoire (Meuse), l'eau des glacières est aérée à l'aide d'un bulleur à piles, afin de maintenir une concentration en oxygène suffisante.

II.2.2. Conditionnement au laboratoire

Au laboratoire les coquilles des mollusques 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. Les dreissènes sont préalablement posées sur des carrelages pour leur permettre de se fixer.

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 santé de tous les animaux est vérifié à chaque changement d'eau et les morts sont comptabilisés et retirés des bacs. A la fin de la phase de stabulation, tous les individus n'ayant jamais ouvert leurs valves (unionidés), n'étant jamais sortis de leur coquille (gastéropodes) ou ne s'étant pas fixés (dreissènes), sont considérés être en mauvaise condition et sont également retirés des bacs et rejetés dans la Moselle.

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

II.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. Les unionidés sont exposés dans des cages en plastique de taille 60 x 40 x 20 cm (Photo 2.5).

Photo 2.5 : Cage d'exposition (ouverte) des bivalves unionidés, *Anodonta cygnea* et *Unio pictorum*, et de la moule zebrée, *Dreissena polymorpha*, fixée sous le couvercle.

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 détritus végétaux. Une couche de 2 à 3 cm de sédiment du site d'exposition est déposé sur le fond de la cage, puis les anodontes et unios sont placés sur celui-ci, et la cage est refermée. Les vivipares et les carrelages sur lesquels sont fixés les dreissènes sont placés dans des cages en grillage (20 x 15 x 10 cm) de 0.5 cm de vide de maille, puis fixées sur le couvercle de la cage à unionidés (Photo 2.6). L'ensemble est fixée 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.

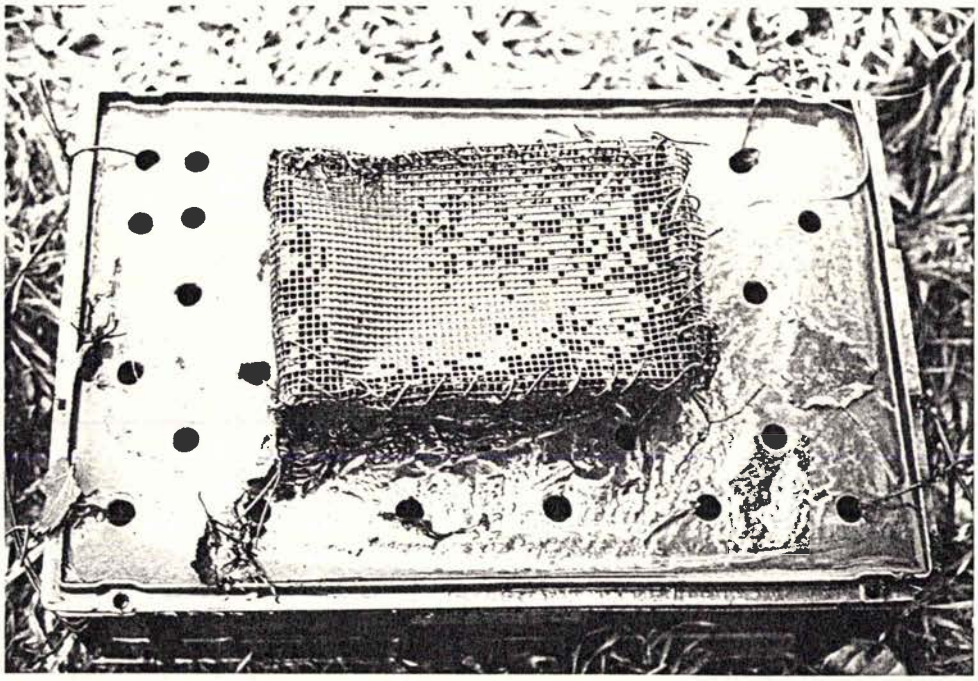


Photo 2.6 : Cage d'exposition (fermée) des bivalves unionidés, *Anodonta cygnea* et *Unio pictorum*, et du gastéropode, *Viviparus viviparus*, fixée sur le couvercle.

II.3. Présentation du site d'étude

Les différentes expériences d'accumulation des composés organo-halogénés 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.

II.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 2.7). 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).

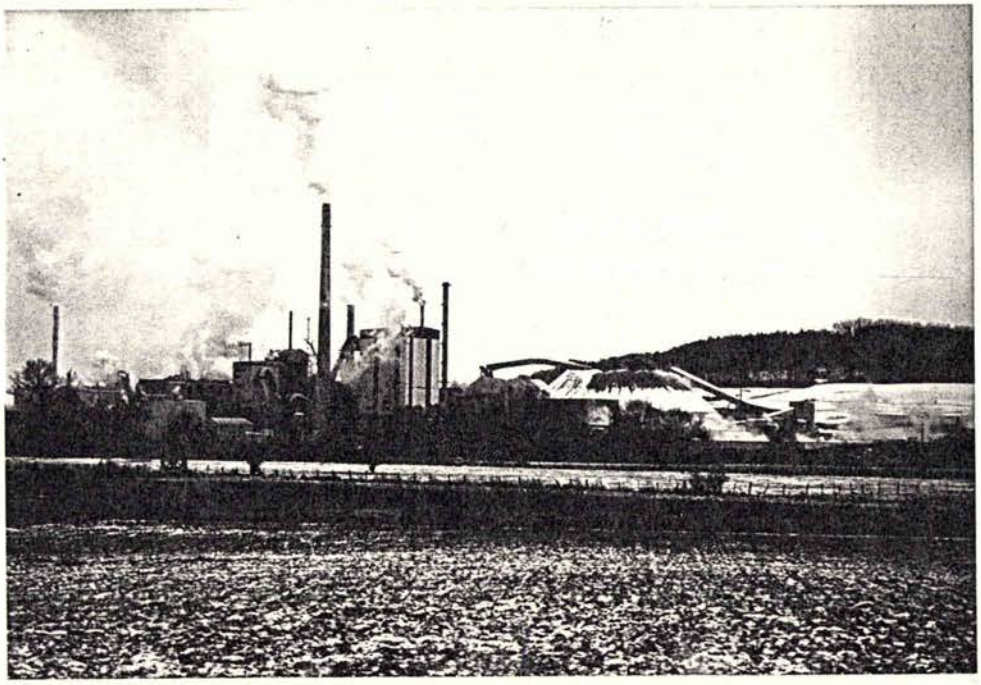


Photo 2.7 : Présentation de l'usine de pâte à papier.

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 Cl_2 et ClO_2, suivant la séquence $C/D_{75/25}$ - E_1 - D_1 - E_2 - D_2 (cf. analyse bibliographique, § I.2.2.3). 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 $ng.kg^{-1}$, ainsi que des polychlorophénols à des concentrations de l'ordre du $\mu g.g^{-1}$.

Les rejets de composés organo-chlorés peuvent être évalués par la quantité de chlore utilisée lors du blanchiment de la pâte à papier. Ainsi, en 1989, l'usine utilisait 28.9 Kg de Cl_2 et 15.7 Kg de ClO_2, soit 37.2 Kg de chlore élémentaire par tonne de pâte à papier (Goris, 1989). Comme nous l'avons vu précédemment (§ I.2.3.3), il existe une relation linéaire entre la quantité de chlore utilisée et la quantité de composés organo-halogénés générée, du type : $AOX = k * (Cl_2 + (ClO^-)/2 + (ClO_2)/5)$ 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 :

AOX = 0.108 * 37.2, soit 3.94 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 de : AOX = 3.94 * 0.35 * 668, soit 1710 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.

II.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 2.1). Elles sont situées à des endroits protégés et difficiles d'accès à des personnes etrangères au site, pour éviter les actes de vandalisme sur le matériel installé.

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 (Photo 2.8).

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 $m^3.s^{-1}$ (Photo 2.9).

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 $m^3.s^{-1}$ (Photo 2.10).

Photo 2.10 : La station 3, située sur la Chiers, en aval de la confluence avec le Ton.

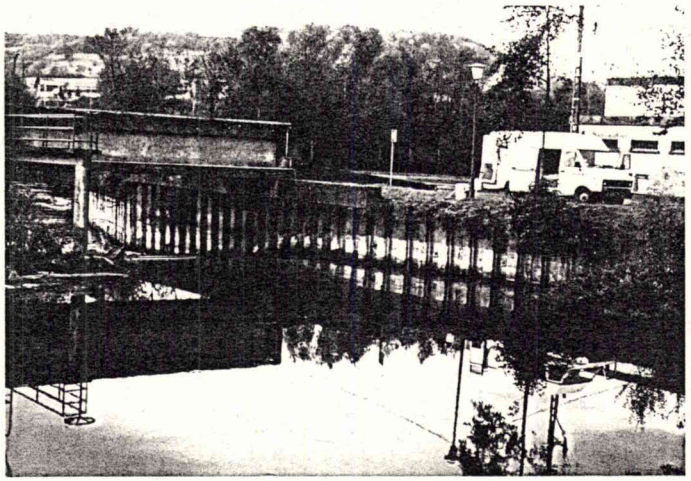
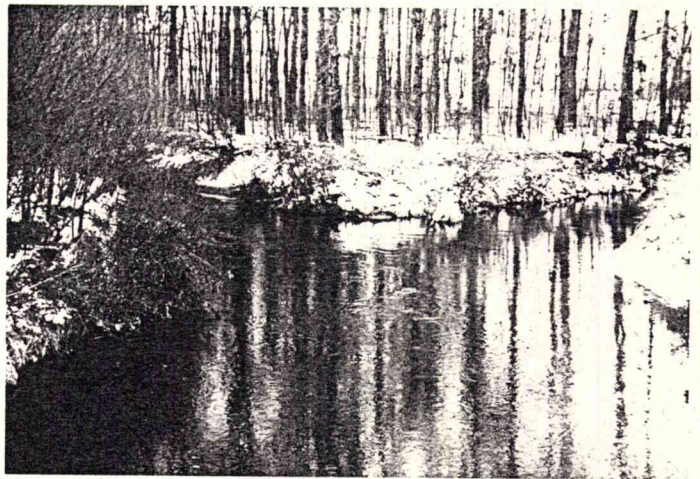


Photo 2.9 : La station 2, située sur le Ton, en aval des rejets d'EPKB.

Photo 2.8 : La station 1, située sur le Ton, en amont des rejets d'EPKB.



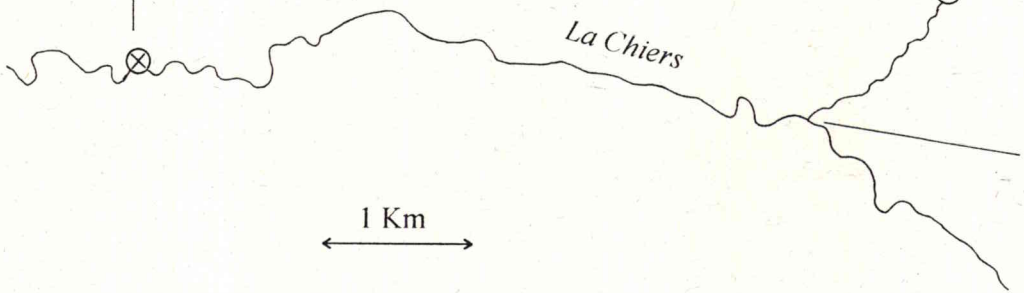


Figure 2.1 : Localisation géographique d[e]

II.4. Méthodes de dosage des composés organo-halogénés

II.4.1. Le dosage microcoulométrique

II.4.1.1. Principe

Les différents composés organo-halogénés, R-X (R = partie organique ; X = Cl, Br, I) contenus dans l'échantillon réagissent à haute température (850-950°C) avec l'oxygène pour former l'acide correspondant :

$$R\text{-}X + O_2 \text{ --> } CO_2 + H_2O + HX + R$$

Le maintien d'un courant d'oxygène dans le tube de combustion permet d'assurer une oxydation complète des produits évaporés avec l'eau et de déplacer l'équilibre exothermique de la réaction :

$$2HX + {}^1/_2O_2 \text{ <==> } X_2 + H_2O$$

vers la gauche. L'ajout d'un gaz vecteur inerte (azote) permet de diminuer la pression partielle de l'oxygène. Les acides, HX, formés sont entraînés par le gaz vecteur vers la cellule de titrage où ils sont détectés par un couple d'électrodes (électrode de référence : Hg_2SO_4 dans une solution saturée en sulfate de potassium, et électrode de mesure : argent) plongées dans une solution d'électrolyte à base d'acide acétique (Tableau 2.2), et contenant une quantité déterminée d'ions Ag^+.

L'introduction des HX dans la cellule de titration entraîne une précipitation des Ag^+ selon la réaction :

$$Ag^+ + HX \text{ --> } AgX + H^+$$

Tableau 2.2 : Composition de la solution de titrage.

Composé	Volume	Remarque : l'addition de bleu de thymol permet
Acide acétique	700 ml	de ralentir la photo-décomposition des
Eau déminéralisée	300 ml	halogénures, ainsi que l'effet photovoltaïque
Hydrate d'hydrazine	3 ml	sur l'électrode de mesure, qui sont négligeables
Acide nitrique	6 ml	dans une cellule à l'abri de la lumière

Le potentiel électrique de la réaction : $Ag \rightarrow Ag^+ + e^-$ est donné par la formule :

$$E_2 = Eo_2 + \frac{R*T}{z*F} * \ln([Ag^+])$$

avec :

- E_1 : potentiel électrique de l'électrode de référence
- E_2 : potentiel électrique de l'électrode de mesure
- Eo_2 : potentiel normal de l'électrode de mesure
- R : constante des gaz parfaits
- T : température
- z : nombre d'électrons
- F : constante de Faraday
- $[Ag^+]$: concentration en Ag+ dans la solution

La valeur mesurée est la différence de potentiel :

$$\Delta E = E_2 - E_1 = Eo_2 + \frac{R * T}{z * F} * \ln([Ag^+]) - E_1$$

et qui, à une température donnée, est uniquement dépendante de la concentration en ions argent de la solution.

Les HX produits durant la combustion sont détectés par le couple d'électrodes suite à la diminution de la concentration en Ag^+ due à la précipitation de l'halogénure d'argent, il s'en suit une modification de la valeur de ΔE.

Une deuxième étape consiste en l'analyse quantitative des HX réalisée par titrage coulométrique, au cours de laquelle l'intensité électrique est utilisée comme titrant. Les ions à mesurer (chlorures, bromures et iodures) réagissent avec l'ion argent produit par l'anode :

$$Ag \rightarrow Ag^+ + e^-$$

L'oxydation anodique de l'électrode d'argent rétablit la concentration originale en Ag^+. Selon la loi de Faraday, la quantité de charge, q, qui passe en solution est proportionnelle à la quantité de substance n qui a été transformée :

$$q = z * F * n$$

La quantité d'argent transformée est équivalente à la quantité d'halogénure qui a réagi. La charge q, peut facilement être mesurée si un courant I qui traverse la solution pendant un temps t :

$$q = I * t$$

La concentration en chlorure est donnée par

$$m = n * M$$

avec M : masse atomique du chlore, et donc

$$m = M * I . \frac{t}{z} * F$$

Etant donné les très faibles courants utilisés (100 µA maximum) et l'ordre de grandeur des concentrations mesurées ($\mu g.l^{-1}$), cette méthode est généralement considérée comme micro-coulométrique.

II.4.1.2. Vérification et calibrage de la titration

La méthode du titrage microcoulométrique est une méthode absolue et ne nécessite par conséquent pas d'étalonnage (Duvivier, 1993). Cependant, des dérives de la titration peuvent intervenir lorsque la solution d'électrolyte ou les électrodes sont usagées et ne permettent plus de maintenir une concentration constante d'ions Ag^+ dans la solution.

Tableau 2.3 : Vérification du microcoulomètre avec une solution HCl 0.1 M (F=96487)

Volume de HCl (V) µl	Q théorique V * [HCl] * F	F observé	Q observé F observé * F
1	9.38	$9.31E^{-08}$	8.98
2	18.77	$1.96E^{-07}$	18.91
3	28.15	$2.92E^{-07}$	28.20
4	37.54	$3.85E^{-07}$	37.11
5	46.92	$4.82E^{-07}$	46.49
6	56.30	$5.79E^{-07}$	55.89
7	65.69	$6.75E^{-07}$	65.17
8	75.07	$7.65E^{-07}$	73.77
9	84.56	$8.66E^{-07}$	83.59
10	93.84	$9.68E^{-07}$	93.43

Il est donc important de vérifier l'état de la solution et des électrodes avant chaque série de dosages. Pour cela on injecte différents volumes d'une solution d'acide chlorhydrique 0.1 M directement dans la cellule de titrage et l'on mesure dans chaque cas la quantité de charge transférée (Hahn *et al.*, 1991). Les résultats d'une telle vérification sont présentés dans le tableau 2.3. Lorsque les valeurs de différence de potentiel s'écartent trop des valeurs théoriques, il convient de changer la solution d'électrolyte et/ou de nettoyer la cellule et les électrodes.

II.4.2. Dosage des AOX dans l'eau

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.

II.4.2.1. 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 $mol.l^{-1}$) 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.

II.4.2.2. 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 oeuvre que la méthode par colonnes, et également employée pour le dosage des AOX dans les sédiments (cf. § II.5.3). 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 $mol.l^{-1}$) et 50 mg de charbon actif (Merck, indice d'iode > 1050 $mg.g^{-1}$). 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 µm. Le gâteau de filtre est lavé avec 25 ml d'une solution de nitrate de sodium (0.04 $mol.l^{-1}$) 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 (Figure 2.2) 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 µg de chlore lié organiquement par litre d'échantillon (µg $Cl.l^{-1}$).

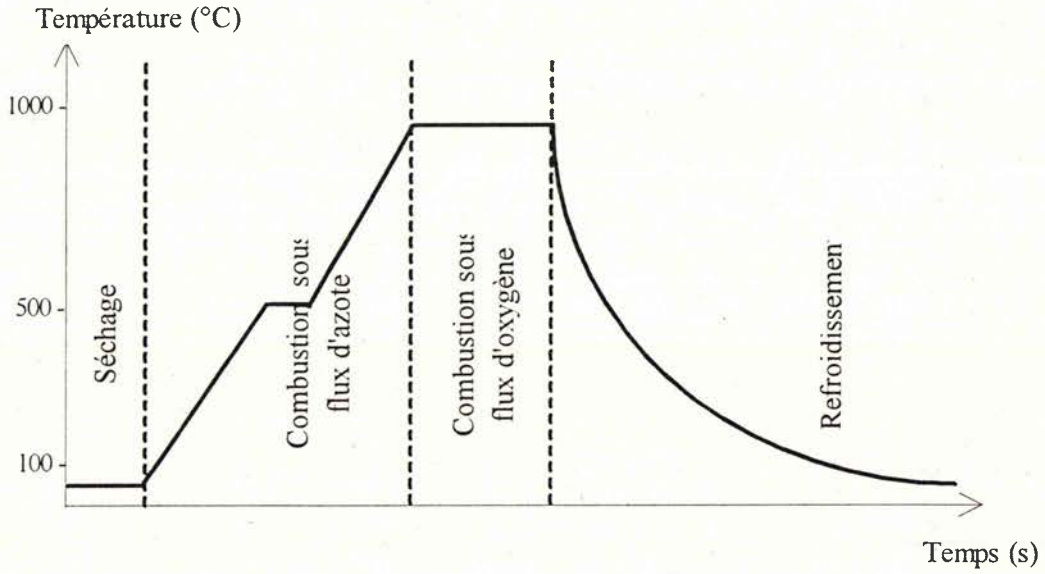


Figure 2.2 : Programmation en température du four de combustion.

La limite de détection donné par le constructeur de l'analyseur (ERALY, Noisy-le-Roi, France) est de 2 $\mu g.l^{-1}$, soit 0.2 µg 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 $\mu g.l^{-1}$, soit 0.5 µg 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 (Tableau 2.4).

Tableau 2.4 : Vérification de la capacité d'adsorption du chlorophénol sur le charbon actif.

µg Cl ajouté	µg Cl dosé	CV	% de recouvrement	n
1	1.1 ± 0.2	18.2 %	79 - 140	17
5	5.0 ± 0.4	8.0 %	90 - 120	20
10	10.1 ± 0.6	5.9 %	92 - 110	20
15	15.2 ± 0.6	3.9 %	95 - 112	20
20	20.5 ± 1.8	8.7 %	90 - 116	17
25	25.7 ± 0.7	2.7 %	97 - 106	13

II.4.2.3. Précautions à prendre

Afin d'obtenir des résultats reproductibles et fiables dans le dosage des AOX dans l'eau, des précautions sont à prendre.

Lors de la filtration, il est important d'éviter que le gâteau de filtre ne soit aspiré jusqu'à sec pour ne pas contaminer le charbon actif par l'air du laboratoire.

Dans le cas d'échantillons contenant de fortes concentrations de composés oragno-halogénés, tels que les effluents d'usine de pâte à papier blanchissant au chlore, la durée d'agitation est prolongée à 12 heures, permettant une adsorption totale de toutes le molécules sur le charbon actif (DIN, 1985).

Afin de s'assurer de l'efficacité de l'adsorption des molécules organo-halogénés sur le charbon actif, deux dosages sont réalisés, l'un avec échantillon normal et l'autre avec un échantillon dilué au demi, permettant d'éviter de possibles biais lors du dosage. Ceux-ci peuvent notamment apparaître dans deux cas :

- lorsque la concentration en chlorures inorganiques est supérieure à 1 $g.l^{-1}$, car ceux-ci ne peuvent plus être entièrement déplacés lors de l'étape de lavage par la solution de nitrate de sodium, entraînant une surestimation de la concentration en AOX,
- lorsque la concentration en carbone organique dissous est supérieure à 10 $g.l^{-1}$, car celui-ci est alors en compétition d'adsorption avec les molécules oragno-halogénées, entraînant une sous-estimation de la concentration en AOX.

Dans tous les cas, la différence entre les valeurs d'AOX ne doit pas dépasser 10 %. D'autre part, il est absolument impératif que la salle de préparation et de dosage des échantillons ne soit pas nettoyée avec le l'eau de Javel. En effet au début de nos travaux, d'importants problèmes de reproductibilité et de fiabilité des résultats sont apparus. Ce n'est qu'après avoir déterminé la cause, et lavé la piéce à grande eau que les résultats ont été reproductibles.

Remarque : Des dosages des composés organo-halogénés purgeables ou volatiles (POX ou VOX) ont été réalisés à intervalle de temps régulier sur les échantillons d'eau. Cependant, étant donné que leurs concentrations ne dépassaient jamais 5 à 6 % de la concentration en AOX, ils n'ont pas été tenu en compte.

II.4.3. Dosage des AOX dans les sédiments

Le principe de base est le même que pour le dosage des AOX dans l'eau. 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.

II.4.3.1. Prélèvement et traitement du sédiment

Le sédiment est prélevé à l'aide d'une benne à sédiment (Züllig, Suisse) ou à l'aide d'une cuillère en inox de manière à ne récupérer que la partie supérieure, représenatant les dépôts les plus récents. Il est tamisé sur le terrain sur un tamis en inox de 2 mm de trame pour éliminer les brindilles, cailloux, etc...et ramené au laboratoire dans des bocaux en verre placés dans une glacière. Il est conservé à l'obscurité et en chambre froide à 4°C et préparé dans les trois jours suivant le prélèvement.

Au laboratoire environ 10 grammes de sédiment frais sont transférés dans un bêcher en verre recouvert d'une feuille d'aluminium et mis à sécher pendant 24 heures à l'étuve à 60°C. Le sédiment sec est broyé dans un mortier en porcelaine, et tamisé sur un tamis de 0.1 mm de trame, permettant d'homogénéiser l'échantillon, tout en augmentant la surface d'adsorption spécifique (Hoffmann *et al.*, 1988). Le sédiment sec et broyé peut alors être conservé quelque temps, à l'obscurité, dans un tube à essai en verre, fermé. Chaque échantillon de sédiment est divisé en deux sous-échantillons qui sont traités et titrés de manière identique.

II.4.3.2. Adsorption et titration des composés organo-halogénés

50 à 100 mg de sédiment sec et broyé sont placés dans un erlenmeyer en verre auquel on ajoute 10 ml d'une solution de nitrate de sodium (0.2 mol.l) et 20 mg de charbon actif (Merck, indice d'iode > 1050 $mg.g^{-1}$). L'erlenmeyer est fermé et mis à agiter pendant au moins une heure. Après filtration par aspiration sur une membrane en polycarbonate (Whatman, cyclopore à faible teneur en chlorures), de 0.4 µm de diamètre de pore et lavage du charbon actif par une solution de nitrate de sodium (0.04 $mol.l^{-1}$), l'échantillon est dosé par microcoulométrie selon le même principe et la même programmation de température que l'eau. Comme pour l'eau, deux dosages sont réalisés avec des poids différents de sédiment.

Parallèlement au dosage des AOX, une fraction du sédiment sec est calcinée pendant 2 heures à 500°C, pour mesurer la perte au feu qui donne une bonne indication de la teneur en matière organique du sédiment.

Les résultats sont exprimés en µg de chlore lié organiquement par gramme de sédiment sec ($\mu g.g^{-1}$ PS), et en µg de chlore lié organiquement par gramme de matière organique ($\mu g.g^{-1}$ MO).

La durée totale d'une titration, et la limite de détection sont du même ordre de grandeur que pour le dosage des AOX dans l'eau.

II.4.3.3. Vérification de l'adsorption

La fiabilité et l'efficacité de l'adsorption et du dosage sont vérifiés par ajouts dosés d'une solution de chlorophénol (Tableau 2.5). Une autre méthode de vérification a également été utilisée dans ce travail. Elle consiste à doser, en plus de la teneur en AOX, la teneur en chlore total du sédiment, ainsi

que la teneur en chlorures dans l'eau de l'étape de lavage du sédiment. La teneur en chlore total (ClT) est mesurée par combustion d'une quantité déterminée (50 à 100 mg) de sédiment sec dans l'analyseur AOX, et la teneur en chlorure (Cl^-) est déterminée par chromatographie ionique. Lorsque l'adsorption et la titration des AOX dans le sédiments sont correctes, alors AOX = ClT - Cl^-.

Tableau 2.5 : Pourcentage de recouvrement du dosage des AOX dans les sédiments par ajouts dosés de penta-chlorophénol.

AOX du sédiment (µg)	AOX de l'ajout (µg)	AOX total	% de recouvrement
9.4	5.0	13.8	96
9.1	5.0	14.0	99
10.6	10.0	20.1	98
11.0	10.0	20.7	99
10.2	15.0	24.9	99
11.3	15.0	24.9	95

II.4.4. Dosage des EOX dans les mollusques

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 ".

II.4.4.1. Prélèvement et traitement des mollusques

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, les animaux 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.

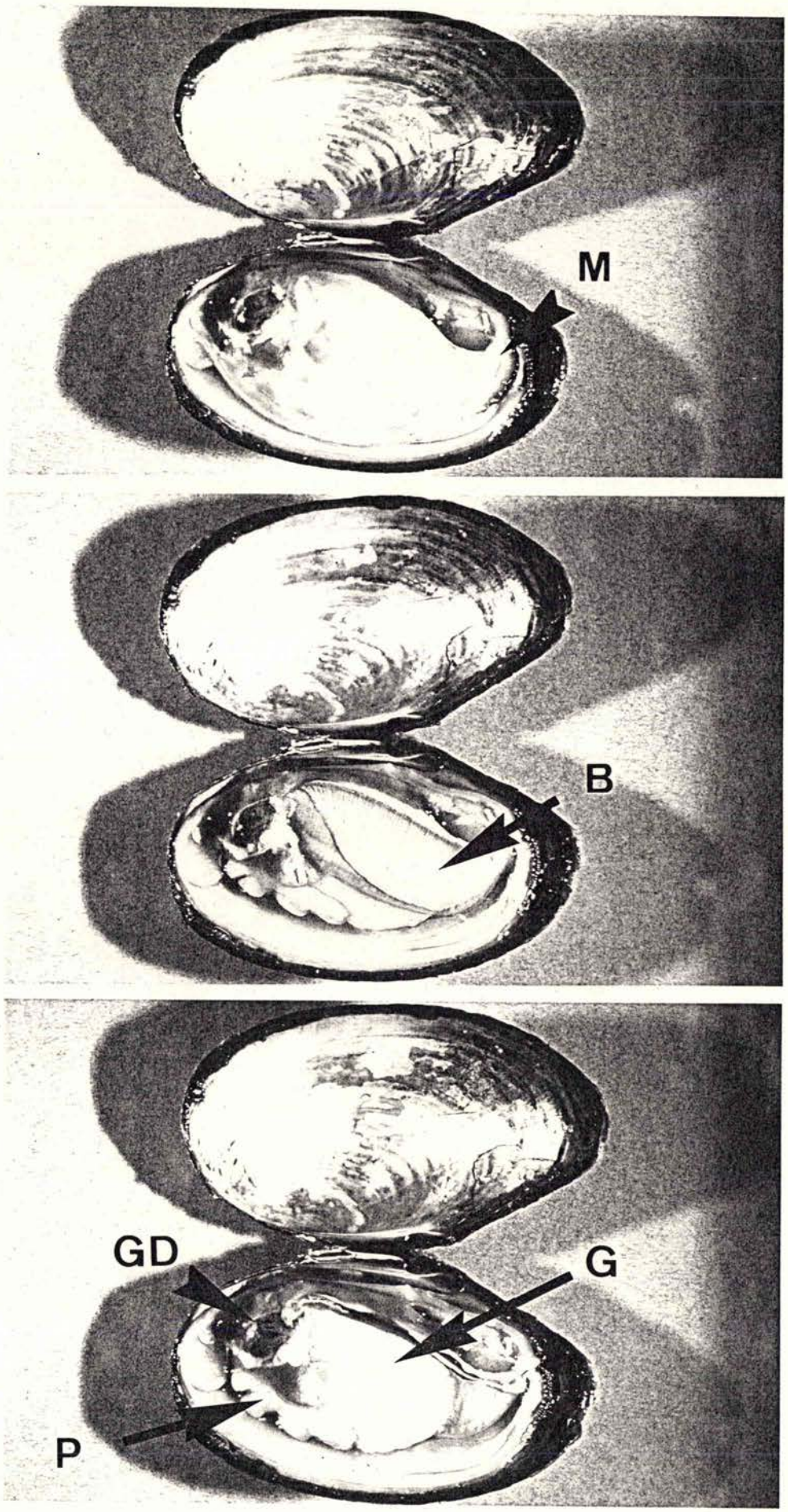
II.4.4.2. Dissection des mollusques

Les bivalves 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 (Photos 2.12 a, b, c). La coquille est séchée à l'aide d'un papier essuie-tout puis pesée. Pour les gastéropodes, la coquille est cassée à l'aide d'une pince, puis les parties molles sont prélevées à l'aide d'une pince de laboratoire en inox. 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.

II.4.4.3. 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^{-1}. 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_2SO_4) au mélange de solvant contenu dans l'erlenmeyer qui est mis à agiter à 400 trs.min^{-1} 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_2SO_4 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.



Photos 2.12 a, b et c : Dissection de *Anodonta cygnea* L. (**M**, manteau ; **B**, branchies ; **G**, gonade ; **GD**, glande digestive ; **P**, pied)

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 µl 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 µg de chlore lié organiquement par µl 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 (Tableau 2.6), et l'efficacité de l'extraction par ajouts d'étalons internes de pentachlorophénol.

Tableau 2.6 : Titrage de la solution étalon de chlorophénol à 90.4 mg dans 100ml de cyclohexane.

Prélèvement	µg Cl dosé	µg Cl théorique	% de recouvrement
8	2.1	2.0	105 %
9	2.2	2.2	100 %
10	2.3	2.5	92 %
10	2.7	2.5	108 %
12	3.3	3.0	110 %
14	3.7	3.5	105 %
16	3.8	4.0	95 %
36	9.1	9.0	101 %
42	10.3	10.5	98 %

Chapitre III
Etude de la contamination de l'eau et des sédiments

III.1. Objectifs de l'étude

Comme nous l'avons vu dans l'étude bibliographique, les composés organo-halogénés entrent dans l'environnement aquatique par deux voies : naturelle et anthropique. Même si la production naturelle de ces composés semble prendre une importance croissante dans l'estimation de la contamination du milieu aquatique (Gribble, 1994 ; Hoekstra & de Leer, 1994), la contribution anthropique reste largement prédominante dans les régions fortement urbanisées et industrialisées. Parmi les rejets anthropiques, la potabilisation de l'eau (Rook, 1974), la désinfection des aéroréfrigérants (Garric, 1980 ; Duvivier, 1993), l'épuration des eaux urbaines (Klopp & Kornatzki, 1987 ; Schowanek *et al.*, 1996), la synthèse et l'utilisation de pesticides et de solvants organo-chlorés, et le blanchiment de la pâte à papier au chlore (Remberger *et al.*, 1992 ; Paasivirta *et al.*, 1992), sont autant de sources responsables de l 'augmentation, à la fois de l'abondance et de la diversité de ces composés dans le milieu aquatique.

Au début de nos travaux, en 1993, peu d'informations étaient disponibles sur la distribution, les niveaux de contamination et le comportement des AOX dans le bassin Rhin-Meuse. En effet, la méthode des AOX n'ayant été normalisée au niveau international qu'en 1989 (Norme ISO 9562), le paramètre AOX n'a fait son entrée dans les réseaux de surveillance qu'à la fin des années 80, début des années 90.

Plusieurs objectifs ont été visés dans cette étude :

- avoir un aperçu des niveaux de concentrations, et des sources potentielles d'AOX au niveau de différents cours d'eau du nord-est de la France, aussi bien dans des régions urbanisées et industrialisées, que dans des régions localisées en amont de tout rejet anthropique. L'étude spatiale de la contamination par les composés organo-halogénés a été faite par la réalisation de profils longitudinaux de la concentration en AOX.
- avoir un aperçu de l'évolution des concentrations en AOX au cours du temps, et d'une éventuelle relation entre les concentrations observées dans l'eau et celles observées dans les sédiments. L'étude temporelle et la répartition des composés organo-halogénés dans deux compartiments : l'eau et les sédiments, ont été réalisées par le suivi mensuel des concentrations en AOX durant 18 mois au niveau de huit stations, reparties sur trois cours d'eau du Nord-Est de la France.

Les résultats obtenus lors de ces deux suivis seront discutés en commun à la fin de ce chapitre.

III.2. Etude spatiale : réalisation de profils longitudinaux de la concentration en AOX

III.2.1. Présentation des cours d'eau étudiés

Quatre cours d'eau du Nord-Est de la France : la Chiers, la Meurthe, la Meuse et la Moselle, ont été échantillonnés à deux reprises chacun entre 1993 et 1996 (Figure 3.1). L'échantillonnage de 45 stations en 1993-94 et de 39 stations en 1996 a été réalisé, soit sur la longueur totale du cours d'eau (Chiers et Meurthe), soit sur le tronçon français (Meuse et Moselle). Le choix des stations a été guidé par leur situation géographique vis-à-vis de sources potentielles de pollution par les composés organo-halogénés (agglomérations, industries). De plus, lors de la premiers série de campagnes (1993-94), quelques uns des principaux affluents (21 affluents répartis sur les quatre cours d'eau) ont été échantillonnés au niveau de stations situées immédiatement en amont de leur confluence avec le cours d'eau principal. Le tableau 3.1 regroupe les différentes stations en fonction de leur éloignement à la source et de leur date d'échantillonnage.

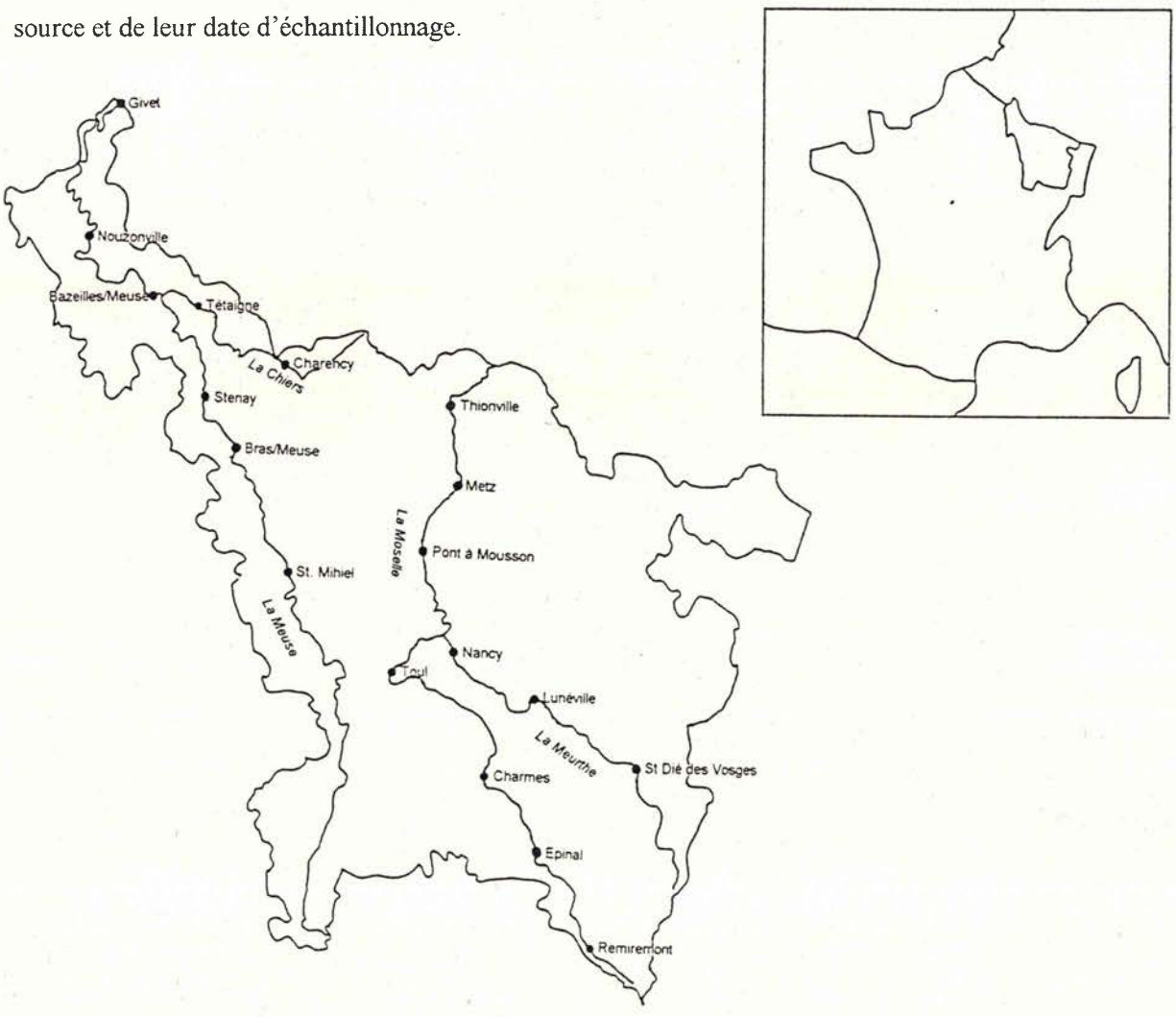


Figure 3.1 : Localisation des quatre cours d'eau échantillonnés.

Tableau 3.1 : Localisation des stations de prélèvement sur les quatre cours d'eau (les affluents sont en italique).

Moselle (07.10.93 et 28.08.96)		**Meurthe (07.02.94 et 27.08.96)**		**Meuse (22.03.94 et 01.09.96)**		**Chiers (16.09.93 et 28.08.96)**	
Km	**Station**	**Km**	**Station**	**Km**	**Station**	**Km**	**Station**
0	Source	0	Source	250	St. Mihiel		Longlaville
	Amont Remiremont	10	Aval Fraize	265	Dieue sur Meuse		Longwy
	Moselotte		*Petite Meurthe*	280	Bras sur Meuse		Cons la Grandville (*)
30	Aval Remiremont		*Fave*	310	Dun sur Meuse		Montigny sur Chiers (*)
	Vologne	30	Aval St. Dié	330	Stenay		*Crusnes*
50	Amont Epinal		*Hure*	360	Mouzon		Colmey (*)
70	Aval Epinal		*Rabodeau*		*Chiers*		Charency-Vezin (*)
80	Aval Châtel		*Plaine*	380	Bazeilles sur Meuse		*Ton*
	Durbion	50	Aval Raôn l'étape	415	Nouzonville		Montmédy
100	Aval Charmes	60	Aval Baccarat	450	Revin		*Othain*
	Madon		*Vezouse*	500	Givet		Lamouille (*)
130	Aval Neuves Maisons	90	Aval Lunéville				Carignan
160	Aval Toul		*Mortagne*				Tétaigne (*)
	Meurthe	120	Aval Dombasle				Douzy
200	Aval Pont à Mousson	150	Aval Nancy				
	Rupt de Mad						
	Mance						(*) station non échan-
230	Jouy aux arches						-tillonnée en 1996.
	Seille						
240	Aval Metz						
	Orne						
	Fensch						
275	Aval Thionville						
	Rejet Mirgenbach						
300	Apach						

III.2.2. Protocole de prélèvement

Pour chaque cours d'eau, l'échantillonnage est effectué en un jour, depuis l'amont jusqu'à l'aval. Les prélèvements sont faits, soit depuis des ponts à l'aide d'un seau muni d'une corde, soit depuis la berge à l'aide d'une perche de prélèvement de 3 mètres de long, de façon à prélever l'eau dans le courant de la rivière.

Chaque échantillon est divisé en deux sous-échantillons, l'un pour le dosage des AOX sur eau brute, l'autre pour dosage des AOX sur eau filtrée à 0.45 µm. Le traitement, la préparation et le dosage des échantillons sont réalisés selon le protocole décrit au § II.4.2.

III.2.3. Résultats

Pour chaque échantillon, deux dosages sont réalisés, l'un sur eau brute, l'autre sur eau filtrée à 0.45 µm. Dans tous les cas, les différences entre eau filtrée et eau brute sont faibles, et les résultats ne présentent pas de différences supérieures à 10 %. Aussi, afin de ne pas surcharger inutilement les représentations graphiques des profils longitudinaux, seuls les résultats du dosage sur l'eau brute seront présentés. Les résultats brutes sont regroupés dans l'annexe A.

III.2.3.1. La Moselle (Figure 3.2)

La rivière Moselle prend sa source dans le massif vosgiens à proximité du col de Bussang. Elle traverse la Lorraine du Sud au Nord sur une distance de 300 Km, traverse la frontière franco-allemande et se jette avec un débit moyen de 320 m3/s dans le Rhin au niveau de Coblence.

L'eau prélevée en tête de bassin, en amont de toute activité anthropique présente une concentration non négligeable en AOX, avec respectivement 15.0 et 9.8 µg $Cl.l^{-1}$ en 1993 et 1996. La concentration augmente progressivement et atteint un premier pic de l'ordre de 50 µg $Cl.l^{-1}$ à l'aval des villes d'Epinal et de Golbey. Après une légère diminution, la concentration augmentent à nouveau entre Toul et Pont-à-Mousson, après confluence de la rivière Meurthe. L'important pic de plus de 110 µg $Cl.l^{-1}$, observé en 1993 au niveau de Jouy-aux-Arches, est encore présent en 1996, mais à une concentration plus faible (88.3 µg $Cl.l^{-1}$). A l'aval de la ville de Metz, la concentration en AOX diminue et se stabilise autour de 60 µg $Cl.l^{-1}$.

L'évolution de la charge en AOX dans la rivière Moselle est semblable à celle de la concentration, passant de 0.52 $g.s^{-1}$ (Saulx) à plus de 10 $g.s^{-1}$ (Apach).

Les principaux affluents prospectés présentent des concentrations en AOX de 25.1 µg $Cl.l^{-1}$ (Vologne), 98.6 µg $Cl.l^{-1}$ (Meurthe) et 66.9 µg $Cl.l^{-1}$ (Seille).

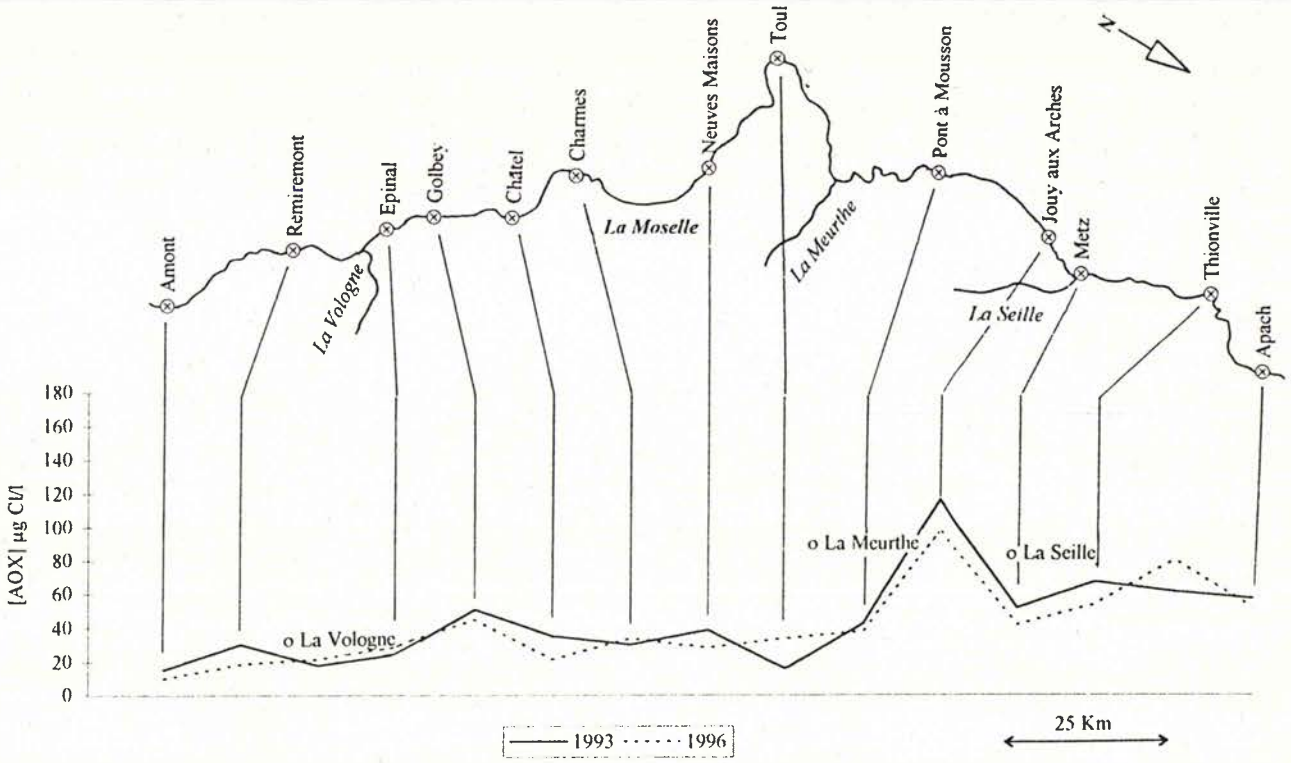


Figure 3.2 : Profils longitudinaux des concentrations en AOX dans l'eau de la Moselle en 1993 et 1996.

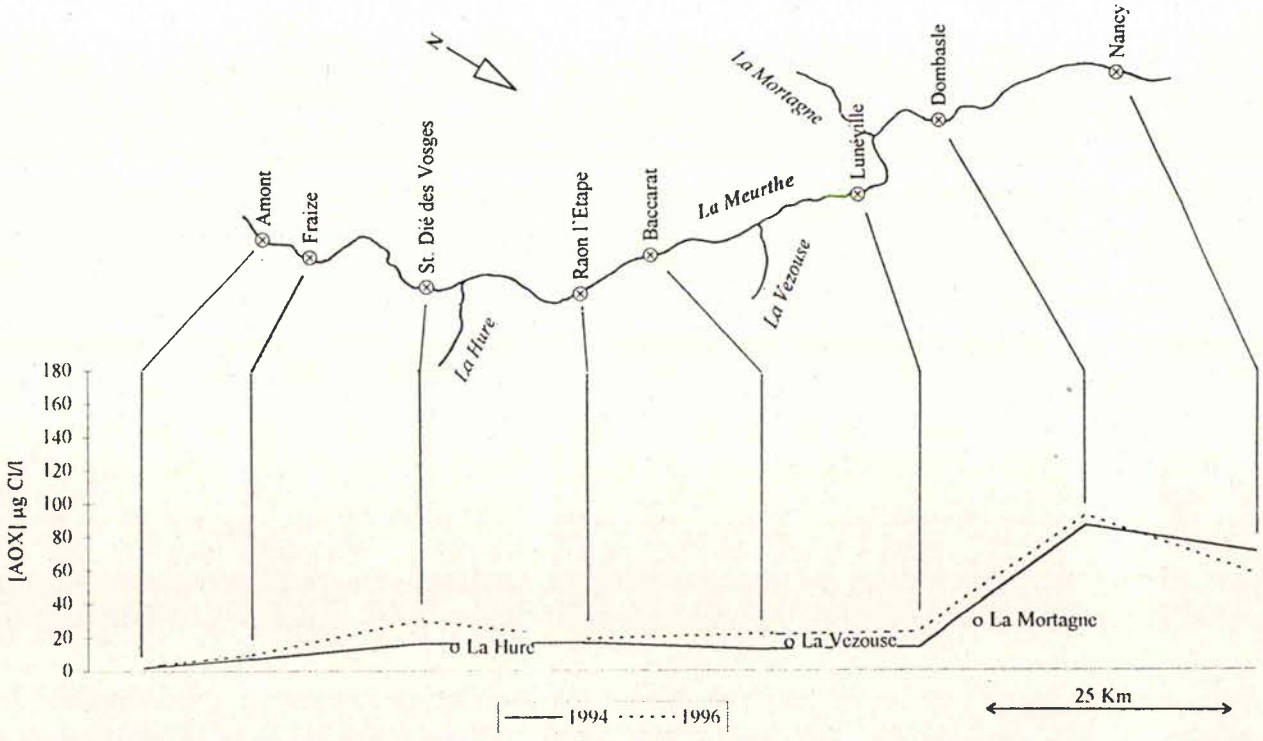


Figure 3.3 : Profils longitudinaux des concentrations en AOX dans l'eau de la Meurthe en 1994 et 1996.

III.2.3.2. La Meurthe (Figure 3.3)

La rivière Meurthe prend également sa source dans le massif vosgiens, au pied du col du Bonhomme. Elle coule du Sud au Nord, presque parallèlement à la Moselle, dans laquelle elle se jette après environ 170 Km, à l'aval de la ville de Nancy.

Comme pour la Moselle, la première station, située en amont de toute activité anthropique présente déjà une concentration en AOX non nulle. Avec 5.7 et 6.6 µg $Cl.l^{-1}$, respectivement en 1994 et 1996, ces concentrations sont toutefois inférieures à celles de la station la plus en amont sur la Moselle. La teneur en AOX augmente progressivement, atteint un premier maximum à l'aval de la ville de St. Dié dans les Vosges (16.1 µg $Cl.l^{-1}$ en 1994 et 29.6 µg $Cl.l^{-1}$ en 1996), puis se stabilise. A l'aval de Dombasle, la concentration en AOX augmente très fortement, avec des maximales de 86.2 et 92.7 µg $Cl.l^{-1}$, respectivement en 1994 et 1996, puis diminue légèrement jusqu'à 60-70 µg $Cl.l^{-1}$ avant la confluence avec la Moselle.

L'évolution de la charge en AOX présente le même profil que les concentrations ; elle passe de 0.026 $g.s^{-1}$ (Fraize) à plus de 8 $g.s^{-1}$ en amont de la confluence avec la Moselle.

