Université de Montpellier & Montpellier SupAgro
Master Mention " *Biodiversité, Ecologie, Evolution, B2E* "

Parcours « EcoSystèmeS »

Projet de Recherche :

Contamination plasmatique chez la cistude d'Europe dans une zone humide méditerranéenne

Par
Burkart Louisiane
Stage de M2

Réalisé sous la direction de

Marion Vittecoq et Anthony Olivier (Chargée de recherche et Garde-technicien), Aurélie Goutte (Maître de conférences) et Olivier Lourdais (Chargé de recherche)

Tour du Valat | UMR 7619 METIS | UMR 7372 CEBC
Département Espèces – Tour du Valat
Tutelles : Universités de La Rochelle et de la Sorbonne | EPHE | CNRS

Remerciements

Tout d'abord j'aimerais remercier chaleureusement mes encadrants de stage pour m'avoir permis de faire ce stage incroyable et pour m'avoir conseillé et formé durant toutes les étapes de ce projet. Un grand merci à Aurélie Goutte pour m'avoir accueilli à Paris dans les locaux de l'UMR METIS, de m'avoir fait confiance sur la préparation des échantillons au laboratoire et pour m'avoir guidé dans les analyses statistiques. Je remercie Anthony pour m'avoir accueilli à la Tour du Valat, pour ta bonne humeur ainsi que pour m'avoir fait découvrir la Camargue, les cistudes, les serpents et le magnifique pick-up de terrain. Merci à Olivier Lourdais pour tes conseils avisés et pour la formation « prise de sang ». Je remercie également Marion Vittecoq pour son aide lors de la rédaction de mon rapport et pour son implication dans mon stage malgré que l'on ne se soit vu que très rarement.

Je remercie Hélène Blanchoud pour m'avoir permis d'occuper son bureau, pour les discussions toutes plus intéressantes les unes que les autres qu'on a pu avoir et pour sa jovialité.

Merci à Fabrice pour m'avoir énormément aidé à propos des analyses de laboratoire, pour avoir réalisé les quantifications de mes résultats et pour m'avoir fait goûter des dattes venant d'Oman.

Un très grand merci à Annie ! Pour toutes tes explications sur le protocole de laboratoire, pour ta gaieté, pour nous avoir permis d'écouter Nostalgie pendant qu'on faisait la vaisselle et pour avoir supervisé mon travail de paillasse.

Merci également à Etienne, pour m'avoir supporté pendant 3 mois, m'avoir fait découvrir les coins sympas de Jussieu (et les boules coco !). Je remercie Diane et Noëlie pour avoir partagées avec moi le labo et pour l'avoir animé par leur présence studieuse.

A tous les résidents de la Florentine (Cédric, Éléa, Claire, Mendi, Sam, Federico, Illaria, Oscar, Baptiste, Valentina) : mille mercis pour m'avoir accueilli à Villejuif dans cette super colloc, pour les soirées jeux, l'escalade, les repas improvisés et tout le reste. Vous êtes des gens géniaux, ne changez rien.

Merci à la Fondation de la Tour du Valat pour m'avoir permis de réaliser une partie de mon stage dans un cadre magnifique et convivial.

Merci à Olivier Pineau pour m'avoir emmené faire des balades à cheval, pour toutes les discussions naturalistes, ton humour, pour m'avoir montré les glaréoles, pour les « médicaments » et les gâteaux délicieux que tu nous apportes chaque mercredi soir.

Merci à Clément Le Gac et à Nicolas Martin sans qui mon stage n'aurait pas eu lieu, pour avoir réalisé tous les prélèvements en 2018.

Merci à Carole Leray pour me suivre dans ce projet et pour m'avoir relayé (même si ce n'était pas très souvent) pour les prises de sang pendant la rédaction de mon rapport. Merci à Aésane Meric pour ton implication dans les captures, pour ton efficacité sur le terrain et pour m'avoir supportée au bureau. Il en est de même pour Manon pour m'avoir aidé en statistique et, particulièrement, merci à Flo pour m'avoir fait du riz au lait le soir où je suis arrivée dans le sud après être tombée en panne sur l'autoroute, 2 fois (et pour tout le reste). Merci à Ben pour t'être improvisé « Coach de vie ».

Un énorme merci à tous les stagiaires et services civiques de la Tour. Je vous remercie pour les repas communs, la plage, les soirées dansantes ou cinéma, les fous rires, pour l'ambiance incroyable et la solidarité que vous dégagez.

Pour finir merci à Adrien, pour avoir supporté mon absence et pour être resté patient malgré la distance.