Les affluents de la Meurthe qui ont été échantillonnés présentent des concentrations relativement faibles en AOX avec 10.4 µg $Cl.l^{-1}$ (Hure), 12.4 µg $Cl.l^{-1}$ (Vezouse) et 22.7 µg $Cl.l^{-1}$ (Mortagne).

III.2.3.3. La Meuse (Figure 3.4)

Le fleuve Meuse prend sa source à Pouilly en Bassigny, sur le plateau de Langres. Il coule du Sud au Nord sur une distance de 950 Km, à travers la France, la Belgique et les Pays-Bas, avant de se jeter dans la mer du nord. Sur les 500 Km de cours en France, un tronçon d'environ 250 Km, entre la ville de St. Mihiel et la frontière franco-belge, a été échantillonné.

De St. Mihiel à Dun sur Meuse, la concentration en AOX est relativement faible et stable, avec une valeur de l'ordre de 15 à 20 µg $Cl.l^{-1}$. Deux pics importants apparaissent sur le profil de la Meuse. Le premier se situe à l'aval de la ville de Stenay où la concentration en AOX passe au dessus de 30 µg $Cl.l^{-1}$, et le deuxième entre Mouzon et Bazeilles sur Meuse, au niveau de la confluence avec la rivière Chiers et où la concentration en AOX passe au dessus de 40, voir de 60 µg $Cl.l^{-1}$. A l'aval de Bazeilles sur Meuse, la concentration diminue et est de l'ordre de 20 à 30 µg $Cl.l^{-1}$ à la frontière avec la Belgique.

L'évolution des charges en AOX est similaire à celle des concentrations, et passe de 1.21 $g.s^{-1}$ (St. Mihiel) à 8 $g.s^{-1}$ (Givet).

Le seul affluent de la Meuse ayant été échantillonné est la Chiers, avec une concentration de plus de 45 µg $Cl.l^{-1}$.

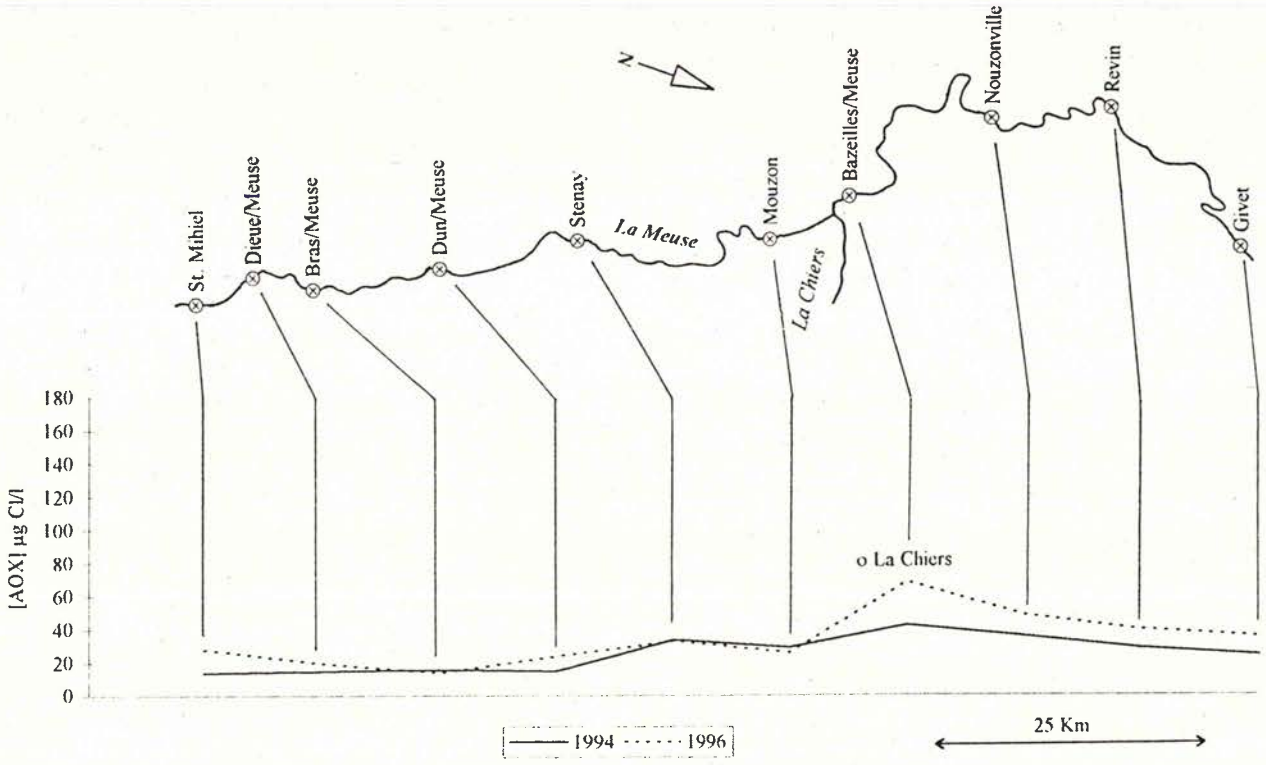


Figure 3.4 : Profils longitudinaux des concentrations en AOX dans l'eau de la Meuse en 1994 et 1996.

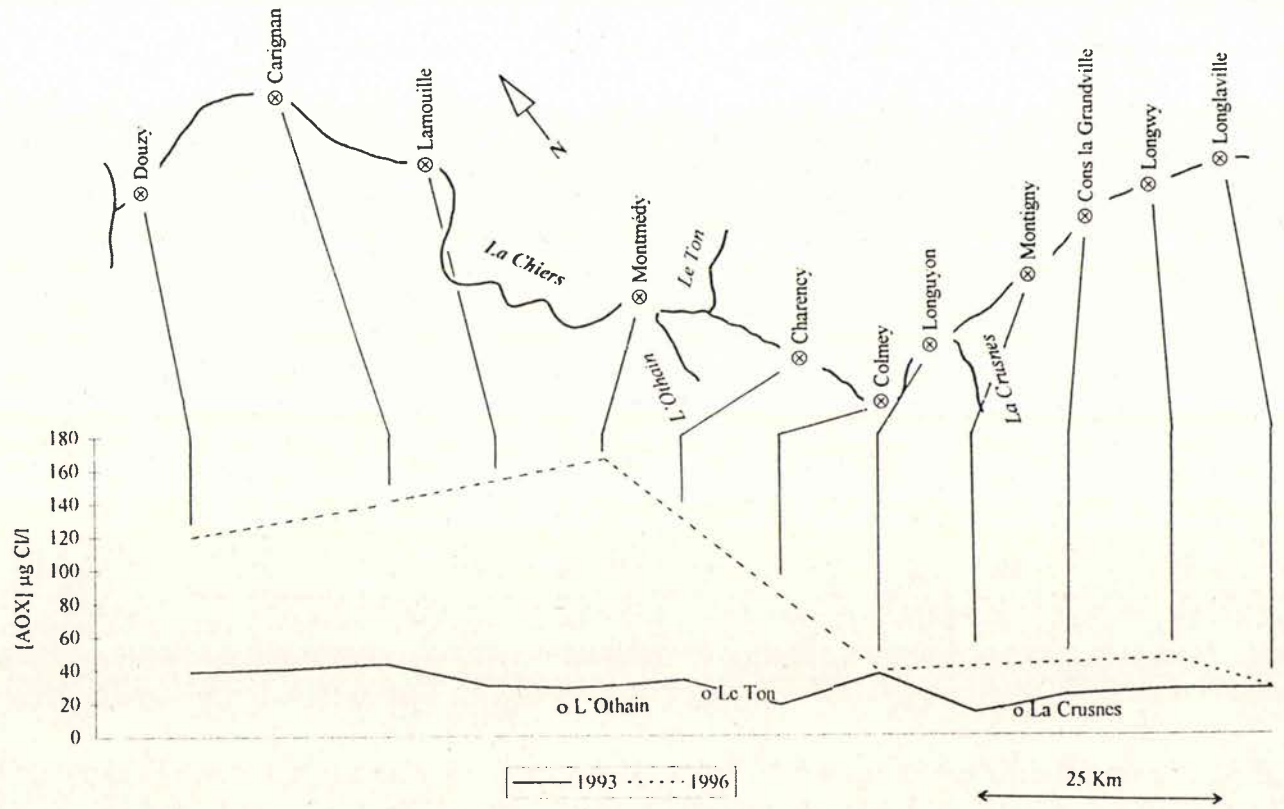


Figure 3.4 : Profils longitudinaux des concentrations en AOX dans l'eau de la Chiers en 1993 et 1996.

III.2.3.4. La Chiers (Figure 3.5)

La rivière Chiers prend sa source au Grand Duché du Luxembourg, et traverse le Nord-Est de la France d'Est en Ouest avant de confluer avec la Meuse après un parcours d'environ 135 Km.

A l'aval de la ville de Longwy la contamination par les AOX est déjà relativement élevée, avec une concentration de respectivement 27.2 et 45.4 µg $Cl.l^{-1}$ en 1993 et 1996. La partie aval de la Chiers est la seule, parmi tous les cours d'eau étudiés, à présenter de grandes différences dans les concentrations en AOX entre les deux séries de campagnes. Durant la première campagne, les concentrations sont relativement stables aux environs de 30 à 40 µg $Cl.l^{-1}$, alors qu'en 1996, les concentrations augmentent fortement entre Longuyon et Montmédy, après confluence avec la rivière Ton. Ceci s'explique par un arrêt de production de juillet 1993 à février 1994 (cf. § III.3) de l'usine de pâte à papier de Harnoncourt située sur le Ton.

Les flux en AOX calculés en fonction des débits du jour de prélèvements en 1993 passent de 0.042 $g.s^{-1}$ (Cons la Grandville) à 0.43 $g.s^{-1}$ (Carignan).

La Crusne, le Ton et l'Othain, principaux affluents de la Chiers présentent des concentrations en AOX de respectivement 8.6, 35.2 et 30.6 µg $Cl.l^{-1}$ en 1993. Le Ton est le seul affluent à avoir été échantillonné en 1996, sa concentration en AOX est de 245.3 µg $Cl.l^{-1}$.

III.3. Etude temporelle : suivi de la concentration en AOX dans l'eau et les sédiments

III.3.1. Présentation des stations d'étude

Huit stations (Tableau 3.2) localisées sur trois cours d'eau : le Ton, la Chiers et la Meuse, d'un même système hydrique du Nord-Est de la France ont fait l'objet d'un suivi mensuel de la concentration en AOX dans l'eau et les sédiments, de mai 1993 à novembre 1994. Ces stations ont été sélectionnées en raison de leur situation géographique par rapport à une source importante de pollution par les composés organo-halogénés, et correspondent toutes sauf une à des stations du Réseau National de Bassins (Figure 3.6).

III.3.2. Protocole de prélèvement

A chaque campagne mensuelle, de l'eau est récoltée dans le courant des cours d'eau au niveau des huit stations à l'aide d'une perche de 3 mètres de long. Deux prélèvements de sédiments sont réalisés à l'aide d'une benne à sédiments, en deux endroits différents de la station, puis mélangés afin d'obtenir un échantillon moyen homogène. L'eau et les sédiments sont ramenés au laboratoire dans des glacières puis traités, préparés et dosés selon les protocoles décrits aux § II.4.2 et II.4.3.

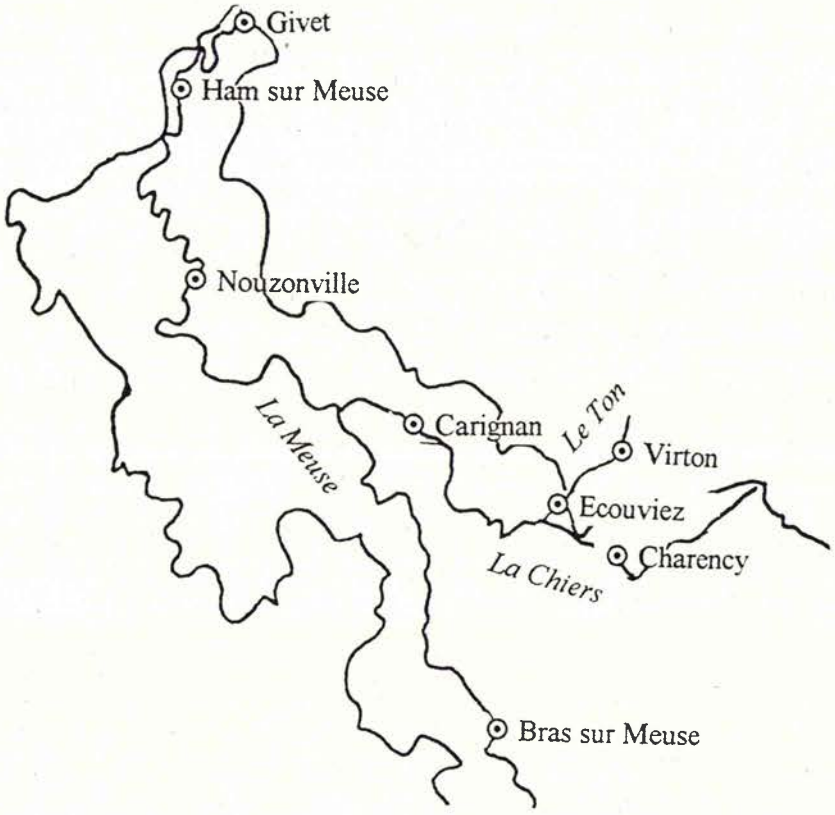


Figure 3.6 : Locaisation géographique des stations de l'étude temporelle des concentrations en AOX.

Tableau 3.2 : Stations d'étude de l'étude temporelle des concentations en AOX dans l'eau et les sédiments.

Nom de la station	Cours d'eau	Numéro RNB
Virton	Ton	-
Ecouviez	Ton	115 775
Charency	Chiers	115 750
Carignan	Chiers	116 000
Bras sur Meuse	Meuse	112 000
Nouzonville	Meuse	119 000
Ham sur Meuse	Meuse	123 000
Givet	Meuse	124 000

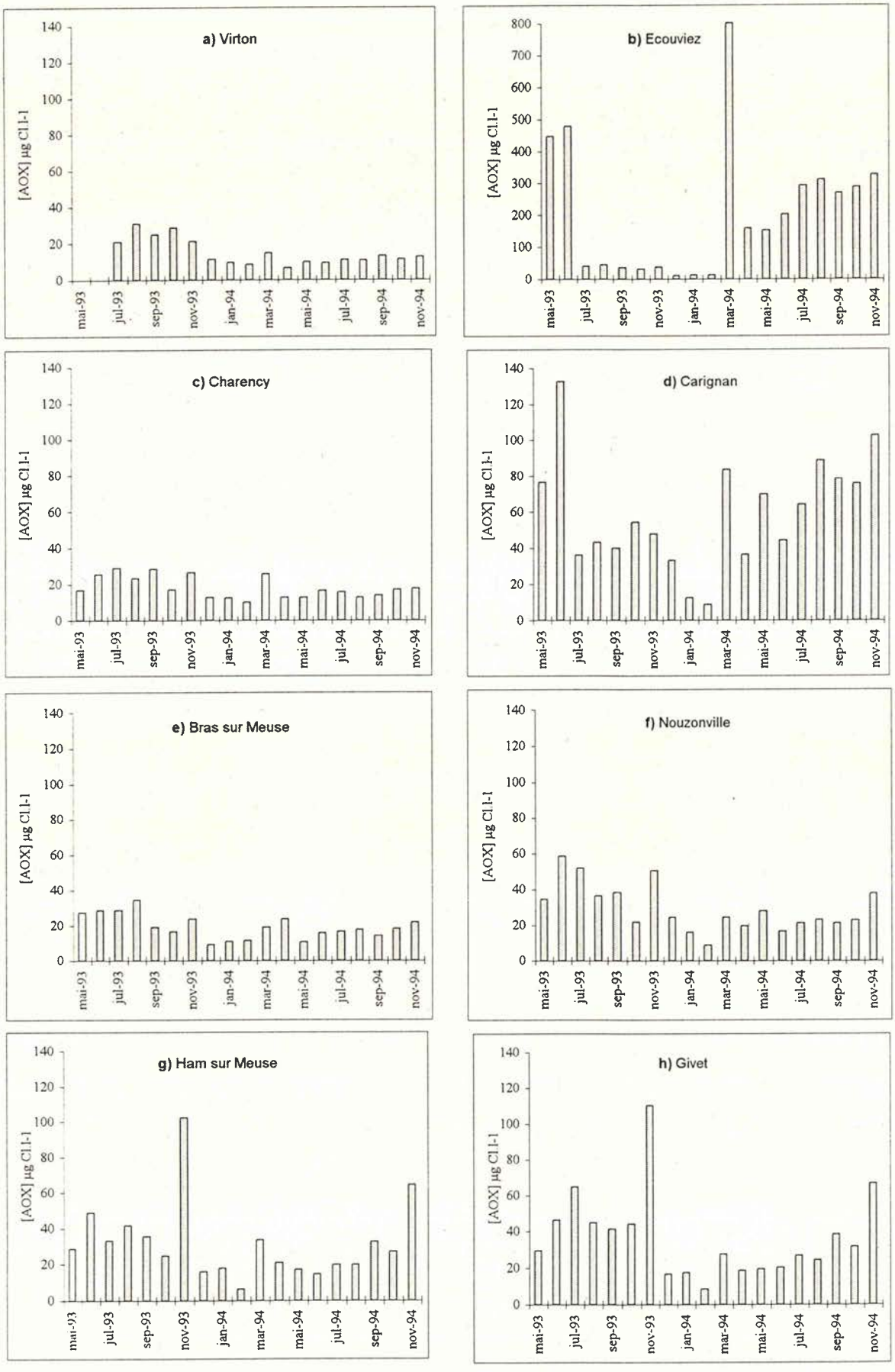


Figure 3.7 : Evolution des concentrations en AOX dans l'eau en fonction du temps et des stations.

III.3.3.Résultats

Les résultats brutes des concentrations en AOX dans l'eau et les sédiments sont présentés dans l'annexe A.

III.3.3.1. Concentrations en AOX dans l'eau

L'évolution temporelle des concentrations en AOX dans l'eau des huit stations est illustrée par les figures 3.7a à 3.7h. Au niveau de la station Virton, les concentrations en AOX sont relativement faibles, avec une moyenne de 14.9 µg $Cl.l^{-1}$. A l'aval des rejets de l'usine de pâte à papier, la concentration en AOX augmente fortement avec une moyenne de 207.8 µg $Cl.l^{-1}$, soit 14 fois plus élevée qu'à l'amont (Tableau 3.3). Les importantes variations observées, sont dues à une période de non activité de l'usine entre juillet 1993 et février 1994. Cependant, même durant l'arrêt des rejets, les concentrations en AOX dans l'eau restent supérieures à celles de la station Virton. La remise en marche de l'usine en mars 1994, se caractérise par un pic de plus de 800 µg $Cl.l^{-1}$, provenant certainement du nettoyage des installations. Au fur et à mesure de la reprise de l'activité, les concentrations en AOX augmentent progressivement, passant de 158.5 µg $Cl.l^{-1}$ à 325.0 µg $Cl.l^{-1}$ entre avril et novembre 1994, soit des concentrations 21 à 27 fois plus élevées qu'à l'amont.

Tableau 3.3 : Concentrations moyennes, minimales et maximales en AOX dans l'eau (µg $Cl.l^{-1}$).

Station	Rivière	Moyenne	Ecart type	Minimum	Maximum	n
Virton	Ton	14.9	7.4	6.4	30.8	17
Ecouviez	Ton	207.8	209.7	11.0	802.2	19
Charency	Chiers	18.1	6.1	9.9	28.7	19
Carignan	Chiers	59.3	31.0	8.6	132.7	19
Bras/Meuse	Meuse	19.3	7.0	9.0	34.4	19
Nouzonville	Meuse	29.4	13.4	8.8	58.8	19
Ham/Meuse	Meuse	31.9	21.8	6.4	102.2	19
Givet	Meuse	36.8	23.9	8.5	110.3	19

Au niveau des deux stations localisée sur la Chiers, on constate une évolution similaire à celle rencontrée pour les stations situées sur le Ton. En effet, les concentrations en AOX de la station Charency, située avant la confluence avec le Ton, sont relativement faibles, et avec une moyenne de 18.1 µg $Cl.l^{-1}$, elles sont du même ordre de grandeur que celles mesurées à la station Virton, sur le Ton en amont de l'usine. La station Carignan se caractérise par une concentration moyenne en AOX de 59.3

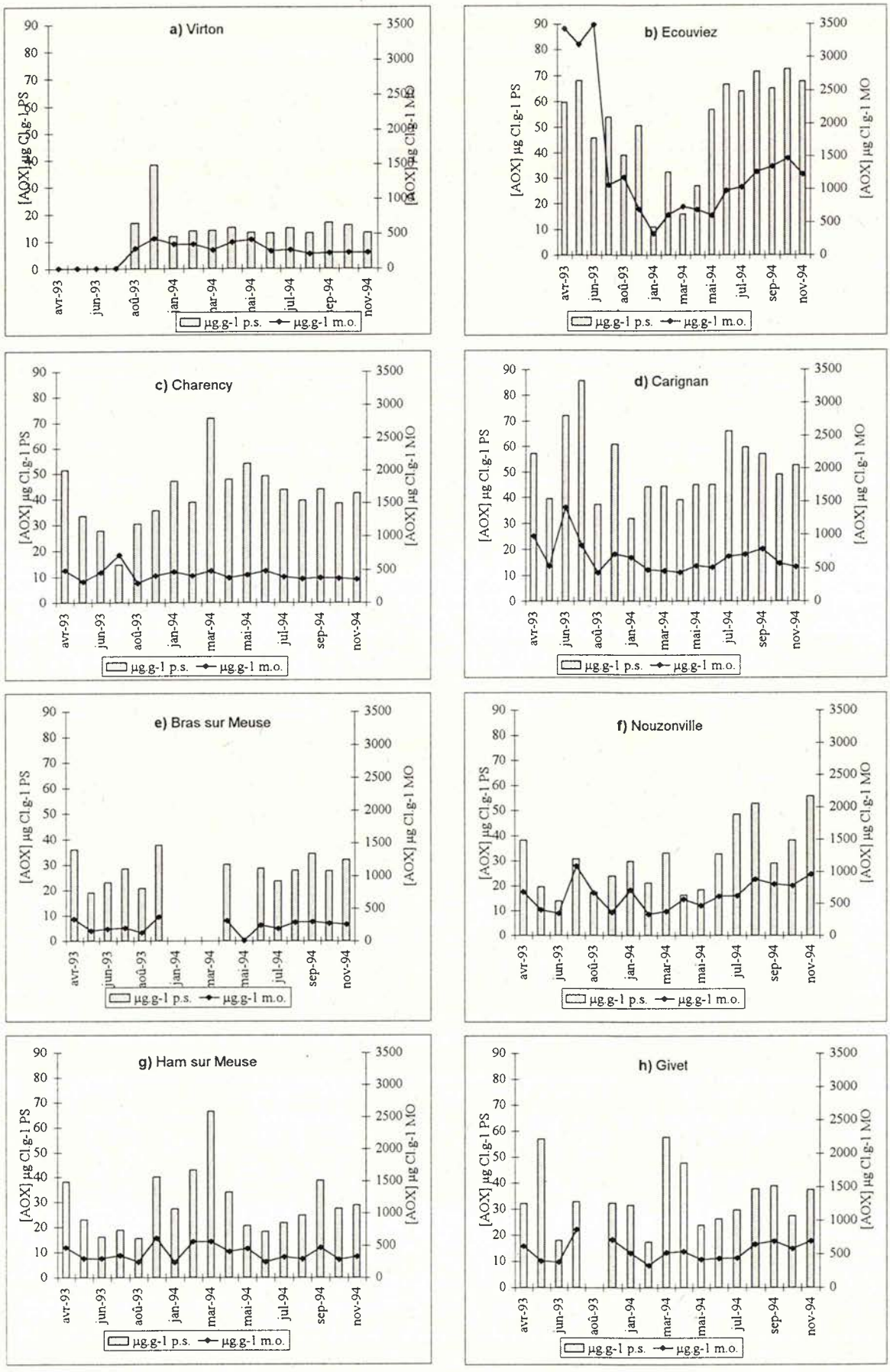


Figure 3.8 : Evolution des concentrations en AOX dans les sédiments en fonction du temps et des stations

µg $Cl.l^{-1}$, soit 3.3 fois plus élevée qu'à l'amont. L'évolution des concentrations reflète bien l'activité de l'usine, avec une diminution à partir du mois de juillet 93, puis une augmentation progressive jusqu'à plus de 100 µg $Cl.l^{-1}$ à partir de mars 1994.

Les concentrations moyennes en AOX dans l'eau de la Meuse augmentent de l'amont vers l'aval, passant de 19.3 µg $Cl.l^{-1}$ à Bras sur Meuse, à 36.8 µg $Cl.l^{-1}$ à Givet. La confluence avec la Chiers, entre Bras sur Meuse et Nouzonville se traduit par une augmentation moyenne de la concentration en AOX par un facteur 1.5. Les quatre stations localisée sur la Meuse présentent un important pic de concentration en AOX en novembre 1993, au moment où ont commencé les fortes crues de l'hiver 1993-94. Ce pic est suivi, pour toutes les stations, d'une diminution importante des concentrations dans l'eau.

III.3.3.2. Concentrations en AOX dans les sédiments

Les concentrations en AOX dans les sédiments sont exprimées en fonction du poids sec (µg Clg^{-1} PS). Mais, étant donné que la nature et la composition du sédiment varient beaucoup au cours du temps et en fonction des stations (tableau 3.4), et que les composés organo-halogénés s'accumulent dans la partie organique du sédiment, il est difficile de comparer les concentrations entre elles.

Aussi, après avoir déterminé la perte au feu du sédiment, les concentrations en AOX sont également exprimées en fonction de la matière organique (µg $Cl.g^{-1}$ MO).

Tableau 3.4 : Pourcentages moyens et extrêmes en matière organique dans les sédiments (% du PS).

Station	Rivière	Moyenne	Ecart type	Minimum	Maximum	n
Virton	Ton	5.6	1.7	3.3	9.1	13
Ecouviez	Ton	4.7	2.2	1.3	9.6	17
Charency	Chiers	10.4	2.9	2.1	15.1	17
Carignan	Chiers	8.3	1.7	4.9	10.3	17
Bras/Meuse	Meuse	12.1	2.2	9.7	17.9	13
Nouzonville	Meuse	5.1	1.8	2.6	8.9	17
Ham/Meuse	Meuse	8.0	2.0	4.6	12.0	17
Givet	Meuse	6.6	2.8	3.8	14.5	16

Les figures 3.8a à 3.8h illustrent l'évolution temporelle des concentrations en AOX dans les sédiments des huit stations étudiées.

Au niveau de la station Virton, les concentrations varient peu, avec une moyenne de 16.1 µg $Cl.g^{-1}$ PS (Tableau 3.5), soit, 293.2 µg $Cl.g^{-1}$ MO (Tableau 3.6). A l'aval des rejets de l'usine de pâte à

papier, la concentration moyenne augmente d'un facteur 3.2 et 4.6, si on l'exprime respectivement en fonction du poids sec (51.0 µg $Cl.g^{-1}$ PS) et en fonction des matières organiques (1365.3 µg $Cl.g^{-1}$ MO). Comme pour les concentrations dans l'eau, l'interruption de l'activité de l'usine se traduit par une diminution des concentrations en AOX dans les sédiments, surtout si elles sont exprimées en fonction de la matière organique. Si l'on considère les concentrations en fonction du poids sec, la diminution n'est pas importante au début, mais devient marquée à partir du mois de janvier. La reprise de l'activité de l'usine se traduit par une augmentation progressive des concentrations à partir du mois de mars.

Tableau 3.5: Concentrations moyennes et extrêmes en AOX dans les sédiments (µg $Cl.g^{-1}$ PS).

Station	Rivière	Moyenne	Ecart type	Minimum	Maximum	n
Virton	Ton	16.1	6.8	11.7	38.2	13
Ecouviez	Ton	51.0	19.5	10.9	72.5	17
Charency	Chiers	41.8	12.4	14.7	71.9	17
Carignan	Chiers	52.1	13.9	31.9	85.5	17
Bras/Meuse	Meuse	28.4	5.7	19.0	37.7	13
Nouzonville	Meuse	30.5	12.9	13.9	55.8	17
Ham/Meuse	Meuse	29.6	12.9	15.5	66.4	17
Givet	Meuse	34.2	11.8	17.4	57.8	16

La concentration moyenne dans les sédiments de la Chiers, augmente d'un facteur 1.26 (en fonction du poids sec) et 1.56 (en fonction de la matière organique) entre la station située en amont (Charency) et la station située en aval (Carignan) de la confluence avec le Ton.

Tableau 3.6 : Concentrations moyennes et extrêmes en AOX dans les sédiments, (µg $Cl.g^{-1}$ MO).

Station	Rivière	Moyenne	Ecart type	Minimum	Maximum	n
Virton	Ton	293.2	76.2	202.4	419.8	13
Ecouviez	Ton	1365.3	1003.3	316.9	3482.9	17
Charency	Chiers	416.6	95.6	286.5	713.3	17
Carignan	Chiers	653.3	245.6	421.9	1398.4	17
Bras/Meuse	Meuse	243.9	73.4	116.4	363.2	13
Nouzonville	Meuse	621.9	226.9	329.4	1077.2	17
Ham/Meuse	Meuse	369.3	120.2	230.9	600.4	17
Givet	Meuse	541.5	147.4	326.4	860.4	16

Les concentrations en AOX dans les sédiments de la station Carignan ne sont que faiblement affectées par la fermeture de l'usine de pâte à papier.

Les concentrations moyennes en AOX dans les sédiments de la Meuse ne varient que légèrement entre les quatre stations, lorsqu'elles sont exprimées en fonction du poids sec. Cependant, en raison des différentes composition du sédiment, de grandes différences apparaissent lorsque les concentrations sont exprimées par rapport à la matière organique.

III.4. Discussion

Un profil longitudinal de la concentration en AOX d'un cours d'eau représente une situation momentanée, et ne peut pas être considéré comme représentatif du niveau de contamination de celui-ci. Cependant, il permet une approche générale et la mise en évidence de certaines sources de pollution ponctuelles par les composés organo-halogénés, ainsi qu'une comparaison entre différents cours d'eau (Keller, 1989).

L'allure globale des différents profils est similaire entre 1993 et 1996, avec toutefois des variations dans les niveaux de concentrations. Ces légères différences ne dépassent pas 30 µg $Cl.l^{-1}$, et peuvent s'expliquer de plusieurs manières. Les rejets anthropiques de composés organo-halogénés, qu'ils soient urbains ou industriels, sont variables au cours du temps et dépendent de la période de l'année (vacances ou pas), des jours de la semaine (semaine ou week-end) et même du moment de la journée (Schowanek *et al.*, 1996), mais également des contraintes économiques. Ainsi, durant la période de fermeture de l'usine de pâte à papier de Harnoncourt, suite à une faillite, les concentrations en AOX dans l'eau du Ton et de la Chiers à l'aval des rejets ont fortement diminués de juillet 1993 à février 1994. D'autre part, les différents régimes hydriques sont responsables de dilutions plus ou moins importantes des concentrations en AOX dans l'eau, même si selon Klopp & Kornatzki (1987), il n'existe pas de proportionnalité directe entre ces deux paramètres. En effet, après de fortes précipitations, les débits des cours d'eau augmentent, et les concentrations en AOX diminuent alors que les charges ne varient que peu, suite aux importants apports diffus de composés organo-halogénés provenant du ruissellement (Keller 1989). Lors du lessivage des terres, des produits phytosanitaires (sur les terres agricoles), mais également des composés organo-halogénés produits naturellement (cf. analyse bibliographique) sont entraînés vers les cours d'eau.. Selon Asplund (1992), les phénomènes de bio-halogénation ayant lieu dans le sol, dépendent de la nature de celui-ci, et plus particulièrement du pH et de la quantité de matière organique. Ceci peut en partie expliquer les concentrations en AOX mesurés au niveau des stations situées en tête de bassin de la Moselle et de la Meurthe (5.6 à 15.0 µg $Cl.l^{-1}$), et les différences de concentrations entre ces deux stations. Des concentrations de 10 à 190 µg $Cl.l^{-1}$ ont été mesurées dans des lacs suédois loin de toute source de contamination anthropique, avec

les plus fortes concentrations dans des lacs fortement eutrophisés (Asplund & Grimvall, 1991). D'autre part, les précipitations en elles-mêmes peuvent contribuer aux apports d'AOX dans le milieu naturel, par des dépôts humides de composés organo-halogénés, suite à des transports à longue distance. Selon Enell *et al.* (1989), les dépôts atmosphériques d'AOX en Suède sont de l'ordre de 3500 à 4000 tonnes par an. Les concentrations moyennes en AOX dans les précipitations ont été estimées à 15 µg $Cl.l^{-1}$ en Suède (Enell & Wennberg, 1991), à 7 µg $Cl.l^{-1}$ en Finlande (Jokela *et al.*, 1992) et à 20 µg $Cl.l^{-1}$ en Allemagne (Klopp & Kornatzki, 1987). Les résultats de quelques dosages réalisés sur l'eau de pluie récoltée dans le jardin du cloître des Récollets, situé dans le centre ville de Metz, ont montré des concentrations en AOX variant de 18 à 5 µg $Cl.l^{-1}$, selon que l'eau ait été récolté en début ou en fin de période pluvieuse. Cependant, selon Hoekstra & de Leer (1994), la contribution des précipitations à la concentration totale en AOX dans les eaux de surface reste faible en raison de leur forte nature volatile. Ainsi, les 40 tonnes annuelles d'AOX résultant des dépôts atmosphériques sur le bassin versant du Rhin, ne participent qu'à 0.1 µg $Cl.l^{-1}$ à la concentration totale d'AOX dans ce fleuve.

D'importants pics de concentration en AOX sont observés à l'aval de grandes agglomérations et de rejets industriels où la teneur en AOX augmente d'un facteur 2 voire plus. Des observations similaires ont été faites par Keller (1989), sur quelques grands cours d'eau allemands. Dans notre étude, l'exemple le plus marquant est celui de l'usine de pâte à papier de Harnoncourt, dont les périodes d'activité et de non-activité se matérialisent aussi bien dans le suivi spatiale, par les profils de la Chiers, que dans le suivi temporel au niveau de la station Ecouviez.

Selon Salkinoja-Salonen (1991, *in* Asplund, 1992), les concentrations en chlorures inorganiques dans les micro-organismes aquatiques peuvent contribuer de 0.4 à 40 µg $Cl.l^{-1}$ aux concentrations en AOX, respectivement dans des eaux oligotrophes et fortement eutrophes. Cependant, dans les quatre cours d'eau étudiés, les différences entre eau brute et eau filtrée ne dépassent jamais 10 %, indiquant que la plus grand part des AOX se trouve sous forme dissoute dans ces eaux. Comme dans un étude menée en Suède (Asplund, 1992), où ces différences ne dépassent pas 5 µg $Cl.l^{-1}$, les interférences biologiques sont négligeables dans les eaux de surface courantes.

Les concentrations en AOX rencontrées dans les sédiments lors de l'étude temporelle (§ III.3.) dans les stations situées en amont des rejets de l'usine de pâte à papier (Virton, Charency et Bras-sur-Meuse), ainsi que celles mesurées au niveau des autres stations durant la période de non activité de l'usine, peuvent s'expliquer de deux manières. D'une part, par des phénomènes d'adsorption d'AOX sur les sédiments, même au niveau des stations présentant de faibles concentrations en AOX dans l'eau (Koistinen *et al.*, 1990 ; Maatela *et al.*, 1990). Ce point sera vu plus en détail dans les chapitres IV et V. D'autre part, les concentrations non négligeables en AOX au niveau de stations non soumises aux rejets organo-halogénés anthropiques, renforcent l'hypothèse d'une halogénation naturelle dans l'environnement terrestre et limnique (Asplund & Grimvall, 1991).

Les concentrations « naturelles » moyennes observées (16 à 40 µg $Cl.g^{-1}$ PS) sont légèrement supérieures à celles rencontrées dans le Golf de Bothnie (6 à 17 µg $Cl.g^{-1}$ PS, Palm & Lammi, 1995) et nettement inférieures à celles rencontrées dans le Golf de Finlande (50 à 180 µg $Cl.g^{-1}$ PS, Kankaanpää & Tissari, 1994a).

III.5. Conclusions

Les suivis spatial et temporel de la concentration en AOX dans l'eau fournissent un aperçu du niveau de contamination de plusieurs cours d'eau du Nord-Est de la France. Différentes sources potentielles (agglomérations, industries) ont pu être identifiées et/ou confirmées, dont notamment l'usine de pâte à papier blanchissant au chlore de Harnoncourt, qui rejette ses eaux usées dans le Ton, affluent de la Chiers, elle même affluent de la Meuse. Il est apparu que pour ces cours d'eau, la charge en AOX se trouvait essentiellement (> 90 %) sous forme dissoute, et que l'influence de chlorures biologiques pouvait être négligé. Les résultats observés au niveau des stations situées en tête de bassin versant, en amont de toute activité anthropique, confirment le caractère ubiquiste des composés organo-halogénés dans l'environnement aquatique. Selon les classifications de la RIWA (1992) et de Hoffmann *et al.* (1988), trois groupes de stations peuvent être distingués en fonction de leur concentration en AOX :

- les stations situées en amont des cours d'eau, où les concentrations moyennes en AOX sont inférieures à 25 µg $Cl.l^{-1}$, reflétant une influence anthropique faible,
- les stations intermédiaires, telles que la Meuse aval, la Moselle, la Meurthe et la Chiers amont, présentant une influence anthropique significative, avec des concentrations moyennes en AOX comprises entre 25 et 50 µg $Cl.l^{-1}$,
- les stations présentant un impact anthropique important, situées en aval des grandes agglomérations et des sites industriels, tels que l'usine de Harnoncourt, dont les concentrations moyennes en AOX dépassent 50 µg $Cl.l^{-1}$.

Tous les sédiments analysés présentent des concentrations non négligeables en AOX, qui, mis à part au niveau des stations situées en aval des rejets de l'usine de pâte à papier, varient peu au cours du temps. Selon Asplund (1992), une grande part de ces composés organo-halogénés est d'origine naturelle et provient de réactions de biohalogénation des matières organiques du sol et des sédiments. En raison de la nature, et plus particulièrement du pourcentage de matière organique, variable des sédiments, il est important d'exprimer les concentrations aussi bien en fonction du poids sec que de la matière organique.

Chapitre IV

Accumulation de micropolluants métalliques et organo-halogénés chez *Anodonta cygnea*

IV.1. Introduction - Objectifs de l'étude

Malgré de grands efforts, notamment dans l'épuration des eaux usées, le recyclage des déchets, l'établissement de circuits fermés et la mise en oeuvre 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 de substances toxiques, difficilement dégradables, les EPKB se caractérisent par un grand nombre de paramètres physico-chimiques affectant la qualité de l'eau et la vie aquatique dans le milieu récepteur.

Les mollusques aquatiques filtreurs répondent à la plupart part 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 (Metcalfe & Charlton, 1990), et plus récemment vers les effluents d'usine de pâte à papier blanchissant au chlore.

Les objectifs de cette étude concernent d'une part, les effets d'EPKB de l'usine de Harnoncourt, remise en marche au début du mois de mars 1994 après une fermeture de plus de 8 mois, sur la qualité générale de l'eau et les concentrations en micropolluants organo-halogénés dans l'eau et les sédiments. D'autre part, il s'agit d'évaluer les effets d'EPKB sur la physiologie et la capacité bioaccumulatrice d'un mollusque bivalve, *Anodonta cygnea*, vis-à-vis de micropolluants métalliques et organo-halogénés susceptibles d'être déversés par les effluents de l'usine de pâte à papier.

Deux stations sont sélectionnées sur la rivière Ton, localisées respectivement en amont (station 1) et en aval (station 2) de l'émissaire d'eaux usées de l'usine. Durant 75 jours, l'influence des EPKB sur la qualité physico-chimique générale de l'eau du Ton est suivie à l'aide de 21 paramètres. Les concentrations en AOX sont mesurées à intervalle de temps régulier dans l'eau et dans les sédiments, en amont et en aval des rejets. Les effets sur un mollusque aquatique bivalve, *Anodonta cygnea*, vivant dans le sédiment, sont étudiés par des paramètres physiologiques (mortalité, poids sec et poids de lipides), et par la bioaccumulation de micropolluants métalliques (cuivre, fer, zinc, chrome, nickel, manganèse, cadmium, plomb et arsenic) et organo-halogénés (EOX).

IV.2. Protocole expérimental

La figure 4.1 résume le protocole expérimental, avec les prélèvements des échantillons d'eau, de sédiments et d'anodontes au cours de 75 jours de l'étude.

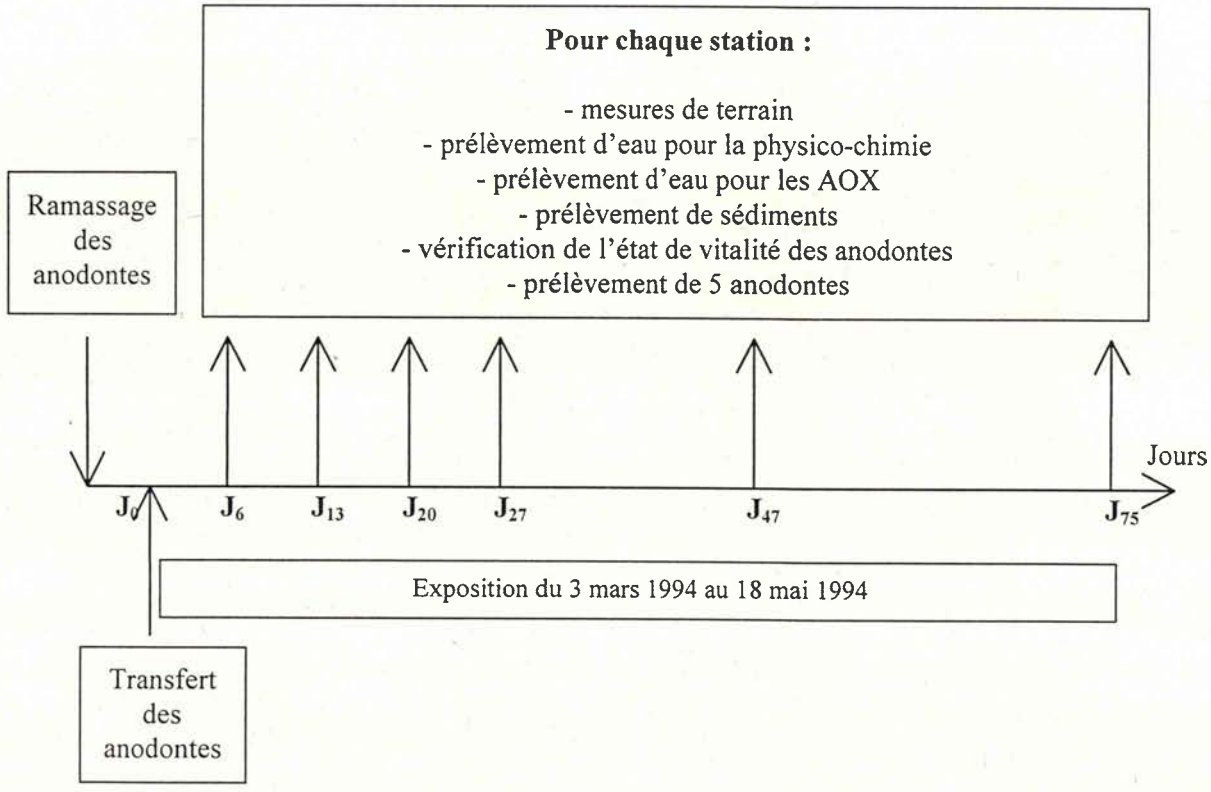


Figure 4.1 : Protocole expérimental de l'étude d'accumulation de micropolluants métalliques et organo-halogénés par *Anodonta cygnea*.

IV.2.1. Collecte, conditionnement, transfert et exposition des anodontes

Environ 100 anodontes de taille comprise entre 55 et 75 mm sont ramassés à la fin du mois de février 1994 dans la Meuse au niveau de la station Ham-sur-Meuse (Chapitre III), à une profondeur d'environ 60 cm. Au laboratoire, les anodontes sont triés, et 85 individus de taille homogène sont retenus, et conditionnés selon le protocole décrit au § II.2.2. Avant le transfert, les anodontes sont divisés en trois lots : un lot témoin de 5 individus et deux lots de 40 individus destinés au transfert et à l'exposition au niveau des stations 1 et 2, respectivement en amont et en aval des rejets de l'usine de pâte à papier de Harnoncourt.

IV.2.2. Prélèvement et analyse de l'eau

Le pH, la conductivité, la température et la concentration en oxygène dissous sont mesurés à chaque campagne de prélèvement, soit le jour du transfert, et après 6, 13, 20, 27, 47 et 75 jours d'exposition. Des échantillons d'eau pour les analyses physico-chimiques et pour le dosage des AOX (c.f. § II.4.2.) sont prélevés aux mêmes dates et aux deux stations.

IV.2.3. Prélèvement et analyse des sédiments

Des prélèvements de sédiments pour la détermination du pourcentage de matière organique et pour le dosage des AOX (c.f. § II.4.3.) sont réalisés au niveau des deux stations, aux mêmes dates que les prélèvements d'eau.

IV.2.4. Prélèvement et analyse des anodontes

Lors de chaque campagne de prélèvement, les cages d'exposition des anodontes sont sorties de l'eau, et l'état de vitalité de tous les animaux est vérifié. Des lots de cinq anodontes, sélectionnés au hasard, sont prélevés aux deux stations et aux mêmes dates que les échantillons d'eau et de sédiment. Les anodontes sont ramenés au laboratoire dans des bocaux en verre contenant de l'eau de la station d'exposition. Après dissection, les parties molles des cinq anodontes sont broyées et homogénéisées ensemble. Chaque homogénat est divisé en quatre sous-échantillons, deux pour les extractions et le dosage des EOX selon le protocole décrit au § II.4.4., et deux pour le dosage des micropolluants métalliques. Ces derniers sont séchés à l'étuve à 60°C pendant 48 heures, puis les tissus séchés sont broyés dans un mortier en porcelaine jusqu'à obtention d'une poudre fine. Environ 300 mg de matière sèche de chaque sous-échantillon, pesés précisément, sont minéralisés à chaud en présence d'acide nitrique selon le protocole décrit par Mersch (1993). Les concentrations en micropolluants métalliques

sont déterminées par spectrophotométrie d'absorption atomique soit en flamme (cuivre, fer, cadmium, plomb, zinc, chrome, nickel, manganèse), soit par la méthode des hydrures (arsenic).

IV.2.5. Etude statistique

Les différents paramètres physico-chimiques, ainsi que les concentrations en AOX dans l'eau et les sédiments sont comparés à l'aide du test T de Student, au seuil de 0.05. Afin d'homogénéiser la présentation des résultats, le terme d'écart type est également employé pour les échantillons d'anodontes analysés en duplicats, sachant qu'il évoque plutôt un écart à la moyenne. Les concentrations moyennes (sur les 75 jours d'exposition) en EOX et en micropolluants métalliques dans les anodontes exposés aux deux stations sont également comparées à l'aide du test T de Student, au seuil de 0.05.

IV.3. Résultats

IV.3.1. Résultats des analyses de l'eau

IV.3.1.1. Physico-chimie de l'eau

Les résultats de l'analyse physico-chimique de l'eau au niveau des deux stations d'exposition sont résumés dans le tableau 4.1. Globalement on constate une dégradation générale de la qualité de l'eau, se traduisant notamment par une diminution significative du pH et de la concentration en oxygène dissous, et par une augmentation des autres paramètres. La température moyenne augmente de 2.7°C entre la station 1 et la station 2, et la conductivité moyenne est multipliée par un facteur de 1.5, tout comme la majorité des anions (Cl^-x3.2, Br^-x22.7, SO_4^{2-}x 2.3) et des cations. Les matières en suspension et la demande chimique en oxygène augmentent d'un facteur de plus de 2.6. Mis à part pour les orthophosphates, on n'observe pas de différence significative dans les concentrations des autres éléments nutritifs.

IV.3.1.2. Contamination de l'eau par les AOX

Au niveau de la station 1 les concentrations en AOX varient peu (Figure 4.2), avec une moyenne de 9.3 ± 4.2 µg $Cl.l^{-1}$. Par contre, au niveau de la station 2, la teneur en AOX augmente fortement durant les 13 premiers jours, passant à près de 1000 µg $Cl.l^{-1}$, avant de diminuer et de se stabiliser aux environs de 100 µg $Cl.l^{-1}$ durant les 50 derniers jours de l'expérience. Avec une moyenne de 407.9 ± 343.2 µg $Cl.l^{-1}$, la concentration en AOX est significativement plus élevée à la station 2 qu'à la station 1.

Tableau 4.1 : Physico-chimie de l'eau des deux stations (* : différence significative entre la station 1 et la station 2 ; n.s. : différence non significative).

Paramètre	Unité	Station 1	Station 2		n
pH		8.13 ± 0.06	8.05 ± 0.04	*	7
Conductivité	$\mu S.cm^{-1}$	353 ± 9	542 ± 34	*	7
Température	°C	8.7 ± 1.9	11.4 ± 2.3	*	7
Oxygène dissous	$mg.l^{-1}$	10.83 ± 0.98	9.69 ± 0.91	*	7
Matières en suspension	$mg.l^{-1}$	16.08 ± 9.12	43.76 ± 20.43	*	7
DBO_5	$mg.l^{-1}$	4.68 ± 1.65	6.65 ± 2.90	n.s.	4
DCO	$mg.l^{-1}$	12.25 ± 3.69	32.25 ± 7.29	*	4
Cl^-	$mg.l^{-1}$	11.14 ± 1.54	35.51 ±10.96	*	7
F^-	$mg.l^{-1}$	0.12 ± 0.03	0.17 ± 0.05	*	7
Br^-	$mg.l^{-1}$	0.03 ± 0.04	0.68 ± 0.79	n.s.	7
K^+	$mg.l^{-1}$	2.77 ± 0.77	4.03 ± 1.22	n.s.	6
Na^+	$mg.l^{-1}$	29.28 ± 33.17	38.93 ± 17.11	n.s.	6
Ca^{2+}	$mg.l^{-1}$	79.2 ± 8.3	89.65 ± 7.26	*	6
Mg^{2+}	$mg.l^{-1}$	3.92 ± 0.23	3.99 ± 0.27	n.s.	6
NO_2^-	$mg.l^{-1}$	0.11 ± 0.03	0.17 ± 0.29	n.s.	7
NO_3^-	$mg.l^{-1}$	8.47 ± 0.44	8.15 ± 0.69	n.s.	7
NH_4^+	$mg.l^{-1}$	0.23 ± 0.01	0.18 ± 0.06	n.s.	3
N Kjeldahl	$mg.l^{-1}$	2.22 ± 1.01	1.75 ± 0.84	n.s.	3
PO_4^{3-}	$mg.l^{-1}$	0.2 ± 0.03	0.11 ± 0.04	*	7
P Total	$mg.l^{-1}$	0.16 ± 0.0	0.17 ± 0.02	n.s.	3
SO_4^{2-}	$mg.l^{-1}$	26.79 ± 1.47	60.67 ± 27.45	*	7

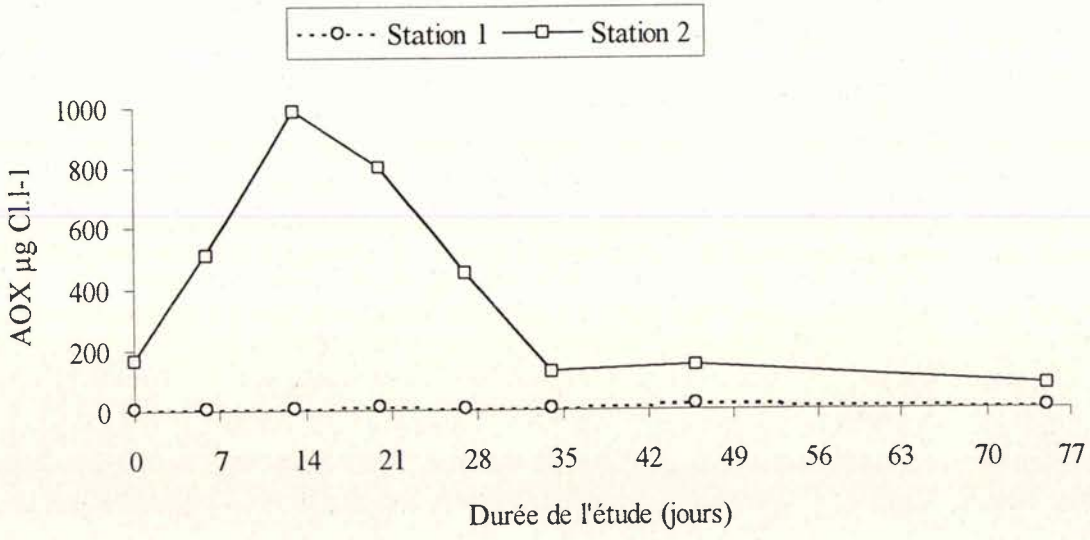


Figure 4.2 : Evolution de la concentration en AOX dans l'eau au niveau des deux stations.

IV.3.2. Résultats des analyses des sédiments

Lorsque les concentrations en AOX dans les sédiments sont exprimées en fonction du poids sec de celui-ci, on observe de fortes variations (CV > 35%) au niveau des deux stations (figure 4.3).

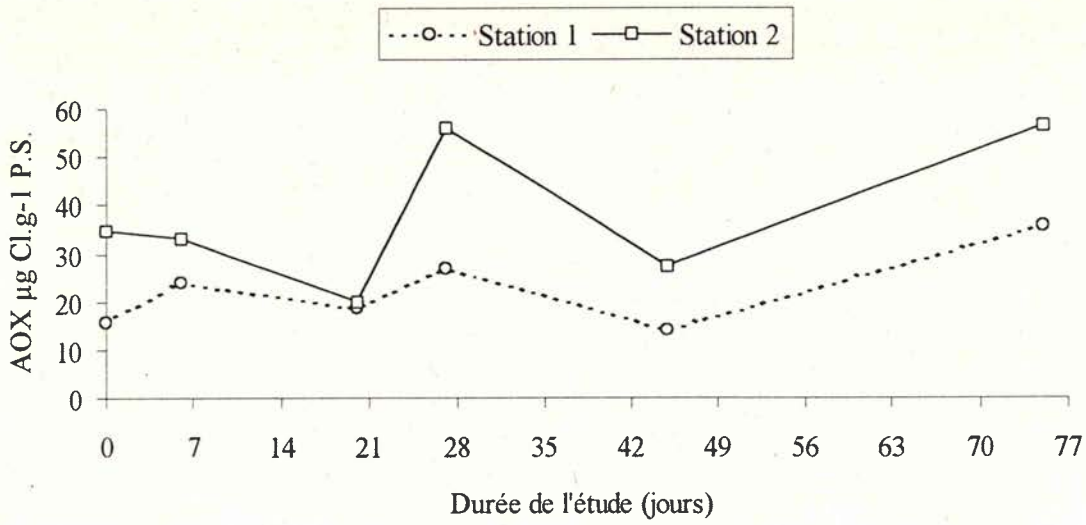


Figure 4.3 : Evolution de la concentration en AOX, exprimée par rapport au poids sec, dans les sédiments au niveau des deux stations.

En raison de la composition variable des sédiments (pourcentage de matière organique), ces variations s'atténuent (CV < 20%) lorsque les concentrations sont exprimées en fonction de la matière organique (figure 4.4).

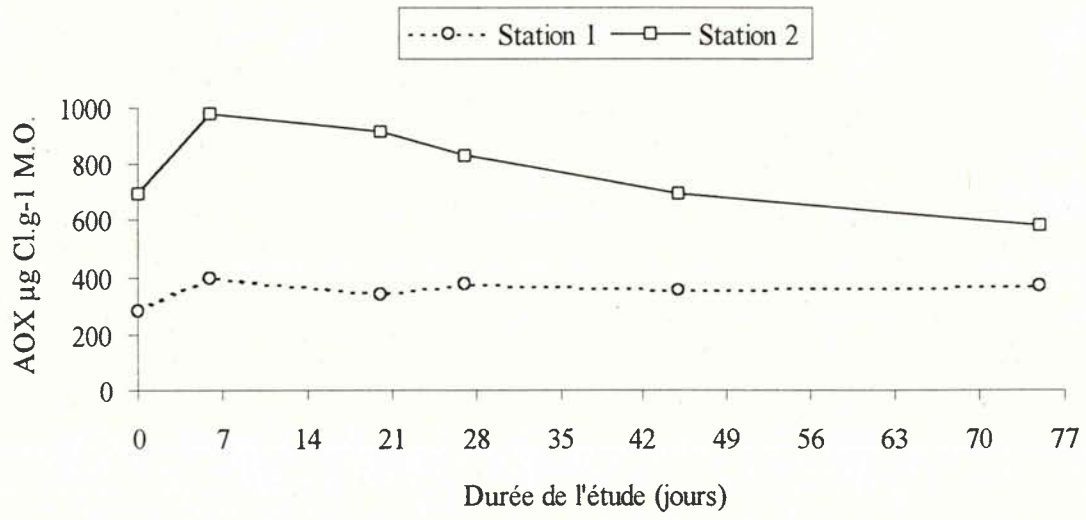


Figure 4.4 : Evolution de la concentration en AOX, exprimée par rapport à la matière organique, dans les sédiments au niveau des deux stations.

Dans les deux cas, les concentrations moyennes des deux stations sont significativement différentes (tableau 4.2). Au niveau de la station 2, les concentrations en AOX, exprimées en fonction de la matière organique, augmentent durant les 6 premiers jours, passant de 693.4 à 980.3 µg $Cl.g^{-1}$ MO, puis diminuent lentement, alors qu'elles sont relativement stables au cours des 75 jours d'exposition à la station 1.

Tableau 4.2 : Concentrations en AOX (moyenne ± écart type), et pourcentage de matière organique dans les sédiments (* : différence significative entre la station 1 et la station 2, n.s. : différence non significative).

	Station 1	**Station 2**		**n**
[AOX] µg $Cl.g^{-1}$ PS	22.5 ± 8.0	37.9 ± 14.9	*	6
% matière organique	6.3 ± 1.9	5.1 ± 2.7	n.s.	6
[AOX] µg $Cl.g^{-1}$ MO	353.9 ± 40.9	783.0 ± 151.0	*	6

IV.3.3. Résultats des analyses des anodontes

IV.3.3.1. Condition physiologique

La condition physiologique des anodontes exposés au niveau des deux stations est suivie par la mortalité et par l'évolution des pourcentages de poids sec et de lipides.

IV.3.3.1.1 Mortalité, comportement

Durant les 75 jours d'exposition, aucun anodonte n'est mort, ni à la station 1, ni à la station 2 Cependant, une différence comportementale est observée entre les animaux des deux stations. En effet, lors de chaque campagne de prélèvement, les anodontes de la station 1 présentent un pied largement dévaginé ainsi que des coquilles entr'ouvertes, laissant paraître les siphons en activité de filtration. Par contre, au niveau de la station 2, les coquilles des anodontes sont souvent fermées et leur pied n'est que rarement et faiblement sorti.

IV.3.3.1.2. Pourcentage de poids sec et pourcentage de lipides

Le pourcentage de poids sec des anodontes exposés au niveau de la station 1 augmente avec le temps d'exposition, alors qu'il a tendance à diminuer au niveau de la station 2, sauf pour les animaux

issus du dernier prélèvement (Figure 4.5a). Cependant, le pourcentage de poids sec moyen, calculé sur les 75 jours d'exposition n'est pas statistiquement différent, ni entre les deux stations, ni entre les stations et les témoins (Tableau 4.3).

Tableau 4.3 : Pourcentages de poids sec et pourcentage de lipides chez les anodontes témoins et exposés aux deux stations (moyenne ± écart type).

	Témoins (n=2)	**Station 1 (n=12)**	**Station 2 (n=12)**
Poids sec (% poids frais)	7.7 ± 0.6	9.8 ± 3.5	7.6 ± 2.7
Lipides (% poids sec)	7.4 ± 0.2	6.5 ± 0.9	5.8 ± 1.1

Le pourcentage de lipides diminue légèrement à partir du 13ème jour d'exposition, aussi bien en amont qu'en aval des rejets, et il est généralement légèrement inférieur chez les anodontes exposés à la station aval (Figure 4.5b). Comme pour le poids sec, le pourcentage de lipides moyen calculé sur les 75 jours d'exposition n'est pas statistiquement différent, ni entre les deux stations, ni entre les stations et les témoins (Tableau 4.3).

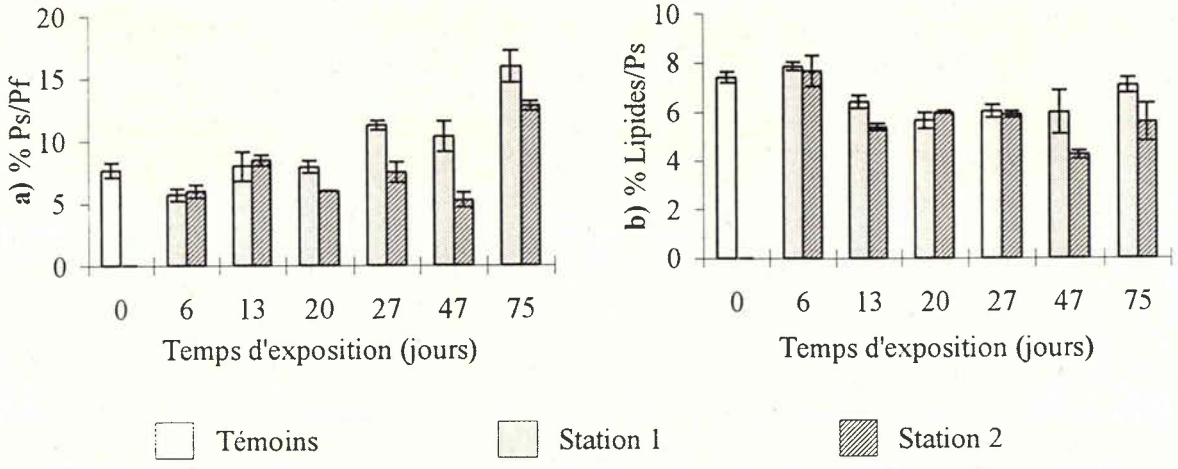


Figure 4.5 : Evolution des paramètres physiologiques mesurés dans les anodontes en fonction du temps et de la station d'exposition. a) pourcentage de poids sec par rapport au poids frais ; b) pourcentage de lipides par rapport au poids sec. Les histogrammes représentent les moyennes, les barres verticales les écart types (n=2 pour tous).

IV.3.3.2. Micropolluants métalliques dans les anodontes

L'évolution des concentrations en micropolluants métalliques dans les anodontes est montrée par les figures 4.6a à 4.6i. Mis à part pour l'arsenic, où les concentrations dans les anodontes de la station aval sont toujours supérieures à celles de la station amont, il n'apparaît pas de différences nettes entre les deux stations. En effet, les concentrations fluctuent de manière relativement importante (11 % < coefficient de variation < 42 %) au cours du temps, et sont plus importantes tantôt à la station amont, tantôt à la station aval. La comparaison des concentrations moyennes, calculées sur les 75 jours d'exposition (tableau 4.4), montre des différences significatives entre les stations 1 et 2, pour les concentrations en fer, manganèse et arsenic, qui sont plus élevées au niveau de la station aval.

Tableau 4.4 : Concentrations moyennes en micropolluants métalliques dans les anodontes témoins et exposés aux deux stations (moyenne ± écart type).

$\mu g.g^{-1}$ poids sec	Témoins (n=2)	Station 1 (n=12)	Station 2 (n=12)
Cuivre	11.5 ± 0.6	11.5 ± 2.2	12.5 ± 2.9
Fer	1456 ± 66	1147 ± 299	1417 ± 160
Zinc	333 ± 17	313 ± 53	309 ± 101
Chrome	2.9 ± 0.1	3.0 ± 1.2	4.0 ± 1.2
Nickel	2.9 ± 0.3	3.8 ± 1.5	4.4 ± 1.4
Manganèse	3926 ± 11	2798 ± 1060	3637 ± 661
Arsenic	1.7 ± 0.0	2.0 ± 0.4	3.6 ± 0.6
Cadmium	0.4 ± 0.0	0.5 ± 0.2	0.6 ± 0.2
Plomb	1.4 ± 0.1	2.4 ± 0.6	2.2 ± 0.5

Pour tous les autres micropolluants métalliques (cuivre, zinc, chrome, nickel, cadmium et plomb), il n'y a pas de différences statistiquement significatives, ni entre les stations, ni avec les témoins.

IV.3.3.2. Micropolluants organo-halogénés dans les anodontes

Globalement, l'évolution des concentrations en EOX dans les anodontes est similaire, que celles-ci soient exprimées en fonction du poids frais (figure 4.7a), du poids sec (figure 4.7b) ou du poids de lipides (figure 4.7c). Cependant, en raison des variations dans le pourcentage de poids sec et de lipides, de légères différences apparaissent selon l'expression des résultats. Au niveau de la station 1 on observe peu de variations au cours du temps, et la concentration moyenne mesurée sur les 75 jours d'exposition n'est pas significativement différente de celle mesurée dans les témoins (Tableau 4.5).

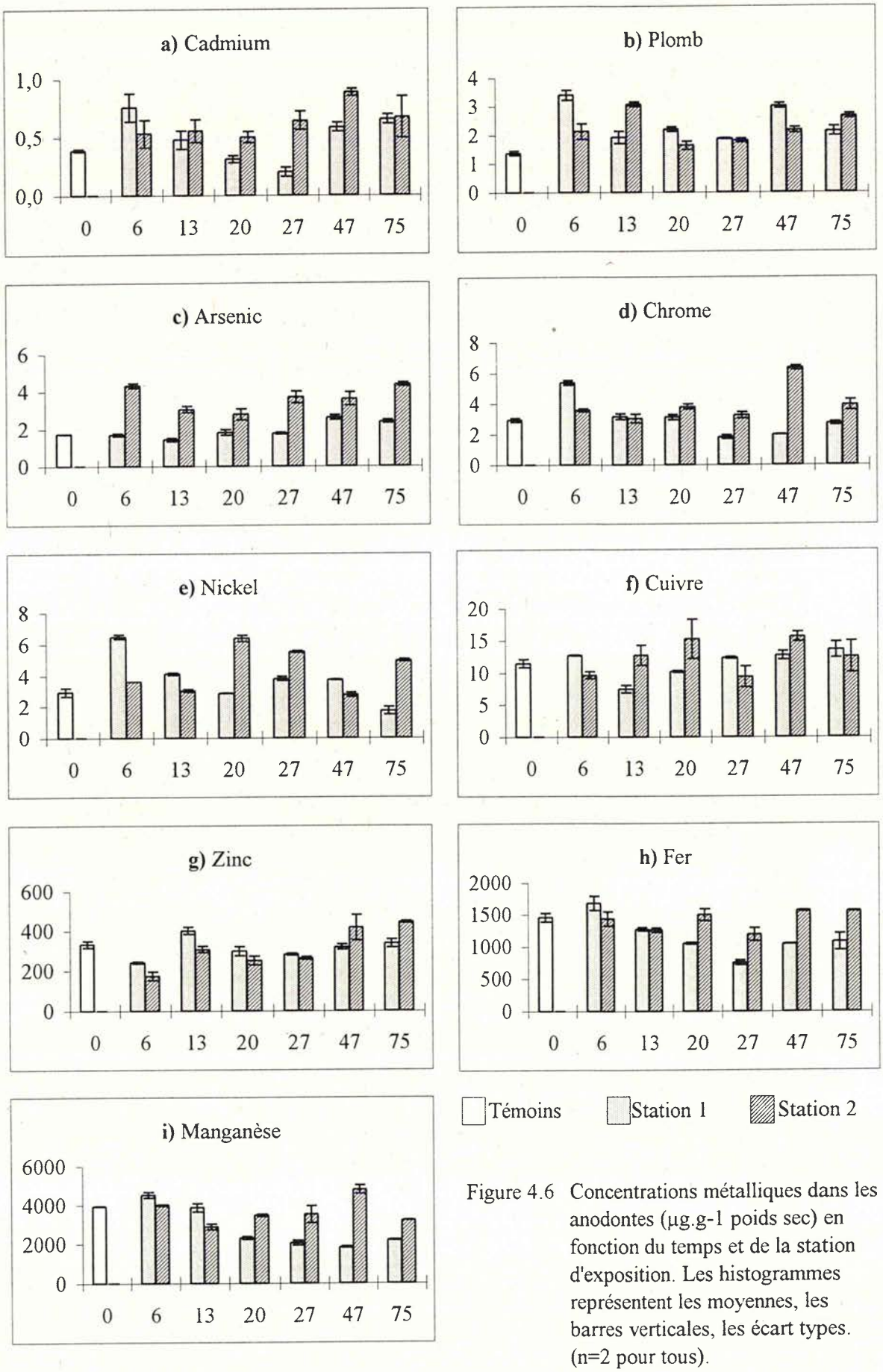


Figure 4.6 Concentrations métalliques dans les anodontes (µg.g-1 poids sec) en fonction du temps et de la station d'exposition. Les histogrammes représentent les moyennes, les barres verticales, les écart types. (n=2 pour tous).

Tableau 4.5 : Concentrations moyennes en EOX dans les anodontes témoins et exposés aux deux stations (moyenne ± écart type).

[EOX]	Témoins (n=2)	Station 1 (n=12)	Station 2 (n=12)
µg Cl/g poids frais	0.85 ± 0.06	1.50 ± 0.76	3.75 ± 1.5
µg Cl/g poids sec	11.2 ± 0.1	14.7 ± 3.5	48.4 ± 9.1
µg Cl/g lipides	150.6 ± 6.2	229.4 ± 63.6	855.4 ± 174.4

En revanche, au niveau de la station 2, les concentrations en EOX augmentent rapidement et fortement durant les 13 premiers jours d'exposition, puis diminuent légèrement. La concentration moyenne calculée sur les 75 jours d'exposition est significativement différente de celles des témoins et de celles des anodontes exposés à la station 1.

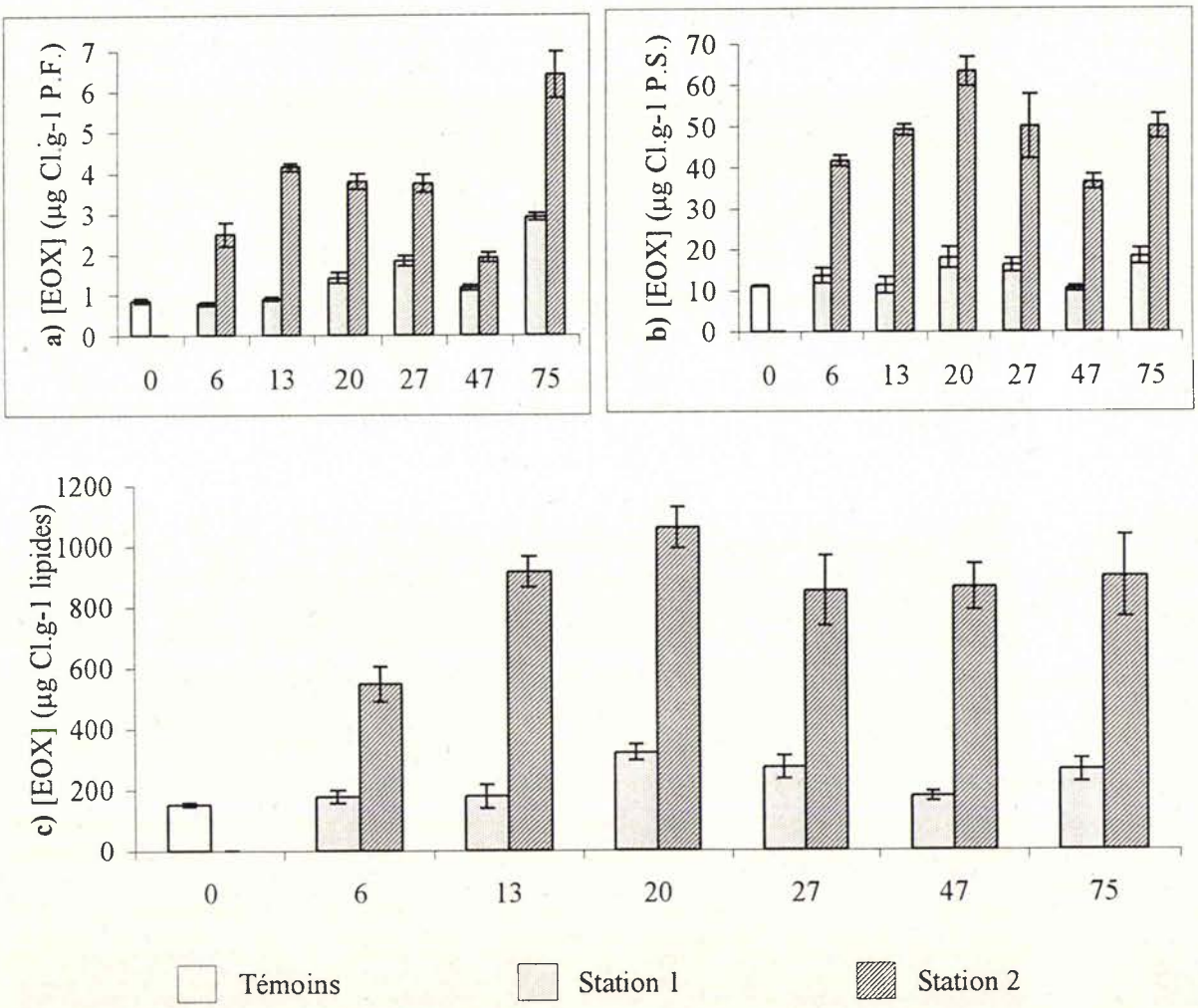


Figure 4.7 : Evolution des concentrations en EOX dans les anodontes en fonction du temps et de la station d'exposition. a) en fonction du poids frais, b) en fonction du poids sec, c) en fontion des lipides. Les histogrammes représentent les moyennes, les barres verticales les écart types (n=2 pour tous).

IV.4. Discussion

Les rejets d'effluents de l'usine de pâte à papier de Harnoncourt dans la rivière Ton se traduisent par une dégradation globale de la qualité de l'eau au niveau de la station aval, comparée à la station amont. Lors de la fabrication de pâte à papier par le procédé Kraft, suivi d'un blanchiment par le chlore, des eaux usées sont produites à tous les stades du procédé (Rintala & Puhakka, 1994). L'augmentation de la conductivité à l'aval des rejets est essentiellement due à une augmentation des concentrations en SO_4^{2-}, Na^+ et Ca^{2+}, provenant des circuits annexes (liqueur blanche : NaOH et Na_2S, et chaux : CaO, ajoutés lors de la cuisson de la pâte), ainsi que des ions chlorures issus de l'étape de blanchiment par le chlore sous forme de Cl_2 et de ClO_2. L'épuration des eaux résiduaires par décantation permet d'éliminer une grande partie des matières en suspension de haute densité, mais reste relativement inefficace vis-à-vis des résidus de fibres de bois, responsables d'une forte turbidité et coloration des eaux (Kautsky *et al.*, 1988). La diminution de la transparence qui en résulte modifie fortement la pénétration de la lumière dans l'eau, aussi bien par la quantité que par la distribution du spectre (Vogel & Chovanek, 1989). La réduction de l'activité photosynthétique, associée à une augmentation de la température et des concentrations en DBO_5 et en DCO, se traduit ainsi par une diminution de la concentration en oxygène dissous. Lors du blanchiment de la pâte à papier par le chlore, de nombreux produits de dégradation du bois réagissent avec le chlore et forment des molécules organo-chlorées, quantifiées sous forme d'AOX. L'augmentation importante de la concentration en AOX observée à l'aval des rejets durant les 13 premiers jours, correspond à la reprise d'activité de l'usine après plus de huit mois d'interruption. Selon Gullichsen (1991), les quantités d'AOX ainsi générées varient de 2.8 à 7 kg d'AOX par tonne de pâte, selon la nature du bois et les méthodes de délignification employées.

Ces molécules organo-halogénées s'accumulent rapidement dans les sédiments comme le montre l'évolution de leur concentration à l'aval des rejets. Cependant, lorsque les concentrations en AOX dans l'eau diminuent, celles dans les sédiments diminuent également. Une réponse rapide des sédiments aux concentrations en AOX dans l'eau avait déjà été observée lors du suivi des concentrations en AOX dans l'eau et les sédiments du chapitre III, à la station « Ecouviez ». Il semblerait que les molécules organo-halogénés accumulées dans les sédiments soient réparties en deux groupes, l'un comportant des molécules facilement relargables, l'autre des molécules beaucoup plus persistantes. Selon Pellinen (1994), l'accumulation des chlorolignines, sous-produits majeurs du blanchiment de la pâte à papier par le chlore, dans les sédiments se fait en deux phases. En effet, dans des expériences de laboratoire, la plus grande partie des chlorolignines s'accumule durant les 6 premières heures d'exposition, et un équilibre des concentrations est souvent atteint en moins de 50 heures. En raison de leur poids moléculaire élevé, ces molécules sont généralement considérées comme non dangereuses pour les organismes aquatiques, étant donné que leur grande taille diminue considérablement leur biodisponibilité (Kringstad & Lindström, 1984). Même si la dégradation biologique et/ou chimique de ces molécules est

faible, elle existe, et les molécules organo-halogénées ainsi relarguées sont généralement de plus faible poids moléculaire, et potentiellement bioaccumulables (Eriksson & Kolar, 1985). Cependant, la désorption des molécules organo-halogénées est faible, et en laboratoire, seuls 4 à 18 % des AOX accumulés dans les sédiments sont relargués lorsque le sédiment contaminé est lavé avec de l'eau propre (Pellinen, 1994). Ainsi, Carlberg *et al.* (1987, *in* Kvernheim *et al.*, 1993) ont montré que des sédiments contaminés par les EPKB continuaient de relarguer des composés organo-halogénés même 16 mois après la fermeture de l'usine et l'arrêt des rejets. Selon O'Connor & Voss (1992), ces molécules relarguées ne seraient en fait ni des chlorolignines, ni des produits de dégradation des chlorolignines, mais des molécules de faible poids moléculaire, associées aux chlorolignines.

L'absence de mortalité chez les anodontes exposés durant les 75 jours aux effluents de l'usine de pâte à papier renforce l'hypothèse que de tels effluents ne peuvent pas être corrélés à une toxicité aiguë et létale chez les organismes aquatiques (Craig *et al.*, 1990 ; Pellinen & Soimasuo, 1993). Elle peut aussi s'expliquer par la bonne résistance des mollusques bivalves unionidés aux EPKB, comme elle est 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 chez les anodontes exposés en amont et en aval des rejets. Les différences comportementales observées entre les anodontes exposés en amont et en aval des rejets d'EPKB peuvent être expliquées par la dégradation générale de la qualité de l'eau au niveau de la station 2. En effet, Salanki *et al.* (1974), ont montré qu'une augmentation de la température de l'eau était associée à une augmentation de l'activité, et à une diminution de la fréquence d'ouverture des valves chez *Anodonta cygnea*. Selon Pynnönen & Huebner (1995), l'exposition épisodique de *Anodonta cygnea* à des pH faibles (pH,4-5) diminue considérablement leurs mouvements valvaires. Cependant, même si les pH des deux stations de cette étude diffèrent de manière significative, leur différence n'est certainement pas assez importante (station 1 : 8.13, station 2 : 8.05) pour affecter les mouvements valvaires et le comportement des anodontes. En revanche, des composés organo-chlorés, tels que le 2,4,6 trichlorophénol présent dans les EPKB, associés à de fortes concentrations en acides humiques, entraîne une diminution significative du temps d'ouverture des valves de *Anodonta anatina* (Englund & Heino, 1996). Un effet similaire est observé chez *Anodonta cygnea*, exposé en laboratoire à différentes concentrations de micropolluants métalliques, notamment le cuivre et le plomb (Salanki & Varanka, 1976 ; Salanki & V.-Balogh, 1989).

Si l'utilisation de mollusques bivalves en tant que bioindicateurs de la contamination métallique par l'industrie métallurgique et sidérurgique est adaptée, elle ne s'applique pas aux effluents de l'industrie de la pâte et du papier. Effectivement, pour la plupart des métaux analysés, il n'apparaît pas de différences significatives entre les anodontes exposés à la station amont et ceux de la station aval. Les concentrations en cuivre, chrome, zinc, nickel, plomb et cadmium dans les anodontes des deux stations fluctuent de façon importante, mais restent toujours dans la gamme de celles rencontrées chez

Anodonta anatina dans le milieu naturel non contaminé (Mäkelä, 1995). Les concentrations en fer et en manganèse sont significativement supérieures à la station 2, mais pour les deux métaux les concentrations sont inférieures à celles mesurées chez les témoins. Seules les concentrations en arsenic sont constamment supérieures à la station aval, comparées à celles mesurées chez les témoins et à la station amont. Selon Rodier (1996), des dérivés arsenicaux sont utilisés lors de la fabrication du papier peint, qui pourrait avoir lieu dans la papeterie couplée à l'usine de pâte à papier de Harnoncourt. Cependant en raison du refus de réponse de la part de l'usine, cette hypothèse n'a pas pu être vérifiée.

Deux hypothèses peuvent être avancées pour expliquer les concentrations en EOX (150.6 ± 6.2 µg $Cl.g^{-1}$ lipides) observées dans les anodontes témoins. Tout d'abord, la contamination par les composés organo-halogénés de la station de prélèvement à Ham-sur-Meuse. En effet, comme nous l'avons vu au chapitre III, cette station est située sur le cours aval de la Meuse française, en aval de la confluence avec la Chiers, et donc en aval des rejets de l'usine de pâte à papier de Harnoncourt. Cependant, avec une concentration moyenne dans l'eau de 31.9 ± 21.8 µg $Cl.l^{-1}$, elle reste nettement moins contaminée que le Ton (207.8 ± 209.7 µg $Cl.l^{-1}$) et la Chiers (59.3 ± 31.0 µg $Cl.l^{-1}$). Selon la RIWA (1995), les déversements de l'usine de Harnoncourt ont fortement baissé depuis 1993, et ne participent que faiblement à la contamination en AOX de la Meuse aval. De plus, les concentrations moyennes en AOX des sédiments (29.6 ± 12.9 µg $Cl.g^{-1}$ poids sec, soit 369.3 ± 120.2 µg $Cl.g^{-1}$ matière organique) sont du même ordre de grandeur qu'au niveau de la station 1 au cours de cette étude (22.5 ± 8.0 µg $Cl.g^{-1}$ poids sec, soit 353.9 ± 40.9 µg $Cl.g^{-1}$ matière organique), et proches des concentrations naturelles rencontrées dans le Golfe de Bothnie (Palm & Lammi, 1995). L'hypothèse la plus probable est celle d'un « bruit de fond naturel » 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), prélevés dans des lacs suédois et finlandais loin de toute source de pollution anthropique. Cette hypothèse est renforcée par le fait que les concentrations en EOX ne diminuent pas au cours du temps chez les anodontes exposés à la station 1, où la concentration moyenne en AOX est 3.5 fois plus faible (9.3 ± 4.2 µg $Cl.l^{-1}$) qu'à la station de Ham-sur-Meuse. Selon Pellinen *et al.* (1993), une période de 5 jours est suffisante pour relarguer quasiment tous les EOX accumulés par *Anodonta anatina* durant une exposition de 7 jours à des EPKB.

Les concentrations en EOX dans les anodontes exposés en aval des rejets de l'usine de pâte à papier augmentent fortement et rapidement durant les 20 premiers jours, parallèlement aux concentrations en AOX dans l'eau. Cependant, en raison des fortes variations temporelles de celles-ci et de l'important intervalle de temps entre les prélèvements, les rapprochements sont difficiles à faire. Aussi, l'accumulation des EOX par les anodontes sera étudiée et discutée de manière plus approfondie dans les chapitres V, VI et VII.

IV.5. Conclusions

Les rejets des effluents de l'usine de l'usine de pâte à papier dans la rivière Ton se traduisent par une dégradation générale de la qualité de l'eau. Chez des anodontes transférés en aval des rejets, cette dégradation induit un changement de comportement qui se matérialise par un réflexe de protection des animaux : la fermeture de leur coquille les isole du milieu contaminé. Cependant, elle ne semble pas affecter significativement la physiologie des anodontes en termes de perte de poids ou de variation des réserves lipidiques. Le suivi des concentrations métalliques dans les anodontes n'a pas permis de montrer une contamination métallique spécifique aux EPKB, sauf pour l'arsenic, dont l'origine n'a pas pu être définie clairement. En revanche, les composés organo-halogénés résultant du blanchiment de la pâte à papier par le chlore, se retrouvent à des concentrations importantes dans les trois compartiments étudiés de la station aval, à savoir l'eau, les sédiments et les anodontes. Les fortes fluctuations des concentrations en AOX observées dans l'eau sont certainement dues à la reprise de production de l'usine (nettoyage, etc...) après une longue période d'arrêt. Des prélèvements moins espacés dans le temps sont nécessaires si l'on veut une image plus réelle des rejets effectifs. Les sédiments et les anodontes répondent rapidement aux rejets d'EPKB, en accumulant fortement les composés organo-halogénés. Cependant, en raison de la non-constance des rejets dans le temps, et de l'espacement important entre les prélèvements, une relation entre les différents compartiments est difficile a établir.

Chapitre V

Accumulation de composés organo-halogénés extractibles chez quatre espèces de mollusques aquatiques *

V.1. Introduction - Objectifs de l'étude

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, 1991a ; 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.

Du fait de sa bonne résistance aux EPKB, et de sa grande capacité bioaccumulatrice de composés organo-halogénés, le mollusque bivalve, *Anodonta cygnea*, s'est avéré être un bon indicateur biologique de ce genre de pollution. Cependant, les études d'accumulation menées sur une seule espèce ne permettent pas de généraliser et d'extrapoler les résultats obtenus à tout un groupe, tels que les mollusques.

Le but de cette étude est de comparer l'accumulation de composés organo-halogénés présents dans les effluents d'une usine de pâte à papier blanchissant au chlore, dans les sédiments et différents mollusques aquatiques, et de mettre en évidence, le cas échéant, des relations dans les concentrations entre eau / sédiment, eau / organismes et organismes / sédiments.

Quatre espèces de mollusques : trois bivalves (deux unionidés : *Anodonta cygnea* et *Unio pictorum*, et un dreissénidé : *Dreissena polymorpha*) et un gastéropode prosobranche (*Viviparus viviparus*) ont été ramassés le même jour au niveau d'un site faiblement contaminé par les composés organo-halogénés. Ils sont conditionnés, transférés et exposés durant 28 jours, dans les mêmes conditions au niveau de trois stations (une station amont et deux stations aval) à proximité de l'usine.

---

* Ce travail à fait l'objet de deux publications :

Hayer F. & Pihan J.C., 1996, *Chemosphere* 32 (4), pp. 791-803

Hayer F., Wagner P. & Pihan J.C., 1996, *Chemosphere* 33 (11), pp. 2321-2334.

V.2. Protocole expérimental de l'étude

La figure 5.1 récapitule le protocole de prélèvement des échantillons d'eau, de sédiment et des quatre espèces de mollusques.

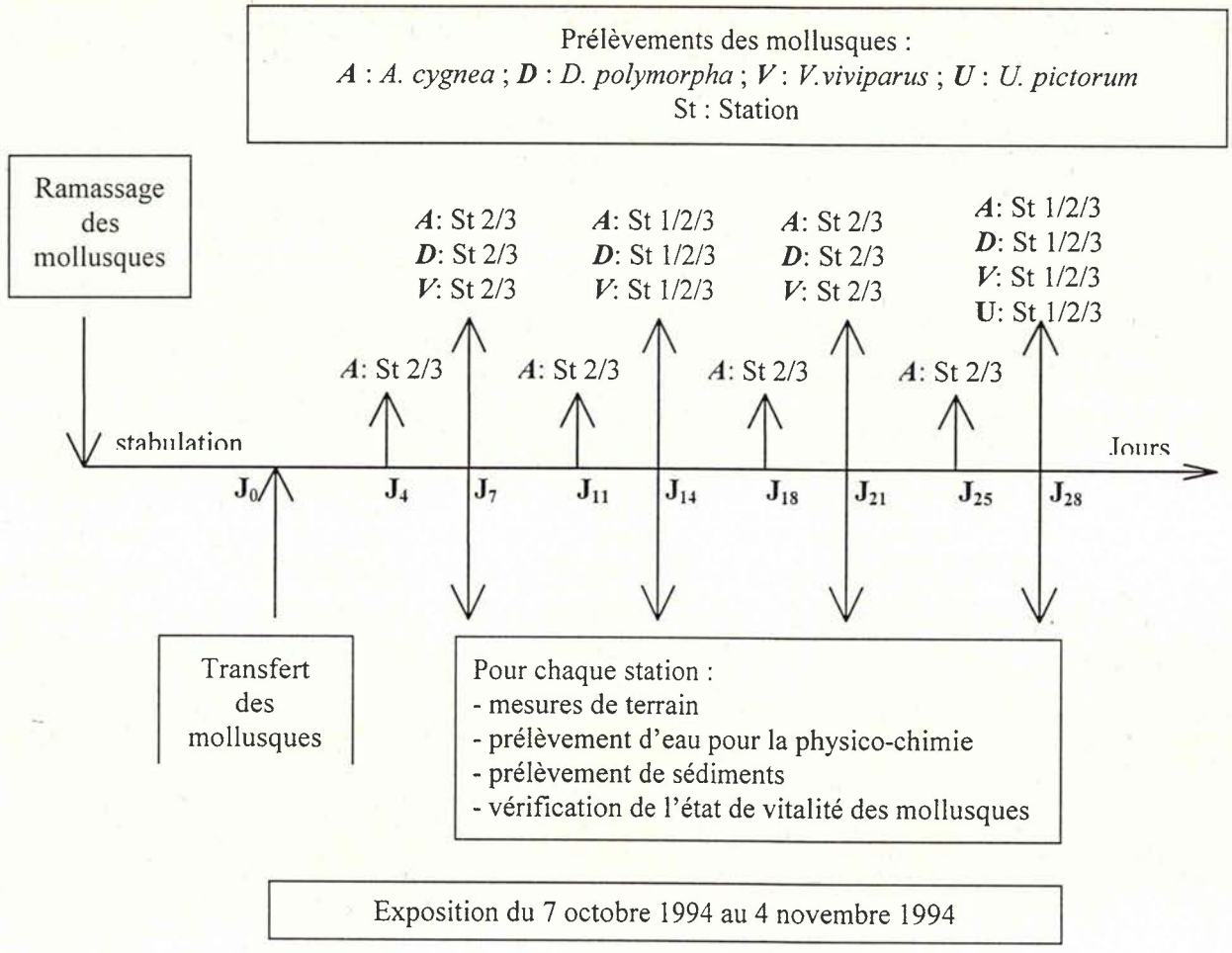


Figure 5.1 : Protocole expérimental de l'étude d'accumulation d'EOX par quatre espèces de mollusques aquatiques.

V.2.1. Collecte, conditionnement, transfert et exposition des mollusques

Tous les mollusques utilisés dans cette étude ont été récoltés fin septembre 1994, dans le canal de l'est au niveau de la station Bras-sur-Meuse, décrite précédemment (§ III.2). Le nombre d'individus de chaque espèce est variable en raison de la quantité de matière fraîche nécessaire au dosage des EOX. Environ 150 individus de l'espèce *A. cygnea* (longueur de 55 à 75 mm), 30 de l'espèce *U. pictorum* (longueur de 60 à 80 mm), 400 de l'espèce *V. viviparus* (hauteur de 22 à 28 mm) et 600 de l'espèce *D. polymorpha* (longueur de 18 à 22 mm), sont ramenés au laboratoire et conditionnés selon le protocole décrit au § II.2. Ils sont transférés et exposés au niveau des trois

stations (station 1 : amont ; station 2 et station 3 : aval de l'usine de pâte à papier), le 7 octobre 1994. Le nombre d'individus transféré dépend de la station et de l'espèce :

- à la station 1 : 20 anodontes, 7 unios, 80 vivipares et 100 dreissènes,
- aux stations 2 et 3 : 50 anodontes, 7 unios, 150 vivipares et 200 dreissènes.

Le jour du transfert, un lot d'animaux témoins de chaque espèce est prélevé et préparé puis congelé jusqu'au moment de l'extraction et du dosage.

V.2.2. Prélèvement et analyse de l'eau

Le pH, la conductivité, la température et la concentration en oxygène dissous sont mesurés deux fois par semaine au niveau des trois stations. Des échantillons d'eau pour l'analyse physico-chimique sont prélevés le jour du transfert, puis toutes les semaines au niveau des trois stations. Pour l'analyse des AOX dans l'eau, deux préleveurs automatiques (ISCO et SIGMA) sont installés au niveau des stations situées à l'aval des rejets de l'usine (stations 2 et 3). La fréquence de prélèvement est de un flacon de 500 ml par huit heures, rempli par quatre pompages successifs de 125 ml espacés de 2 heures. Les flacons sont prélevés deux fois par semaine et remplacés par des flacons vides, préalablement rincés avec une solution d'acide nitrique diluée.

V.2.3. Prélèvement et analyse des sédiments

Du sédiment est prélevé dans la rivière au niveau des trois stations le jour du transfert, puis dans les cages d'exposition après 7, 14, 21 et 28 jours aux stations 2 et 3. Les sédiments sont prélevés, traités et dosés selon le protocole décrit au § II.4.3.

V.2.4. Prélèvement et analyse des mollusques

Une fois par semaine, les cages d'exposition sont sorties de l'eau et l'état de vitalité de tous les animaux est vérifié. Les individus morts sont comptabilisés et retirés des cages. En raison du nombre de mollusques collectés, et de la quantité de matière fraîche nécessaire à l'extraction et au dosage des EOX, le protocole de prélèvement n'est pas le même pour les quatre espèces :

- pour les anodontes, 4 individus sont prélevés au bout de 14 et 28 jours d'exposition à la station 1, et au bout de 4, 7, 11, 14, 18, 21, 25 et 28 jours d'exposition aux stations 2 et 3,
- pour les dreissènes, 45 individus sont prélevés au bout de 14 et 28 jours d'exposition à la station 1, et au bout de 7, 14, 21 et 28 jours d'exposition aux stations 2 et 3,
- pour les vivipares, 30 individus sont prélevés au bout de 14 et 28 jours d'exposition à la station 1, et au bout de 7, 14, 21 et 28 jours d'exposition aux stations 2 et 3,
- pour les unios, 3 individus sont prélevés au bout de 28 jours d'exposition aux trois stations.

Les animaux sont ramenés au laboratoire dans des bocaux en verre contenant de l'eau du site d'exposition et mis à stabuler dans de l'eau déchlorée par passage sur charbon actif, et aéré par bullage durant 24 heures, puis préparés selon le protocole décrit au §.II.4.4.

Les anodontes et les unios sont traités et dosés individuellement. En raison de leur faible masse, les dreissènes et les vivipares ne peuvent être analysés individuellement. Aussi, les échantillons prélevés sont divisés en deux sous-échantillons de respectivement 20 et 12 individus pour *D. polymorpha* et *V. viviparus*, qui sont alors traités et dosés séparément.

V.2.4. Etude statistique

Les résultats de l'analyse physico-chimique, ainsi que les concentrations en AOX dans l'eau et les sédiments des différentes stations sont comparées à l'aide du test t de Student au seuil de 0.05. Les paramètres physiologiques et les concentrations en EOX dans les quatre espèces de mollusques sont comparées 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, et par le test T de Student, au seuil de 0.05. En raison du grand nombre d'individus nécessaires au dosage des EOX, seuls deux sous échantillons ont été réalisés pour les dreissènes et les vivipares.

V.3. Résultats

V.3.1. Résultats de l'analyse de l'eau

V.3.1.1. Physico-chimie de l'eau

Les résultats des analyses physico-chimiques de l'eau des trois stations sont regroupés dans le tableau 5.1. L'analyse statistique montre que presque tous les paramètres présentent des différences significatives entre les trois stations. Le déversement des effluents de l'usine de pâte à papier en aval de la station 1 se traduit par une dégradation générale de la qualité de l'eau à la station 2, et une situation intermédiaire entre les stations 1 et 2 à la station 3.

L'évolution des différents paramètres étudiés est semblable à celle observée lors de la première étude d'accumulation (§ IV). On constate notamment un échauffement de l'eau de +5.1°C, une augmentation des matières en suspension, de la demande chimique en oxygène, ainsi que de la conductivité (x 1.8) due aux concentrations croissantes d'anions (Cl^-, SO_4^{2-}) et de cations (Na^+, Ca^{2+}). Après confluence avec la Chiers, la qualité de l'eau s'améliore légèrement, mais reste inférieure à celle de la station 1.

Tableau 5.1 : Physico-chimie de l'eau des trois stations (moyenne ± écart type ; * : différence significative entre deux stations ; n.s. : différence non significative).

Paramètre	Unité	Station 1	Station 2	Station 3	N	St1/2	St1/3	St2/3
pH		7.9 ± 0.2	7.8 ± 0.1	7.9 ± 0.2	9	n.s.	n.s.	n.s.
Conductivité	$\mu S.cm^{-1}$	366 ± 4	667 ± 45	621 ± 22	9	*	*	*
Température	°C	9.1 ± 1.1	14.2 ± 0.6	11.3 ± 0.8	9	*	*	*
Oxygène dissous	$mg.l^{-1}$	9.2 ± 1.2	7.1 ± 1.8	7.8 ± 1.6	9	*	n.s.	n.s.
MES 105°C	$mg.l^{-1}$	4.0 ± 1.5	26.6 ± 20.9	16.4 ± 10.2	5	*	*	n.s.
MES 500°C	$mg.l^{-1}$	2.3 ± 1.3	15.5 ± 12.7	10.2 ± 6.9	5	*	*	n.s.
DCO	$mg.l^{-1}$	14.4 ± 1.7	47.0 ± 15.4	29.8 ± 5.2	5	*	*	*
Cl^-	$mg.l^{-1}$	11.7 ± 2.6	46.5 ± 6.0	35.6 ± 2.9	5	*	*	*
F^-	$mg.l^{-1}$	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.1	5	n.s.	n.s.	n.s.
Br^-	$mg.l^{-1}$	n.d.	1.8 ± 1.9	0.2 ± 0.4	5			n.s.
K^+	$mg.l^{-1}$	2.1 ± 0.2	5.3 ± 0.3	5.9 ± 0.4	5	*	*	*
Na^+	$mg.l^{-1}$	7.8 ± 0.9	70.9 ± 5.9	46.3 ± 2.5	5	*	*	*
Ca^{2+}	$mg.l^{-1}$	79.9 ± 1.3	94.6 ± 7.3	102.2 ± 3.8	5	*	*	n.s.
Mg^{2+}	$mg.l^{-1}$	3.3 ± 0.4	4.2 ± 0.2	5.6 ± 0.4	5	*	*	*
NO_2^-	$mg.l^{-1}$	0.2 ± 0.0	0.0 ± 0.1	0.2 ± 0.0	5	*	n.s.	*
NO_3^-	$mg.l^{-1}$	7.5 ± 1.0	5.8 ± 0.5	13.0 ± 1.2	5	*	*	*
N total	$mg.l^{-1}$	1.8 ± 0.3	1.8 ± 1.4	1.7 ± 1.4	5	n.s.	n.s.	n.s.
PO_4^{3-}	$mg.l^{-1}$	0.3 ± 0.1	0.1 ± 0.0	0.5 ± 0.2	5	*	n.s.	*
P Total	$mg.l^{-1}$	0.2 ± 0.0	0.2 ± 0.1	0.3 ± 0.1	5	n.s.	n.s.	n.s.
SO_4^{2-}	$mg.l^{-1}$	24.0 ± 1.1	120.0 ± 27.0	93.6 ± 11.8	5	*	*	n.s.
Chlorophylle a	$mg.l^{-1}$	2.1 ± 1.7	2.3 ± 1.3	2.2 ± 1.0	5	n.s.	n.s.	n.s.

V.3.1.2. Contamination de l'eau par les AOX

La figure 5.2 montre l'évolution temporelle des concentrations en AOX dans l'eau au niveau des trois stations, durant les 28 jours de l'étude. A la station 1, située en amont des rejets, les concentrations sont stables (CV < 10 %), avec une moyenne de 16.6 ± 1.2 µg $Cl.l^{-1}$. Par contre, au niveau des deux stations localisées en aval des rejets de l'usine de pâte à papier, les concentrations en AOX montrent de fortes fluctuations journalières, pouvant doubler en moins de 24 heures. Pendant les trois premières semaines, ces variations ne sont dues qu'aux rejets de l'usine, étant donné que le débit des cours d'eau est relativement constant (station 2 : 2.63 ± 0.38 $m^3.s^{-1}$, n = 23).

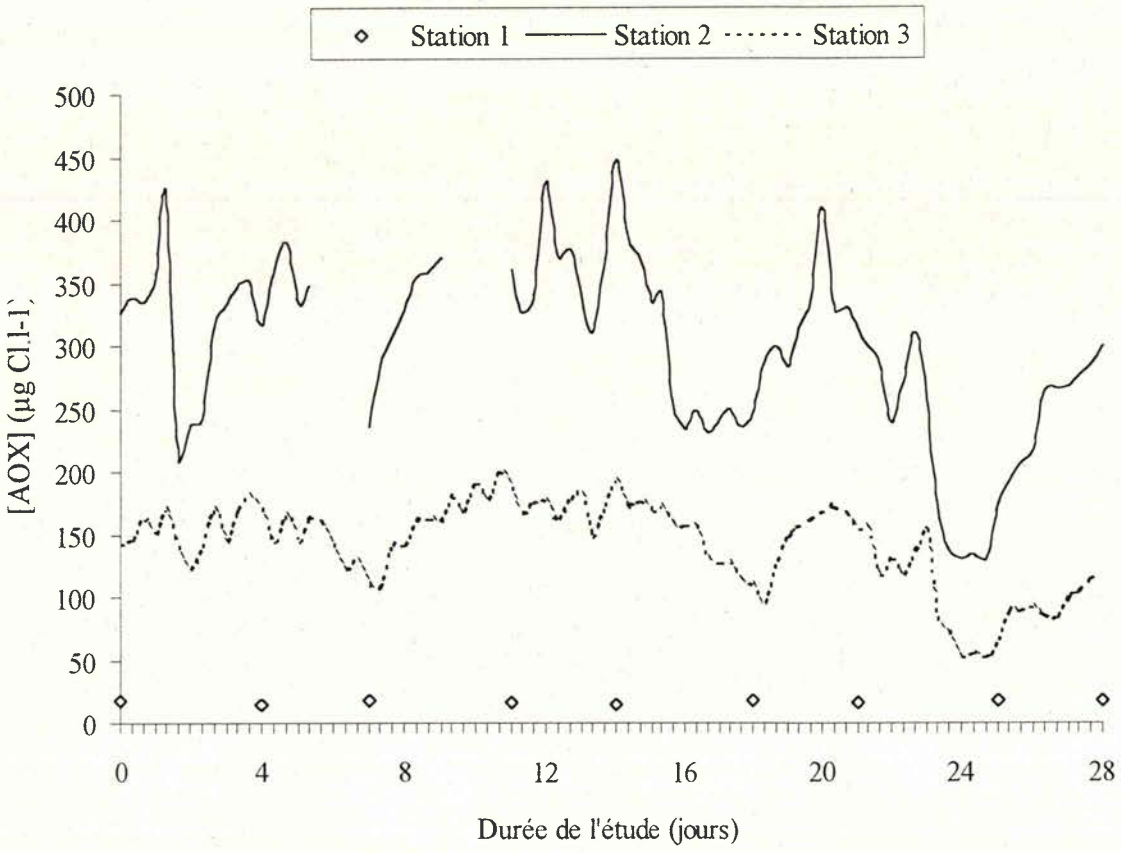


Figure 5.2 : Evolution des concentrations en AOX dans l'eau au niveau des trois stations (l'interruption du profil de la station 2 est due à un dysfonctionnement du préleveur automatique).

Durant les jours 24, 25 et 26, de fortes précipitations ont fait augmenter le débit à plus de 7 $m^3.s^{-1}$, diluant ainsi considérablement les concentrations en AOX des deux stations aval. Comparées à la station 1, les concentrations moyennes en AOX augmentent d'un facteur de 17.8 et de 8.5, respectivement au niveau des stations 2 et 3 (tableau 5.2).

Tableau 5.2 : Concentrations moyennes et extrêmes en AOX dans l'eau au niveau des trois stations.

[AOX] µg $Cl.l^{-1}$	Station 1	Station 2	Station 3
Moyenne	16.6	295.9	141.0
Ecart type	1.2	70.5	34.8
N	9	76	80
Coefficient de variation	7.2 %	23.8 %	24.7 %
Minimum	14.4	130.2	52.0
Maximum	17.9	448.3	200.8

V.3.2. Résultats de l'analyse des sédiments

La composition des sédiments, et plus particulièrement le pourcentage de matière organique (exprimé par la perte au feu), est significativement différente pour les trois stations. Les concentrations en AOX sont relativement constantes à chaque station durant les 28 jours de l'étude (CV < 20 %), qu'elles soient exprimées en fonction du poids sec ou du poids de matière organique (tableau 5.3). Dans les deux cas, elles sont significativement plus élevées au niveau des stations 2 et 3, situées en aval des rejets de l'usine de pâte à papier, qu'au niveau de la station 1. Elles sont plus élevées à la station 2 qu'à la station 3, mais cette différence n'est significative que lorsqu'elles sont exprimées par rapport à la matière organique. Le facteur de contamination, calculé comme le rapport : [AOX] moyenne dans les sédiments aval / [AOX] moyenne dans les sédiments amont, est de 3.1 et 2.5 (par rapport au poids sec), et de 3.8 et 2.2 (par rapport à la matière organique), respectivement aux stations 2 et 3.

Tableau 5.3 : Composition en matière organique et concentrations moyennes en AOX dans les sédiments (moyenne ± écart type ; n = 5).

Paramètre	Unité	Station 1	Station 2	Station 3
[AOX]	µg $Cl.g^{-1}$ PS	22.3 ± 4.5	68.5 ± 8.6	56.9 ± 10.3
Perte au feu	% M.O.	6.8 ± 0.6	5.5 ± 0.4	7.8 ± 0.6
[AOX]	µg $Cl.g^{-1}$ MO	326.5 ± 52.0	1225.3 ± 89.6	726.1 ± 78.3

Les concentrations en AOX dans les sédiments présentent une corrélation significative avec les concentrations en AOX dans l'eau (figures 5.3a et b). Le coefficient de corrélation, R^2, est de 0.771 et 0.961, lorsque les concentrations en AOX dans les sédiments sont exprimées respectivement en fonction du poids sec et de la matière organique.

Le facteur d'accumulation dans les sédiments est le rapport entre les concentrations en AOX dans les sédiments (en µg $Cl.kg^{-1}$) et les concentrations en AOX dans l'eau (en µg $Cl.l^{-1}$). Pour calculer le facteur d'accumulation des composés organo-halogénés provenant des rejets de l'usine de pâte à papier, il faut retrancher les concentrations en AOX mesurées en amont à celles de l'aval (tableau 5.4). Il apparaît que lorsque les concentrations en AOX dans les sédiments sont exprimés par rapport au poids sec, le facteur d'accumulation est nettement supérieur à la station 3 qu'à la station 2. Cependant, cette différence n'existe plus lorsque les concentrations sont exprimées par rapport à la matière organique des sédiments.

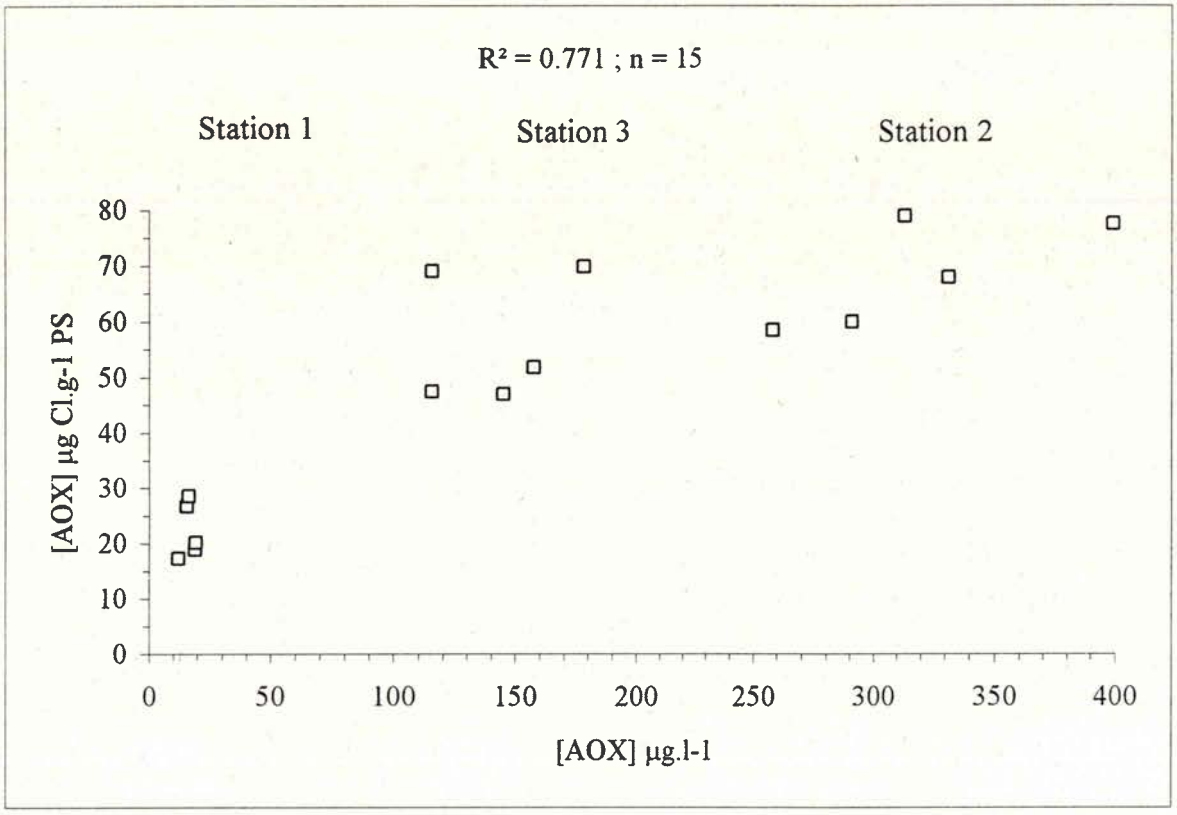


Figure 5.3a : Concentration en AOX dans les sédiments (µg Cl.g-1 PS) en fonction de la concentration en AOX dans l'eau.

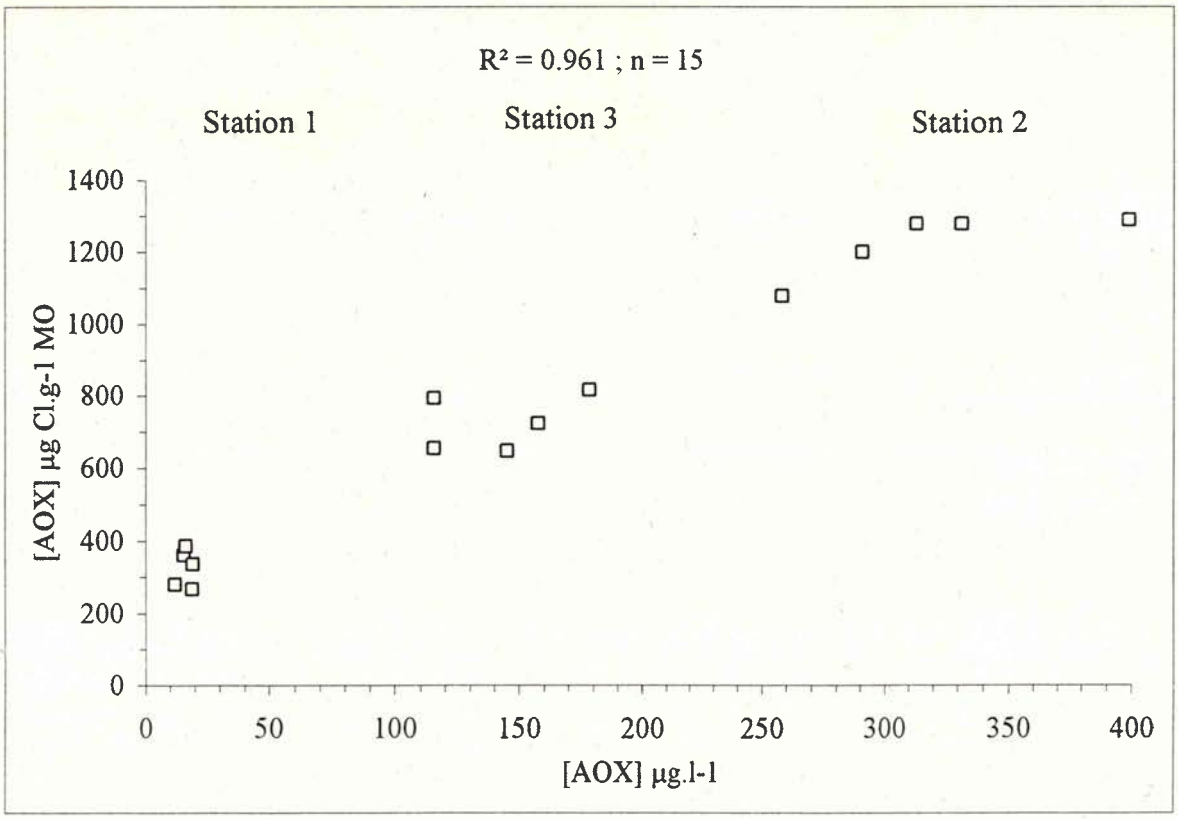


Figure 5.3b : Concentration en AOX dans les sédiments (µg Cl.g-1 MO) en fonction de la concentration en AOX dans l'eau.

Tableau 5.4 : Concentrations en AOX dans l'eau et les sédiments provenant des rejets de l'usine de pâte à papier, et facteurs d'accumulation.

	Station 2	Station 3
Eau µg $Cl.l^{-1}$	279.3	124.4
Sédiments µg $Cl.kg^{-1}$ PS	46200	34600
Facteur d'accumulation/PS	**165**	**278**
Sédiments µg $Cl.kg^{-1}$ MO	898800	399600
Facteur d'accumulation/MO	**3218**	**3212**

V.3.3. Résultats de l'analyse des mollusques

Des anodontes ont été prélevés après 4, 7, 11, 14, 18, 21, 25 et 28 jours d'exposition aux stations 2 et 3, situées en aval des rejets de l'usine de pâte à papier. Afin de faciliter la comparaisons avec les trois autres espèces de mollusques étudiés, et pour ne pas surcharger les graphiques, nous ne présenterons dans les § V.3.3.1 et V.3.3.2. que les résultats des prélèvements aux dates communes avec les autres mollusques, soit après 7, 14, 21 et 28 jours d'exposition. Les résultats complets concernant les anodontes seront donnés au § V.3.3.3.

V.3.3.1. Condition physiologique

V.3.3.1.1 Mortalité

Durant toute la durée d'exposition le taux de mortalité est resté faible (<10 %) pour les individus des quatre espèces, et ce au niveau des trois stations (tableau 5.5). Le taux de mortalité élevé des unio au niveau de la station 1 (14 %), correspond à la mort d'un seul individu sur sept exposés.

Tableau 5.5 : Taux de mortalité (nombre d'individus morts/nombre d'individus transférés x 100) pour les quatre espèces de mollusques, en fonction de la durée (7, 14, 21 et 28 jours) et de la station d'exposition (T : mortalité totale durant l'exposition).

	Station 1					Station 2					Station 3				
Espèce	J_7	J_{14}	J_{21}	J_{28}	**T**	J_7	J_{14}	J_{21}	J_{28}	**T**	J_7	J_{14}	J_{21}	J_{28}	**T**
A. cygnea	0	0	0	0	**0**	0	2	0	4	**6**	0	2	0	2	**4**
U. pictorum	14	0	0	0	**14**	0	0	0	0	**0**	0	0	0	0	**0**
D. polymorpha	0	0	2	3	**5**	0	1	1	1	**3**	0	3	1	2	**6**
V. viviparus	0	0	2	0	**2**	0	0	3	2	**5**	0	3	3	2	**8**

V.3.3.1.2. Pourcentage de poids sec - pourcentage de lipides

Le pourcentage de poids sec de tous les anodontes exposés est inférieur à celui des témoins (figure 5.4 a). Cette différence devient statistiquement significative par rapport aux témoins à partir du 14^{éme} jour d'exposition, aussi bien au niveau de la station amont que des deux stations aval. Cependant, mis à part pour les stations 2 et 3 le 14^{éme} jour d'exposition, il n'y a pas de différences significatives entres les trois stations à une date donnée. Pour les trois autres espèces de mollusques, le pourcentage de poids sec des animaux exposés ne diffère pas significativement de leurs témoins respectifs (figures 5.4 b, c, d). De plus, il n'y a .généralement pas de différences significatives entre les stations. Chez *D. polymorpha*, seule la station 3 diffère des deux autres stations le 28^{éme} jour, et chez *V. viviparus*, seules les stations 2 et 3 différent entre elles le 7^{éme} jour d'exposition.

Aucune différence statistiquement significative n'est observée pour le pourcentage de lipides , ni au cours du temps (par rapport aux témoins), ni entre les stations à une même date de prélèvement (figures 5.5 a, b, c, d).

Le tableau 5.6 regroupe les valeurs moyennes (± écart type) du pourcentage de poids sec et de lipides chez les quatre espèces de mollusques au cours de 28 jours d'exposition. Il apparaît que les quatre espèces diffèrent significativement entre elles, aussi bien au niveau du pourcentage de poids sec qu'au niveau du pourcentage de lipides.

Tableau 5.6 : Pourcentages moyens (± écart type) de poids sec et de lipides dans les quatre espèces de mollusques.

Espèce	N	% poids sec / poids frais	% lipides / poids sec
A. cygnea	44	10.4 ± 2.0	5.4 ± 1.2
U. pictorum	11	15.0 ± 1.0	6.2 ± 0.8
D. polymorpha	22	13.2 ± 1.0	4.5 ± 0.4
V. viviparus	22	7.3 ± 1.6	11.0 ± 0.8

V.3.3.2. Accumulation des EOX

En raison des différences observées dans les pourcentages de poids sec et de lipides entre les quatre espèces de mollusques et des différents modes d'expression dans la littérature, les résultats des analyses d'EOX sont exprimés de trois manières : en fonction du poids frais (figure 5.6), du poids sec (figure 5.7) et du poids de lipides (figure 5.8). Cependant, étant donné que l'évolution globale des

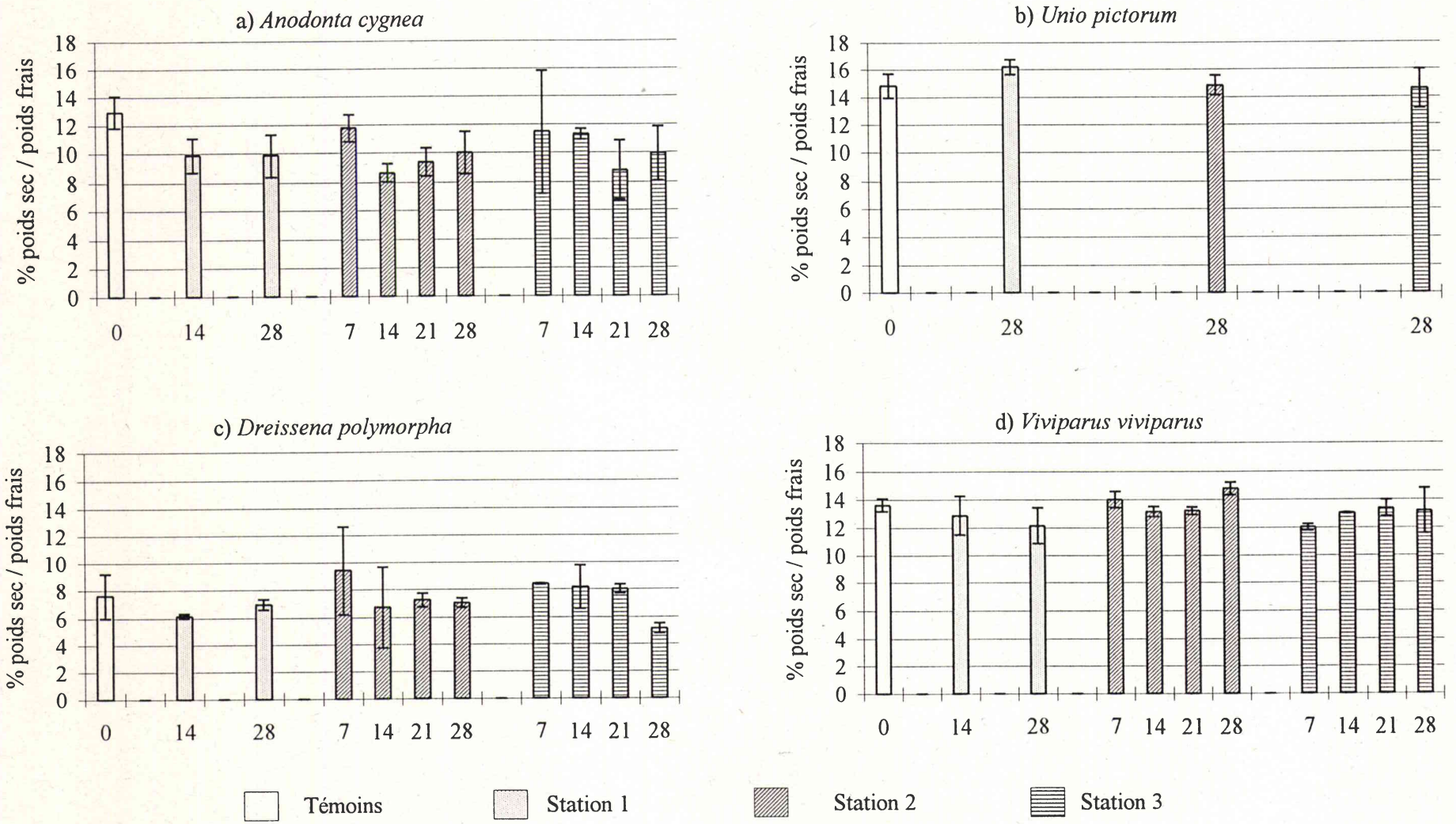


Figure 5.4 : Evolution du pourcentage de poids sec(/poids frais) en fonction du temps et de la station d'exposition chez les quatre espèces de mollusques.
Les histogrammes représentent les moyennes, les barres verticales les écarts types (*A. cygnea*, n=4 ; *U. pictorum*, n=3 ; *D. polymorpha* , *V. viviparus*, n=2).

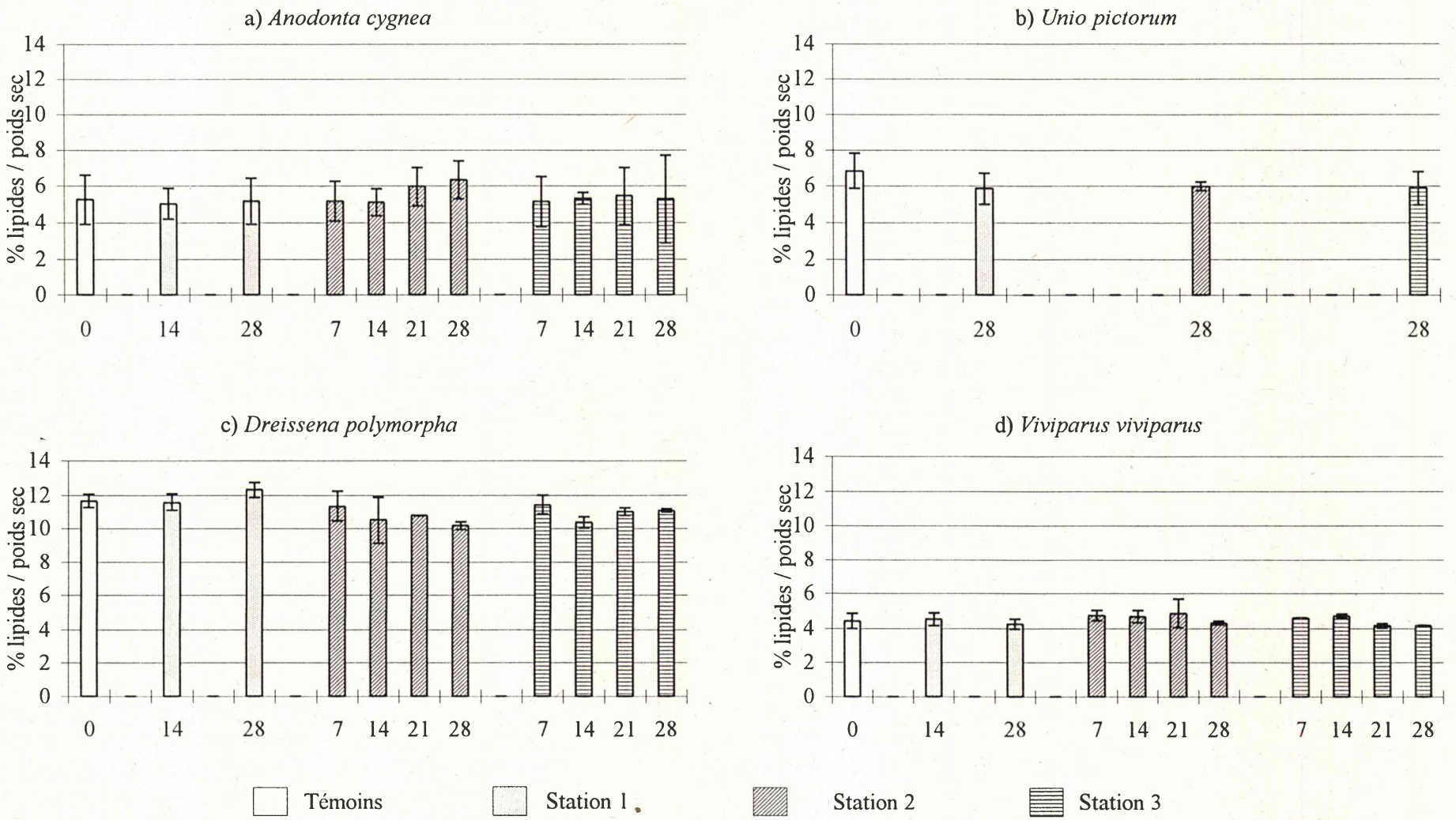


Figure 5.5 : Evolution du pourcentage de lipides (/poids sec) en fonction du temps et de la station d'exposition chez les quatre espèces de mollusques.
Les histogrammes représentent les moyennes, les barres verticales les écarts types (*A. cygnea*, n=4 ; *U. pictorum*, n=3 ; *D. polymorpha*, *V. viviparus*, n=2).

concentrations en EOX est à peu près similaire pour les trois modes d'expression, et en raison du caractère lipophile des composés organo-halogénés, seuls les résultats exprimés par rapport aux lipides sont décrits en détail.

Chez les quatre espèces de mollusques, les concentrations en EOX mesurées dans les animaux exposés au niveau de la station 1 ne différent pas significativement de celles de leurs témoins respectifs.

Dans les deux espèces d'unionidés (*A. cygnea* et *U. pictorum*), les concentrations dans les animaux exposés au niveau des stations 2 et 3 sont significativement différentes par rapport aux témoins et par rapport aux animaux exposés à la station 1. Chez *A. cygnea*, elles augmentent régulièrement à partir du 7^{éme} jour d'exposition, passant de 157.2 ± 31.9 µg Cl.g^{-1} lipides chez les témoins, à 539.6 ± 119.1 et 456.6 ± 135.3 µg Cl.g^{-1} lipides après 28 jours d'exposition, respectivement à la station 2 et à la station 3 (figure 4.9 a). De la même manière, chez *U. pictorum*, elles augmentent significativement, passant de 113.2 ± 17.4 µg Cl.g^{-1} lipides chez les témoins, à 302.5 ± 35.2 et 253.1 ± 53.4 µg Cl.g^{-1} lipides, respectivement à la station 2 et à la station 3 (figure 4.9 b). Chez *D. polymorpha*, les concentrations en EOX augmentent chez les animaux exposés à l'aval des rejets d'EPKB, mais ces différences ne sont statistiquement significatives qu'au niveau de la station 2. Elles passent de 131.6 ± 6.9 µg Cl.g^{-1} lipides chez les témoins, à 301.1 ± 34.2 et 232.1 ± 37.2 µg Cl.g^{-1} lipides, respectivement à la station 2 et à la station 3. Comme chez les dreissènes, les concentrations en EOX augmentent faiblement chez *V. viviparus* exposés à l'aval des rejets, passant de 97.3 ± 5.0 µg Cl.g^{-1} lipides chez les témoins, à 138.1 ± 1.1 et 139.8 ± 18.3 µg Cl.g^{-1} lipides, respectivement à la station 2 et.à la station 3. Toutefois, ces différences ne sont jamais statistiquement significatives.

Le tableau 5.7 montre les concentrations en EOX initiales, chez les individus témoins, et finales, après 28 jours d'exposition, pour les quatre espèces de mollusques au niveau des trois stations.

Tableau 5.7 : Concentrations initiales (témoins) et finales (stations 1,2 et 3) en EOX (µg Cl $^{-1}$ lipides ; moyenne ± écart type) chez les quatre espèces de mollusques.

Espèce	N	Témoins	Station 1	Station 2	Station 3
A. cygnea	4	157.2 ± 31.9	195.7 ± 36.4	539.6 ± 119.1	456.6 ± 135.3
U. pictorum	3	113.2 ± 17.4	88.2 ± 20.8	302.5 ± 35.2	253.1 ± 53.4
D. polymorpha	2	131.6 ± 6.9	145.8 ± 16.8	301.1 ± 34.2	232.1 ± 37.2
V. viviparus	2	97.3 ± 5.0	88.1 ± 15.2	138.1 ± 1.1	139.8 ± 18.3

Les facteurs de pollution, calculés comme le rapport [EOX] dans les mollusques des stations d'exposition / [EOX] dans les mollusques témoins, est plus important pour les animaux exposés à la

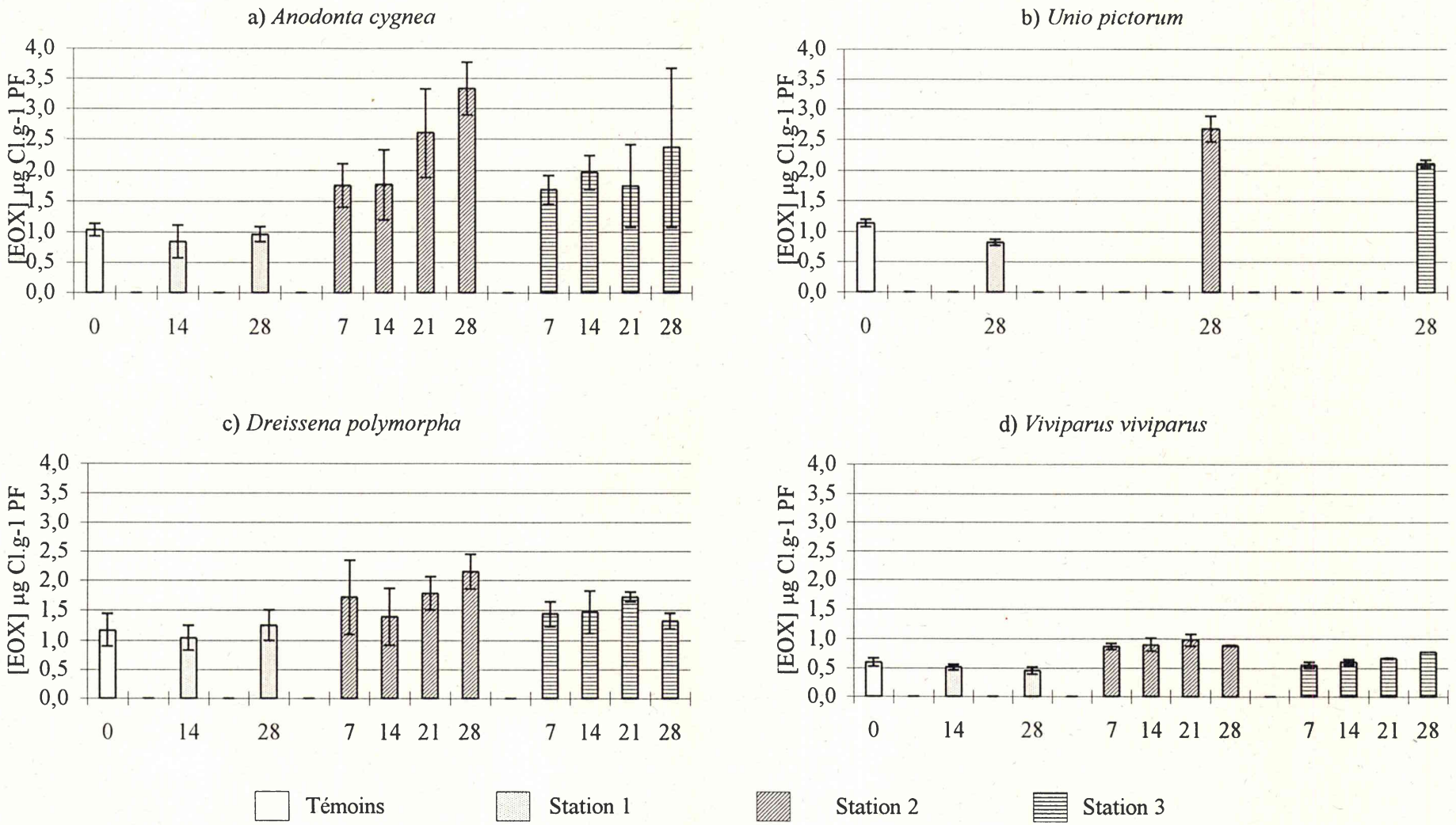


Figure 5.6 : Evolution de la concentration en EOX (µg Cl.g-1 PF) en fonction du temps et de la station d'exposition chez les quatre espèces de mollusques. Les histogrammes représentent les moyennes, les barres verticales les écarts types (*A. cygnea* , n=4 ; *U. pictorum* , n=3 ; *D. polymorpha, V. viviparus* , n=2).

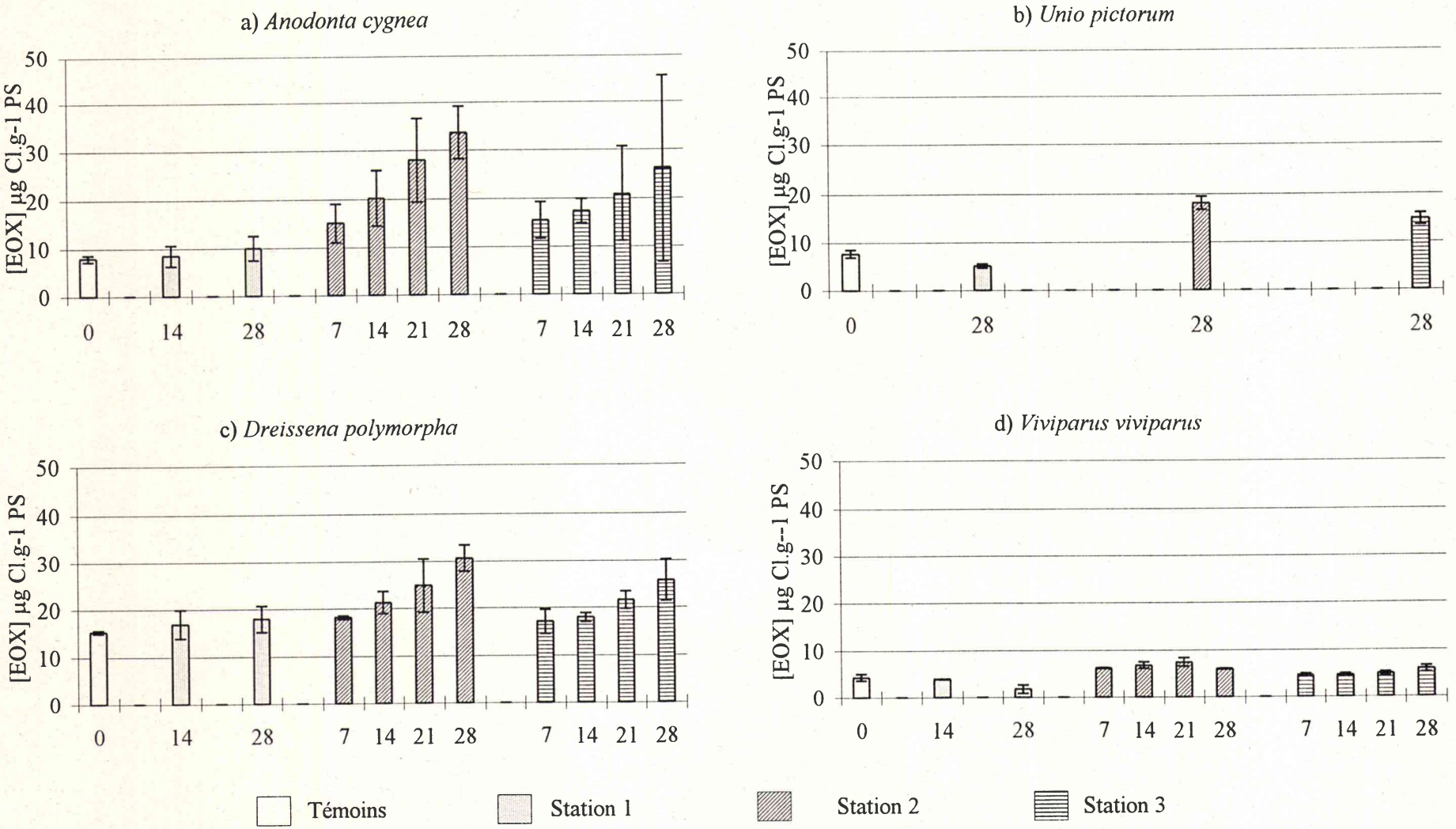


Figure 5.7 : Evolution de la concentration en EOX (µg Cl.g-1 PS) en fonction du temps et de la station d'exposition chez les quatre espèces de mollusques. Les histogrammes représentent les moyennes, les barres verticales les écarts types (*A. cygnea* , n=4 ; *U. pictorum* , n=3 ; *D. polymorpha, V. viviparus* , n=2).

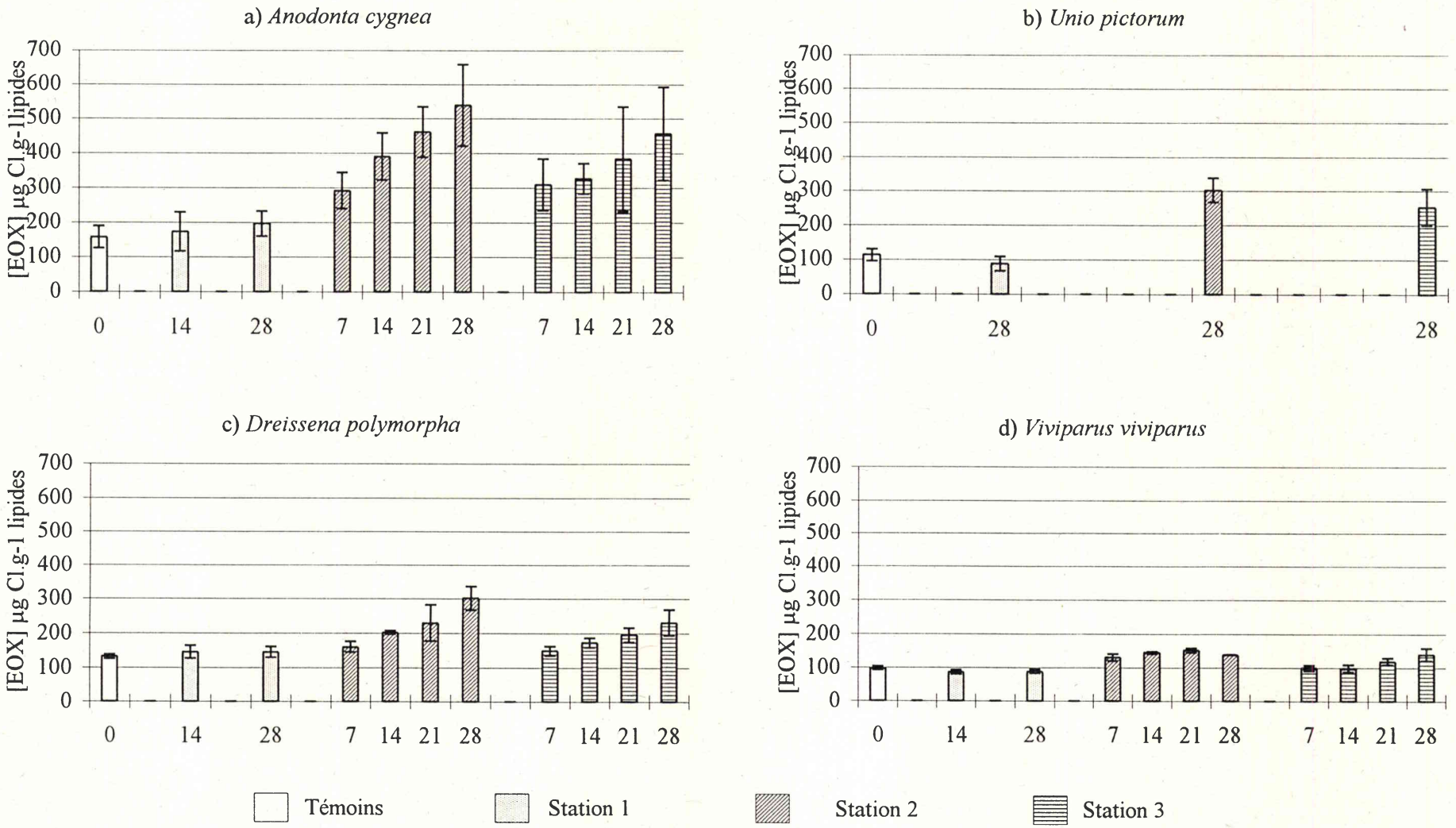


Figure 5.8 : Evolution de la concentration en EOX (µg Cl.g-1 lipides) en fonction du temps et de la station d'exposition chez les quatre espèces de mollusques. Les histogrammes représentent les moyennes, les barres verticales les écart-types (*A. cygnea* , n=4 ; *U. pictorum* , n=3 ; *D. polymorpha, V. viviparus* , n=2).

station 2 que pour les animaux exposés à la station 3 (tableau 5.8). Il est le plus élevé chez *A. cygnea*, suivi de *U. pictorum*, *D. polymorpha* et *V. viviparus*.

Tableau 5.8 : Facteurs de pollution ([EOX] station d'exposition / [EOX] témoins) des quatre espèces de mollusques en fonction de la station d'exposition, calculés pour les concentrations exprimées par rapport au poids de lipides, après 28 jours d'exposition.

Espèce	Station 1	Station 2	Station 3
A. cygnea	1.2	3.4	2.9
U. pictorum	0.8	2.7	2.2
D. polymorpha	1.1	2.3	1.8
V. viviparus	0.9	1.4	1.4

Selon Berry (1992), les concentrations en EOX, dans les effluents d'usines de pâte à papier classiques, blanchissant au ClO_2 et Cl_2, représentent 1 à 3 % des concentrations en AOX, avec une moyenne de 2 %. Ceci permet de calculer le facteur de bioaccumulation (FB) dans les mollusques exposés au niveau des deux stations aval par la formule :

$$FB = \frac{[EOX]_{28j} \text{ mollusque aval} - [EOX]_{28j} \text{ mollusque amont}}{([AOX] \text{ eau aval} - [AOX] \text{ eau amont}) * 0.02}$$

Le tableau 5.9 regroupe les valeurs du FB dans les mollusques exposés au niveau des deux stations aval, calculés à partir des concentrations en EOX aprés 28 jours d'exposition, exprimées par rapport au poids frais des mollusques.

Tableau 5.9 : Facteurs de bioaccumulation des mollusques après 28 jours d'exposition à la station 2 et à la station 3, calculé à partir des concentrations exprimées par rapport au poids frais.

Espèce	Station 2	Station 3
A. cygnea	432	564
U. pictorum	332	520
D. polymorpha	160	188
V. viviparus	79	128

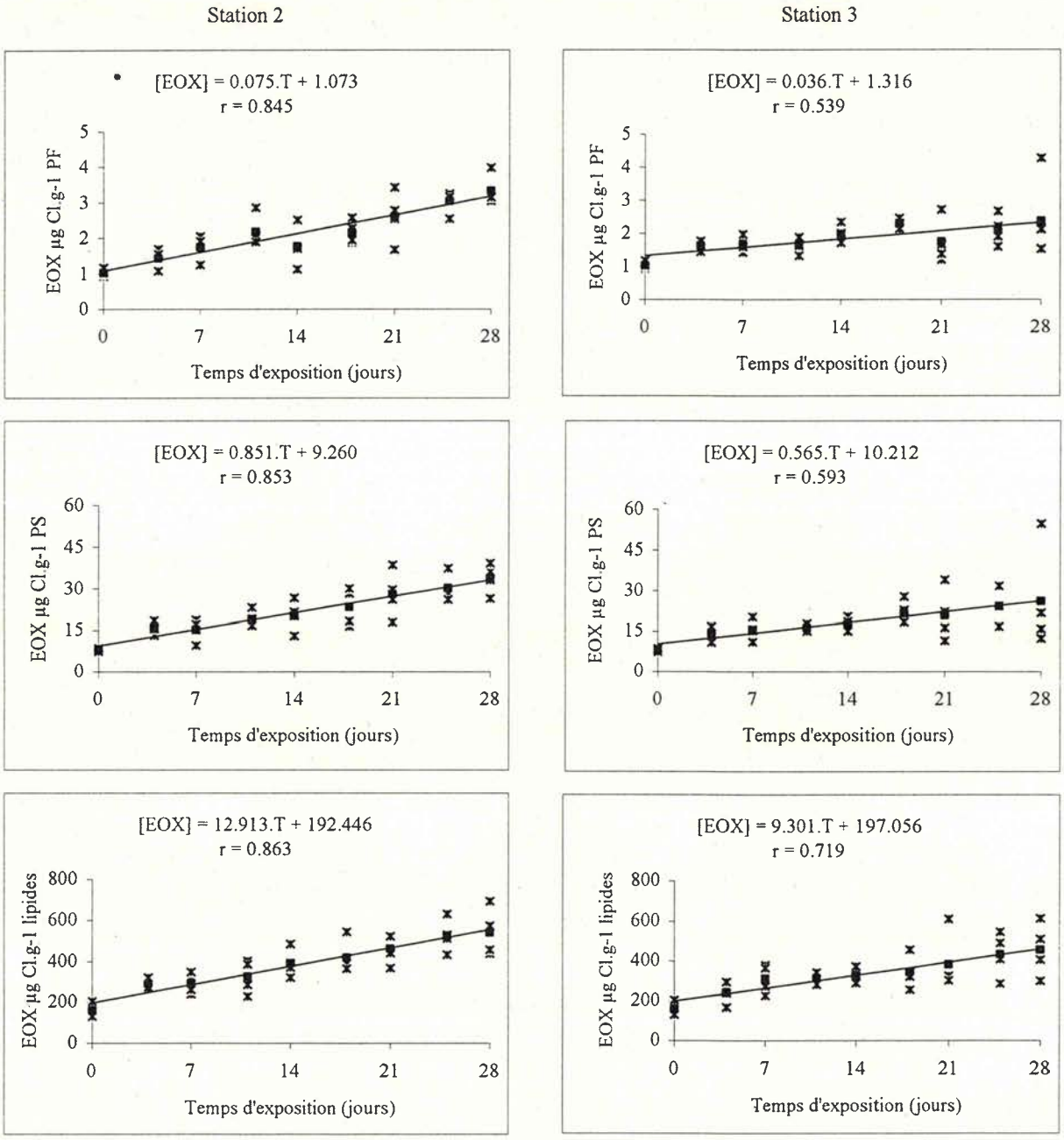


Figure 5.9 : Cinétiques d'accumulation d'EOX chez les anodontes exposés au niveau des stations 2 et 3.
Les étoiles représentent les valeurs individuelles, les carrés noirs les moyennes sur 4 individus.

Comme pour les facteurs de pollution, les deux espèces de bivalves unionidés, *A. cygnea* et *U. pictorum*, présentent les facteurs de bioaccumulation les plus élevés, suivi de *D. polymorpha*, puis de *V. viviparus*. Cependant, contrairement au facteur de pollution, les valeurs du facteur de bioaccumulation sont plus élevées au niveau de la station 3 qu'au niveau de la station 2, et ceci pour les quatre espèces de mollusques.

V.3.3.3. Cinétiques d'accumulation des EOX par *A. cygnea*

Les résultats complets des concentrations en EOX dans les anodontes exposés au niveau des deux stations situées en aval des rejets d'EPKB en fonction du temps sont présentés dans la figure 5.9. Il apparaît que les concentrations augmentent de manière linéaire, et présentent une corrélation positive avec le temps d'exposition. Le coefficient de corrélation est compris entre 0.539 et 0.863. Il est toujours plus élevé au niveau de la station 2, et augmente selon que les concentrations sont exprimées en fonction du poids frais, du poids sec ou du poids de lipides. La valeur de l'ordonnée à l'origine est similaire pour les deux stations. Elle est légèrement supérieure à la concentration mesurée dans les témoins, mais correspond à celle mesurée dans les anodontes exposés à la station 1, en amont des rejets. D'autre part, la pente des droites de régression est toujours supérieure chez les anodontes de la station 2.

Après 28 jours d'exposition, les concentrations en EOX dans les anodontes n'ont pas atteint de plateau d'équilibre, ni à la station 2, ni à la station 3.

V.4. Discussion

La quantification de composés organo-halogénés dans les sédiments peut se faire par l'utilisation de deux paramètres de groupes complémentaires : AOX (Hoffmann *et al.*, 1988) et EOX (Martinsen *et al.*, 1994). Selon Palm & Lammi (1995), les concentrations en AOX et en EOX mesurées dans les sédiments du Golfe de Botnie présentent une corrélation significative. Ceci a également été observé dans des sédiments prélevés dans le Golfe de Finlande, où la concentration en EOX représente en moyenne 3.4 % de la concentration en AOX (Kankaanpää & Tissari, 1994b). L'existence d'une méthode normalisée pour la mesure des AOX dans les boues et les sédiments (DIN, 1989) nous a fait préférer cette méthode à celle des EOX. Contrairement aux résultats observés lors de la première étude (chapitre IV), les concentrations en AOX dans les sédiments prélevés au niveau des stations aval sont stables au cours des 28 jours d'étude. Lors de la présente étude, l'usine de pâte à papier avait repris son activité, sans interruption, depuis plus de 7 mois, et les sédiments analysés ont été exposés durant une longue période aux rejets chroniques de l'usine. Les concentrations en AOX mesurées pourraient ainsi refléter une situation d'équilibre entre l'adsorption et la désorption des composés organo-halogénés sur les sédiments, comme nous l'avons vu au chapitre précédent. La présence d'une concentration non

négligeable en AOX au niveau de la station 1, en amont des rejets de l'usine, tend à confirmer l'existence de phénomènes d'halogénations naturels comme ils ont été décrits en milieu terrestre et limnique (Asplund *et al.*, 1989). A titre de comparaison, les concentrations en AOX rencontrées aussi bien en amont (15 à 30 µg $Cl.g^{-1}$ poids sec), qu'en aval des rejets de l'usine (45 à 80 µg $Cl.g^{-1}$ poids sec) sont nettement inférieures à celles mesurées dans le Golfe de Finlande, respectivement dans une zone non soumise aux rejets anthropiques (50 à 180 µg $Cl.g^{-1}$ poids sec, Kankaanpää & Tissari, 1994a) et dans une zone à proximité de rejets d'EPKB (jusqu'à 620 µg $Cl.g^{-1}$ poids sec, Kankaanpää & Tissari, 1994b). Cependant, selon ces mêmes auteurs, une possible interférence par les ions chlorures, plus abondants en milieu marin qu'en milieu dulcicole, n'est pas à exclure, et peut dans certains cas expliquer les plus fortes concentrations mesurées dans les sédiments marins (Kankaanpää & Masuku, 1992).

A l'exception de *A. cygnea*, aucune espèce de mollusque ne présente de variations significatives ni du poids sec, ni du poids des lipides, entre les individus exposés et leurs témoins respectifs. Mersch & Pihan (1993) montrent une diminution significative du poids sec et du taux de fixation chez des dreissènes transférées. Cette première réponse au stress n'a pas été observée lors des 28 jours de notre étude. Même après une exposition de 5 mois à des EPKB, ni le pourcentage de poids sec, ni le pourcentage de lipides n'ont varié significativement chez *A. anatina* (Mäkelä *et al.*, 1992). De plus, des variations saisonnières dans la physiologie des animaux, telles que l'accumulation de lipides durant l'hiver (Pellinen *et al.*, 1994), n'ont pas été observés durant cette exposition relativement courte qui a eu lieu dans la même saison. Quoi qu'il en soit, pour une espèce donnée, ces variations biologiques sont généralement faibles et n'interfèrent pas significativement sur le résultat d'accumulation de composés organo-halogénés (Herve *et al.*, 1988). En revanche, les différences significatives observées pour le poids sec et le poids de lipides entre les quatre espèces sont importantes à noter car elles influent directement sur l'expression et la comparaison des concentrations en EOX. Etant donné que la majorité des molécules organo-halogénés sont hydrophobes et s'accumulent préférentiellement dans les graisses, les résultats obtenus seront discutés sur la base des concentrations en EOX exprimées par rapport au poids de lipides.

Comme pour les anodontes utilisés lors de l'étude précédente (chapitre IV), les quatre espèces de mollusques prélevés au niveau de la station de référence présentent déjà des concentrations non négligeables en EOX, variant de 97.3 à 157.2 µg $Cl.g^{-1}$ lipides. Les concentrations en EOX mesurées dans les anodontes sont du même ordre de grandeur que celles mesurées auparavant, renforçant l'hypothèse du « bruit de fond naturel », plutôt que celle de la contamination du site d'origine. A titre de comparaison, des concentration naturelles de 120 et 1070 µg $Cl.g^{-1}$ lipides ont été mesurées respectivement dans les poissons, *Perca fluviatilis* et *Salmo salar*, issus de lacs de référence suédois et finlandais (NSEPB, 1989 ; Pellinen *et al.*, 1993). Des concentrations de référence variant de 86 à 1972 µg $Cl.g^{-1}$ lipides ont été mesurées dans des moules marines, *Mytilus edulis*, sur les côtes australiennes

(Haynes *et al.*, 1995). De la même manière des anodontes prélevés dans un lac de référence finlandais présentent des concentrations de base variant de 615 à 990 µg $Cl.g^{-1}$ lipides (Pellinen *et al.*, 1993). Selon ces mêmes auteurs, la concentration naturelle en EOX dans *A. anatina* est fonction de la saison, telle que [EOX] (µg $Cl.g^{-1}$ lipides) = 111 + 1.31 x jour de l'année (Pellinen *et al.*, 1994). Cette relation n'a pas été observée chez les anodontes utilisés dans nos études, étant donné que les animaux prélevés au mois de février ([EOX] moyenne de 150.6 ± 6.2 µg $Cl.g^{-1}$ lipides, chapitre IV) et au mois de septembre ([EOX] moyenne de 157.2 ± 31.9 µg $Cl.g^{-1}$ lipides, ce chapitre) ne différent pas significativement. Il est a rappeler que les anodontes utilisés dans ces deux études sont originaires du même cours d'eau (la Meuse), mais n'ont pas été prélevés à la même station. Dans tous les cas, une contamination des mollusques par une pollution diffuse de composés organo-halogénés ne peut être exclue.

Les quatre espèces de mollusques exposées au niveau des deux stations situées en aval des rejets de l'usine de pâte à papier montrent une augmentation de leur concentration en EOX au cours des 28 jours de l'étude. Cependant, cette augmentation n'est pas statistiquement significative pour toutes les espèces, et le taux d'accumulation d'EOX dépend de l'espèce et de la station d'exposition. Le plus faible taux d'accumulation est observé chez *V. viviparus*, chez qui la concentration en EOX n'augmente que d'un facteur 1.4 au bout de 28 jours d'exposition, et ce aussi bien au niveau de la station 2 que de la station 3. Lors d'une étude d'accumulation du cadmium par quatre espèces de mollusques aquatiques, Winter (1996) montre que le gastéropode *Ancylus fluviatilis* présente des taux d'accumulation plus faibles que les bivalves, *D. polymorpha* et *Corbicula fluviatilis*. *V. viviparus* est un gastéropode qui vit sur le fond des cours d'eau et se nourrit essentiellement d'algues et de débris organiques (Glöer & Meier-Brock, 1994). Le fait que dans la présente étude les gastéropodes aient été exposés dans des cages sans contact direct avec le fond du cours d'eau peut en partie expliquer la plus faible accumulation. En effet, lors des vérifications de l'état de vitalité des mollusques, la grande majorité des vivipares avaient leur opercule fermé, réduisant ainsi fortement leur contact avec leur environnement, et la possibilité d'accumuler des composés organo-halogénés. Les trois espèces de bivalves présentent des taux d'accumulation d'EOX supérieurs à ceux des gastéropodes, et variant avec la station d'exposition, c'est à dire avec la concentration en AOX dans l'eau. Cependant, pour les trois espèces, l'accumulation d'EOX n'est pas directement proportionnelle aux concentrations en AOX dans l'eau. Effectivement, la concentration moyenne en AOX est deux fois plus élevée à la station 2 qu'à la station 3, alors que dans les bivalves le rapport entre les concentrations en EOX à la station 2 et à la station 3 est plus faible (1.2 à 1.3). Une observation semblable a été faite par Pellinen *et al.* (1993), qui montrent que lorsque la concentration en AOX dans l'eau augmente d'un facteur 10, la concentration en EOX dans *A. anatina* n'augmente que d'un facteur 3 après 5 mois d'exposition. Deux hypothèses peuvent être avancées pour expliquer ces différences. Tout d'abord la qualité générale de l'eau, qui, comme nous l'avons vu au chapitre précédent, influence directement l'ouverture des valves et l'activité de filtration des bivalves.

La qualité de l'eau étant dégradée au niveau de la station 2, les bivalves filtrent moins, et sont donc moins en contact direct avec leur environnement contaminé, ce qui se traduit par une accumulation relativement plus faible qu'au niveau de la station 3, 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 imédiate des rejets d'EPKB (Kukkonen, 1992). Ces molécules sont désorbées lorsque leur concentration dissoute diminue dans l'eau, et redeviennent alors biodisponibles à des distances éloignées de la source de pollution. Ceci est confirmé par les facteurs de bioaccumulation qui sont plus élevés au niveau de la station 3 qu'au niveau de la station 2. Cette deuxième hypothèse permet aussi d'expliquer les différences observées dans les taux d'accumulation entre *D. polymorpha* et les deux bivalves unionidés, *A. cygnea* et *U. pictorum*. Parmi les trois espèces de bivalves, *D. polymorpha* présente les plus faibles taux d'accumulation d'EOX, avec respectivement 2.3 et 1.8 après 28 jours d'exposition à la station 2 et à la station 3. Les concentrations en EOX des deux unionidés augmentent d'un facteur 2.7 et 2.2 pour *U. pictorum* et d'un facteur 3.4 et 2.9 pour *A. cygnea*, respectivement à la station 2 et à la station 3. La méthode d'exposition différente pour les deux unionidés, par raport à celle de *D. polymorpha*, peut en partie expliquer les plus forts taux d'accumulation. En effet, les unionidés sont exposés dans les sédiments contaminés des deux stations aval, et sont ainsi en contact avec les composés organo-halogénés dans l'eau et dans les sédiments. L'accumulation des EOX peut donc se faire depuis l'eau et les sédiments. De plus, Salanki & V.-Balogh (1985) ont montré que même la fermeture totale des valves n'empêchait pas l'accumulation de métaux lourds chez *A. cygnea*. Etant donné que la majorité des molécules organo-halogénées hydrophobes s'accumulent dans les matières en suspension et les sédiments, il semble que la voie principale d'accumulation d'EOX se fasse par la filtration de celles-ci. De fait, dans une étude d'accumulation de 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-p-dioxine et de 2,3,7,8-tétrachlorodibenzofuranes par différentes espèces de poissons, Owens *et al.* (1994) montrent que les concentrations de ces molécules sont significativement plus élevées chez les poissons se nourrissant d'insectes filtreurs, avec pour déduction que l'accumulation se fait essentiellement par l'intermédiaire de la chaîne alimentaire.

Contrairement au pentachlorophénol et au 4,5,6-trichloroguaiacol, qui, en laboratoire, atteignent un plateau d'équilibre en moins de 24 heures dans les tissus de *A. anatina* (Mäkelä & Oikari, 1990), aucun plateau de concentration n'est observé dans les concentrations en EOX après 28 jours d'exposition. Ceci est conforme aux résultats obtenus par Hansen (1992) et Reincke (1992), qui n'observent pas de plateau d'équilibre chez *D. polymorpha*, et ce même après 9 mois d'exposition à une concentration moyenne en AOX de 100 µg Cl/l. De même Hektoen *et al.* (1994), n'observent pas

d'équilibre dans les concentrations de dioxines et de furanes dans des moules marines, *Mytilus edulis*, exposées durant 99 jours à des sédiments contaminés.

V.5. Conclusions

Les sédiments se révèlent être de bons indicateurs de la contamination par les composés organo-halogénés car ils répondent rapidement aux variations de concentration dans l'eau, et présentent une corrélation significative avec les concentrations en AOX dans l'eau, reflétant ainsi la contamination chronique engendrée par l'usine de pâte à papier. Cependant, ils ne donnent pas d'informations sur la fraction de micropolluants organo-halogénés biodisponible, qui est celle qui risque d'avoir un effet écotoxicologique. Durant les 28 jours d'exposition, aucun effet toxique des EPKB n'a pu être observé chez les quatre espèces de mollusques. L'accumulation de composés organo-halogénés extractibles est faible et non significative chez le gastéropode, *V. viviparus*, mais se fait de manière progressive chez les trois espèces de bivalves. En termes de concentration absolue, l'accumulation d'EOX est plus élevée chez les bivalves exposés à la station la plus proche des rejets de l'usine (station 2), se traduisant par des facteurs de concentration plus élevés. Cependant, elle ne présente pas de relation directe avec les concentrations moyennes en AOX dans l'eau, et en termes de facteurs de bioaccumulation, elle est plus importante au niveau de la station 3 qu'au niveau de la station 2. Une période d'exposition de 28 jours ne semble pas être suffisamment longue pour estimer la quantité d'EOX accumulables par les mollusques étant donné qu'aucun plateau d'équilibre des concentrations n'a pu être observé. Lors de cette étude, les taux d'accumulation, rangés dans l'ordre décroissant, sont :

A. cygnea > *U. pictorum* > *D. polymorpha* > *V. viviparus*.

Chapitre VI

Etude de l'accumulation de composés organo-halogénés extractibles dans différents organes de *Anodonta cygnea*

VI.1. Introduction - Objectifs de l'étude

Parmi les quatre espèces testées dans le chapitre précédent pour comparer l'accumulation de composés organo-halogénés extractibles, le bivalve *Anodonta cygnea*, s'est révélé être plus intéressant que les autres mollusques. En effet, en plus de sa grande résistance aux EPKB, *Anodonta cygnea* est l'espèce qui présente le plus fort taux d'accumulation d'EOX. 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 inter-individuelle. Cette caractéristique morphologique permet également de disséquer facilement les individus afin de pouvoir quantifier et compare l'accumulation d'EOX dans certains organes intervennant dans les processus de prise, de transport, d'accumulation et de détoxication.

La localisation (en contact avec le milieu environnant ou non), les fonctions physiologiques et la composition biochimique (notamment le taux de lipides) des différents organes varient fortement, et influencent directement ou indirectement la quantité et la qualité des composés organo-halogénés accumulés.

Après avoir vu l'accumulation d'EOX au niveau des organismes entiers, le 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 éventuel organo-tropisme de ces composés. Pour cela trois organes ont été choisi : les branchies, qui par leurs fonctions dans l'alimentation et la respiration représentent la plus grande surface de contact entre l'animal et le milieu extérieur (Morton, 1983) ; la glande digestive, site essentiel du tri, de la digestion intracellulaire et de l'adsorption des aliments et des micropolluants associés, mais également un des sites principaux de défense de l'organisme contre les micropolluants (Henry, 1987) ; 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 (McMaster *et al.*, 1992). Des anodontes ont été collectés dans un milieu faiblement contaminé par les organo-halogénés, puis transférés et exposés au niveau de trois stations (une amont et deux aval) à proximité des rejets d'une usine de pâte à papier. Durant les 91 jours de l'étude, des prélèvements réguliers d'eau et d'anodontes ont été réalisés, et les micropolluants organo-halogénés ont été dosés à l'aide des paramètres AOX (eau) et EOX (organes des anodontes).

VI.2. Protocole expérimental

La figure 6.1 résume le protocole expérimental des prélèvements d'eau et d'anodontes lors des 91 jours de cette étude.

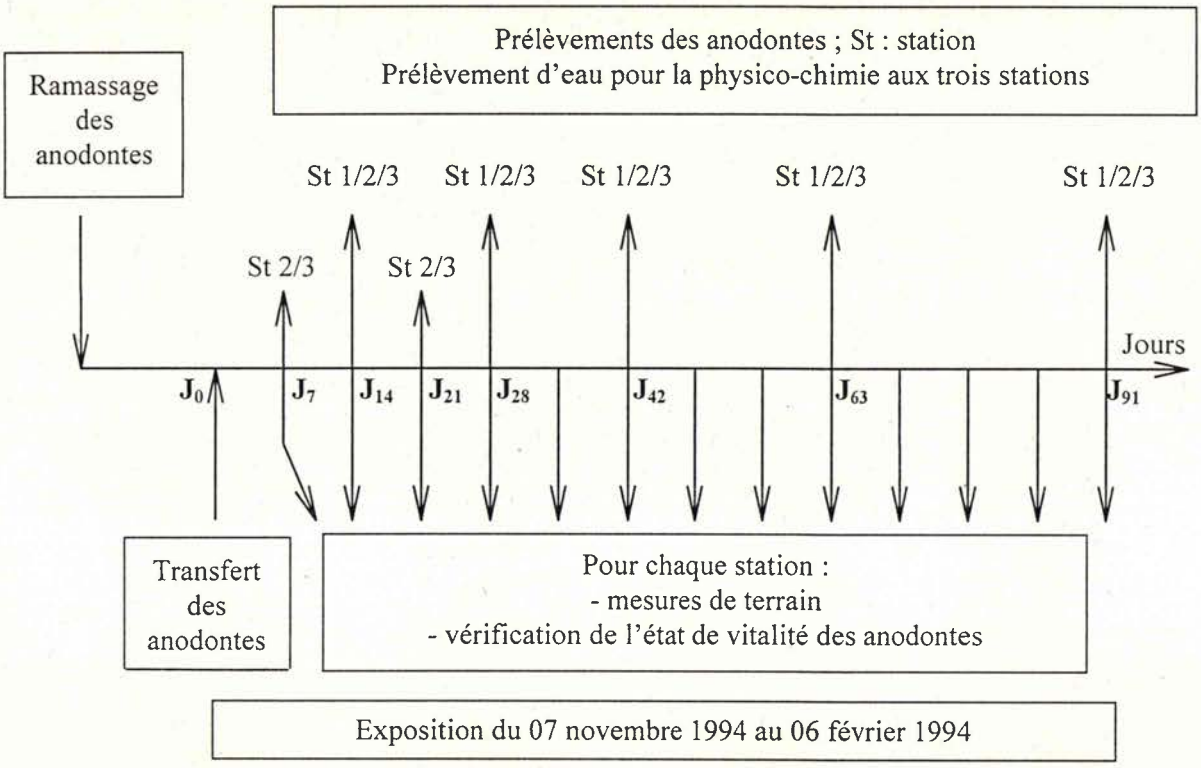


Figure 6.1 : Protocole expérimental de l'étude d'accumulation d'EOX dans différents organes de *Anodonta cygnea*.

VI.2.1. Collecte, conditionnement, transfert et exposition 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 ± 4.9 mm) sont retenus, et conditionnés selon le protocole décrit au § II.2, avant d'être transférés, 14 jours après le ramassage. 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, neuf individus témoins sont prélevés, 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.

VI.2.2. 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, 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.

VI.2.3. 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. La différence entre le poids frais total et la somme du poids des organes constitue le poids des liquides internes. 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 § II.4.4.

VI.2.4. 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 sont comparés à l'aide d'une analyse de variance, suivi d'une comparaison multiple par la méthode H.S.D de Tuckey, au seuil de 0.05, et par le test T de Student au seuil de 0.05.

VI.3. Résultats

VI.3.1. Résultats de l'analyses de l'eau

VI.1.3.1.1. Physico-chimie de l'eau

Le tableau 6.1 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 précédentes, la qualité générale de l'eau du Ton se dégrade fortement en aval des rejets de l'usine de pâte à papier. 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.

Tableau 6.1 : Caractéristiques physico-chimiques (moyenne ± 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	St1/2	St1/3	St2/3
pH		8.1 ± 0.1	8.0 ± 0.1	8.1 ± 0.1	14	*	n.s.	*
Conductivité	$\mu S.cm^{-1}$	379 ± 10	651 ± 59	621 ± 43	14	*	*	n.s.
Température	°C	5.0 ± 1.6	10.2 ± 1.5	6.6 ± 1.8	14	*	*	*
Oxygène dissous	$mg.l^{-1}$	9.6 ± 1.0	8.4 ± 0.9	9.2 ± 0.9	14	*	n.s.	*
M.E.S.	$mg.l^{-1}$	6.0 ± 1.3	21.2 ± 9.9	11.5 ± 4.1	6	*	*	n.s.
DCO	$mg.l^{-1}$	12.3 ± 2.8	33.2 ± 5.3	21.7 ± 2.7	6	*	*	*
Cl^-	$mg.l^{-1}$	15.4 ± 3.6	47.2 ± 12.9	40.5 ± 11.3	6	*	*	n.s.
F^-	$mg.l^{-1}$	0.1 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.2 ± 0.0	6	n.s.	*	*
Br^-	$mg.l^{-1}$	0.0 ± 0.0	2.9 ± 2.2	0.9 ± 1.3	6	*	n.s.	n.s.
K^+	$mg.l^{-1}$	2.4 ± 0.1	5.1 ± 0.6	5.4 ± 0.3	6	*	*	n.s.
Na^+	$mg.l^{-1}$	7.4 ± 1.4	61.2 ± 15.7	38.3 ± 5.5	6	*	*	*
Ca^{2+}	$mg.l^{-1}$	86.1 ± 3.3	100.7 ± 8.7	110.9 ± 2.8	6	*	*	*
Mg^{2+}	$mg.l^{-1}$	3.4 ± 0.2	3.4 ± 0.2	4.4 ± 0.3	6	n.s.	*	*
N Total	$mg.l^{-1}$	0.36 ± 0.01	0.60 ± 0.04	0.57 ± 0.04	6	*	*	n.s.
P Total	$mg.l^{-1}$	0.16 ± 0.01	0.20 ± 0.02	0.23 ± 0.02	6	*	*	*
SO_4^{2-}	$mg.l^{-1}$	29.1 ± 3.1	102.6 ± 31.0	89.5 ± 15.2	6	*	*	n.s.

VI.1.3.1.2. Contamination de l'eau par les AOX

La figure 6.2 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 gelée dans les tuyaux, empêchant le pompage. Durant cette période, des prélèvements ponctuels hebdomadaires sont réalisés aux 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 6.2). Au niveau de la station 2, les concentrations en AOX augmentent fortement, et la moyenne est multipliée par un facteur 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 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^{éme} et le 57^{éme} jour d'exposition, correspondant à un arrêt provisoire de l'usine durant les vacances de Noël.

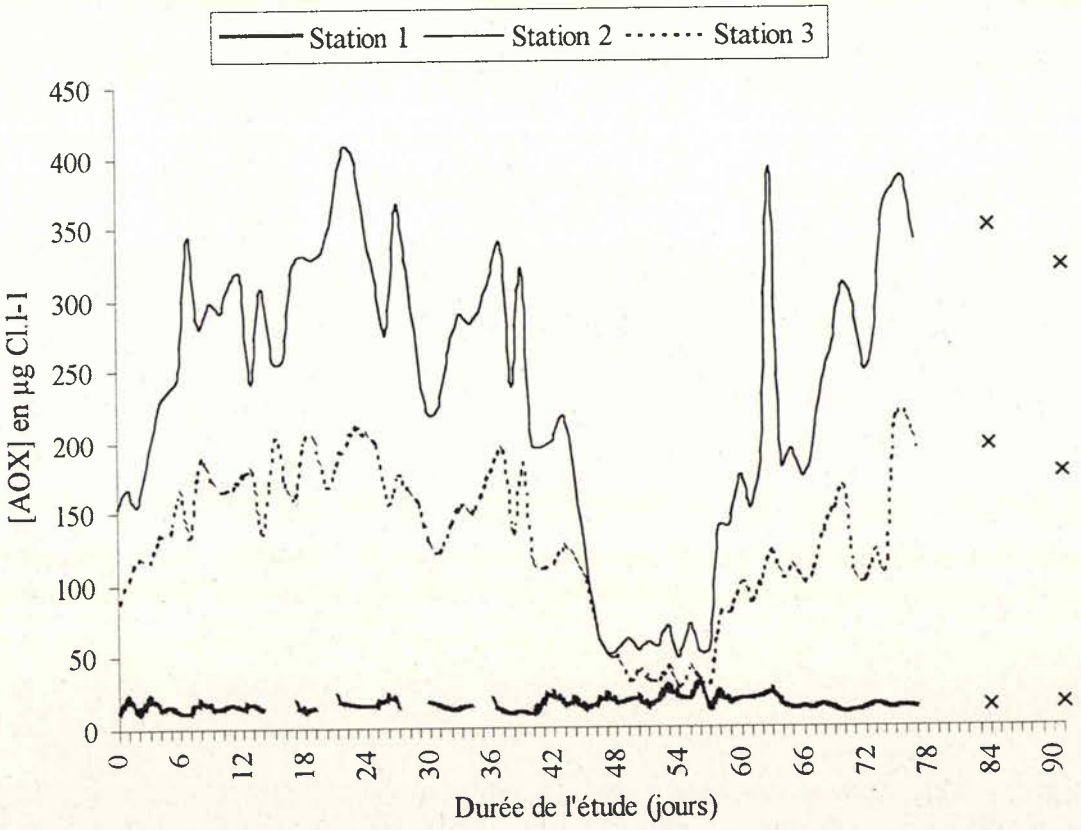


Figure 6.2 : Evolution de la concentration en AOX dans l'eau des trois stations.

Tableau 6.2 : Concentrations minimales, moyennes et maximales en AOX au niveau des trois stations.

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

VI.3.2. Résultats des analyses des anodontes

VI.3.2.1. Caractéristiques morphologiques

Les données brutes des caractéristiques morphologiques des anodontes sont regroupées dans l'annexe D (Tableau D.1).

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 6.3), le poids frais total des anodontes varie plus fortement (coefficient de variation > 20%), et présente des différences significatives entre certains lots.

Tableau 6.3 : Caractéristiques morphologiques des anodontes utilisés dans cette étude (n=180).

		Moyenne	Ecart type	C.V. (%)	Minimum	Maximum
Longueur	mm	85.4	4.9	5.7	74.5	97.8
Hauteur	mm	50.3	2.8	5.6	44.8	58.6
Epaisseur	mm	30.0	2.5	8.3	24.1	36.4
Poids frais total	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 6.4). Cependant, aucune différence statistiquement significative n'est observée entre les 20 lots, ni pour le poids de la coquille, ni pour le poids des parties molles, ni pour le poids dues liquides internes.

Tableau 6.3 : Pourcentages relatifs (par rapport au poids frais total) des trois composantes principales des anodontes (n=180).

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

VI.3.2.2. Paramètres physiologiques

VI.3.2.2.1. Mortalité

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

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

La mortalité totale est donc de respectivemnt 3.8 et 2.5 % à al station2 et à la station 3.

VI.3.2.2.2. Indice de condition

Etant donné que les anodontes utilisés dans cette étude sont disséqués et les organes traités individuellement, il n'est pas possible de déterminer le poids sec et le poids de lipides sur les organismes entiers. 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 6.3 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.

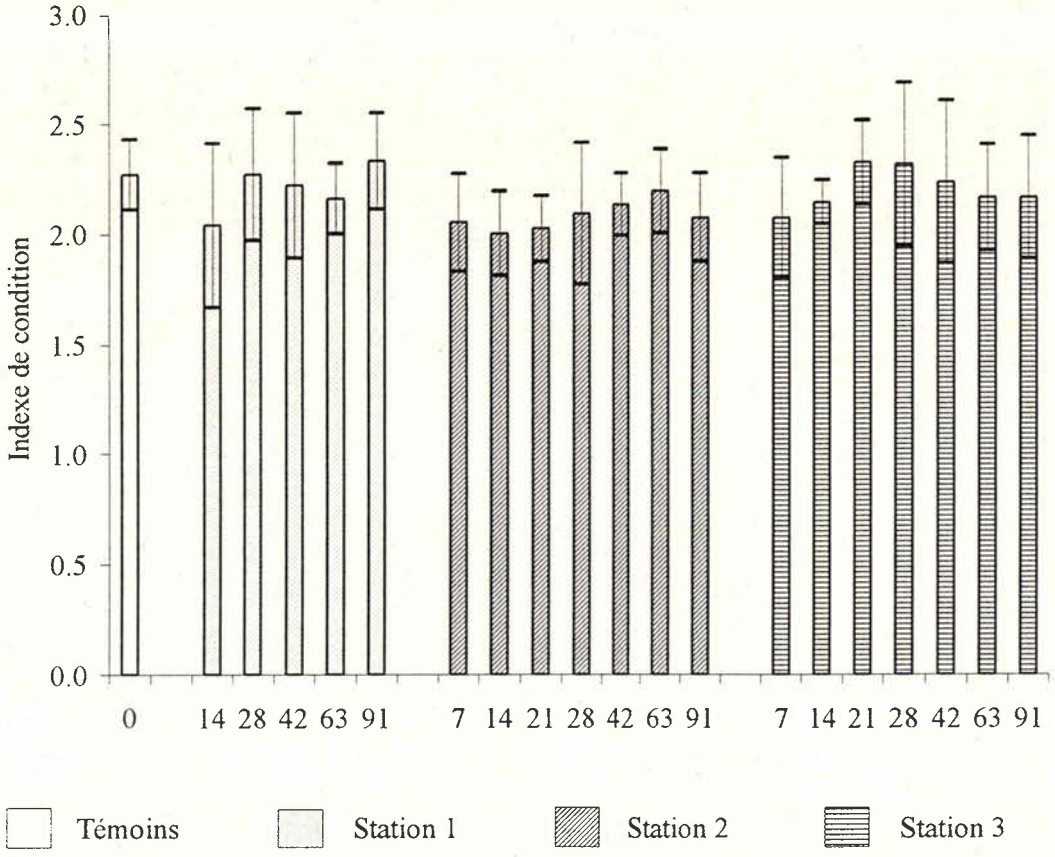


Figure 6.3 : Evolution de l'indice de condition en fonction du temps et de la station d'exposition. Les histogrammes représentent les moyennes, les barres verticales les écart-types (n=9).

VI.3.3. Etude des différents organes de *Anodonta cygnea*

Les données brutes (paramètres physiologiques et concentrations en EOX) concernant les tros organes ainsi que les restes des anodontes sont regroupées dans l'annexe D (tableaux D.2 à D.5).

VI.3.3.1. Indices 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 6.4a), 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 élevé chez les anodontes exposés que chez les anodontes témoins (figure 6.4b), sans pour autant que ces différences ne soient significatives. Seul l'indices de glandes digestives présente des différences significatives entre les anodontes témoins et ceux exposés durant les premiers jours au niveau des deux stations aval

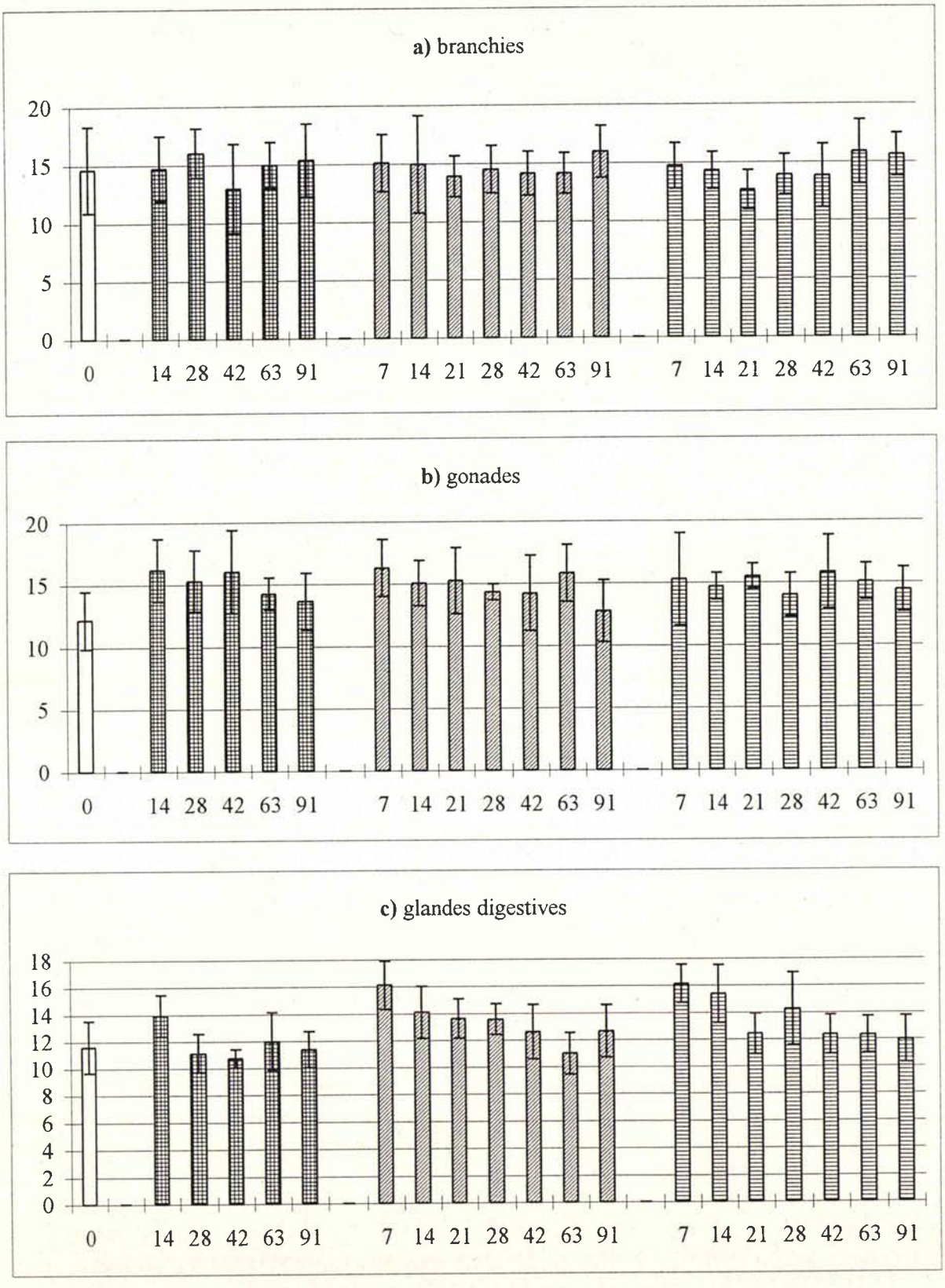


Figure 6.4 : Evolution des indices organiques en fonction du temps et de la station d'exposition. Les histogrammes représentent les moyennes, les barres verticales les écarts types, (n=9 pour tous).

figure 6.4c). 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 6.4).

Tableau 6.4 : Poids relatif des trois organes par rapport au poids frais des parties molles (n=180).

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

VI.3.3.2. Pourcentage de poids sec - pourcentage de lipides

Le pourcentage de poids sec moyen des branchies des anodontes exposés est plus faible que celui mesuré chez les témoins ; il varie légèrement au cours du temps et en fonction des stations d'exposition (figure 6.5a). Cependant, aucune des différences observées n'est statistiquement significative. Il en est de même au niveau des gonades (figure 6.5b), pour lesquelles 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 et des restes 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 et les gonades, au cours de l'exposition, aussi bien au niveau de la station amont que des deux stations aval (figure 6.6a, b, c). Il varie plus fortement dans les glandes digestives, mais pour les trois organes, aucune différence statistiquement significative n'est observée, ni au cours du temps, ni entre les stations.

Tableau 6.5 : Pourcentages moyens de poids sec et de poids de lipides dans les trois organes étudiés et les restes (n=60).

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

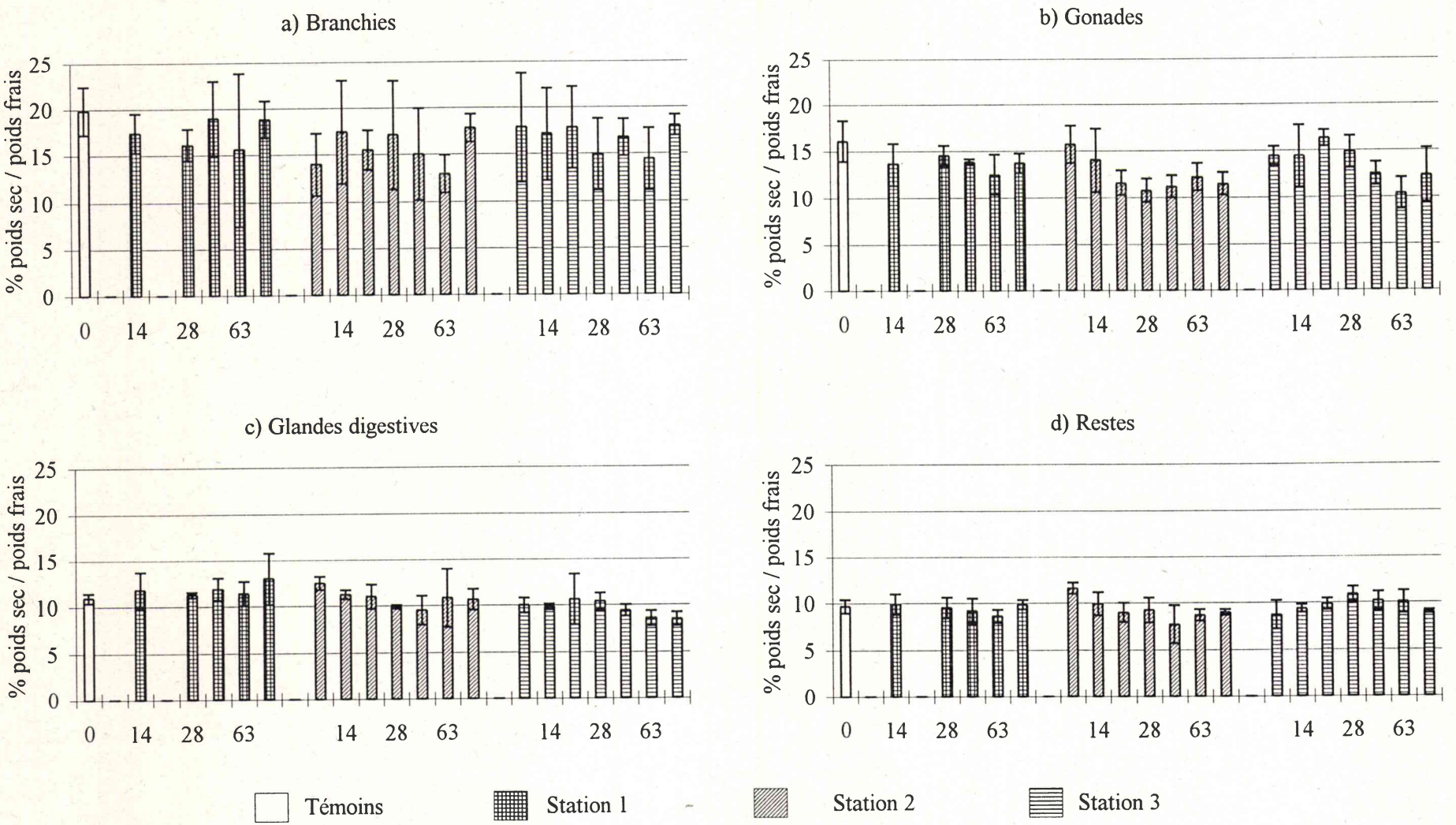


Figure 6.5 : Evolution du pourcentage de poids sec (/ poids frais) en fonction du temps et de la station d'exposition dans les différents organes. Les histogrammes représentent les moyennes, les barres verticales les écarts types (n = 3 pour tous).

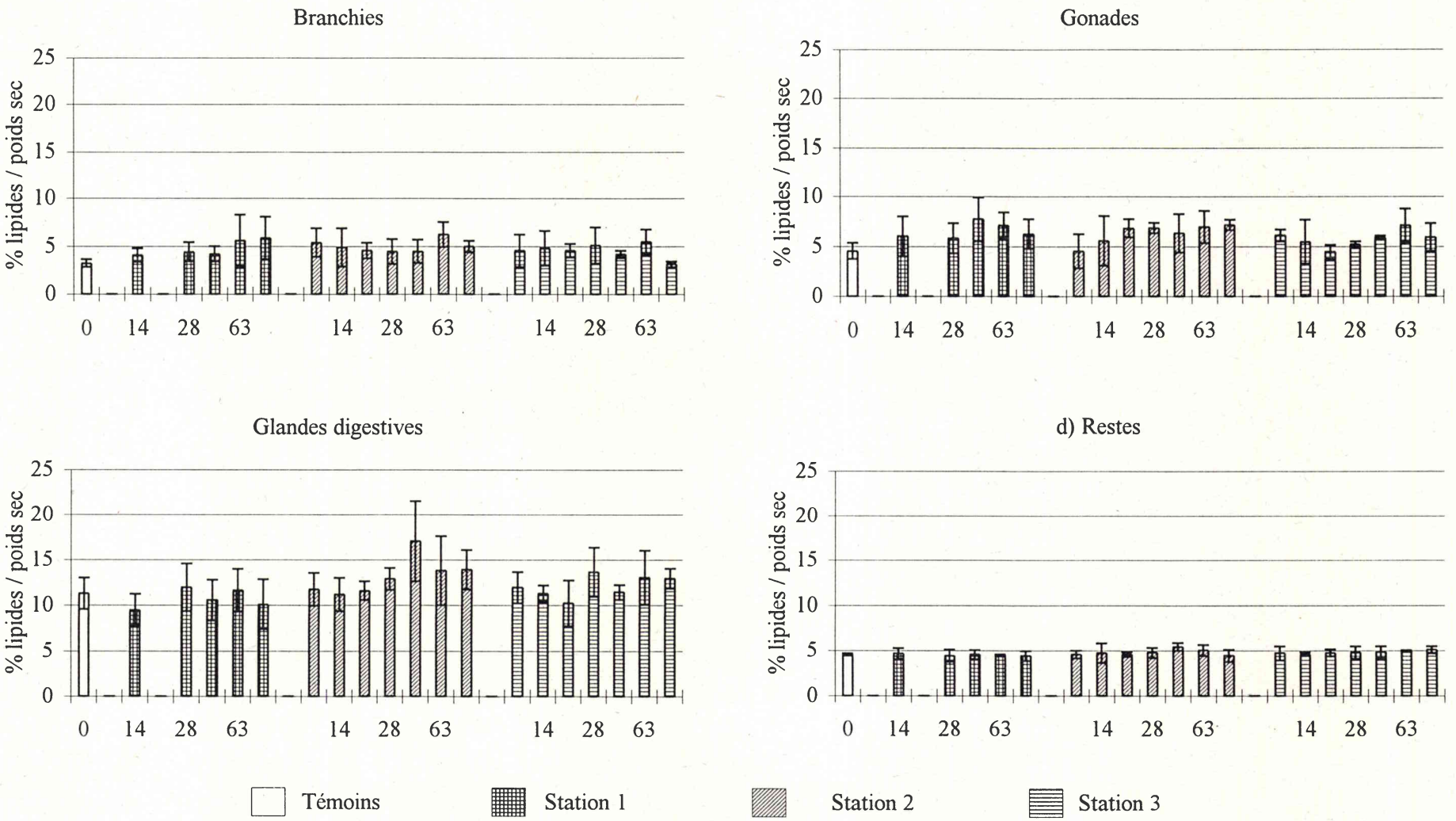


Figure 6.6 : Evolution du pourcentage de lipides (/ poids sec) en fonction du temps et de la station d'exposition dans les différents organes. Les histogrammes représentent les moyennes, les barres verticales les écarts types (n = 3 pour tous).

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 6.5). 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.

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.

VI.3.3.3. Accumulation des EOX

Comme lors du chapitre précédent, les résultats des concentrations en EOX dans les différents organes sont exprimés en fonction du poids frais (figure 6.7), en fonction du poids sec (figure 6.8) et en fonction du poids de lipides (figure 6.9).

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 6.6). Lorsque ces concentrations sont exprimées par rapport au poids frais, elles ne diffèrent pas de manière significative entre les organes. En revanche, en raison des différences dans les paramètres physiologiques constatés auparavant (pourcentage de poids sec et pourcentage de lipides), les concentrations en EOX sont significativement différentes dans les trois organes lorsqu'elles sont exprimées par rapport au poids sec et au poids de lipides.

Tableau 6.6 : Concentrations en EOX dans les trois types d'organes chez les anodontes témoins (moyenne ± écart-type ; n=3)

	[EOX] µg Cl.g-1 poids frais	**[EOX] µg Cl.g-1 poids sec**	**[EOX] µg Cl.g-1 lipides**
Branchies	1.5 ± 0.3	7.6 ± 0.7	238.8 ± 12.5
Gonades	2.1 ± 0.2	13.0 ± 2.0	298.5 ± 10.4
Glandes digestives	2.1 ± 0.2	19.6 ± 1.3	176.2 ± 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 pour 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.

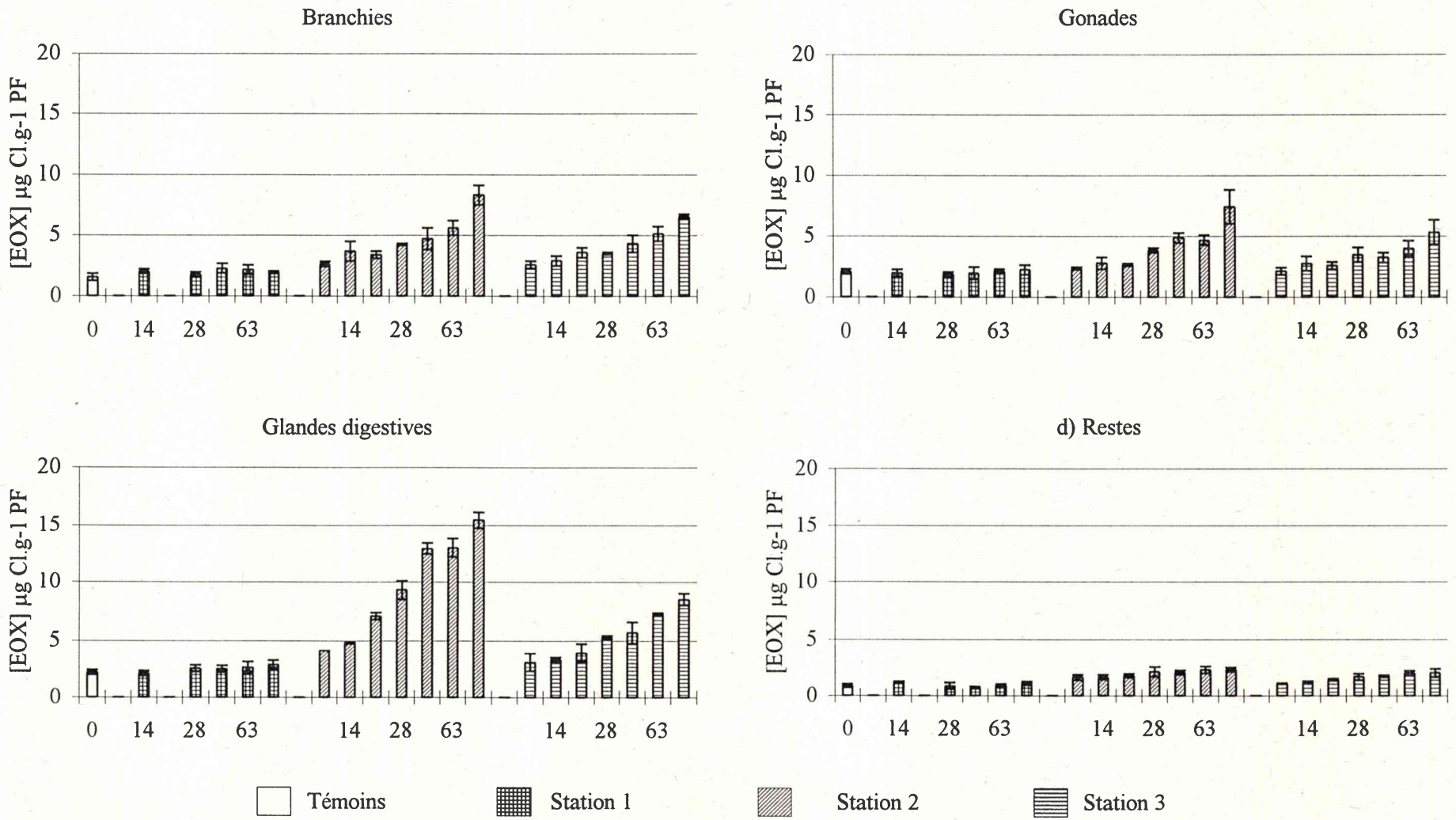


Figure 6.7 : Evolution de la concentration en EOX (µg Cl.g-1 poids frais) en fonction du temps et de la station d'exposition dans les différents organes. Les histogrammes représentent les moyennes, les barres verticales les écarts types (n = 3 pour tous).

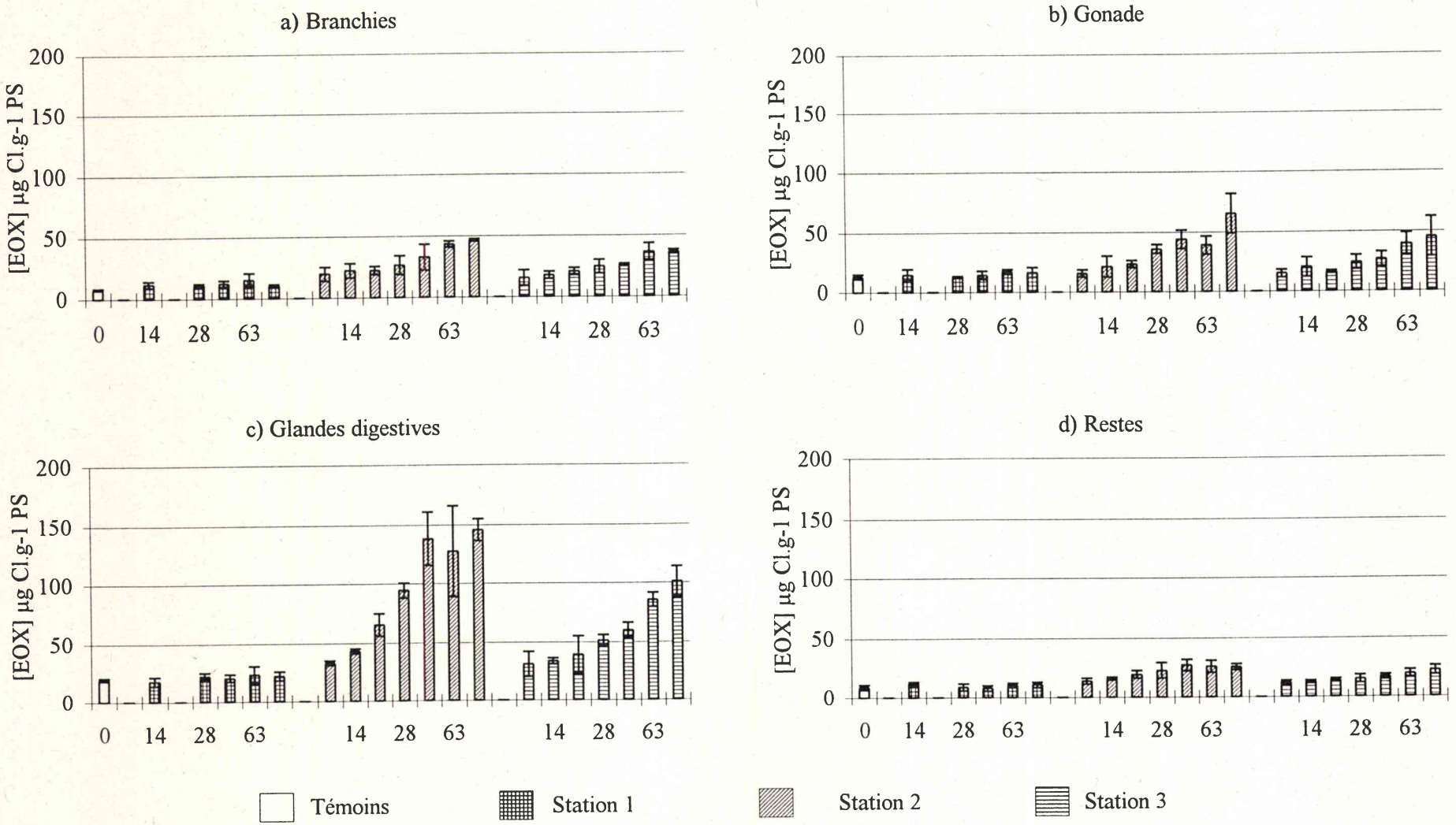


Figure 6.8 : Evolution de la concentration en EOX (µg Cl.g-1 poids sec) en fonction du temps et de la station d'exposition dans les différents organes. Les histogrammes représentent les moyennes, les barres verticales les écarts types (n = 3 pour tous).

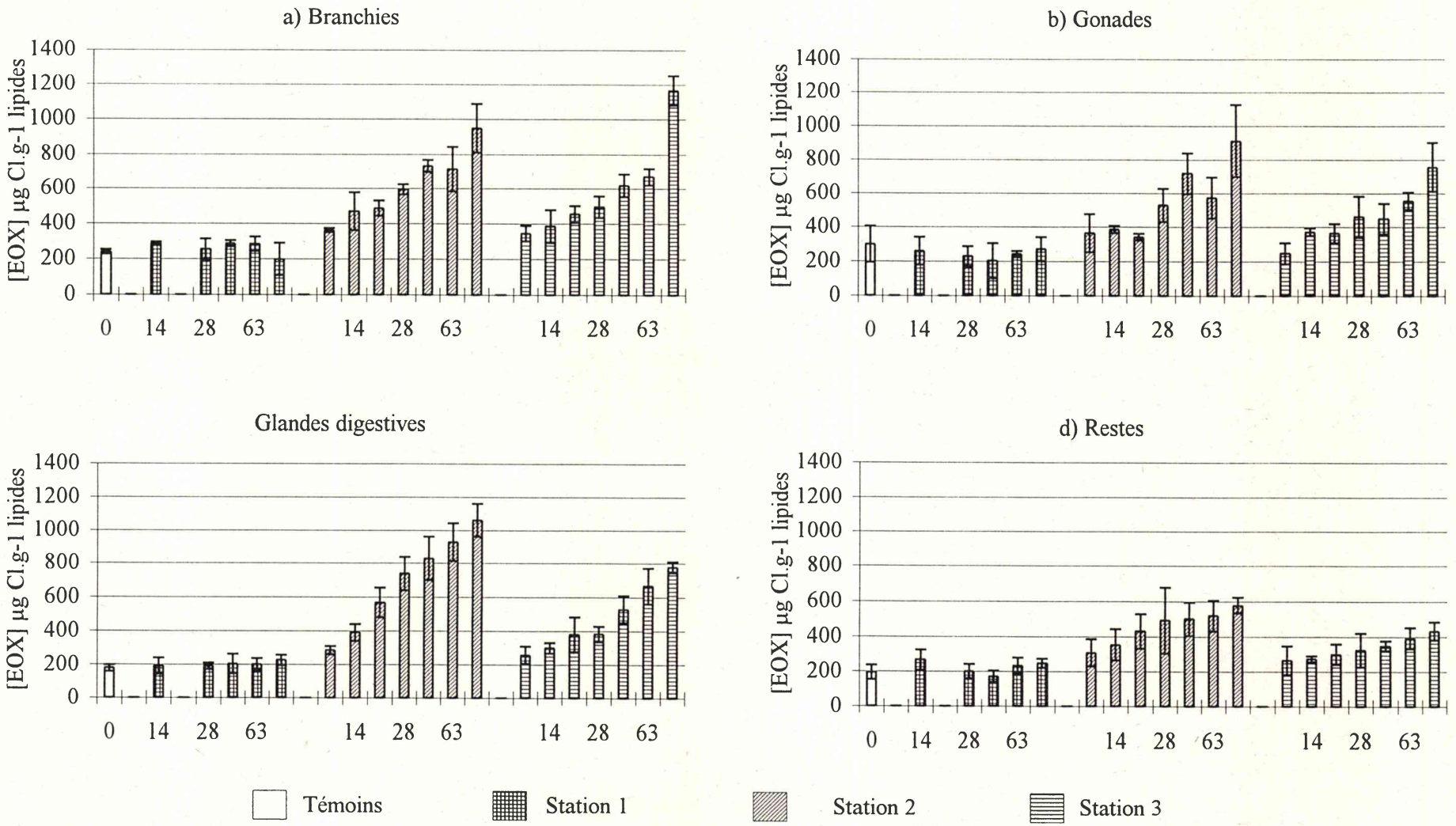


Figure 6.9 : Evolution de la concentration en EOX (µg Cl.g-1 lipides) en fonction du temps et de la station d'exposition dans les différents organes. Les histogrammes représentent les moyennes, les barres verticales les écarts types (n = 3 pour tous).

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.

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 dés le 7^{éme} jour d'exposition. L'accumulation d'EOX se fait progressivement au niveau des deux stations et tend à se stabiliser à partir du 63^{éme} jour d'exposition, étant donné que les concentrations mesurées le 63^{éme} et le 91^{éme} jour ne différent 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.

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 dés le 7^{éme} jour au niveau de la station 2, et à partir du 14^{éme} 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^{éme} jour les concentrations se stabilisent et ne différent 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^{éme} jour.

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 différent pas de manière significative de celle mesurées après 91 jours, ni à la station 2, ni à la station 3.

Le tableau 6.7 récapitulent les concentrations finales en EOX mesurées dans les trois organes des anodontes exposés au niveau des stations 2 et 3.

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.

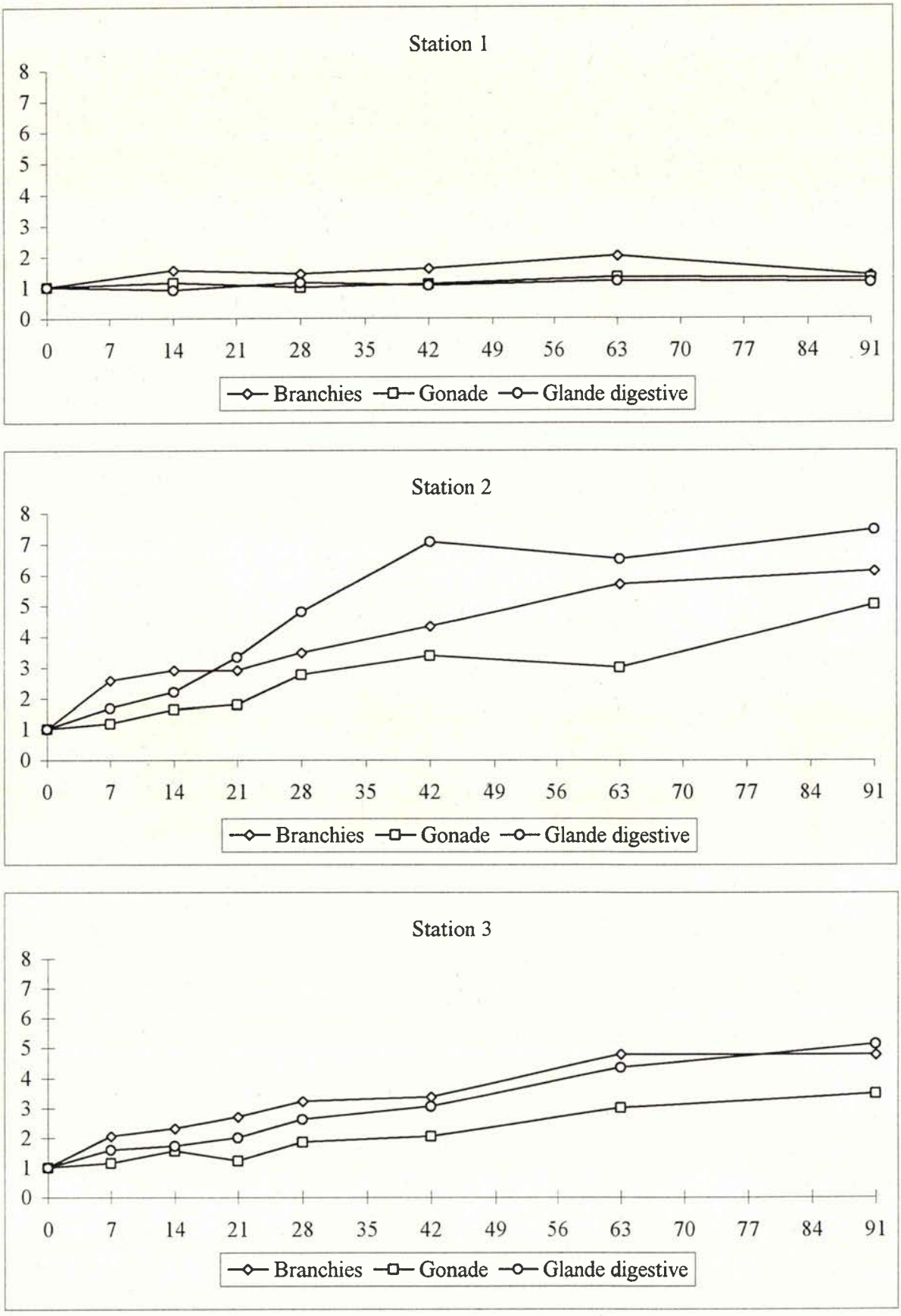


Figure 6.10 : Evolution des facteurs de concentration dans les trois organes en fonction du temps et de la station d'exposition des anodontes.

Tableau 6.7 : Concentrations en EOX dans les organes des anodontes exposés durant 91 jours à la station 2 et à la station 3.

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

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 6.10). 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 2.6, puis ralentie légèrement, et se stabilise à partir du 63ème jour. Après 91 jours d'exposition, le facteur de concentration dans les branchies est de respectivement 6.1 et 4.8, 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 a partir du 21ème jour, et ce jusqu'au 42ème 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 7.4 et 5.1 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 1.8 et 1.2 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 6.11). 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.

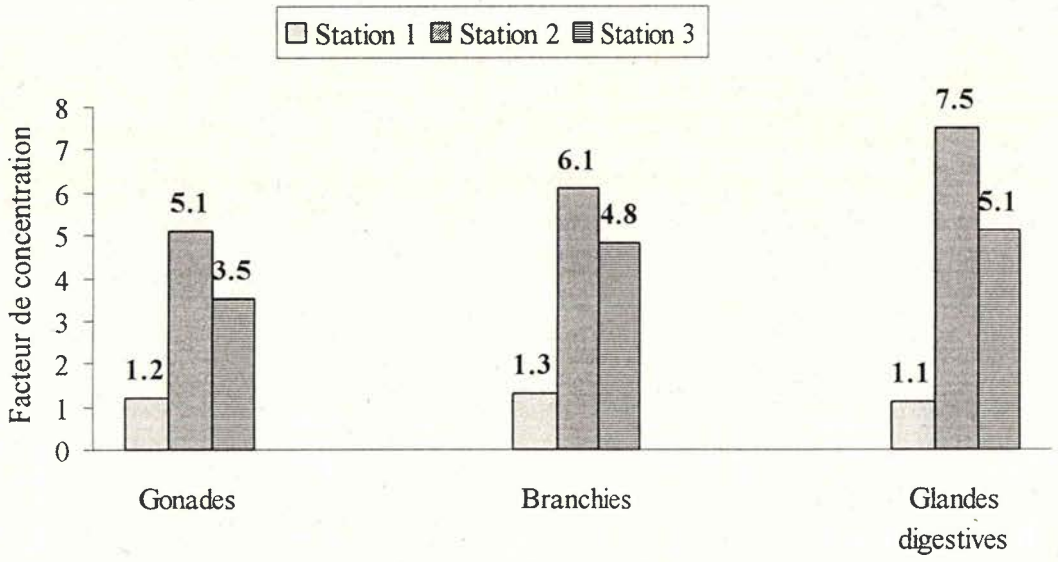


Figure 6.11 : Comparaison des facteurs de concentrations dans les différents organes de *Anodonta cygnea* exposé durant 91 jours au niveau des trois stations (calculés à partir des concentrations en EOX exprimées par rapport au poids sec).

Comme lors du chapitre précédent, on peut calculer le facteur de bioaccumulation des composés organo-halogénés extractibles issus des EPKB, dans les organes des anodontes exposés durant 91 jours, selon la formule :

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

Tableau 6.8 : 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 tableau 6.8 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 aprés 91 jours d'exposition, exprimées par rapport au poids frais des mollusques.

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 prés similaire au niveau des deux stations. Par contre, dans les glandes digestives, il est plus élevé au niveau de la station la plus contaminée.

VI.3.4. Synthèse : l'organisme entier

Afin de pouvoir suivre l'évolution dans l'organisme entier, les concentrations totales en EOX dans les anodontes sont calculées à partir des paramètres physiologiques et des concentrations individuelles en EOX dans les différents organes et les restes. Les valeurs brutes sont regroupées dans l'annexe D (Tableau D.6).

Les figures 6.11 (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 a voir de plateau d'équilibre lorsque les concentrations sont ramenées aux anodontes entiers. Effectivement, les concentrations mesurées le 63ème jour d'exposition sont significativement différentes de celles mesurées le 91^{éme} jour, et ce au niveau des deux stations aval. Les valeurs du facteur de concentration global après 91 jours d'exposition au niveau des trois stations sont regroupées dans le tableau 6.9.

Tableau 6.9 : Facteur de concentrations dans les anodontes ayant été exposés durant 91 jours au niveau des trois stations.

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

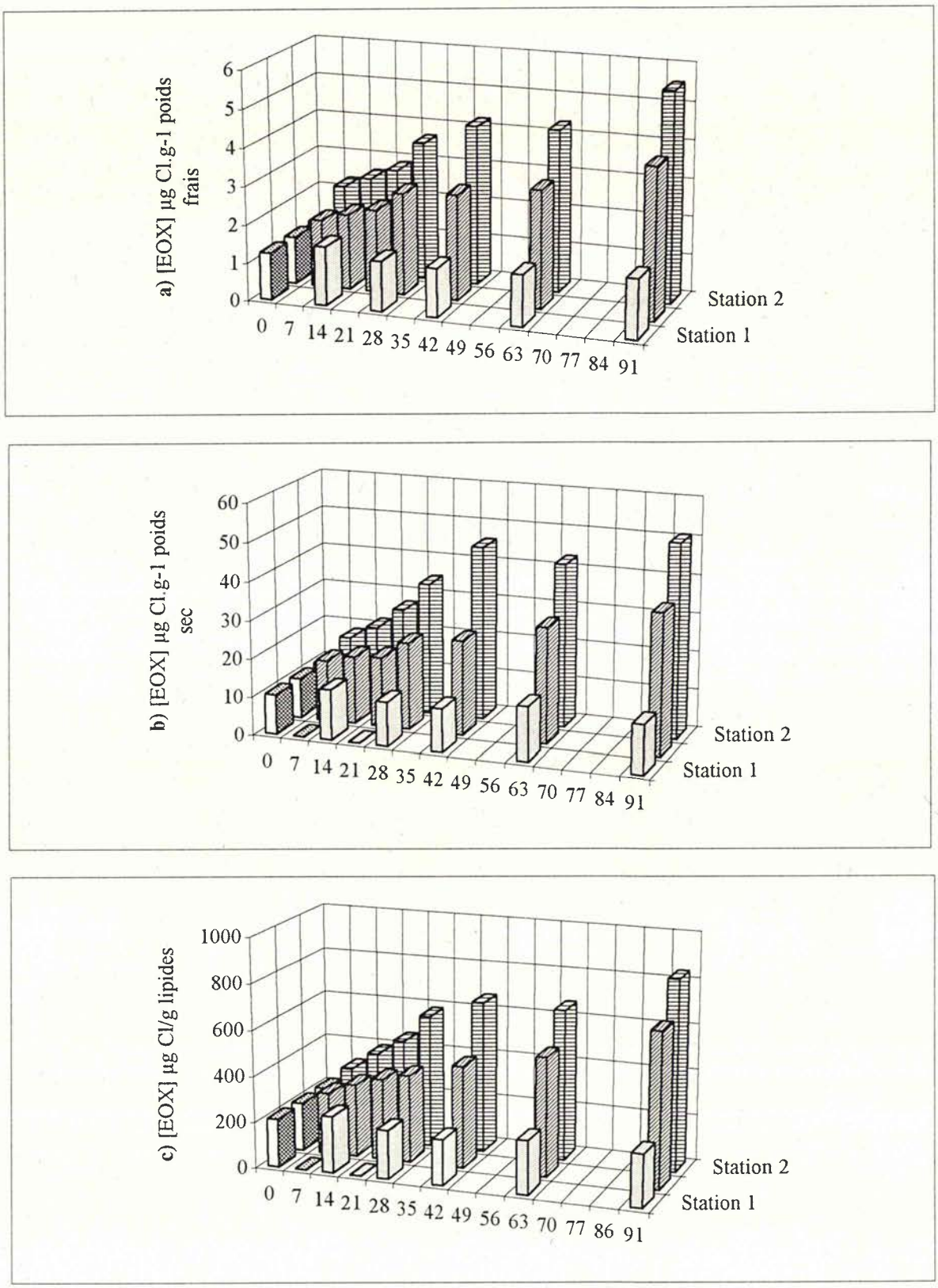


Figure 6.11 : Evolution des concentrations en EOX dans les anodontes entiers en fonction de la station et du temps d'exposition. Les concentrations sont recalculées à partir des concentrations dans les organes et les restes.
a) en fonction du poids frais, **b)** en fonction du poids sec, **c)** en fonction des lipides.

VI.4. Discussion

Comme lors des deux précédentes études (chapitres IV et V), 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 91ème jour de l'étude. Le ralentissement de la vitesse d'accumulation à partir du 7ème 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 21ème 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 21ème 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 interieur 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 : $Log_{10}[EOX]_{poids\ sec} = Log_{10}[EOX]_{lipides} - 1.236$, ($r^2$=0.914). Une relation similaire a été observé dans la présente étude pour les concentrations en EOX chez *Anodonta cygnea*, avec : $Log_{10}[EOX]_{poids\ sec} = 1.08 * Log_{10}[EOX]_{lipides} - 1.444$, ($r^2$=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.

VI.5. Conclusions

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.

Chapitre VII

Etude du relargage de composés organo-halogénés extractibles chez *Anodonta cygnea*

VII.1. Introduction - Objectifs de l'étude

De nombreux travaux s'intéressent à l'utilisation de mollusques aquatiques en tant que bioindicateurs de la pollution organo-halogénée engendrée par l'industrie de la pâte à papier blanchissant au chlore (Herve, 1991 ; Haynes *et al.*, 1995 ; Mäkelä, 1995). Dans la plupart de ces études, les auteurs s'intéressent essentiellement à l'accumulation, et peu à la dépuration de composés organo-halogénés. Cependant, afin de pouvoir comprendre les effets des variations de concentrations en micropolluants sur les intégrateurs biologiques, il est important de connaître aussi bien les modalités d'accumulation que de relargage de ces composés (Burggraaf et al., 1996), car physiologiquement les deux processus ont lieu simultanément.

Après avoir étudié l'accumulation dans des organismes entiers (chapitre IV et V) et dans certains organes (chapitre VI), le but de ce travail est de rendre compte des effets qu'aurait une diminution, voire un arrêt, des rejets d'EPKB sur la physiologie et les concentrations en EOX dans les anodontes. Pour ce faire, des anodontes sont exposés durant 147 jours à des EPKB au niveau d'une station située sur le Ton (station 2), puis transférés et exposés durant 42 jours au niveau d'une station située sur le même cours mais en amont des rejets de l'usine de pâte à papier (station 1).

VII.2. Protocole expérimental

La figure 7.1 résume le protocole des prélèvements d'eau et d'anodontes après l'exposition de 147 jours à la station 2 et le transfert à la station 1.

VII.2.1. Collecte, conditionnement et exposition des anodontes à la station contaminée

Soixante dix anodontes de taille homogène, comprise entre 67.4 et 77.6 mm (moyenne : 73.1 ± 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 § II.2. Durant la phase de conditionnement, un

anodonte 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. chapitre VI).

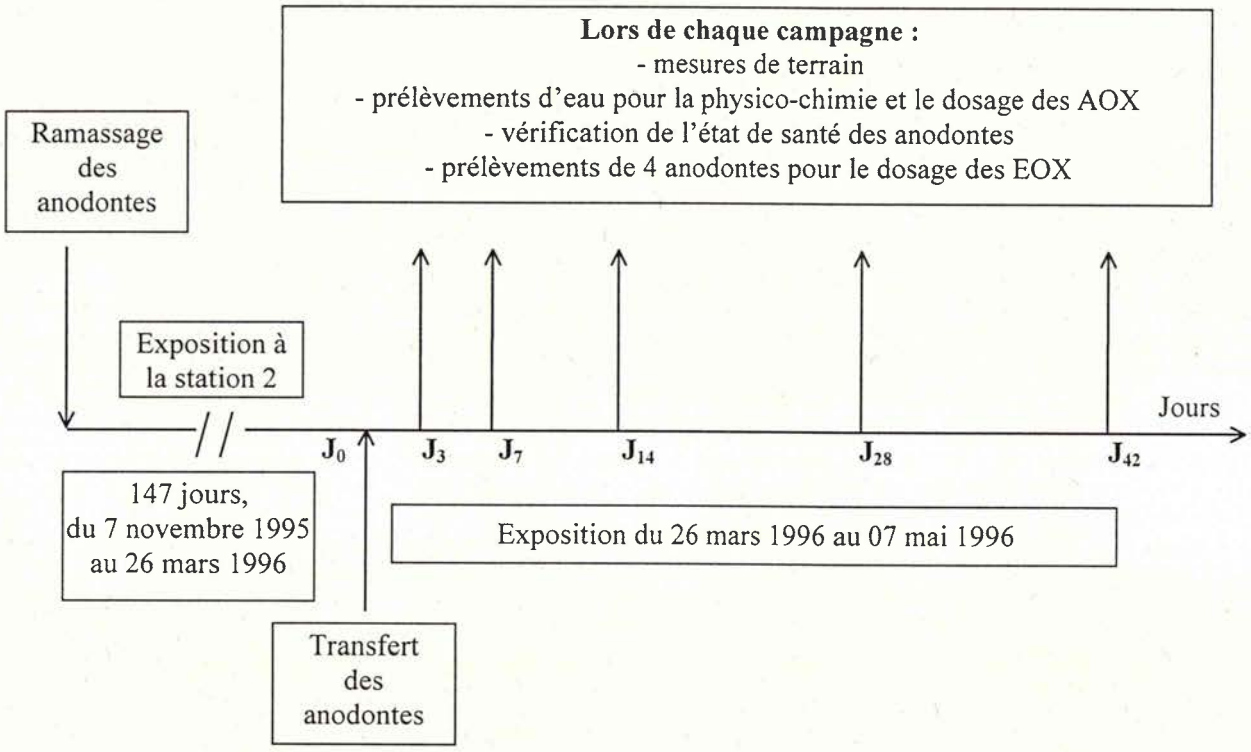


Figure 7.1 : Protocole expérimental de l'étude de relargage d'EOX par *Anodonta cygnea*.

VII 2.2. 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 salissures 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.

VII.2.3.. Prélèvement et analyse de l'eau

Lors des précédentes études (chapitres III, IV, V et VI), nous avons constaté que les différents paramètres physico-chimiques et la concentration en AOX de la station 1 ne varient pas significativement 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.

VII.2.4. Prélèvements 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 d'exposition, où ils sont préparés puis dosés selon le protocole décrit au § II.4.4.

VII.2.5. 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.

VII.3. Résultats

VII.3.1. Résultats de l'analyse de l'eau

Le tableau 7.1 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 Cl^-, SO_4^{2-}, Na^+ et 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 7.1 : 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	
pH		8.0 ± 0.1	14	8.1 ± 0.1	6	n.s.
Température	°C	10.2 ± 1.5	14	9.8 ± 2.9	6	n.s.
Conductivité	$\mu S.cm^{-1}$	651 ± 59	14	366 ± 10	6	*
Oxygène dissous	$mg.l^{-1}$	8.4 ± 0.9	14	9.0 ± 0.5	6	n.s.
F^-	$mg.l^{-1}$	0.16 ± 0.04	6	0.11 ± 0.02	6	*
Cl^-	$mg.l^{-1}$	47.2 ± 12.9	6	16.9 ± 2.8	6	*
Br^-	$mg.l^{-1}$	2.95 ± 2.16	6	0.01 ± 0.02	6	*
SO_4^{2-}	$mg.l^{-1}$	102.6 ± 31.0	6	26.4 ± 3.2	6	*
K^+	$mg.l^{-1}$	5.1 ± 0.6	6	2.7 ± 0.1	6	*
Na^+	$mg.l^{-1}$	61.2 ± 15.7	6	7.8 ± 0.9	6	*
Mg^{2+}	$mg.l^{-1}$	3.4 ± 0.2	6	3.4 ± 0.3	6	n.s.
Ca^{2+}	$mg.l^{-1}$	100.7 ± 8.7	6	79.3 ± 2.2	6	*
N total	$mg.l^{-1}$	0.60 ± 0.04	6	2.13 ± 0.37	6	*
P total	$mg.l^{-1}$	0.20 ± 0.02	6	0.19 ± 0.05	6	n.s.
Matières en suspension	$mg.l^{-1}$	21.2 ± 9.9	6	5.8 ± 0.8	6	*
DCO	$mg.l^{-1}$	33.2 ± 5.3	6	12.9 ± 1.5	6	*
AOX	$\mu g\ Cl.l^{-1}$	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 $\mu g\ Cl.l^{-1}$ au niveau de la station 2, et de 16.9 $\mu g\ Cl.l^{-1}$ au niveau de la station 1.

VII.3.2. Résultats de l'analyse des anodontes

VII.3.2.1. Condition physiologique

VII.3.2.1.1. 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 7.2). Ainsi, durant les 189 jours de l'étude, 41 anodontes sont morts, soit un taux de mortalité cumulé de 60 %.

Tableau 7.2 : Mortalité des anodontes durant les deux phases d'exposition

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

VII.3.2.1.2. 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 $(cm)^3$ x 100), sont donnés dans le tableau 7.3.

Tableau 7.3 : Evolution de l'indice de condition des anodontes.

Temps d'exposition	**Moyenne**	**Ecart type**	**CV (%)**	**Minimum**	**Maximum**
0 jours	0.93	0.58	62.0	0.49	1.77
3 jours	1.58	0.70	44.4	0.73	2.34
7 jours	1.20	0.15	12.9	1.05	1.41
14 jours	0.99	0.49	49.9	0.47	1.41
28 jours	1.45	0.83	59.4	0.45	2.50
42 jours	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 différence n'est statistiquement significative.

VII.3.2.1.3. Pourcentage de poids sec - pourcentage de lipides

Le pourcentage de poids sec en fonction du poids frais (Figure 7.2a), ainsi que les pourcentages de lipides en fonction du poids sec (Figure 7.2b), 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.

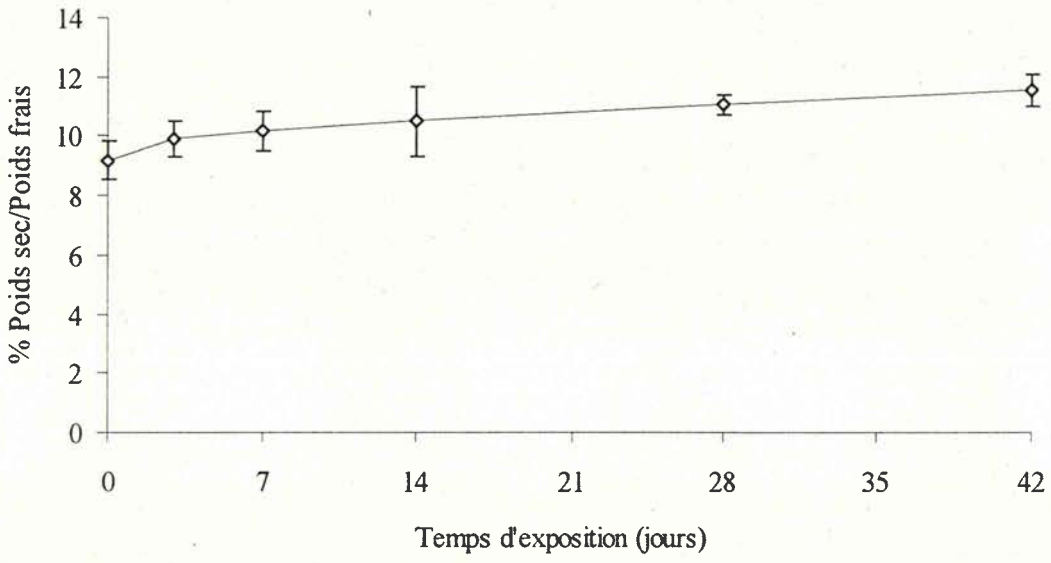


Figure 7.2a : Evolution du pourcentage de poids sec chez les anodontes transférés et exposés à la station 1.

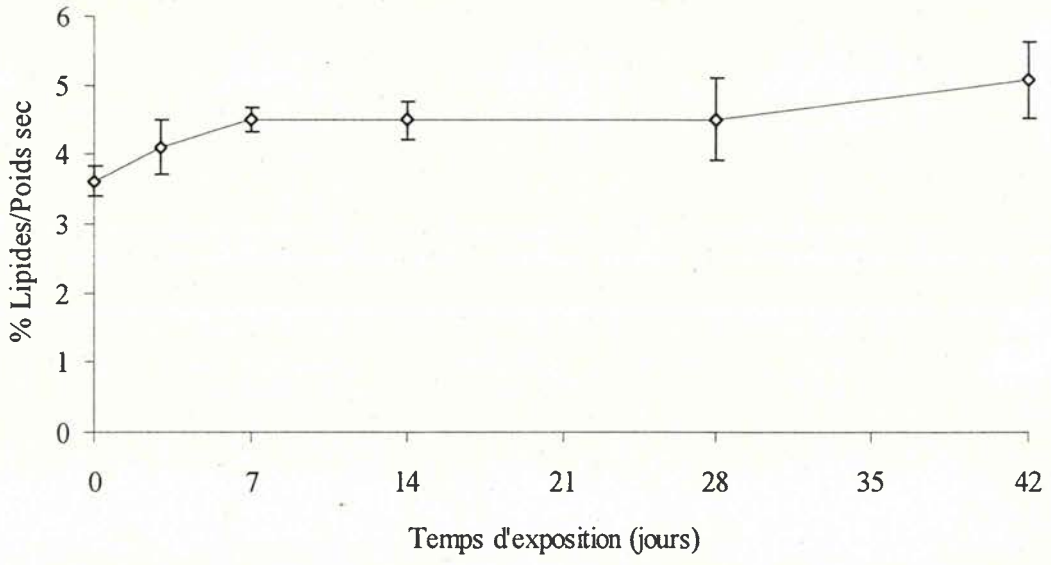


Figure 7.2b : Evolution du pourcentage de lipides chez les anodontes transférés et exposés à la station 1.

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 7.4). 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 7.4 : 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 ± écart type).

	% de poids sec/poids frais	% lipides/poids sec
Témoins (n=3)	12.06 ± 0.83	4.94 ± 0.30
Station 2 J_{91} (n=3)	10.91 ± 0.16	6.08 ± 0.53
Station 2 J_{147} (n=4)	9.17 ± 0.63	3.61 ± 0.22
Station 1 J_{189} (n=4)	11.50 ± 0.53	5.08 ± 0.55

VII.3.2.2. 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 7.3a), du poids sec (Figure 7.3b) ou du poids de lipides (Figure 7.3c). 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 $7^{ème}$ 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 $Cl.g^{-1}$ PF, soit 6.6 µg $Cl.g^{-1}$ PS, soit 222 µg $Cl.g^{-1}$ lipides.

La phase de relargage lent, entre le $7^{ème}$ et le $28^{ème}$ 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 $Cl.g^{-1}$ PF, soit 1.3 µg $Cl.g^{-1}$ PS, soit 28 µg $Cl.g^{-1}$ de lipides.

Entre le $28^{ème}$ et le $42^{ème}$ 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.

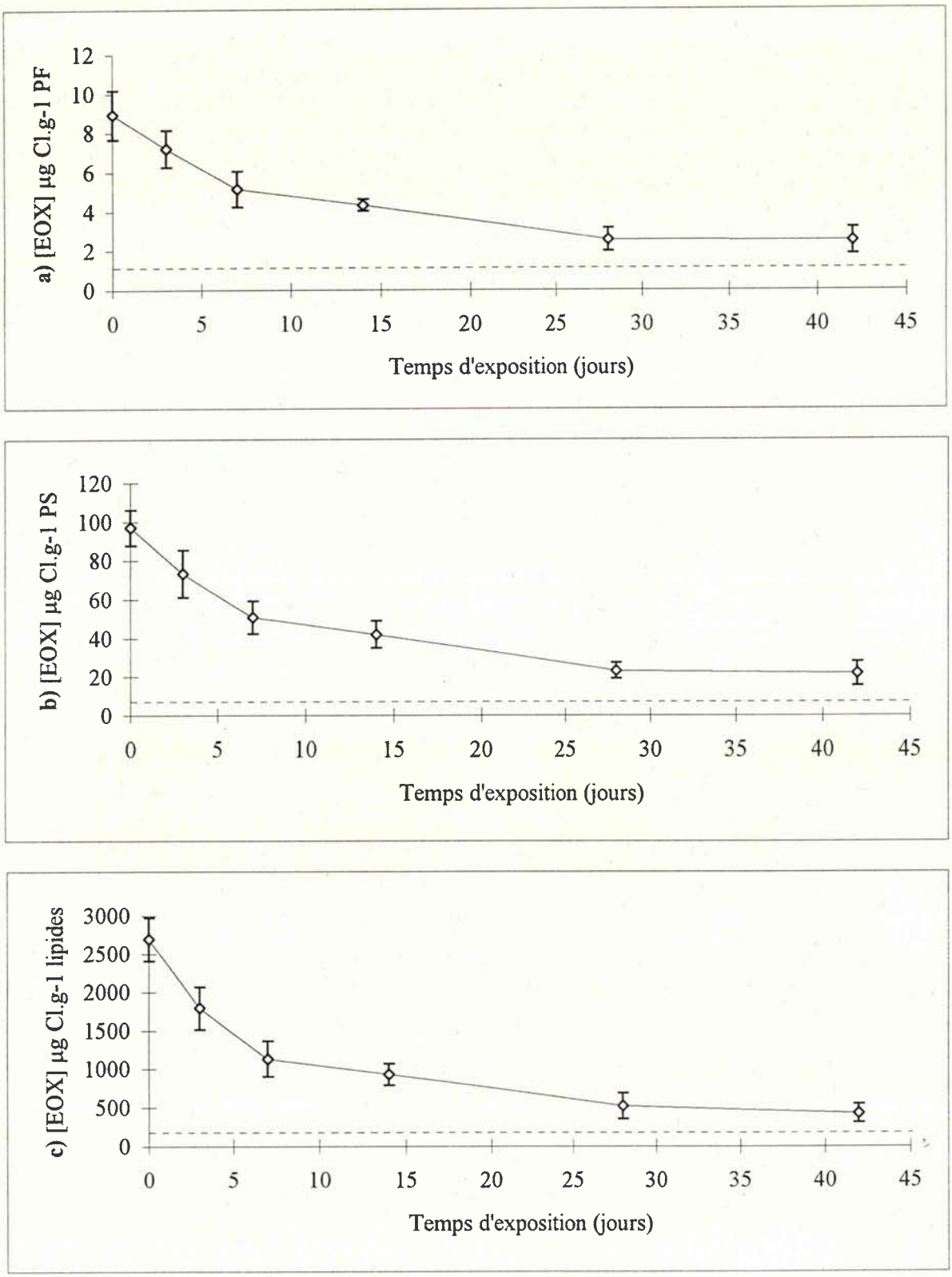


Figure 7.3 : Evolution de la concentration en EOX dans les anodontes après transfert à la station 1. **a)** en fonction du poids frais, **b)** en fonction du poids sec, **c)** en fonction des lipides. Les points représentent les moyennes, les barres verticales les écart types (n=4). Les pointillés représente la concentration en EOX avant le transfert à la station 2.

Les concentrations en EOX continuent d'augmenter après le 91ème jour d'exposition (cf chapitre VI) et, comme nous le laissait 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 147ème jour sont significativement plus élevées que celle mesurées le 91ème 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 7.4).

Tableau 7.4 : 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 $Cl.g^{-1}$ poids frais	[EOX] µg $Cl.g^{-1}$ poids sec	[EOX] µg $Cl.g^{-1}$ lipides
Témoins (n=3)	1.2 ± 0.1	10.4 ± 1.6	208.8 ± 23.3
Station 2 J_{91} (n=3)	5.5 ± 0.2	50.6 ± 2.2	834.5 ± 57.6
Station 2 J_{147} (n=4)	8.9 ± 1.2	97.0 ± 9.1	2689.4 ± 284.5
Station 1 J_{189} (n=4)	2.5 ± 0.7	21.6 ± 6.2	427.2 ± 117.7

VII.4. 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 7ème et le 28ème 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 µg $Cl.l^{-1}$), l'élimination des EOX de poids moléculaire inférieur à 1000 $g.mol^{-1}$ est quasiment totale en 5 jours, alors qu'elle n'est que de 50 % pour les molécules de poids moléculaire élevé.

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 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 ± 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 $28^{ème}$ et le $42^{ème}$ 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 non 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 dépuration (Hektonen *et al.*, 1994). Le bivalve, *Unio pictorum*, exposés durant 12 semaines à une concentration de 50 $\mu g.l^{-1}$ de cadmium, accumule fortement ce métal (Jenner *et al.*, 1991), et durant une phase de dépuration 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 dépuration significative de cuivre et de plomb dans les branchies de *Anodonta cygnea* ayant été contaminé par ces deux métaux.

VII.5. 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.

Synthèse

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. De fait, comme nous l'avons vu dans l'analyse bibliographique, malgré de nombreux efforts analytiques réalisés ces dernières années, seuls 10 à 25 % des composés de cette famille chimique ont été identifiés (Quentin, 1984). 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 appropriée 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 ce travail 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 longue 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.

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 (Chapitre III). Les résultats obtenus (5.7 à 988.9 µg $Cl.l^{-1}$) sont en accord avec ceux relevés dans la littérature internationale (Keller, 1989 ; Vogel & Chovanec, 1989 ; Enell & Wennberg, 1991 ; Jokela *et al.*, 1992), soulignant le caractère ubiquiste des composés organo-halogénés dans l'environnement aquatique (Asplund & Grimvall, 1989), et dont l'origine semble être aussi bien naturelle qu'anthropique.

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 (concernant la France, la Belgique, les Pays-Bas, le Luxembourg et l'Allemagne) avec 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 µg $Cl.l^{-1}$,
- les stations intermédiaires, situées en général en aval d'agglomérations, et pour lesquelles la concentration moyenne en AOX est comprise entre 25 et 50 µg $Cl.l^{-1}$, 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 µg $Cl.l^{-1}$.

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 (Chapitres III, IV et V). 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 biohalogénation naturels, comme ils ont pu être observés par Asplund & Grimvall (1991). Les concentration naturelles rencontrées dans le Nord-Est de la France (15 à 30 µg $Cl.g^{-1}$ poids sec) sont du même ordre de grandeur que celles rencontrées dans le Golfe de Botnie (Palm & Lammi, 1995), mais nettement plus faibles que celles mesurées dans le Golfe de Finlande (Kankaanpää & Tissari, 1994a). Ces différences peuvent en partie s'expliquer par des concentrations élevées en ions chlorures dans les sédiments marins (jusqu'à 70 $mg.g^{-1}$ poids sec), ions qui peuvent selon Kankanpää & Masuku (1992) 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 (Effluents d'usines de Pâte à papier Kraft Blanchissant au chlore) 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 (Chapitre V), 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 (Chapitre V). Même lorsque l'exposition est prolongée jusqu'à 75 (Chapitre IV) et 91 jours (Chapitre VI), le taux de mortalité de *Anodonta cygnea* reste faible et inférieur à 10%. Ceci semble confirmer les affirmations de Craig *et al.* (1990), 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 d'une étude histologique sur différents organes de *Anodonta cygnea* exposés durant 28 jours aux EPKB (résultats non présentés), et qui ne montrent pas d'effets marquants au niveau de la structure des branchies et des glandes digestives.

Toutefois, en fonction des résultats de toutes nos études, et plus particulièrement de ceux du chapitre VII, concernant les anodontes exposés durant 147 jours aux EPKB avant leur transfert à la station amont, une autre hypothèse peut être avancée. En effet, avec une mortalité supérieur à 35% 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 8.1).

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 (Chapitre IV). 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 (Holwerda & Veenhof, 1984, *in* Mäkelä, 1995). 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

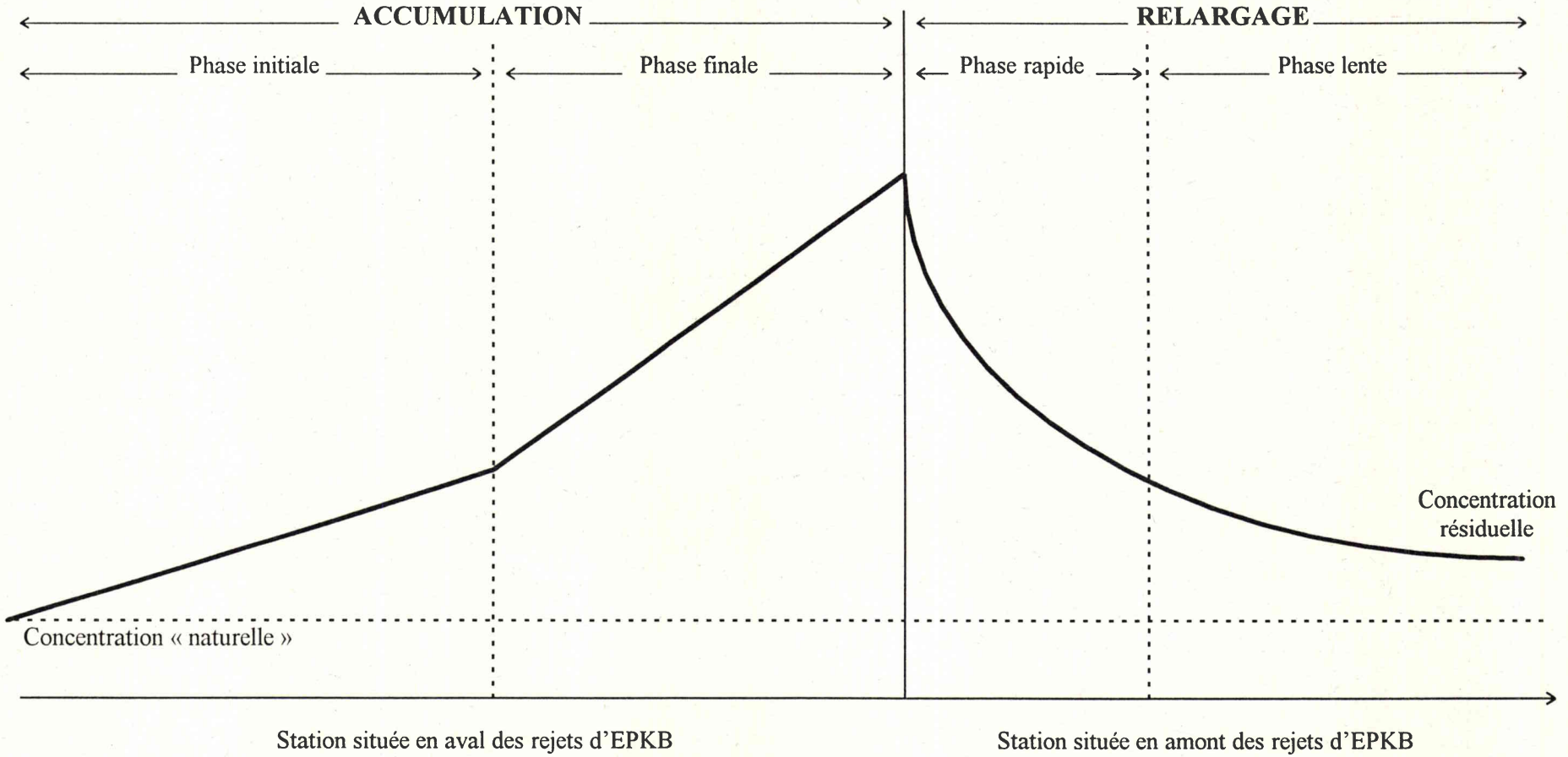
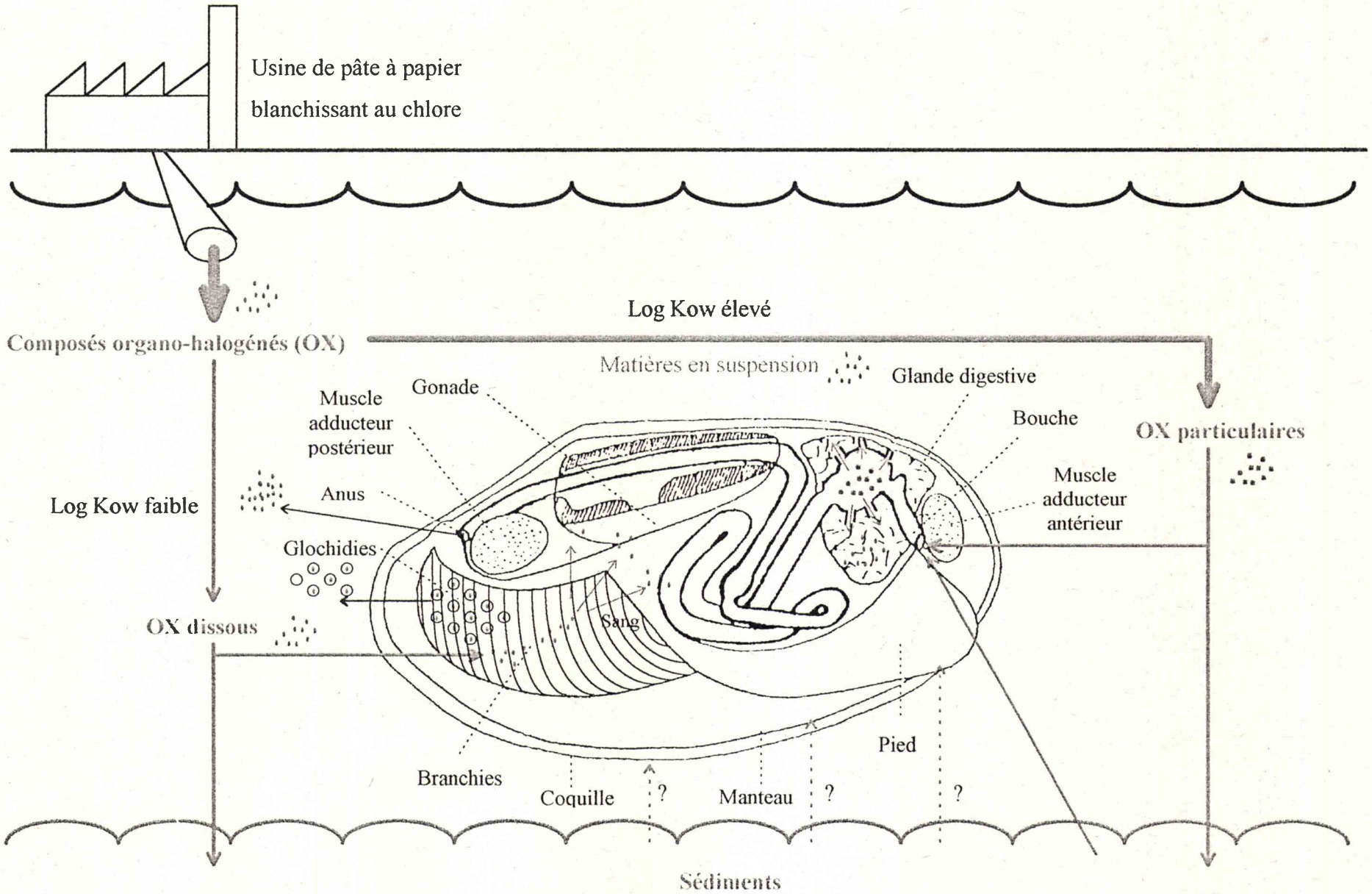


Figure 8.1 : Synthèse des phases d'accumulation et de relargage de composés organo-halogénés extractibles par l'anodonte, *Anodonta cygnea*, exposé à des effluents d'une usine de pâte à papier blanchissant au chlore, puis transférés au niveau d'une station non contaminée.

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, comme elle a été observée dans le chapitre VII.

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 (Chapitre V), de même que Salanki & V.-Balogh (1985) ont montré que *Anodonta cygnea* pouvait accumuler du mercure et du cadmium même lorsque les valves restaient fermées. La filtration intermittente des anodontes peut varier fortement d'un individu à l'autre, ce qui peut expliquer les grandes différences interindividuelles (coefficient de variation de 22 à 29%) observées dans l'accumulation des EOX (Chapitres V et VI). 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 contaminé, 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, comme nous l'avons vu dans l'analyse bibliographique, la plupart des composés organo-halogénés sont hydrophobes et s'accumulent rapidement dans les sédiments et les matières en suspension (Kukkonen, 1992). 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* (chapitre VI). 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


Usine de pâte à papier
blanchissant au chlore
Log Kow élevé
Composés organo-halogénés (OX)
Matières en suspension
Glande digestive
Gonade
Muscle
adducteur
postérieur
Bouche
OX particulaires
Anus
Muscle
adducteur
antérieur
Log Kow faible
Glochidies
OX dissous
Sang
Pied
Branchies
Coquille
?
Manteau
?
?
Sédiments

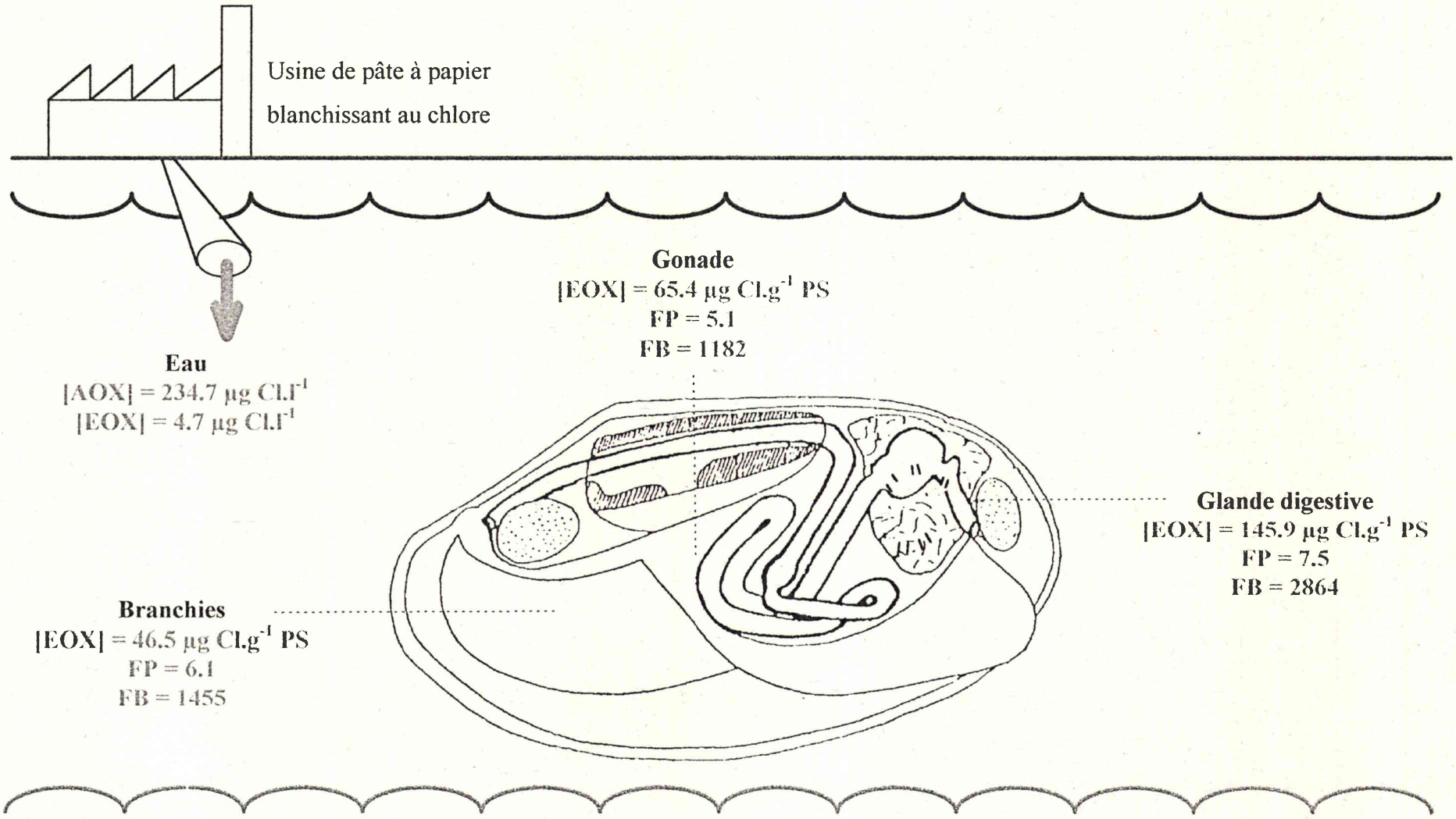
l'accumulation des composés organo-halogénés. En effet, en raison de leur caractère lipophile, ces derniers s'accumulent préférentiellement dans les lipides ; ainsi les plus forts taux d'accumulation sont observés dans les glandes digestives, qui présentent le plus fort pourcentage en lipides.

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 (coefficient de variation de 6 à 10%).

Il semble qu'il n'y ait pas de plateau d'équilibre des concentrations en EOX dans l'anodonte, et que celui-ci accumule les composés organo-halogénés jusqu'à la mort. Une exposition prolongée sur trois mois est actuellement en cours afin de déterminer l'impact histopathologique des composés organo-halogénés sur les différents organes de *Anodonta cygnea*.

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 (Chapitre VII), 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 dépuration trop courte, soit par l'existence d'une fraction de composés organo-halogénés non métabolisables et donc non relargable par l'anodonte.

Les figure 8.1 et 8.2 tentent de résumer les différentes phases d'accumulation et de relargage des composés organo-halogénés issus des EPKB ; la figure 8.3 donne un exemple chiffré des facteurs de bioaccumulation et de pollution des EOX dans les différents organes de *Anodonta cygnea*.


Usine de pâte à papier
blanchissant au chlore
Eau
[AOX] = 234.7 µg Cl.l-1
[EOX] = 4.7 µg Cl.l-1
Gonade
[EOX] = 65.4 µg Cl.g-1 PS
FP = 5.1
FB = 1182
Glande digestive
[EOX] = 145.9 µg Cl.g-1 PS
FP = 7.5
FB = 2864
Branchies
[EOX] = 46.5 µg Cl.g-1 PS
FP = 6.1
FB = 1455
Sédiments
[AOX] = 68.5 µg Cl.g-1 PS FP = 165
[AOX] = 1225.3 µg Cl.g-1 MO FP = 3218

Perspectives

L'utilisation de paramètres de groupe dans l'estimation du niveau de contamination des écosystèmes aquatiques par les composés organo-halogénés est relativement récente, et de nombreux travaux supplémentaires sont nécessaires pour apporter des réponses plus complètes dans ce domaine. Parmi les principales questions auxquelles il est important d'apporter des réponses, il faut citer le problème de la production naturelle de composés organo-halogénés, et ce aussi bien dans le milieu aquatique (eau et sédiments) que dans le milieu terrestre. En effet, les premiers travaux, essentiellement réalisés par des équipes de recherche scandinaves, ont montré que les concentrations naturelles en AOX dépendent de nombreux facteurs, tels que l'eutrophisation, les concentrations en acides humiques et fulviques et le pH de l'eau, mais également de la nature et de la composition du sol des bassins versants. La production naturelle d'AOX peut ainsi largement contribuer aux concentrations rencontrées dans les eaux de surface, et influencer plus ou moins fortement l'interprétation des résultats lorsque l'on se réfère aux valeurs guides proposées pour la potabilisation de l'eau.

Si l'utilisation des mollusques aquatiques en tant qu'indicateurs biologiques vis-à-vis de pollutions par les métaux lourds, les radionucléides, les PCBs ou les pesticides est de nos jours relativement bien maîtrisée, de nombreux travaux complémentaires sont indispensables dans le cas des pollutions organo-halogénés complexes engendrées par l'industrie de la pâte à papier blanchie au chlore. Parmi les points importants qu'il serait intéressant d'aborder, et dont certains font actuellement l'objet d'études en cours au Centre de Recherches Ecologiques, il faut citer :

- la mise au point de techniques standardisées pour l'exposition des mollusques, ainsi que pour l'extraction et le titrage des EOX dans le matériel biologique, comme elles existent déjà pour l'eau et les sédiments. De fait, l'exposition à différentes profondeurs, en présence ou en absence de sédiments, influe directement sur le comportement des mollusques, et plus particulièrement sur leur activité de filtration, et ainsi sur l'accumulation des micropolluants. De plus, les méthodes de broyage et d'homogénéisation des organismes, la nature des solvants, le temps d'extraction et les techniques de dosage, sont autant d'étapes pouvant influencer les rendements de la quantification des EOX.

- la définition d'organisme témoin et celle de concentration de référence en EOX. En effet, que ce soit dans la littérature ou lors de nos propres travaux, tous les organismes aquatiques récoltés dans le milieu naturel présentent des concentrations en EOX non négligeables, et ce quelque soit leur

origine. Or, lors d'études de surveillance biologique active de la qualité de l'eau, c'est à dire faisant appel à un transfert d'organismes, il est important que ces derniers présentent des concentrations initiales faibles des micropolluants recherchés. Il est donc important de savoir si ces concentrations sont le résultat d'une contamination diffuse faible, mais continue, de l'environnement aquatique, ou si, comme tend à le montrer la littérature, elles reflètent des procédés de biohalogénation naturels.

- l'étude chromatographique et le suivi de certaines molécules organo-halogénées spécifiques dans les différents compartiments de l'écosystème aquatique. Parmi celles-ci, les chlorophénols et leurs différents dérivés (chloroguaiacols et chlorocatéchols) représentent une famille intéressante car ce sont des molécules que l'on rencontre fréquemment dans les effluents d'usine de pâte à papier blanchissant au chlore, et dont l'identification et la quantification sont relativement faciles. De plus, en raison de leur petite taille ($128 < PM < 266$) et de leur coefficient de partage n-octanol-eau élevé ($2 < \text{Log Kow} < 5$), elles sont potentiellement facilement bioaccumulables par les organismes aquatiques. Contrairement à l'étude d'accumulation et de relargage des composés organo-halogénés totaux *in situ*, le suivi de ces molécules spécifique présente également l'avantage de pouvoir être validé par des expériences en laboratoire dans des conditions contrôlées de : la température, l'oxygénation, les concentration en composés organo-halogénés, la physiologie de la filtration et de la respiration, etc.

- l'étude histochimique des altérations cellulaires pouvant être induites à long terme par l'exposition aux effluents d'usines de pâte à papier blanchissant au chlore, et les conséquences que ces dernières peuvent avoir sur la reproduction et la survie des organismes.

- l'étude biochimique des enzymes de détoxification intervenant dans les processus de défense des organismes exposés aux micropolluants organo-halogénés.

Calendrier des expériences d'accumulation et de relargage

Chapitre IV : Accumulation de micropolluants métalliques et organo-halogénés chez *Anodonta cygnea*

Collecte des anodontes	:	fin février 1994 dans le canal de l'est à Ham sur Meuse
Transfert sur le terrain	:	03 mars 1994
Exposition sur le terrain	:	75 jours, du 03 mars 1994 au 18 mai 1994

Chapitre V : Etude de l'accumulation de composés organo-halogénés extractibles chez quatre espèces de mollusques aquatiques

Collecte des mollusques	:	30 septembre 1994 dans la Meuse à Bras sur Meuse
Transfert sur le terrain	:	07 octobre 1994
Exposition sur le terrain	:	28 jours, du 07 octobre 1994 au 4 novembre 1994

Chapitre VI : Etude de l'accumulation de composés organo-halogénés extractibles dans différents organes de *Anodonta cygnea*

Collecte des anodontes	:	25 octobre 1995 dans le plan d'eau de la ville de Metz
Transfert sur le terrain	:	07 novembre 1995
Exposition sur le terrain	:	91 jours, du 07 novembre 1995 au 06 février 1995

Chapitre VII : Etude du relargage de composés organo-halogénés extractibles chez *Anodonta cygnea*

Collecte des anodontes	:	25 octobre 1995 dans le plan d'eau de la ville de Metz
Transfert sur le terrain	:	07 novembre 1995
Exposition sur le terrain	:	147 jours, du 07 novembre 1995 au 26 mars 1996
Transfert à la station amont	:	26 mars 1996
Exposition à la station amont	:	42 jours, du 26 mars 1996 au 07 mai 1996

Références bibliographiques

Abarnou A. & Miossec L., 1992. Chlorinated waters discharged to the marine environment chemistry and environmental impact. An overview. The *Science of the Total Environment*, 126, pp. 173-197.

Adams W., 1960. Mollusques. Tome I - Mollusques terrestres et dulcicoles. Bruxelles, Institut royal des Sciences Naturelles de Belgique. 402 pages.

AERM (Agence de l'Eau Rhin Meuse), 1993. Dossier qualité des eaux superficielles du bassin Rhin-Meuse - actualisation 1988-1991. Ed. AERM, Rozérieulles, 28 pages.

Alawi M.A., Khalill F. & Sahili I., 1994. Determination of trihalomethanes produced through the chlorination of water as a function of its humic acid content. *Archieves of Environmental Contamination and Toxicology*, 26, pp. 381-386.

Amaral O.C., Otero R., Grimalt J.O. & Albaiges J., 1996. Volatile and semi-volatile organochlorine compounds in tap and riverine waters in the area of influence of a chlorinated organic solvent factory. *Water Research*, 30, pp. 1876-1884.

Andersson T., Bengtsson B.-E., Förlin L., Härdig J. & Larsson A., 1987. Long-term effects of bleached pulp mill effluents on carbohydrate metabolism and hepatic xenobiotic biotransformation enzymes in fish. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 13, pp. 53-60.

Asplund G., 1992. On the origin of organohalogens found in the environment. *Linköping studies in arts and science*, No 77. Linköping University, Suède. 50 pages + 6 publications.

Asplund G., Grimvall A. & Pettersson C., 1989. Naturally produced adsorbable organic halogens (AOX) in humic substances from soil and water. *The Science of the Total Environment*, 81/82, pp. 239-248.

Asplund G. & Grimvall A., 1991. Organohalogens in nature - more widespread than previously assumed. *Environmental Science and Technology*, 25, pp.1346-1350.

Asplund G., Grimvall A. & Jonsson S., 1994. Determination of the total and leachable amounts of organohalogens in soil. *Chemosphere*, 28, pp. 1467-1475.

ASTM (American Society for Testing and Materials), 1989. Standard test method for organic halides in water by carbon adsorption-microcoulometric detection. ASTM D 4744-89. *Annual Book of ASTM*, Philadelphia, 5 pages.

Axegard P., 1988. Improvement of bleach plant effluent by cutting back on Cl_2 - International pulp bleaching conference, april 1988. *Tappi proceedings*, pp. 69-76.

Bagge P. & Hakkari L., 1992. Effects of paper mill effluents on the fish fauna of stony shores of lake Päijänne. *Hydrobiologia*, 143/244, pp. 413-420.

Barker D.E., Khan R.A. & Hooper R., 1994a. Bioindicators of stress in winter flounder, *Pleuronectes americanus*, captured adjacent to a pulp and paper mill in St. George's bay, Newfoundland. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 51, pp. 2203-2209.

Barker D.E., Khan R.A., Lee E.M., Hooper R.G. & Ryan K., 1994b. Anomalies in sculpins (*Myoxocephalus* spp.) sampled near a pulp and paper mill. *Archieves of Environmental Contamination and Toxicology*, 26, pp. 491-496.

Becker K.H., Brockman K.J. & Bechara J., 1990. Production of hydrogen peroxide in forest air by reaction of ozone with terpenes. *Nature*, 346, pp. 256-258.

Bengtsson B.-E., 1988. Effects of pulp mill effluents on skeletal parameters in fish - a progress report. *Water Science and Techology*, 20, pp. 87-94.

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.

Boryslawskyj M., Garrod T., Stanger M. & Pearson T., 1988. Role of lipid/water partitioning and membrane composition in the uptake of organochlorine pesticides into a freshwater mussel. *Marine Environmental Research*, 24, pp. 57-61.

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.

Burggraaf S., Langdon A.G., Wilkins A.L. & Roper D.S., 1996. Accumulation and depuration of resin acids and fichtelite by the freshwater mussel, *Hyridella menziesi*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 15, pp. 369-375.

Calambodikis J., Mowrer J., Beug M.W. & Herman S.G., 1979. Selective retention of polychlorinated biphenyl components in the mussel, *Mytilus edulis*. *Archieves of Environmental Contamination and Toxicology*, 8, pp. 299-308.

Cantor K.P., 1994. Water chlorination, mutagenicity, and cancer epidemiology. *American Journal of Public Health*, 84, pp. 1211-1213.

Centre Technique du Papier, 1995. Industrie papetiere - guide des technologies propres et des filieres de traitement des dechets. Ed. Centre technique du papier, Grenoble, 125 pages.

Chovanec A. & Winkler G., 1994. River monitoring and water quality assessment in Austria. *Toxicology and Environmental Chemistry*, 44, pp. 161-176.

Christman R.F., Norwood D.L., Millington D.S., Johnson J.A. & Stevens A.A., 1983. Identity and yields of major halogenated products of aquatic fulvic acid chlorination. *Environmental Science and Technology*, 17, pp. 625-628.

Comba M.E., Palabrica V.S. & Kaiser K.L.E., 1994. Volatile halocarbons as tracers of pulp mill effluent plumes. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 13, pp. 1065-1074.

Craig G.R., Orr P.L., Robertson J.L. & Vrooman W.M., 1990. Toxicity and bioaccumulation of AOX and EOX. *Pulp & Paper Canada*, 91, pp. 39-45.

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.

DIN (Deutsches Institut für Normung e.V.), 1989. Bestimmung von adsorbierten, organisch gebundenen Halogenen (AOX) (S 18). DIN 38 414, Teil 18, Schlamm und Sedimente (Gruppe S) Beuth Verlag, Berlin, 8 pages.

Doré M., 1989. Chimie des oxydants & traitement des eaux. Lavoisier éd., Paris, 505 pages.

Duvivier L., 1993. Formation et élimination des organo-halogénés lors de la désinfection des eaux. Th. doct. Sci. : Louvain, 174 pages + annexes.

Enell M., Kaj L. & Wennberg L., 1989. Long-distance distribution of halogenated organic compounds (AOX). River Bassin Management, Ed. Laikiri H., Pergamon Press, Oxford, pp. 29-36.

Enell M. & Wennberg L., 1991. Distribution of halogenated organic compounds (AOX) - Swedish transport to surrounding sea areas and mass balance studies in five drainage systems. *Water Science and Technology*, 24, pp. 385-395.

Enell M. & Haglind I., 1994. Nitrogen, phosphorus and metal loads from swedish pulp and paper industry in the gulf of Bothnia - quantities and shares of total loads. *Water Science and Technology*, 29, pp. 49-59.

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.

Engvild K.C., 1986. Chlorine containing natural compounds in higher plants. *Phytochemistry*, 25, pp. 781-791.

Eriksson K.E. & Kolar M.C., 1985. Microbial degradation of chlorolignins. *Environmental Science and Technology*, 19, pp. 1086-1089.

Field J.A., Leyendeckers M.J.H., Sierra-Alvarez R., Lettinga G. & Habets L.H.A., 1988. The methanogenic toxicity of bark tannins and the anaerobic biodegradability of water soluble bark matter. *Water Science and Technology*, 20, pp 219-240.

Forss K. & Jokinen K., 1990. Biotechnology in the pulp and paper industry. VTT Symposium 122 : Bioconversion of plant raw materials - biotechnology advancement. Ed. M.-L. Niku-Paavola. Espoo, Finlande, pp. 9-18.

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.

Franke C., Studinger G., Berger G., Böhling S., Bruckmann U., Cohors-Fresenborg D. & Jöhncke U., 1994. The assessment of bioaccumulation. *Chemosphere*, 29, pp. 1501-1514.

Franzén R. & Kronberg L., 1994. Determination of chlorinated 5-methyl-5-hydroxyfuranones in drinking water, in chlorinated humic water, and in pulp bleaching liquor. *Environmental Science and Technology*, 28, pp. 2222-2227.

Gagnon M.M., Dodson J.J., Hodson P.V., van der Kraak G. & Carey J.H., 1994. Seasonal effects of bleached kraft mill effluents on reproductive parameters of white sucker (*Catostomus commersoni*) populations of the St. Maurice river, Quebec, Canada. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 51, pp. 337-347.

Gagnon M.M., Bussieres D., Dodson J.J. & Hodson P.V., 1995. White sucker (*Catostomus commersoni*) growth and sexual maturation in pulp mill-contaminated and reference rivers. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 14, pp. 317-327.

Gallissot B., 1988. Mise en évidence du potentiel bioaccumulateur des bryophytes aquatiques vis-à-vis des PCB et des pesticides organochlorés. Th. doct.: Sci. vie, Ecotoxicol. : Metz, 192 pages.

Garric J., 1980. La chloration des réfrigèrants atmosphériques - détérmination du protocole optimal et toxicité des rejets. Th. doct. Sci. vie, Ecotoxicol. : Metz, 1980.

Gergov M., Priha M., Talka E. & Valtilla O., 1988. Chlorinated organic compounds in effluent treatment at kraft mills. *Tappi Journal*, 71, pp. 175-184.

Glöer P. & Meier-Brock C., 1994. Süsswassermollusken. Deutscher Jugenbund 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 posibilités 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.

Gribble G.W., 1994. The natural production of chlorinated compounds. *Environmenal Science and Technology*, 28, pp. 310-319.

GTZ (Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit), 1990. Technologie des eaux résiduaires. Springer Verlag, Pariś, 1137 pages.

Gullichsen J., 1991. Process internal measures to reduce pulp mill pollution load. *Water Science and Technology*, 24, pp. 331-345.

Haas F., 1969. Superfamilia Unionacea. *In* : Das Tierreich. 663 pages

Hahn M., Rüttinger H.H., Matschiner H. & Lenk N., 1991. A new measuring device for the rapid coulometric determination of adsorbable organic halogen compounds. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 340, pp. 22-26.

Hakkari L. & Bagge P., 1992. Reproductive success of *Coregonus* species in areas loaded by effluents from paper mills. *Hydrobiologia*, 243/244, pp. 405-412.

Hansen P.D., 1992. Phagocytosis in *Mytilus edulis*, a system for understanding the sublethal effects of anthropogenic pollutants, and the use of AOX as an integrating parameter for the study of equilibria between chlorinated organics in *Dreissena polymorpha* following long term exposures. *Limnologie aktuell*, 4, pp. 171-184.

Hanson J.M., MacKay W.C. & Prepas E.E., 1988. The effects of water depht 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* (Pelecyboda, 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*. *Archieves of Environmental Contamination and Toxicology*, 16, pp. 95-101.

Henry M., 1987. La glande digestive de la palourde méditérranéenne *Ruditapes decussatus* L. Recherche ultrastructurales, cytochimiques, écophysiologiques et écotoxicologiques. Th. doct.: Sciences, Aix-Marseille, 439 pages.

Herve S., 1991a. Mussel incubation method for monitoring organochlorine compounds in freshwater recipients of pulp and paper industry. Academic Disertation for the Degree of Doctor of Philosophy, Jyväskylä, Finland. ISBN 951-680-548-5.145 pages.

Herve S., 1991b. Monitoring of organochlorine compounds in Finnish inland waters polluted by pulp and paper effluents using the mussel incubation method. *Water Science and Technology*, 24, pp. 397-402.

Herve S., Heinonen P., Paukku R., Knuutila M., Koistinen J. & Paasivirta J., 1988. Mussel incubation method for monitoring organochlorine pollutants in watercourses. Four year application in Finland. *Chemosphere*, 17, pp. 1945-1961.

Herve S., Paukku R., Paasivirta J., Heinonen P. & Södergren A., 1991. Uptake of organochlorines from lake water by hexane-filled dialysis membranes and by mussels. *Chemosphere*, 22, pp. 997-1001.

Hodson P. V., McWhirter M., Ralph K., Gray B., Thivierge D., Carey J.H., van der Kraak G., Whittle D.M. & Levesque M.-C., 1992. Effects of bleached kraft mill effluent on fish in the St. Maurice river, Quebec. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 11, pp. 1635-1651.

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.

Hoekstra E.J. & de Leer E.W.B., 1994. AOX levels in the river Rhine : fifty percent of natural origin ?! *Water Science and Technology*, 29, pp. 133-136.

Hoffmann H.J., 1986. Untersuchung der AOX-Gehalte in bayrischen Flüssen. Bewertung der Gewässerqualität und Gewässergüteanforderungen. *Münchner Beiträge zur Abwasser-, Fischerei- und Flussbiologie*, 40, pp. 445-459.

Hoffmann H.J., Bühler-Neiens G. & Laschka D., 1988. AOX in Schlämmen und Sedimenten - Bestimmungsverfahren und Ergebnisse. *Vom Wasser*, 71, pp. 125-134.

Illies J., 1978. Limnofauna europea. Ed. Swets & Zeitlinger, B.V., Amsterdam, pp. 135-137.

ISO (Organisation internationale de normalisation), 1989. Qualité de l'eau - dosage des halogènes des composés organiques adsorbables (AOX). Norme ISO 9562. Genève, 8 pages.

Jeney Z., Valtonen E.T., Jeney G. & Jokinen E.I., 1996. Effects of pulp and paper mill effluents (BKME) on physiology and biochemistry of the roach (*Rutilus rutilus* L.). *Archieves of Environmental Contamamination and Toxicology*, 30, pp. 523-529.

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 Environmental*, 108, pp. 205-214.

Jokela J.K. & Salkinoja-Salonen M., 1992. Molecular weight distribution of organic halogens in bleached kraft pulp mill effluents. *Environmental Science and Technology*, 26, pp. 1190-1197.

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, pp. 4-12.

Jokinen E.I., Aaltonen T.M. & Valtonen E.T., 1995. Subchronic effect of pulp and paper mill effluents on the immunoglobulin synthesis of roach, *Rutilus rutilus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 32, pp. 219-225.

Juuti S., Hirvonen A., Tarhanen J., Holopainen J.K. & Ruuskanen J., 1993. Trichloroacetic acid in pine needles in the vicinity of a pulp mill. *Chemosphere*, 26, pp. 1859-1868.

Juuti S., Vartiainen T., Joutsenoja P. & Ruuskanen J., 1996. Volatile organochlorine compounds formed in the bleaching of pulp with ClO_2. *Chemosphere*, 33, pp. 437-448.

Kankaapää H. & Masuku C.P., 1992. Adsorbable organic halogen (AOX) : determination in sea sediments. *Chemosphere*, 24, pp. 1331-1345.

Kankaanpää H. & Tissari J., 1994a. Background levels of EOX and AOX in sediments of the gulf of Finland. Molecular weight distribution of EOX in the sediments. *Chemosphere*, 28, pp. 99-116.

Kankaanpää H. & Tissari J., 1994b. Analysis for EOX and AOX in two industry influenced coastal areas in the gulf of Finland. *Chemosphere*, 29, pp. 241-255.

Kankaanpää H., Laurén M., Mattson M. & Lindström M., 1995. Effects of bleached kraft mill effluents on the swimming activity of *Monoporeia affinis* (crustacea, amphipoda) Lindström. *Chemosphere*, 31, pp. 4455-4473.

Kankaanpää H., Laurén M., Saares R.J., Heitto L.V. & Suursaar Ü.K., 1997. Distribution of halogenated organic material in sediments from anthropogenic and natural sources in the gulf of Finland catchment area. *Environmental Science and Technology*, 31, pp. 96-104.

Karlsson S., Kaugare S., Grimvall A., Borén H. & Sävenhed R., 1995. Formation of 2,4,6-trichlorophenol and 2,4,6-trichloroanisole during treatment and distribution of drinking water. *Water Science and Technology*, 31, pp. 99-103.

Kautsky H., Kautsky U. & Nellbring S., 1988. Distribution of flora and fauna in an area receiving pulp mill effluents in the Baltic sea. *Ophelia*, 28, pp. 139-155.

Kautsky H., 1992. The impact of pulp mill effluents on phytobenthic communities in the Baltic sea. *Ambio*, 21, pp. 308-313.

Keller M., 1989. AOX-Belastung von Oberflächengewässern im Jahr 1987. *Vom Wasser*, 72, pp. 199-210.

Klopp R. & Kornatzki K.-H., 1987. Emission und Immision von AOX im Ruhreinzugsgebiet. *Zeitschrifft für Wasser- und Abwasser-Forschung*, 20, pp. 160-167.

Knuutinen J., Virkki L., Mannila P., Mikkelson P., Paasivirta J. & Herve S., 1988. High performance liquid chromatographic study of dissolved organic matter in natural waters. *Water Research*, 22, pp. 985-990.

Koenig B.G. & Metcalfe C.D., 1990. The distribution of PCB congeners in bivalves, *Elliptio complanata*, introduced in the Ontonabee River Peterborugh, Ontario. *Chemosphere*, 21, pp. 1441-1449.

Koistinen J., Paasivirta J. & Särkkä J., 1990. Organic chlorine compounds in lake sediments. IV. Dioxins, furans and related chloromatic compounds. *Chemosphere*, 12, pp. 1371-1379.

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.

Kringstad K.P. & Lindström K., 1984. Spend liquors from pulp bleaching. *Environmental Science and Technology*, 18, pp. 236-248.

Kühn W. & Sontheimer H., 1973. Einfluss chemischer Umsetzungen auf die Lage der Adsorptionsgleichgewichte an Aktifkohlen. *Vom Wasser*, 40, pp. 115-123.

Kühn W. & Sontheimer H., 1975. Einige Untersuchungen zur Bestimmung von organischen Chlorverbindungen auf Aktivkohlen. *Vom Wasser*, 41, pp. 65-79.

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.

Kvernheim A.L., Martinsen K., Carlberg G.E., Berg B.E., Fresvig M. & Greibrokk T., 1993. Characterization of organohalogen matter in sediments from the receiving water of a bleach plant. *Chemosphere*, 27, pp. 733-745.

Kyllönen H.L., Lappi M.K., Thun R.T. & Mustaranta A.H., 1988. Treatment and characterization of biological sludges from the pulp and paper industry. *Water Science and Technology*, 20, pp. 183-193.

Larsson A., Andersson T., Förlin L. & Härdig J., 1988. Physiological disturbances in fish exposed to bleached kraft mill effluents. *Water Science and Technology*, 20, pp. 67-76

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.

Law F.C.P. & Gudaitis J.A., 1994. A preliminary assessment of human health risks due to consumption of fish contaminated by dioxins and furans in the Fraser and Thompson rivers. *Chemosphere*, 28, pp. 1079-1086.

Léglize L. & Crochard C., 1987. Vérification expérimentale du choix de Dreissena polymorpha Pallas (lamellibrache) comme bioindicateur de la pollution métallique. *Nat. Can. (Rev. Ecol. Syst.)*, 114, pp. 315-322.

Lehtinen K.-J., Notini M., Mattsson J. & Landner L., 1988. Dissappearance of bladder-wrack (*Fucus vesiculosus*) in the Baltic Sea : relation to pulp mill chlorate. *Ambio*, 17, pp. 387-393.

Leonardsson K., 1993. Long-term ecological effects of bleached pulp-mill effluents on benthic macrofauna in the gulf of Bothnia. *Ambio*, 22, pp. 359-362.

Lindesjöö E. & Thulin J., 1990. Fin erosion of perch *Perca fluviatilis* and ruffe *Gymnocephalus cernua* in a pulp mill effluent area. *Diseases of Aquatic Organisms*, 8, pp. 119-126.

Lindesjöö 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.

Lindesjöö E. & Thulin J., 1994. Histopathology of skin and gills of fish in pulp mill effluents. *Diseases of Aquatic Organisms*, 18, pp. 81-93.

Lindesjöö 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.

Lunde A., Skramstad J. & Carlberg G.E., 1991. Identification, mutagenicity and origin of chlorinated thiophenes in kraft bleaching effluents. *Paperi ja Puu - Paper and Timber*, 73, 6 pages.

Luthe C.E., 1996. Octachlorinated dioxin in pulps and effluents : where does it come from ? *Chemosphere*, 32, pp. 2409-2425.

Maatela P., Paasivirta J., Särkkä J. & Paukku R., 1990. Organic chlorine compounds in lake sediments. II Organically bound chlorine. *Chemosphere* 21, pp. 1343-1354.

McMaster M.E., Portt C.B., Munkittrick K.R. & Dixon D.G., 1992. Milt characteristics, reproductive performance, and larval survival and development of white sucker exposed to bleached kraft mill effluent. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 23,pp. 103-117.

Mackay D., 1982. Correlation of bioconcentration factors. *Environmental Science and Technology*, 16, pp. 274-278.

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.

Manninen P.K.G. & Häsänen E., 1992. Total organochlorine and organobromine in Finnish water courses. *Hydrobiologia*, 243/244, pp. 475-479.

Martin A.B., Cooke G.D. & Carlson R.E., 1993. Lake sediments as potential sources of trihalomethane precursors. *Water Ressearch*, 27, pp. 1725-1729.

Martinsen K., Kringstad A. & Carlberg G.E., 1988. Methods for determination of sum parameters and charactrization 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.

Martinsen K., Lund Kvernheim A. & Carlberg G.E., 1994. Distribution of organohalogens in sediments outside pulp mills using sum parameters. *The Science of the Total Environment*, 144, pp. 47-57.

Marttila O., Jaakkola J.J. & Vilkka V., 1994. The south Karelia air pollution study : the effects of malodorous sulfur compounds from pulp mills on respiratory and other symptoms in children. *Environmental Research*, 66, pp. 152-159.

Mayack D.T. & Waterhouse J.S., 1983. The effects of low concentrations of particulates from paper mill effluents on the macroinvertebrate community of a fast flowing stream. *Hydrobiologia*, 107, pp. 271-282.

Mehrtens G., 1994. Haloperoxidase activities in arctic macroalgae. *Polar Biology*, 14, pp. 351-354.

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. Th. doct. : Sci. vie, Ecotoxicol.: Metz, 210 pages.

Mersch J. & Pihan J.C., 1993. Simultaneous assessment of environmental impact on condition and trace metal availability in zebra mussel *Dreissena polymorpha* transplante into the Wiltz river, Luxembourg. Comparaison with the aquatic moss *Fontinalis antipyretica*. *Archieves of Environmental Contamination and Toxicology*, 25, pp. 353-364.

Metcalfe 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.

Moore J.E. & Love R.J., 1977. Effect of a pulp and paper mill effluent on the productivity of periphyton and plankton. *Journal of Fishery Research Bd. Canada*, 34, pp. 856-862.

Morton B., 1983. Feeding and digestion in bivalvia. In : The mollusca, vol. 5, Physiology, part 2. Saleudin A.S.M. & Wilbur K.M. (Ed.), Academic Press, London.

Munkittrick K.R., Portt C.B., van der Kraak G.J., Smith I.R. & Rokosh D.A., 1991. Impact of bleached kraft mill effluents on population characteristics, liver MFO activity, and serum steroid levels of a lake superior white sucker (*Catostomus commersoni*) population. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 48, pp. 1371-1380.

Munkittrick K.R., McMaster M.E., Portt C.B., van der Kraak G.J., Smith I.R. & Dixon D.G., 1992. Changes in maturity, plasma sex steroid levels, hepatic mixed-function oxygenase activity, and the presence of external lesions in lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*) exposed to bleached kraft mill effluents. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 49, pp. 1560-1569.

Munkittrick K.R., van der Kraak G.J., McMaster M.E., Portt C.B., van den Heuvel M.R. & Servost M.R., 1994. Survey of receiving water environmental impacts associated with discharges from pulp mills. 2. Gonad size, liver size, hepatic EROD activity and plasma sex steroid levels in white sucker. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 13, pp. 1089-1101.

NCASI (National Council of the paper industry for air and stream imrovement), 1992. Naturally occuring organohalogen compounds - a survey. *Technical Bulletin* N° 629, 64 pages.

Negus C.L., 1966. A quantitative study of groth and reproduction od unionidae mussels in the river Thames at Reading. *Journal of Animal Ecology*, 35, pp. 513-532.

Neidleman S.L. & Geigert J., 1987. Biological halogenation : roles in nature, potential in industry. *Endeavour, New Series*, 11, pp. 5-15.

NSEPB (National Swedish Environmental Protection Board), 1989. Biological effects of bleached pulp mill effluents. Report 3558. Ed. Anders Södergren, 139 pages.

O'Connor B.I. & Voss R.H., 1992. A new perspective (sorption/desorption) on the question of chlorolignin degradation to chlorinated phenolics. *Enivironmental Science and Technology*, 26, pp. 556-560.

ÖNORM M 6275. Adsorbierbares organisch gebundenes Halogen (AOX)

Owens J.W., Swanson S.M. & Birkholz D.A., 1994. Environmental monitoring of bleached kraft pulp mill chlorophenolic compounds in a northern canadian river system. *Chemosphere*, 29, pp. 89-109.

Owens J.W., Swanson S.M. & Birkholz D.A., 1994. Bioaccumulation of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin, 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzofuran and extractable organic chlorine at a bleached-kraft mill site in a northern canadian river system. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 13, pp. 343-354.

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, pp. 469-491.

Paasivirta J., Knuutinen J., Maatela P., Paukku R., Soikkeli J. & Särkkä J., 1988. Organic chlorine compounds in lake sediments and the role of the chlorbleaching effluents. *Chemosphere*, 17, pp. 137-146.

Paasivirta J., Hakala H., Knuutinen J., Otollinen T., Särkkä J., Welling L., Paukku R. & Lammi R., 1990. Organic chlorine compounds in lake sediments. III. Chlorohydrocarbons, free and chemically bound chlorophenols. *Chemosphere*, 21, pp. 1355-1370.

Paasivirta J., Tenhola H., Palm H. & Lammi R., 1992. Free and bound chlorophenols in kraft bleaching effluents. *Chemosphere*, 24, pp. 1253-1258.

Palm H. & Lammi R., 1995. Fate of pulp mill organochlorines in the gulf of Bothnia sediments. *Environmental Science and Technology*, 29, pp. 1722-1727.

Partti-Pellinen K., Marttila O., Vilkka V., Jaakkola J.J., Jäppinen P. & Haahtela T., 1996. The south Karelia air pollution study : effects of low-level exposure to malodorous sulfur compounds on symptoms. *Archives of Environmental Health*, 51, pp 315-320.

Pekkarinen M., Annual ring formation in some unionicean shells in the river Vantaanjoki (Southern Finland). Bivalve studies in Finland, 1, pp. 311-321.

Pellinen J. & Soimasuo R., 1993. Toxicity of sediments polluted by the pulp and paper industry to a midge (*Chironomus riparius* Meigen). *The Science of the Total Environment*, Supplement. 1993, pp. 1247-1256.

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., 1994. Sorption of high molecular weight chlorolignin on sediment. *Chemosphere*, 28, pp. 1773-1789.

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.

Phillips D.J.H., 1980. Quantitative aquatic biological indicators. Their use to monitor trace metal and organochlorine pollution. Ed. Applied Science Publisher Ltd, London, 471 pages.

Pinkerton J.E., 1993. Emissions of SO_2 and NO_x from pulp and paper mills. *Air & Waste*, 43, pp.1404-1407.

Pynnönen K. S. & Huebner J., 1995. Effects of episodic low pH exposure on the valve movements of the freshwater bivalve *Anodona cygnea* L. *Water Research*, 29, pp. 2579-2582.

Quentin K.E., 1984. Chlorkohlenwasserstoffe in Gewässern erzwingen Problemlösungen. *Korrespondenz Abwasser*, 31, pp. 477.

Quid, 1994. Robert Laffont Ed., 1998 pages.

Ramade F., 1992. Précis d'écotoxicologie. Ed. Masson, Paris, 300 pages.

Rav-Acha C. & Rebhun M., 1992. Binding of organic solutes to dissolved humic substances and its effect on adsorption and transport in the aquatic environment. *Water Research*, 26, pp. 1645-1654.

Reincke H., 1992. Biological effect monitoring in the river Elbe using the zebra mussel, *Dreissena polymorpha*. *Limnologie aktuell*, 4, pp. 185-196.

Remberger M., Hynning P.-A. & Neilson A.H., 1993. Release of chlorocatechols from a contaminated sediment. *Environmental Science and Technology*, 27, pp. 158-164.

Rintala J.A. & Puhakka J.A., 1994. Anaerobic treatment in pulp and paper mill waste management : a review. *Bioresource Technology*, 47, pp. 1-18.

RIWA, 1992. Rapport annuel, Tome B : la Meuse. RIWA, Amsterdam, 148 pages.

RIWA, 1995. Rapport annuel, Tome B : la Meuse. RIWA, Amsterdam, 128 pages.

Rodier J., 1996. L'analyse de l'eau. Dunod Ed., 1384 pages.

Rook J.J., 1974. Formation of halogens during chlorination of natural waters. *Water Treatment and Examination*, 23, pp. 234-235.

Rosemarin A., Lehtinen K-J., Notini M. & Mattsson J., 1994. Effects of pulp mill chlorate on baltic sea algae. *Environmental Pollution*, 85, pp. 3-13.

Särkkä J., Paasivirta J., Häsänen E., Koistinen J., Manninen P., Mäntykoski K., Rantio T. & Welling L., 1993. Organic chlorine compounds in lake sediments. VI. Two bottom sites of lake Ladoga near pulp mills. *Chemosphere*, 26, pp. 2147-2160.

Sagfors P.-E. & Starck B., 1988. High molar mass lignin in bleached kraft pulp mill effluents. *Water Science and Technology*, 20, pp. 49-58.

Salanki J., Lukacsovics F. & Hiripi L., 1974. The effect of temperature variations on the rythmic and periodic activity of the freshwater mussel (*Anodonta cygnea* L.). *Annales Biology Tihany*, 41, pp. 69-79.

Salanki J. & Varanka I., 1976. Effect of copper and lead compounds on the activity of the freshwater mussel. *Annales Biology Tihany*, 43, pp. 21-27.

Salanki J. & V.-Balogh K., 1985. Uptake and release of mercury and cadmium in various organs of mussels (*Anodonta cygnea* L.). *Symposia Biologica Hungarica*, 29, pp. 325-342.

Salanki J. & V.-Balogh K., 1989. Physiological background for using freshwater mussels in monitoring copper and lead pollution. *Hydrobiologia* 188/189, pp. 445-454.

Sanchez-Jimenez M.C., Pedraza Dominguez A. & Cachaza Silverio J.M., 1993. Reaction kinetics of humic acid with sodium hypochlorite. *Water Research*, 27, pp. 815-820.

Schell J.D., Campbell D.M. & Lowe E., 1993. Bioaccumulation of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in feral fish collected from a bleach-kraft paper mill receiving stream. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 12, pp. 2077-2082.

Schowanek D., Racioppi F., Matthijs E., Boyko R., Gabba M., Buschini A. & Gardini G.P., 1996. Quantitative *in situ* monitoring of organohalogen compounds in domestic sewage resulting from the use of hypochlorite bleach. *Water Research* 30, pp. 2193-2205.

Servizi J.A., Gordon R.W., Martens D.W., Lockhart W.L., Metner D.A., Rogers I.H., McBride J.R. & Norstrom R.J., 1993. Effetcts of biotreated bleached kraft mill effluents on fingerling chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 50, pp. 846-857.

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.

Sinkkonen S., Kolehmainen E., Paasivirta J., Koistinen J., Lahtiperä M. & Lammi R., 1994. Identification and level estimation of chlorinated neutral aromatic sulfur compounds and their alkylated derivates in pulp mill effluents and sediments. *Chemosphere*, 28, pp. 2049-2066.

Smith J.W. & Sprague J.B., 1992. Compatibility of pulping effluents with the aquatic environment. *Pulp & Paper Canada*, 93, pp. 53-57.

Smith T.J., Wearne R.H. & Wallis A.F.A., 1993. Determination of chlorinated benzaldehydes and acetophenones in pulp bleaching effluents by gas chromatography. *Journal of Chromatography*, 648, pp. 289-293.

Smith T.J., Wearne R.H. & Wallis A.F.A., 1994a. An ubiquitous chlorohydroxypyrone in filtrates from chlorine prebleaching of alkaline pulps. *Holzforschung*, 48, pp. 423-428.

Smith T.J., Wearne R.H. & Wallis A.F.A., 1994b. Characteristics of the chlorinated organic substances in filtrates from bleaching of oxygen-delignified eucalypt kraft pulp. *Water Science and Technology*, 29, pp. 61-71.

Smith T.J., Wearne R.H. & Wallis A.F.A., 1994c. Properties of chlorinated dihydroxybenzenes - components of pulp bleaching effluents. *Chemosphere*, 29, pp. 1555-1560.

Smits J.E.G., Wobeser G.A. & Schiefer H.B., 1995. Physiological, reproductive and pathological effects of dietary bleached pulp mill effluent on mink (*Mustela vison*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 14, pp. 2095-2105.

Smits J.E.G., Haines D.M., Blakley B.R. & Wobeser G.A., 1996. Enhanced antibody responses in mink (*Mustela vison*) exposed to dietary bleached kraft pulp mill effluents. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 15, pp. 1166-1170.

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.

Stockner J.G. & Cliff D.D., 1976. Effects of pulp mill effluent on phytoplankton production in coastal marine waters of British Columbia. *Journal of Fishery Research Bd. Canada*, 33, pp. 2433-2442.

Strömvall A-M. & Petersson G., 1993. Photooxidant-forming monoterpenes in air plumes from kraft pulp industries. *Environmental Pollution*, 79, pp. 219-223.

Sudelin B., 1988. Effects of sulfate pulp mill effluents on soft bottom organisms - a microcosm study. *Water Science and Technology*, 20, pp. 175-177.

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 Fliesgewässern durch die Zellstoff- und Papierindustrie in Österreich. Umweltbundesamt Wien - Autriche. 115 pages.

Voss R.H., Wearing J.T., Mortimer R.D., Kovacs T. & Wong A., 1980. Chlorinated phenolics in kraft bleachery effluents. *Paperi ja Puu - Paper and Timber*, 62, pp. 809-814.

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 kinetiks by freshwater mollusc soft body under hard and soft water conditions. *Chemosphere*, 32, pp. 1937-1948.

Wrisberg M.N. & van der Gaag M.A., 1992. In vivo detection of genotoxicity in waste water from a wheat and rye straw paper pulp factory. *The Science of the Total Environment*, 121, pp. 95-108.

Zatta P., Gobbo S., Rocco P., Perazzolo M. & Favarato M., 1992. Evaluation of heavy metal pollution in the Venetian lagoon by using *Mytilus galloprovencialis* as biological indicator. *The Science of the Total Environment*, 119, pp. 29-41.

Annexe A : Chapitre III

Etude de la contamination de l'eau et des sédiments

Tableau A.1 : Concentrations en AOX (µg $Cl.l^{-1}$) dans l'eau des huit stations étudiées.

	Virton	Ecouviez	Charency	Tétaigne	Bras/M.	Nouzonville	Ham/M.	Givet
05/93	n.d.	447.1	16.6	76.4	27.4	34.6	28.7	29.6
06/93	n.d.	479.6	25.4	132.7	28.7	58.8	48.8	46.5
07/93	20.9	40.6	28.7	36.1	28.7	52.1	33.1	65.0
08/93	30.8	44.7	23.3	43.1	34.4	36.5	41.7	45.1
09/93	24.9	35.2	28.2	39.9	19.2	38.4	35.7	41.4
10/93	28.5	31.2	17.0	54.2	16.7	21.7	24.7	44.2
11/93	21.0	36.9	26.5	47.6	23.8	50.8	102.2	110.3
12/93	11.2	11.0	12.6	33.2	9.0	24.7	16.1	16.7
01/94	9.6	11.9	12.3	12.6	10.8	16.0	17.9	17.5
02/94	8.3	12.8	9.9	8.6	11.4	8.8	6.4	8.5
03/94	14.6	802.2	25.5	83.5	19.1	24.7	33.5	27.5
04/94	6.4	158.5	12.7	36.2	23.6	19.8	21.0	18.4
05/94	9.7	152.0	12.6	69.6	10.6	28.2	17.1	19.5
06/94	9.3	201.4	16.5	44.1	15.7	16.5	14.5	20.3
07/94	10.9	291.0	15.7	64.1	16.6	21.3	19.9	26.7
08/94	10.6	310.6	12.7	88.7	17.8	23.2	19.8	24.4
09/94	12.9	268.2	13.6	78.4	14.1	21.2	32.6	38.5
10/94	11.0	287.6	16.9	75.8	18.1	23.0	27.0	31.7
11/94	12.3	325.0	17.6	102.5	21.8	38.0	64.6	66.7

Tableau A.2 : Concentrations en AOX (µg $Cl.g^{-1}$ poids sec) dans les sédiments des huit stations.

	Virton	Ecouviez	Charency	Tétaigne	Bras/M.	Nouzonville	Ham/M.	Givet
04/93	n.d.	59.659.6	51.4	57.1	35.8	38.2	38.1	32.1
05/93	n.d.	68.0	33.5	39.5	19.0	19.5	23.0	56.9
06/93	n.d.	45.6	27.8	72.2	23.1	13.9	16.1	917.9
07/93	n.d.	53.8	14.7	85.5	28.4	30.7	18.9	32.8
08/93	16.6	39.0	30.5	37.1	20.8	17.5	15.5	n.d.
09/93	38.2	50.6	35.6	60.8	37.7	23.9	40.1	32.2
01/94	11.7	10.9	47.0	31.9	n.d.	29.7	27.4	31.5
02/94	13.7	32.2	38.7	44.2	n.d.	21.2	42.8	17.4
03/94	13.9	15.9	71.9	44.4	n.d.	33.0	66.4	57.8
04/94	15.0	27.0	47.7	39.1	30.1	16.2	33.9	47.7
05/94	13.3	56.8	54.0	45.0	n.d.	18.4	20.6	23.8
06/94	13.0	66.5	49.0	45.0	28.6	32.7	18.4	26.3
07/94	14.9	63.9	43.8	65.9	23.6	48.6	21.8	29.6
08/94	13.1	71.4	39.5	59.7	27.9	52.9	24.8	37.8
09/94	16.9	65.0	44.0	57.0	34.3	29.0	38.7	38.8
10/94	15.9	72.5	38.5	49.0	27.5	38.1	27.5	27.3
11/94	13.2	67.6	42.5	52.6	32.0	55.8	28.8	37.3

Tableau A.3 : Concentrations en AOX (µg $Cl.g^{-1}$ matière org.) dans les sédiments des huit stations.

	Virton	Ecouviez	Charency	Tétaigne	Bras/M.	Nouzonville	Ham/M.	Givet
04/93	n.d.	3428.5	479.5	968.2	330.5	675.9	454.7	609.4
05/93	n.d.	3184.8	312.9	527.4	150.6	392.3	288.7	391.2
06/93	n.d.	3482.9	453.1	1398.4	180.3	344.4	292.6	370.8
07/93	n.d.	1053.1	714.3	833.0	197.7	1077.2	339.9	860.4
08/93	281.2	1170.5	286.5	421.9	116.4	662.0	235.4	n.d.
09/93	419.8	690.1	399.8	703.4	363.2	356.6	600.4	705.3
01/94	347.3	316.9	461.7	649.3	n.d.	705.5	230.9	503.1
02/94	348.1	599.0	401.8	468.0	n.d.	329.4	548.9	326.4
03/94	258.3	727.7	474.9	452.0	n.d.	369.9	551.6	515.3
04/94	376.2	685.5	374.5	433.6	309.5	565.9	401.1	530.3
05/94	405.7	590.9	418.7	529.7	n.d.	464.4	444.9	409.2
06/94	244.2	976.5	473.3	502.7	241.2	609.4	236.8	428.9
07/94	262.3	1025.8	388.9	670.2	187.9	618.7	315.6	434.5
08/94	202.4	1257.3	353.4	697.9	285.8	877.5	282.5	638.6
09/94	215.6	1337.2	371.8	775.5	288.8	795.6	459.4	683.9
10/94	228.1	1461.5	367.2	559.9	266.3	775.6	272.5	574.3
11/94	222.9	1221.5	349.3	514.5	252.2	951.8	321.7	682.5

Annexe I.1 : Concentrations en AOX (µg Cl/l) dans l'eau des quatres cours d'eau étudiés ; eau brute et eau filtrée sur 0.4 µm.

	Rivière Moselle			
	06-oct-95		26-aoû-96	
	Eau brute	Eau filtrée	Eau brute	Eau filtrée
Source	15,0	14,5	9,8	8,7
Saulx	30,2	29,1	18,7	17,1
Remiremont	17,9	16,3	21,6	16,8
Epinal	24,2	22,6	29,6	25,6
Golbey	50,6	48,7	44,8	51,2
Chatel	35,0	33,9	21,6	15,6
Charmes	30,0	27,5	33,6	30,9
Neuves Maisons	38,6	37,9	28,3	25,7
Toul	15,8	14,9	33,6	32,9
Pont à Mousson	42,3	42,1	37,6	33,6
Jouy aux arches	116,2	112,7	98,3	95,7
Metz	51,6	49,3	41,6	38,3
Thionville	67,2	66,7	53,6	48,1
Manom	61,3	60,3	80,3	75,7
Apach	57,2	55,1	52,1	50,3

	Rivière Meurthe			
	07-fév-96		26-aoû-96	
	Eau brute	Eau filtrée	Eau brute	Eau filtrée
Source	5,7	5,6	6,6	5,9
Fraize	6,9	6,6	9,6	7,6
Saint Dié	16,1	15,8	29,6	23,6
Raon l'Etape	16,4	15,9	18,7	17,9
Baccarat	12,5	11,8	21,6	19,6
Lunéville	13,9	12,1	23,6	21,8
Dombasle	86,2	80,3	92,7	88,3
Nancy	70,5	66,7	57,3	55,1

	Fleuve Meuse			
	06-oct-95		26-aoû-96	
	Eau brute	Eau filtrée	Eau brute	Eau filtrée
Saint Mihiel	13,8	12,1	27,8	25,6
Dieue sur Meu	14,7	12,8	19,6	16,3
Bras sur Meuse	15,6	13,7	13,6	12,9
Dun sur Meuse	14,4	13,3	23,6	21,6
Stenay	33,5	30,7	32,6	30,8
Mouzon	28,6	25,1	25,7	23,8
Bazeilles sur M	42,0	39,6	68,3	65,2
Charleville	35,6	33,7	48,3	45,8
Revin	28,5	25,3	39,7	38,1
Givet	24,0	22,1	35,2	33,8

	Rivière Chiers			
	16-sep-95		28-aoû-96	
	Eau brute	Eau filtrée	Eau brute	Eau filtrée
Douzy	38,7	36,1	119,2	105,4
Tétaigne	40,1	38,2		
Carignan	43,1	41,2	143,2	129,7
Lamouille	30,1	29,7		
Montmédy	28,2	25,8	171,6	158,6
Charency	33,0	31,3		
Colmey	19,1	17,8		
Longuyon	36,5	34,1	39,6	37,8
Montigny	13,5	12,2		
Cons la grandv	24,0	22,6		
Longwy	27,2	25,2	45,4	39,6
Longlaville	27,0	24,7	28,3	25,6

Annexe B : Chapitre IV

Etude de l'accumulation de micropolluants métalliques et organo-halogénés par *Anodonta cygnea*

Tableau B.1 : Paramètres physiologiques mesurés dans *A. cygnea* (moyenne ± écart type , n=2)..

	Temps d'exposition	% poids sec / poids frais	% lipides / poids sec
Témoins	0	7.65 ± 0.59	7.41 ± 0.22
Station 1	6	5.66 ± 0.47	7.85 ± 0.16
Station 1	13	7.96 ± 1.18	6.40 ± 0.26
Station 1	20	7.90 ± 0.48	5.65 ± 0.33
Station 1	27	11.27 ± 0.39	6.02 ± 0.26
Station 1	47	10.35 ± 1.24	5.96 ± 0.89
Station 1	75	15.89 ± 1.28	7.06 ± 0.31
Station 2	6	5.96 ± 0.52	7.65 ± 0.62
Station 2	13	8.43 ± 0.44	5.37 ± 0.15
Station 2	20	5.99 ± 0.03	5.98 ± 0.06
Station 2	27	7.48 ± 0.82	5.89 ± 0.13
Station 2	47	5.25 ± 0.59	4.23 ± 0.18
Station 2	75	12.79 ± 0.39	5.56 ± 0.76

Tableau B.2 : Concentrations en EOX dans *A. cygnea* (moyenne ± écart type ; n=2).

	Temps d'exposition	µg $Cl.g^{-1}$ poids frais	µg $Cl.g^{-1}$ poids sec	µg $Cl.g^{-1}$ lipides
Témoins	0	0.85 ± 0.06	11.15 ± 0.13	150.64 ± 6.17
Station 1	6	0.78 ± 0.05	13.70 ± 1.87	174.71 ± 20.89
Station 1	13	0.90 ± 0.05	11.31 ± 2.03	176.91 ± 38.03
Station 1	20	1.43 ± 0.13	18.03 ± 2.56	319.41 ± 25.04
Station 1	27	1.83 ± 0.13	16.27 ± 1.60	270.15 ± 38.00
Station 1	47	1.17 ± 0.07	10.46 ± 0.64	175.07 ± 15.64
Station 1	75	2.92 ± 0.09	18.38 ± 1.96	260.45 ± 37.53
Station 2	6	2.49 ± 0.29	41.67 ± 1.26	544.88 ± 57.71
Station 2	13	4.14 ± 0.10	49.13 ± 1.37	915.79 ± 49.76
Station 2	20	3.79 ± 0.19	63.27 ± 3.53	1058.90 ± 67.75
Station 2	27	3.74 ± 0.22	49.95 ± 7.78	849.22 ± 115.95
Station 2	47	1.92 ± 0.12	35.55 ± 1.72	864.10 ± 75.06
Station 2	75	6.40 ± 0.57	49.95 ± 2.92	899.21 ± 134.59

Tableau B.3 : Concentrations métalliques dans *A.cygnea* (moyenne ± écart type ; n=2).

	Temps d'exposition	Plomb $\mu g.g^{-1}$ poids sec	Cadmium $\mu g.g^{-1}$ poids sec	Arsenic $\mu g.g^{-1}$ poids sec
Témoins	0	1.37 ± 0.08	0.39 ± 0.01	1.72 ± 0.01
Station 1	6	3.40 ± 0.17	0.76 ± 0.12	1.69 ± 0.08
Station 1	13	1.91 ± 0.22	0.48 ± 0.08	1.42 ± 0.09
Station 1	20	2.19 ± 0.09	0.31 ± 0.03	1.81 ± 0.15
Station 1	27	1.86 ± 0.01	0.20 ± 0.04	1.76 ± 0.05
Station 1	47	3.01 ± 0.09	0.59 ± 0.04	2.61 ± 0.13
Station 1	75	2.12 ± 0.16	0.65 ± 0.04	2.38 ± 0.09
Station 2	6	2.12 ± 0.27	0.53 ± 0.12	4.32 ± 0.13
Station 2	13	3.07 ± 0.08	0.55 ± 0.10	3.05 ± 0.17
Station 2	20	1.62 ± 0.14	0.50 ± 0.05	2.77 ± 0.30
Station 2	27	1.80 ± 0.07	0.64 ± 0.08	3.69 ± 0.31
Station 2	47	2.15 ± 0.10	0.88 ± 0.03	3.60 ± 0.36
Station 2	75	2.66 ± 0.08	0.67 ± 0.18	4.36 ± 0.10

Tableau B.3 (suite)

	Temps d'exposition	Manganèse µg.g-1 poids sec	Nickel µg.g-1 poids sec	Cuivre µg.g-1 poids sec
Témoins	0	3926.44 ± 10.88	2.92 ± 0.27	11.46 ± 0.64
Station 1	6	4514.96 ± 140.93	6.46 ± 0.14	12.69 ± 0.07
Station 1	13	3862.73 ± 211.51	4.09 ± 0.07	7.44 ± 0.62
Station 1	20	2303.70 ± 82.38	2.84 ± 0.02	10.17 ± 0.14
Station 1	27	2053.16 ± 128.95	3.78 ± 0.13	12.34 ± 0.13
Station 1	47	1845.57 ± 35.46	3.71 ± 0.04	12.71 ± 0.66
Station 1	75	2208.87 ± 24.72	1.70 ± 0.25	13.57 ± 1.24
Station 2	6	3980.54 ± 37.80	3.59 ± 0.01	9.62 ± 0.55
Station 2	13	2872.61 ± 146.08	3.01 ± 0.08	12.71 ± 1.53
Station 2	20	3461.36 ± 64.11	6.35 ± 0.20	15.25 ± 3.02
Station 2	27	3511.91 ± 425.46	5.51 ± 0.05	9.38 ± 1.62
Station 2	47	4791.50 ± 225.03	2.73 ± 0.15	15.58 ± 0.74
Station 2	75	3202.76 ± 8.66	4.94 ± 0.08	12.51 ± 2.44

Tableau B.3 (suite)

	Temps d'exposition	Fer µg.g-1 poids sec	Zinc µg.g-1 poids sec	Chrome µg.g-1 poids sec
Témoins	0	1455.82 ± 65.97	333.06 ± 16.47	2.94 ± 0.13
Station 1	6	1679.89 ± 110.48	240.37 ± 5.25	5.37 ± 0.15
Station 1	13	1271.11 ± 26.30	400.86 ± 18.53	3.16 ± 0.18
Station 1	20	1051.13 ± 12.74	297.61 ± 21.90	3.12 ± 0.17
Station 1	27	745.15 ± 35.81	281.61 ± 5.04	1.81 ± 0.12
Station 1	47	1046.96 ± 3.41	318.87 ± 12.49	1.98 ± 0.01
Station 1	75	1078.77 ± 128.37	336.57 ± 20.77	2.72 ± 0.11
Station 2	6	1435.83 ± 111.29	173.32± 21.78	3.57 ± 0.09
Station 2	13	1257.74 ± 32.25	306.36 ± 15.81	3.03 ± 0.28
Station 2	20	1496.72 ± 92.85	250.23 ± 22.45	3.79 ± 0.17
Station 2	27	1190.60 ± 101.56	262.24 ± 7.84	3.24 ± 0.20
Station 2	47	1564.92 ± 13.24	415.90 ± 64.39	6.33 ± 0.13
Station 2	75	1556.96 ± 7.44	442.94 ± 4.82	3.91 ± 0.35

Annexe C : Chapitre V

Etude de l'accumulation d'EOX chez quatre espèces de mollusques aquatiques

Tableau C.1a : Paramètres physiologiques mesurés dans *D. polymorpha* (moyenne ± écart type ; n=2).

	Temps d'exposition	Poids sec % du poids frais	Lipides % du poids frais	Lipides % poids sec
Témoins	0	7.59 ± 1.60	0.88 ± 0.16	11.66 ± 0.38
Station 1	14	6.14 ± 0.17	0.71 ± 0.05	11.58 ± 0.49
Station 1	28	6.94 ± 0.35	0.85 ± 0.07	12.31 ± 0.43
Station 2	7	9.41 ± 3.22	1.05 ± 0.28	11.34 ± 0.89
Station 2	14	6.70 ± 2.93	0.68 ± 0.22	10.50 ± 1.37
Station 2	21	7.22 ± 0.50	0.78 ± 0.05	10.76 ± 0.02
Station 2	28	7.01 ± 0.33	0.71 ± 0.02	10.17 ± 0.22
Station 3	7	8.38 ± 0.04	0.96 ± 0.04	11.43 ± 0.57
Station 3	14	8.16 ± 1.58	0.84 ± 0.14	10.36 ± 0.33
Station 3	21	7.99 ± 0.33	0.88 ± 0.05	11.01 ± 0.24
Station 3	28	5.15 ± 0.37	0.57 ± 0.04	11.08 ± 0.11

Tableau C.1b : Concentrations en EOX mesurées dans *D. polymorpha* (moyenne ± écart type ; n=2).

	Temps d'exposition	[EOX] µg $Cl.g^{-1}$ poids frais	[EOX] µg $Cl.g^{-1}$ poids sec	[EOX] µg $Cl.g^{-1}$ lipides
Témoins	0	1.17 ± 0.27	15.33 ± 0.31	131.66 ± 6.89
Station 1	14	1.04 ± 0.21	16.93 ± 2.99	145.81 ± 19.67
Station 1	28	1.25 ± 0.25	17.98 ± 2.70	145.77 ± 16.81
Station 2	7	1.72 ± 0.62	18.18 ± 0.37	160.92 ± 15.86
Station 2	14	1.39 ± 0.47	21.24 ± 2.27	202.56 ± 4.81
Station 2	21	1.78 ± 0.28	24.86 ± 5.64	230.89 ± 51.89
Station 2	28	2.15 ± 0.30	30.56 ± 2.81	301.13 ± 34.17
Station 3	7	1.44 ± 0.20	17.13 ± 2.50	149.55 ± 14.33
Station 3	14	1.47 ± 0.35	17.99 ± 0.88	173.77 ± 13.95
Station 3	21	1.72 ± 0.08	21.58 ± 1.81	196.23 ± 20.60
Station 3	28	1.32 ± 0.13	25.74 ± 4.38	232.13 ± 37.21

Tablea C.2a : Paramètres physiologiques mesurés dans *U. pictorum* (moyenne ± écart type ; n=3).

	Temps d'exposition	Poids sec % du poids frais	Lipides % du poids frais	Lipides % poids sec
Témoins	0	14.82 ± 0.89	1.01 ± 0.12	6.84 ± 0.98
Station 1	28	16.20 ± 0.54	0.95 ± 0.17	5.87 ± 0.85
Station 2	28	15.85 ± 0.71	0.89 ± 0.06	5.98 ± 0.24
Station 3	28	15.56 ± 1.40	0.86 ± 0.21	5.89 ± 0.91

Tableau C.2b : Concentrations en EOX mesurées dans *U. pictorum* (moyenne ± écart type ; n=3).

	Temps d'exposition	[EOX] µg $Cl.g^{-1}$ poids frais	[EOX] µg $Cl.g^{-1}$ poids sec	[EOX] µg $Cl.g^{-1}$ lipides
Témoins	0	1.13 ± 0.06	7.66 ± 0.80	113.23 ± 17.37
Station 1	28	0.82 ± 0.05	5.09 ± 0.47	88.19 ± 20.78
Station 2	28	2.68 ± 0.21	18.05 ± 1.37	302.54 ± 35.19
Station 3	28	2.12 ± 0.06	14.61 ± 1.25	253.09 ± 53.40

Tableau C.3a : Paramètres physiologiques mesurés dans *V. viviparus* (moyenne ± écart type ; n=2).

	Temps d'exposition	Poids sec % du poids frais	Lipides % du poids frais	Lipides % poids sec
Témoins	0	13.63 ± 0.46	0.61 ± 0.04	4.45 ± 0.44
Station 1	14	12.88 ± 1.38	0.58 ± 0.02	4.55 ± 0.36
Station 1	28	12.15 ± 1.29	0.52 ± 0.02	4.28 ± 0.29
Station 2	7	14.02 ± 0.58	0.67 ± 0.01	4.77 ± 0.29
Station 2	14	13.15 ± 0.36	0.62 ± 0.06	4.70 ± 0.34
Station 2	21	13.21 ± 0.27	0.65 ± 0.09	4.89 ± 0.81
Station 2	28	14.79 ± 0.46	0.64 ± 0.01	4.34 ± 0.10
Station 3	7	12.03 ± 0.23	0.56 ± 0.01	4.63 ± 0.03
Station 3	14	13.04 ± 0.04	0.62 ± 0.02	4.72 ± 0.14
Station 3	21	13.38 ± 0.59	0.56 ± 0.04	4.17 ± 0.12
Station 3	28	13.18 ± 1.61	0.55 ± 0.07	4.19 ± 0.02

Tableau C.3b : Concentrations en EOX mesurées dans *V. viviparus* (moyenne ± écart type ; n=2).

	Temps d'exposition	[EOX] µg $Cl.g^{-1}$ poids frais	[EOX] µg $Cl.g^{-1}$ poids sec	[EOX] µg $Cl.g^{-1}$ lipides
Témoins	0	0.59 ± 0.07	4.34 ± 0.65	97.30 ± 4.99
Station 1	14	0.51 ± 0.05	3.93 ± 0.04	86.54 ± 5.98
Station 1	28	0.45 ± 0.06	1.79 ± 0.90	88.06 ± 5.15
Station 2	7	0.87 ± 0.05	6.19 ± 0.11	130.09 ± 10.11
Station 2	14	0.90 ± 0.11	6.80 ± 0.68	144.52 ± 4.17
Station 2	21	0.98 ± 0.10	7.42 ± 0.92	152.17 ± 6.37
Station 2	28	0.89 ± 0.01	5.99 ± 0.09	138.13 ± 1.09
Station 3	7	0.55 ± 0.05	4.60 ± 0.36	99.39 ± 8.38
Station 3	14	0.60 ± 0.04	4.63 ± 0.33	98.20 ± 10.08
Station 3	21	0.66 ± 0.01	4.93 ± 0.28	118.42 ± 10.26
Station 3	28	0.77 ± 0.00	5.85 ± 0.74	139.81 ± 18.32

Tableau C.4a : Paramètres physiologiques mesurés dans *A. cygnea* (moyenne ± écart type ; n=4).

	Temps d'exposition	Poids sec % du poids frais	Lipides % du poids frais	Lipides % poids sec
Témoins	0	12.94 ± 1.12	0.68 ± 0.19	5.26 ± 1.34
Station 1	14	9.87 ± 1.17	0.50 ± 0.13	5.03 ± 0.83
Station 1	28	9.85 ± 1.45	0.50 ± 0.13	5.18 ± 1.26
Station 2	4	9.12 ± 0.88	0.50 ± 0.09	5.42 ± 0.56
Station 2	7	11.76 ± 0.96	0.60 ± 0.09	5.18 ± 1.09
Station 2	11	11.42 ± 0.65	0.69 ± 0.13	6.01 ± 1.11
Station 2	14	8.65 ± 0.61	0.44 ± 0.07	5.11 ± 0.73
Station 2	18	9.67 ± 1.73	0.53 ± 0.10	5.54 ± 1.27
Station 2	21	9.37 ± 0.96	0.56 ± 0.10	5.97 ± 1.06
Station 2	25	10.20 ± 1.62	0.59 ± 0.12	5.76 ± 0.33
Station 2	28	10.02 ± 1.45	0.64 ± 0.13	6.34 ± 1.06
Station 3	4	11.50 ± 1.23	0.69 ± 0.12	6.01 ± 0.49
Station 3	7	11.49 ± 4.32	0.56 ± 0.14	5.15 ± 1.37
Station 3	11	10.28 ± 1.32	0.53 ± 0.05	5.18 ± 0.37
Station 3	14	11.30 ± 0.38	0.60 ± 0.05	5.32 ± 0.30
Station 3	18	10.87 ± 1.75	0.69 ± 0.15	6.34 ± 0.55
Station 3	21	8.77 ± 2.05	0.46 ± 0.07	5.46 ± 1.56
Station 3	25	8.76 ± 0.77	0.49 ± 0.05	5.61 ± 0.50
Station 3	28	9.95 ± 1.87	0.50 ± 0.14	5.30± 2.41

Tableau C.4b : Concentrations en EOX mesurées dans *A..cygnea* (moyenne ± écart type ; n=4).

	Temps d'exposition	[EOX] µg Cl.g^{-1} poids frais	[EOX] µg Cl.g^{-1} poids sec	[EOX] µg Cl.g^{-1} lipides
Témoins	0	1.03 ± 0.10	7.96 ± 0.72	157.20 ± 31.94
Station 1	14	0.84 ± 0.27	8.49 ± 2.21	173.17 ± 56.42
Station 1	28	0.96 ± 0.12	10.00 ± 2.54	195.73 ± 36.35
Station 2	4	1.44 ± 0.32	15.68 ± 2.64	288.19 ± 27.58
Station 2	7	1.75 ± 0.35	15.13 ± 4.00	291.30 ± 52.10
Station 2	11	2.17 ± 0.46	18.93 ± 3.04	324.37 ± 83.21
Station 2	14	1.76 ± 0.57	20.21 ± 5.66	390.24 ± 68.06
Station 2	18	2.16 ± 0.32	23.25 ± 6.88	418.64 ± 83.99
Station 2	21	2.60 ± 0.72	27.98 ± 8.60	460.98 ± 73.29
Station 2	25	3.04 ± 0.34	30.22± 4.96	525.36 ± 81.99
Station 2	28	3.33 ± 0.44	33.61 ± 5.50	539.64 ± 119.07
Station 3	4	1.62 ± 0.17	14.31 ± 2.81	240.30 ± 54.42
Station 3	7	1.68 ± 0.23	15.51 ± 3.75	309.21 ± 76.64
Station 3	11	1.67 ± 0.26	16.22 ± 1.21	313.81 ± 24.80
Station 3	14	1.96 ± 0.28	17.41 ± 2.55	326.88 ± 43.63
Station 3	18	2.30 ± 0.14	21.66 ± 4.59	344.17 ± 83.60
Station 3	21	1.74 ± 0.67	20.91 ± 9.68	383.52 ± 151.37
Station 3	25	2.09 ± 0.45	24.10 ± 6.11	432.38 ± 112.94
Station 3	28	2.37 ± 1.30	26.12 ± 19.41	456.61 ± 135.27

Tableau C.5 : Pourcentage de matière organique et concentrations en AOX dans les sédiments et l'eau.

	µg Cl.l^{-1}	µg.g^{-1} P.S.	% M.O.	µg Cl.g^{-1} MO
Station 1	19.1	18.9	7.08	267.1
Station 1	12.1	17.3	6.22	278.0
Station 1	19.3	20.1	5.99	335.5
Station 1	15.6	26.7	7.39	361.1
Station 1	14.6	28.6	7.40	386.6
Station 2	258.3	58.4	5.42	1078.1
Station 2	290.9	59.9	4.99	1201.2
Station 2	331.8	67.8	5.30	1278.9
Station 2	399.2	77.5	6.01	1289.8
Station 2	313.4	78.9	6.17	1278.3
Station 3	145.2	46.8	7.53	645.5
Station 3	115.5	47.3	7.24	653.4
Station 3	157.6	51.7	7.17	721.6
Station 3	115.6	68.9	8.68	793.5
Station 3	178.4	69.7	8.54	816.4

Annexe D : Chapitre VI - Etude de l'accumulation d'EOX dans différents organes de *Anodonta cygnea*

Tableau D.1 : Caractéristiques morphologiques mesurées chez *A. cygnea* (moyenne ± écart type ; n=9).

	Temps d'exposition	Longueur mm	Hauteur mm	Epaisseur mm	Poids total g	Branchies % parties molles	Gonades % parties molles	Glandes digestives % parties molles
Témoins	0	85.6 ± 6.1	51.7 ± 3.7	29.8 ± 2.0	56.7 ± 14.7	14.6 ± 3.7	12.2 ± 2.3	11.6 ± 1.9
Station 1	14	83.3 ± 2.8	49.2 ± 1.4	29.0 ± 3.6	52.5 ± 11.0	14.7 ± 2.7	16.2 ± 2.5	13.9 ± 1.6
Station 1	28	85.1 ± 4.6	51.6 ± 2.9	30.1 ± 2.3	56.7 ± 11.4	16.0 ± 2.1	15.3 ± 2.5	11.1 ± 1.4
Station 1	42	85.1 ± 4.5	48.8 ± 2.3	30.1 ± 2.9	53.1 ± 10.9	13.0 ± 3.8	16.0 ± 3.3	10.7 ± 0.7
Station 1	63	84.9 ± 5.3	50.9 ± 3.5	29.1 ± 2.0	52.5 ± 9.4	14.9 ± 2.0	14.3 ± 1.3	12.0 ± 2.2
Station 1	91	83.9 ± 4.2	49.6 ± 2.0	31.0 ± 2.5	50.0 ± 8.6	15.3 ± 3.1	13.6 ± 2.3	11.4 ± 1.3
Station 2	7	85.1 ± 5.9	50.4 ± 3.1	29.6 ± 1.9	51.3 ± 9.0	15.1 ± 2.4	16.3 ± 2.3	16.1 ± 1.8
Station 2	14	85.9 ± 6.8	51.6 ± 3.9	30.5 ± 2.9	60.4 ± 12.2	15.0 ± 4.2	15.1 ± 1.8	14.1 ± 1.9
Station 2	21	88.7 ± 3.0	51.9 ± 2.3	31.6 ± 2.6	65.2 ± 10.3	13.9 ± 1.8	15.2 ± 2.7	13.6 ± 1.5
Station 2	28	85.2 ± 4.5	49.5 ± 1.9	30.0 ± 1.8	48.7 ± 7.1	14.5 ± 2.0	14.3 ± 0.7	13.6 ± 1.1
Station 2	42	84.2 ± 4.4	50.3 ± 2.7	29.5 ± 2.5	53.8 ± 7.4	14.1 ± 1.9	14.2 ± 3.0	12.6 ± 2.0
Station 2	63	83.4 ± 3.9	49.3 ± 2.0	29.0 ± 2.1	46.7 ± 7.3	14.1 ± 1.8	15.8 ± 2.3	11.0 ± 1.6
Station 2	91	86.8 ± 5.6	50.3 ± 3.4	29.7 ± 2.8	50.3 ± 9.0	16.0 ± 2.2	12.8 ± 2.5	12.7 ± 1.9
Station 3	7	87.4 ± 5.8	49.6 ± 2.4	31.7 ± 3.0	60.9 ± 11.3	14.7 ± 1.9	15.3 ± 3.7	16.1 ± 1.4
Station 3	14	86.2 ± 5.5	50.6 ± 3.0	30.0 ± 2.3	57.4 ± 12.0	14.3 ± 1.6	14.7 ± 1.1	15.4 ± 2.1
Station 3	21	87.6 ± 6.1	51.4 ± 3.3	30.8 ± 2.4	61.8 ± 13.0	12.6 ± 1.7	15.5 ± 1.0	12.4 ± 1.5
Station 3	28	82.8 ± 11.3	50.0 ± 2.1	29.9 ± 1.8	50.1 ± 5.9	13.9 ± 1.7	14.0 ± 1.7	14.3 ± 2.7
Station 3	42	84.7 ± 5.3	50.0 ± 3.2	29.8 ± 3.0	53.0 ± 15.2	13.8 ± 2.7	15.8 ± 3.0	12.3 ± 1.5
Station 3	63	83.5 ± 3.6	49.7 ± 2.8	28.1 ± 2.5	46.7 ± 9.8	15.9 ± 2.7	15.1 ± 1.5	12.3 ± 1.4
Station 3	91	85.5 ± 4.1	50.1 ± 2.5	29.7 ± 1.6	51.2 ± 6.8	15.6 ± 1.8	14.4 ± 1.8	12.0 ± 1.8

Tableau D.2 : Paramètres physiologiques et concentrations en EOX (moyenne ± écart type ; n=3) mesurées dans les branchies de *A. cygnea*.

	Temps d'exposition	Poids sec % du poids frais	Lipides % du poids frais	Lipides % du poids sec	[EOX] µg $Cl.g^{-1}$ poids frais	[EOX] µg $Cl.g^{-1}$ poids sec	[EOX] µg $Cl.g^{-1}$ lipides
Témoins	0	19.8 ± 2.6	0.6 ± 0.1	3.2 ± 0.4	1.5 ± 0.3	7.6 ± 0.7	238.8 ± 12.5
Station 1	14	17.4 ± 2.1	0.7 ± 0.0	4.1 ± 0.7	2.0 ± 0.2	11.7 ± 2.4	287.1 ± 10.0
Station 1	28	16.1 ± 1.7	0.7 ± 0.1	4.4 ± 1.0	1.7 ± 0.2	10.8 ± 1.1	254.5 ± 59.9
Station 1	42	19.0 ± 4.0	0.8 ± 0.1	4.2 ± 0.8	2.3 ± 0.4	12.1 ± 2.6	288.3 ± 17.1
Station 1	63	15.6 ± 8.2	0.8 ± 0.0	5.6 ± 2.7	2.2 ± 0.4	15.2 ± 5.4	283.6 ± 41.1
Station 1	91	18.8 ± 2.0	1.1 ± 0.4	5.9 ± 2.2	1.9 ± 0.1	10.3 ± 0.9	198.2 ± 91.0
Station 2	7	14.0 ± 3.3	0.7 ± 0.1	5.4 ± 1.5	2.6 ± 0.2	19.5 ± 5.6	363.4 ± 12.2
Station 2	14	17.5 ± 5.5	0.8 ± 0.0	4.9 ± 2.0	3.7 ± 0.8	22.0 ± 5.8	469.9 ± 107.1
Station 2	21	15.5 ± 2.1	0.7 ± 0.0	4.5 ± 0.8	3.4 ± 0.3	22.1 ± 3.5	488.2 ± 44.4
Station 2	28	17.1 ± 5.8	0.7 ± 0.1	4.5 ± 1.3	4.2 ± 0.1	26.4 ± 7.8	595.3 ± 30.1
Station 2	42	15.0 ± 4.9	0.6 ± 0.1	4.5 ± 1.2	4.7 ± 0.9	32.9 ± 10.6	730.9 ± 34.8
Station 2	63	12.9 ± 2.0	0.8 ± 0.1	6.2 ± 1.3	5.6 ± 0.6	43.3 ± 2.4	713.3 ± 128.8
Station 2	91	17.8 ± 1.5	0.9 ± 0.1	5.0 ± 0.6	8.3 ± 0.8	46.5 ± 1.1	947.9 ± 137.5
Station 3	7	17.9 ± 5.8	0.7 ± 0.1	4.5 ± 1.7	2.6 ± 0.3	15.5 ± 6.3	345.1 ± 44.4
Station 3	14	17.2 ± 4.9	0.8 ± 0.1	4.8 ± 1.8	2.9 ± 0.4	17.5 ± 3.0	386.9 ± 93.7
Station 3	21	17.8 ± 4.4	0.8 ± 0.1	4.5 ± 0.7	3.6 ± 0.4	20.5 ± 3.0	454.8 ± 48.5
Station 3	28	15.0 ± 3.8	0.7 ± 0.1	5.1 ± 1.9	3.5 ± 0.1	24.5 ± 5.8	496.7 ± 60.2
Station 3	42	16.7 ± 2.0	0.7 ± 0.1	4.2 ± 0.4	4.3 ± 0.7	25.6 ± 1.0	619.6 ± 64.6
Station 3	63	14.5 ± 3.3	0.8 ± 0.0	5.5 ± 1.3	5.1 ± 0.6	36.4 ± 7.0	670.1 ± 48.3
Station 3	91	18.0 ± 1.1	0.6 ± 0.0	3.1 ± 0.3	6.5 ± 0.2	36.3 ± 1.7	1165.3 ± 85.8

Tableau D.3 : Paramètres physiologiques et concentrationsen EOX (moyenne ± écart type ; n=3) mesurées dans les gonades de *A. cygnea*.

	Temps d'exposition	Poids sec % du poids frais	Lipides % du poids frais	Lipides % du poids sec	[EOX] µg $Cl.g^{-1}$ poids frais	[EOX] µg $Cl.g^{-1}$ poids sec	[EOX] µg $Cl.g^{-1}$ lipides
Témoins	0	16.1 ± 2.2	0.7 ± 0.2	4.5 ± 0.8	2.1 ± 0.2	13.0 ± 2.0	298.5 ± 104.9
Station 1	14	13.6 ± 2.2	0.8 ± 0.2	6.0 ± 2.0	1.9 ± 0.3	14.8 ± 4.7	258.5 ± 81.2
Station 1	28	14.5 ± 1.1	0.8 ± 0.2	5.8 ± 1.5	1.9 ± 0.2	12.7 ± 0.7	227.3 ± 57.3
Station 1	42	13.8 ± 0.3	1.1 ± 0.3	7.7 ± 2.2	2.0 ± 0.5	14.2 ± 3.4	200.9 ± 101.8
Station 1	63	12.5 ± 2.1	0.9 ± 0.1	7.1 ± 1.3	2.1 ± 0.2	17.0 ± 1.9	240.8 ± 17.9
Station 1	91	13.7 ± 1.0	0.9 ± 0.2	6.3 ± 1.5	2.2 ± 0.4	16.5 ± 4.0	270.3 ± 71.4
Station 2	7	15.7 ± 2.0	0.7 ± 0.3	4.5 ± 1.7	2.4 ± 0.1	15.3 ± 3.0	364.7 ± 111.1
Station 2	14	14.0 ± 3.4	0.7 ± 0.1	5.6 ± 2.5	2.8 ± 0.5	21.3 ± 8.9	384.3 ± 21.2
Station 2	21	11.6 ± 1.3	0.8 ± 0.0	6.8 ± 0.9	2.7 ± 0.1	23.2 ± 3.1	341.1 ± 19.1
Station 2	28	10.8 ± 1.3	0.7 ± 0.1	6.9 ± 0.5	3.8 ± 0.2	35.9 ± 3.8	528.9 ± 98.7
Station 2	42	11.2 ± 1.2	0.7 ± 0.1	6.3 ± 1.9	4.9 ± 0.4	43.9 ± 7.7	718.2 ± 122.1
Station 2	63	12.2 ± 1.4	0.8 ± 0.2	6.9 ± 1.6	4.7 ± 0.4	39.0 ± 7.5	572.5 ± 121.7
Station 2	91	11.5 ± 1.2	0.8 ± 0.1	7.2 ± 0.5	7.4 ± 1.4	65.4 ± 16.5	912.4 ± 213.7
Station 3	7	14.4 ± 1.0	0.9 ± 0.1	6.1 ± 0.6	2.1 ± 0.3	14.9 ± 3.2	246.0 ± 61.4
Station 3	14	14.4 ± 3.3	0.7 ± 0.2	5.5 ± 2.2	2.7 ± 0.6	20.3 ± 8.1	371.2 ± 21.8
Station 3	21	16.3 ± 0.9	0.7 ± 0.1	4.5 ± 0.7	2.6 ± 0.3	16.0 ± 1.1	363.2 ± 56.2
Station 3	28	14.8 ± 1.7	0.8 ± 0.1	5.2 ± 0.3	3.5 ± 0.6	24.0 ± 6.1	461.0 ± 120.7
Station 3	42	12.5 ± 1.2	0.7 ± 0.1	5.9 ± 0.2	3.3 ± 0.4	26.5 ± 6.1	449.2 ± 90.1
Station 3	63	10.4 ± 1.7	0.7 ± 0.1	7.1 ± 1.7	4.0 ± 0.6	39.2 ± 9.2	553.7 ± 52.2
Station 3	91	12.3 ± 2.9	0.7 ± 0.0	5.9 ± 1.4	5.3 ± 1.0	45.4 ± 16.5	755.8 ± 146.0

Tableau D.4 : Paramètres physiologiques et concentrations en EOX (moyenne ± écart type ; n=3) mesurées dans les glandes digestives de *A. cygnea*.

	Temps d'exposition	Poids sec % du poids frais	Lipides % du poids frais	Lipides % du poids sec	[EOX] µg $Cl.g^{-1}$ poids frais	[EOX] µg $Cl.g^{-1}$ poids sec	[EOX] µg $Cl.g^{-1}$ lipides
Témoins	0	10.9 ± 0.5	1.2 ± 0.2	11.2 ± 1.7	2.1 ± 0.2	19.6 ± 1.3	176.2 ± 20.0
Station 1	14	11.8 ± 1.9	1.1 ± 0.1	9.5 ± 1.7	2.1 ± 0.2	17.8 ± 3.8	190.3 ± 48.4
Station 1	28	11.2 ± 0.3	1.3 ± 0.3	11.9 ± 2.6	2.5 ± 0.3	22.2 ± 2.8	188.8 ± 19.3
Station 1	42	11.9 ± 1.2	1.2 ± 0.2	10.5 ± 2.2	2.4 ± 0.3	20.6 ± 3.1	202.2 ± 58.7
Station 1	63	11.3 ± 1.3	1.3 ± 0.1	11.6 ± 2.3	2.6 ± 0.5	23.3 ± 7.2	199.2 ± 36.6
Station 1	91	13.0 ± 2.8	1.3 ± 0.2	10.1 ± 2.7	2.8 ± 0.4	22.2 ± 3.9	224.9 ± 31.0
Station 2	7	12.5 ± 0.7	1.5 ± 0.2	11.7 ± 1.8	4.1 ± 0.0	33.0 ± 1.8	285.2 ± 36.1
Station 2	14	11.2 ± 0.5	1.3 ± 0.2	11.2 ± 1.8	4.8 ± 0.1	43.0 ± 2.0	390.8 ± 49.8
Station 2	21	11.0 ± 1.3	1.3 ± 0.1	11.6 ± 1.0	7.1 ± 0.3	65.2 ± 9.4	566.0 ± 87.6
Station 2	28	9.9 ± 0.2	1.3 ± 0.1	12.8 ± 1.2	9.3 ± 0.8	94.1 ± 6.1	738.3 ± 98.8
Station 2	42	9.5 ± 1.5	1.6 ± 0.2	17.1 ± 4.5	12.9 ± 0.5	138.3 ± 23.0	829.3 ± 132.1
Station 2	63	10.8 ± 3.1	1.4 ± 0.1	13.8 ± 3.8	13.0 ± 0.8	127.7 ± 38.8	927.3 ± 113.8
Station 2	91	10.6 ± 1.1	1.5 ± 0.1	13.9 ± 2.2	15.4 ± 0.7	145.9 ± 9.3	1061.0 ± 100.2
Station 3	7	10.0 ± 0.8	1.2 ± 0.1	11.9 ± 1.7	3.1 ± 0.8	31.1 ± 10.7	256.3 ± 52.3
Station 3	14	9.8 ± 0.3	1.1 ± 0.1	11.3 ± 0.9	3.3 ± 0.2	33.7 ± 2.7	299.8 ± 32.1
Station 3	21	10.6 ± 2.7	1.0 ± 0.1	10.2 ± 2.5	3.9 ± 0.8	39.2 ± 16.0	380.3 ± 102.0
Station 3	28	10.4 ± 0.9	1.4 ± 0.2	13.6 ± 2.7	5.3 ± 0.1	51.4 ± 4.3	382.4 ± 44.5
Station 3	42	9.4 ± 0.6	1.1 ± 0.1	11.4 ± 0.8	5.7 ± 0.9	59.9 ± 6.2	528.2 ± 79.3
Station 3	63	8.6 ± 0.8	1.1 ± 0.2	13.0 ± 3.0	7.3 ± 0.1	85.3 ± 5.9	665.8 ± 105.7
Station 3	91	8.5 ± 0.7	1.1 ± 0.0	12.9 ± 1.1	8.5 ± 0.5	100.8 ± 12.8	777.5 ± 33.2

Tableau D.5 : Paramètres physiologiques et concentrations en EOX (moyenne ± écart type ; n=3) mesurées dans les restes de *A. cygnea*.

	Temps d'exposition	Poids sec % du poids frais	Lipides % du poids frais	Lipides % du poids sec	[EOX] µg $Cl.g^{-1}$ poids frais	[EOX] µg $Cl.g^{-1}$ poids sec	[EOX] µg $Cl.g^{-1}$ lipides
Témoins	0	9.7 ± 0.7	0.4 ± 0.0	4.6 ±	0.9 ± 0.2	8.9 ± 2.2	193.7 ± 41.4
Station 1	14	9.9 ± 1.1	0.5 ± 0.1	4.7 ±	1.2 ± 0.0	12.1 ± 1.5	264.7 ± 60.6
Station 1	28	9.5 ± 1.1	0.4 ± 0.1	4.4 ±	0.9 ± 0.3	9.0 ± 2.9	199.3 ± 40.7
Station 1	42	9.2 ± 1.3	0.4 ± 0.0	5.6 ±	0.7 ± 0.1	7.9 ± 2.3	170.0 ± 31.1
Station 1	63	8.6 ± 0.7	0.4 ± 0.0	4.5 ±	0.9 ± 0.1	10.4 ± 1.8	232.4 ± 44.6
Station 1	91	9.8 ± 0.5	0.4 ± 0.0	4.4 ±	1.1 ± 0.2	10.9 ± 2.3	245.0 ± 26.3
Station 2	7	11.6 ± 0.6	0.5 ± 0.1	5.6 ±	1.6 ± 0.2	13.8 ± 2.4	307.4 ± 77.9
Station 2	14	9.9 ± 1.2	0.5 ± 0.1	4.8 ±	1.6 ± 0.2	16.2 ± 1.2	352.2 ± 89.4
Station 2	21	9.0 ± 1.0	0.4 ± 0.1	4.6 ±	1.7 ± 0.2	19.5 ± 2.1	430.1 ± 97.0
Station 2	28	9.3 ± 1.3	0.5 ± 0.1	4.8 ±	2.1 ± 0.5	22.9 ± 6.3	490.8 ± 187.4
Station 2	42	7.7 ± 2.0	0.4 ± 0.1	5.5 ±	2.0 ± 0.2	27.2 ± 4.9	499.1 ± 94.5
Station 2	63	8.7 ± 0.6	0.4 ± 0.1	5.1±	2.3 ± 0.3	26.1 ± 4.9	517.3 ± 84.7
Station 2	91	9.0 ± 0.3	0.4 ± 0.1	4.5 ±	2.3 ± 0.2	25.6 ± 2.4	576.9 ± 43.7
Station 3	7	8.7 ± 1.5	0.4 ±0.1	4.7 ±	1.0 ± 0.0	12.1 ± 1.9	264.5 ± 83.6
Station 3	14	9.4 ± 0.4	0.4 ± 0.0	4.6 ±	1.2 ± 0.1	12.6 ± 1.3	272.6 ±17.2
Station 3	21	9.8 ± 0.6	0.5 ± 0.1	4.8 ±	1.4 ± 0.1	14.1 ± 1.7	299.1 ± 59.5
Station 3	28	10.9 ± 0.8	0.5 ± 0.1	4.8 ±	1.6 ± 0.3	15.2 ± 3.3	323.6 ± 97.2
Station 3	42	10.2 ± 1.0	0.5 ± 0.1	4.8 ±	1.7 ± 0.1	16.8 ± 2.1	348.4 ± 28.4
Station 3	63	10.1 ± 1.2	0.5 ± 0.1	5.0 ±	1.9 ± 0.2	19.5 ± 3.2	391.7 ± 59.2
Station 3	91	9.0 ± 0.2	0.5 ± 0.1	5.1 ±	2.0 ± 0.4	22.2 ± 3.8	432.3 ± 50.9

Tableau D.6 : Paramètres physiologiques et concentrations en EOX (moyenne ± écart type ; n=3) recalculés pour les individus entiers de *A. cygnea*.

	Temps d'exposition	Poids sec % du poids frais	Lipides % du poids frais	Lipides % du poids sec	[EOX] µg $Cl.g^{-1}$ poids frais	[EOX] µg $Cl.g^{-1}$ poids sec	[EOX] µg $Cl.g^{-1}$ lipides
Témoins	0	12.1 ± 0.8	0.6 ± 0.0	4.9 ± 0.3	1.2 ± 0.1	10.3 ± 1.6	208.8 ± 23.3
Station 1	14	11.9 ± 1.5	0.6 ± 0.1	5.4 ± 0.4	1.5 ± 0.1	13.2 ± 2.0	246.0 ± 47.8
Station 1	28	11.5 ± 0.4	0.6 ± 0.0	5.5 ± 0.5	1.3 ± 0.2	11.5 ± 1.5	210.2 ± 29.4
Station 1	42	11.5 ± 1.2	0.7 ± 0.0	5.8 ± 0.8	1.3 ± 0.1	11.3 ± 1.7	196.4 ± 12.5
Station 1	63	9.7 ± 2.1	0.6 ± 0.1	6.1 ± 0.6	1.3 ± 0.1	14.2 ± 2.2	231.9 ± 21.5
Station 1	91	12.1 ± 0.6	0.7 ± 0.1	5.7 ± 1.3	1.6 ± 0.1	12.9 ± 1.7	228.4 ± 31.8
Station 2	7	12.8 ± 1.1	0.7 ± 0.1	5.8 ± 0.8	2.3 ± 0.2	18.0 ± 2.7	310.1 ± 18.8
Station 2	14	11.9 ± 0.4	0.7 ± 0.1	5.6± 0.9	2.5 ± 0.1	21.4 ± 1.9	387.1 ± 30.6
Station 2	21	10.6 ± 0.8	0.6 ± 0.1	5.9 ± 0.4	2.8 ± 0.1	26.8 ± 2.1	455.9 ± 57.7
Station 2	28	10.7 ± 1.5	0.6 ± 0.1	6.0 ± 0.4	3.6 ± 0.4	34.4 ± 6.7	578.0 ± 113.5
Station 2	42	9.5 ± 1.7	0.6 ± 0.1	6.8 ± 1.0	4.2 ± 0.2	45.3 ± 8.5	659.8 ± 31.9
Station 2	63	10.1 ± 0.6	0.7 ± 0.1	6.5 ± 0.9	4.3 ± 0.3	42.6 ± 5.2	658.2 ± 94.6
Station 2	91	10.9 ± 0.2	0.7 ± 0.1	6.1 ± 0.5	5.5 ± 0.2	50.6 ± 2.2	834.5 ± 57.6
Station 3	7	11.1 ± 0.3	0.7 ± 0.1	6.0 ± 0.7	1.8 ± 0.2	15.9 ± 2.1	264.5 ± 18.6
Station 3	14	11.3 ± 1.1	0.6 ± 0.0	5.6 ± 0.7	2.0 ± 0.1	17.6 ± 2.3	314.3 ± 8.0
Station 3	21	11.9 ± 0.3	0.6 ± 0.1	5.2 ± 0.6	2.2 ± 0.2	18.1 ± 1.2	351.3 ± 58.8
Station 3	28	11.9 ± 1.2	0.7 ± 0.0	6.0 ± 0.6	2.7 ± 0.2	22.6 ± 3.8	378.3 ± 47.8
Station 3	42	11.3 ± 0.8	0.6 ± 0.0	5.5 ± 0.4	2.8 ± 0.1	24.6 ± 2.5	442.5 ± 22.6
Station 3	63	10.2 ± 1.1	0.6 ± 0.1	5.9 ± 0.5	3.1 ± 0.4	30.1 ± 0.3	516.3 ± 37.6
Station 3	91	10.8 ± 0.4	0.6 ± 0.0	5.4 ± 0.2	4.0 ± 0.1	36.6 ± 1.7	675.0 ± 20.7

Annexe E : Chapitre VII

Etude du relarguage d'EOX par *Anodonta cygnea*

Tableau E.1 : Caractéristiques morphologiques mesurées chez *A. cygnea* (moyenne ± écart type ; n=4).

Temps d'exposition	Longeur mm	Hauteur mm	Epaisseur mm	Poids total g	Parties molles g
0	75.75 ± 2.34	44.72 ± 2.34	25.25 ± 1.05	39.86 ± 7.03	11.33 ± 2.84
3	70.97 ± 2.82	41.23 ± 1.70	23.88 ± 1.70	32.18 ± 6.74	8.53 ± 2.29
7	73.13 ± 1.55	43.99 ± 2.72	26.79 ± 1.51	41.96 ± 5.76	9.17 ± 0.57
14	73.85 ± 1.52	44.44 ± 2.96	25.22 ± 1.43	40.79 ± 5.27	10.93 ± 3.02
28	71.49 ± 4.32	41.58 ± 1.45	24.29 ± 2.80	34.31 ± 8.55	9.54 ± 3.74
42	73.64 ± 2.11	44.83 ± 1.94	26.13 ± 1.57	42.98 ± 7.40	12.06 ± 3.73

Tableau E.2 : Paramètres physiologiques mesurés dans *A. cygnea* (moyenne ± écart type ; n=4).

Temps d'exposition	Poids sec % du poids frais	Lipides % du poids frais	Lipides % du poids sec
0	9.17 ± 0.63	0.33 ± 0.02	3.61 ± 0.22
3	9.88 ± 0.59	0.41 ± 0.04	4.11 ± 0.39
7	10.16 ± 0.65	0.46 ± 0.04	4.51 ± .18
14	10.47 ± 1.19	0.47 ± 0.06	4.49 ± 0.28
28	11.05 ± 0.33	0.50 ± 0.07	4.51 ± 0.58
42	11.50 ± 0.53	0.59 ± 0.08	5.08 ± 0.55

Tableau E.3 : Concentrations en EOX mesurées dans *A. cygnea* (moyenne ± écart type ; n=4).

Temps d'exposition	[EOX] µg $Cl.g^{-1}$ poids frais	[EOX] µg $Cl.g^{-1}$ poids sec	[EOX] µg $Cl.g^{-1}$ lipides
0	8.9 ± 1.2	97.0 ± 9.1	2689.4 ± 284.5
3	7.2 ± 0.9	73.3 ± 12.1	1787.9 ± 279.1
7	5.1 ± 0.9	50.7 ± 8.4	1131.2 ± 230.0
14	4.3 ± 0.3	41.8 ± 7.0	930.9 ± 141.0
28	2.5 ± 0.6	23.1 ± 6.1	522.7 ± 166.7
42	2.5 ± 0.7	21.6 ± 6.2	427.2 ± 117.7

Title : Estimation of the contamination of the aquatic environment by halogenated organic compounds (AOX and EOX).

Application to the study of accumulation and release of EOX by *Anodonta cygnea* L., exposed *in situ* to pulp and paper mill effluents.

Abstract

Halogenated organic compounds are more widespread in the environment than previously assumed, and originated either from natural and antropogenic sources. The use of the sum parameters AOX (adsorbable organic halogens) and EOX (extractable organic halogens), allows to palliate the analytical problems of individual identification of those compounds, among which a great majority is still unknown, and enables also their quantification in the different compartments of the aquatic environment : water, sediments and organisms.

The study of four water courses has permitted to bring to the fore, and to confirm, the existence of several sources of organic halogenated compounds in the water and the sediments of North-Eastern France. Among them, a chlorine bleaching pulp and paper mill is distinguished, and characterised by chronic emissions and high AOX concentration in the water and the sediments of the receiving medium.

In order the account the effects of such effluents on organisms, and to quantify the bioavailable fraction of micropollutants, four species of aquatic molluscs, *Anodonta cygnea* L. (bivalve *unionidae*), *Unio pictorum* L. (bivalve *unionidae*), *Dreissena polymorpha* P. (bivalve *dreissenidae*) et *Viviparus viviparus* L. (gastropod *viviparidae*), were transferred and exposed up and down stream of the mill. The swan mussel, *Anodonta cygnea* L., has been retained as biological indicator for several reasons : its good resistance to the effluents ; its large size allowing studies on individual organisms and organs ; its high accumulation rate of halogenated organics.

The accumulation and the release of these micropollutants by the mussel differ according to the considered organ, and depend on the physico-chemical characteristics of the organic halogenated compounds present in the effluent.

Keywords : organic halogenated compounds - AOX - EOX - biological indicator - accumulation - *Anodonta cygnea* - sediments - pulp and paper mill.

Pergamon

0045-6535(95)00364-X

Chemosphere, Vol. 32, No. 4, pp. 791–803, 1996
Copyright © 1996 Elsevier Science Ltd
Printed in Great Britain. All rights reserved
0045-6535/96 $15.00+0.00

ACCUMULATION OF EXTRACTABLE ORGANIC HALOGENS (EOX) BY THE FRESHWATER MUSSEL, *Anodonta cygnea* L., EXPOSED TO CHLORINE BLEACHED PULP AND PAPER MILL EFFLUENTS

Frank HAYER* & Jean Claude PIHAN

Equipe de recherche en Ecotoxicologie, Centre de Recherches Ecologiques, Université de Metz
B.P. 4116, 57040 Metz Cedex 01, France.

(Received in USA 11 August 1995; accepted 11 October 1995)

ABSTRACT

Freshwater mussels, *Anodonta cygnea* L., were collected in a lowly polluted area in north-eastern France, and exposed during 28 days at three sites up and downstream of a chlorine bleached pulp and paper mill effluent. Water, sediment and mussel samples were collected at regular intervals and analyzed for halogenated organic residues using the sum parameters AOX (Adsorbable Organic Halogen) and EOX (Extractable Organic Halogen). The survey of the water showed a chronic contamination by organic halogens of the water and the sediment downstream of the pulp and paper mill sewer. Mussels exposed upstream of the mill showed no significant variation of their EOX tissue concentration. In contrast, progressive accumulation of EOX occurred with the exposure time in mussels exposed downstream of the mill. No steady state of the EOX concentration was observed after four weeks of exposure.

Key words : *Anodonta cygnea*, AOX, EOX, bioaccumulation, pulp and paper mill effluents.

INTRODUCTION

Although naturally produced organo-halogens take a growing part in the estimation of environmental contamination (Asplund & Grimwall, 1991 ; Gribble, 1994), the anthropogenic contribution remains predominant in industrialized areas. The organohalogen sources include industrial discharge, combustion processes, manufacture

Pergamon

Chemosphere, Vol. 33, No. 11, pp. 2321–2334, 1996
Copyright © 1996 Elsevier Science Ltd
Printed in Great Britain. All rights reserved
0045-6535/96 $15.00+0.00

PII: S0045-6535(96)00323-2

MONITORING OF EXTRACTABLE ORGANIC HALOGENS (EOX) IN CHLORINE BLEACHED PULP AND PAPER MILL EFFLUENTS USING FOUR SPECIES OF TRANSPLANTED AQUATIC MOLLUSKS

Frank HAYER*, Philippe WAGNER & Jean Claude PIHAN

Equipe de recherche en Ecotoxicologie, Centre de Recherches Ecologiques, Université de Metz
B.P. 4116, 57040 Metz Cedex 01, France.

(Received in USA 28 June 1996; accepted 3 August 1996)

ABSTRACT

Four species of aquatic mollusks, three bivalves : *Anodonta cygnea*, *Unio pictorum* and *Dreissena polymorpha*, and one gastropod : *Viviparus viviparus* were collected in a lowly polluted area and transferred to three monitoring sites, one upstream and two downstream of a chlorine bleached pulp and paper mill effluent. During the 28 days of the experiment, water, sediment and mollusks were sampled at regular intervals and analyzed for organo-halogenated residues using the sum parameters AOX and EOX. AOX concentrations in the water of the downstream sites were subjected to daily fluctuations due to the mill activity, while they remained stable in the sediments. The EOX concentrations in the mollusks exposed at the upstream site remained steady during the 28 days of exposure. Downstream, the EOX concentrations at both sites increased regularly in the four species of mollusks. Copyright © 1996 Elsevier Science Ltd

Key words : pulp and paper mill effluents, AOX, EOX, bioaccumulation, *Anodonta cygnea*, *Unio pictorum*, *Dreissena polymorpha*, *Viviparus viviparus*.

INTRODUCTION

Organohalogenated compounds enter the aquatic environment by two sources : natural and anthropogenic. Although natural production seems to take a growing importance in the estimation of the environmental contamination by organohalogens [1], the anthropogenic contribution remains predominant in industrialized areas. There is a growing concern about the release of these anthropogenic compounds into the aquatic environment, since many of them are toxic and may show considerable resistance to biological and chemical degradation [2]. Anthropogenic sources include the manufacture and the use of pesticides and solvents, the combustion of waste material and the chlorine bleaching of pulp. The last has been considered

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE METZ

Auteur : Frank HAYER
Année : 1997

Titre : 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.

Résumé

Les composés organo-halogénés sont, contrairement à ce que l'on a souvent pensé, ubiquistes dans l'environnement, et leurs origines diverses sont aussi bien naturelles qu'anthropiques. L'utilisation des paramètres de groupe AOX (composés organo-halogénés adsorbables) et EOX (composés organo-halogénés extractibles) permet de palier les problèmes analytiques de l'identification individuelle de ces composés, dont une grande majorité reste inconnue de nos jours, et de les quantifier dans les différents compartiments de l'écosystème aquatique : eau, sédiments et organismes.

L'étude de quatre cours d'eau a permis de mettre en évidence et de confirmer l'existence de multiples sources de composés organo-halogénés dans l'eau et les sédiments du Nord-Est de la France. Parmi celles-ci, une usine de pâte à papier blanchissant au chlore se distingue des autres, et se caractérise par des rejets chroniques et des concentrations élevées en AOX dans l'eau et les sédiments du milieu récepteur.

Afin de rendre compte des effets de tels effluents sur les organismes, et de quantifier la fraction de micropolluants biodisponibles, quatre espèces de mollusques aquatiques, *Anodonta cygnea* L. (bivalve *unionidae*), *Unio pictorum* L. (bivalve *unionidae*), *Dreissena polymorpha* P. (bivalve *dreissenidae*) et *Viviparus viviparus* L. (gastéropode *viviparidae*) ont été transférés et exposés en amont et en aval des rejets de l'usine. L'anodonte, *Anodonta cygnea* L., a été retenu comme indicateur biologique pour plusieurs raisons : sa bonne résistance aux effluents ; sa taille suffisamment grande pour permettre l'étude sur des organismes individuels et des organes ; son taux élevé d'accumulation de composés organo-halogénés.

L'accumulation et le relargage de ces micropolluants par l'anodonte se font de manière différente selon les organes considérés, et dépendent des propriétés physico-chimiques des composés organo-halogénés présents dans l'effluent.

Mots clés : composés organo-halogénés - AOX - EOX - indicateurs biologiques - accumulation - *Anodonta cygnea* - sédiments - usine de pâte à papier.