Résumé

La dégradation des zones humides et l'incidence sur les organismes sont des sujets d'actualité car il s'agit d'écosystèmes menacés subissant de multiples pressions anthropiques. Pour déterminer les niveaux de contamination et l'exposition actuelle des organismes, cette étude propose d'étudier la contamination plasmatique d'une espèce « sentinelle » en Camargue, la cistude d'Europe, par les polluants organiques persistants (POPs) historiques (polychlorobiphényles et pesticides organochlorés) et au N,N-Diéthyl-méta-toluamide (DEET), une substance actuellement utilisée dans les répulsifs anti-moustiques. Nous avons examiné si la concentration et l'occurrence des polluants dans le plasma dépendent des caractéristiques des tortues (sexe, âge, stade croissance), de la période d'échantillonnage et du site de capture. Des prises de sang sont réalisées chez des tortues issues de populations suivies depuis plus de 20 ans au sein de la Réserve Naturelle de la Tour du Valat. Les dosages de polluants sont faits dans des extraits purifiés de plasma à l'aide d'une chromatographie en phase gazeuse et spectrométrie de masse en tandem. Nous observons une différence significative de contamination entre les sites de capture et une corrélation négative de la concentration générale avec l'âge. On ne détecte globalement pas de différence entre mâles et femelles. Les POPs sont retrouvés à l'état de trace et, pour la plupart, en dessous des limites de quantification. Seul le DEET atteint des concentrations élevées (535 ng/mL). Au vu de ces résultats, les prospections de la contamination du plasma des cistudes devraient approfondir la piste du DEET et se concentrer sur des pesticides actuellement utilisés.

Mots clés : Camargue, *Emys orbicularis*, plasma, POPs, DEET, caractéristiques individuelles.

The degradation of wetlands and the incidence on organisms are topical issues because wetlands are threatened ecosystems affected by multiple anthropic pressures. To determine the contamination levels and the current exposition of organisms, this study proposes to study the plasmatic contamination of a "sentinel" specie in Camargue, the European pond turtle, by historic persistent organic pollutants (POP) (polychlorobiphenyls and organochlorine pesticides) and by N,N-Diéthyl-méta-toluamide (DEET), a substance currently used in mosquito repellents. We examined if the concentration and the occurrence of pollutants in plasma depends on turtles' characteristics (gender, age, growth stage), the sampling period and the capture site. Blood samples taken on turtles coming from populations followed for more than 20 years within the Natural Reserve of the Tour du Valat. The dosages of pollutants made in purified plasma extracts obtained by gas chromatography and tandem mass spectrometry. We observe a significant difference of contamination between capture sites and a negative correlation of the global concentration with the age. Difference between male and female is not globally detected. The POP are found as traces and, mostly, under the limits of quantification. Only the DEET reaches high concentrations (535 ng/mL). Following these results, researches of contamination of the turtles' plasma should explore DEET issues and should focus on currently used pesticides.

Keywords: Camargue, *Emys orbicularis*, plasma, POPs, DEET, individual characteristics.

Table des matières

Introduction 1

Matériel et méthodes 3

Les sites 3

Captures et prélèvements : méthode d'échantillonnage 3

Analyses de chimie analytique : dosage des contaminants plasmatiques 4

« Dopage » 4

Extraction liquide/liquide 5

Purification-extraction en phase solide (SPE) 5

Mise en flacons..... 5

Chromatographie en phase gazeuse et spectrométrie de masse en tandem 5

Analyses statistiques 6

Résultats 7

Analyses descriptives du jeu de données 7

Corrélation entre variables explicatives 8

Analyses statistiques des données d'occurrence des contaminants en fonction du site, de la date de prélèvement, du sexe, de l'âge et du stade de croissance des tortues..... 8

Analyses statistiques des données de concentration en fonction du site, de la date de prélèvement, du sexe, de l'âge et du stade de croissance des tortues..... 8

Discussion 9

Conclusion 12

Bibliographie .....

Annexes .....

1. Introduction

La dégradation de la qualité de l'eau due à l'intensification des activités humaines est au cœur des préoccupations des politiques publiques en Europe (EEA, 2019). Les niveaux de concentrations des contaminants résultent à la fois de la nature et l'intensité des activités humaines (agricoles ou industrielles par exemple), les habitats et les régimes hydrologiques (drainage, débit, matière en suspension, etc.) mais également les caractéristiques de ces contaminations multiples (substance volatile, polaire, biodégradable, rémanence etc.). Les impacts des contaminants sur les communautés animales restent encore très largement méconnus et leurs études se limitent souvent à des évaluations de niveau de contamination ou des tests expérimentaux concernant peu de taxons (Relyea, 2005). Il est pourtant indispensable d'évaluer ces effets en particulier sur les espèces bioindicatrices des zones humides. Les organismes situés en fin de chaîne alimentaire représentent des intégrateurs des processus sous-jacents (actions « bottom-up ») et les structurent par leur rôle de prédateurs (« top-down »). Ainsi les espèces prédatrices et longévives exploitent des habitats souvent variés, présentent des niveaux de contamination parfois élevés, en raison d'un mécanisme de bioamplification trophique pour les polluants persistants, et vont jouer un rôle de sentinelle de l'état des milieux (Rowe, 2008). Evaluer la dynamique des contaminants selon les expositions sur les individus en milieu naturel et comprendre les différences interindividuelles d'imprégnation est difficile. Les études en ce sens restent rares (Goutte *et al.*, 2014 ; Slimani *et al.*, 2018). Cette étape est pourtant essentielle pour obtenir une image représentative des organismes intégrés à leur contexte écologique naturel et pour préserver la biodiversité, mais aussi les services écosystémiques qui y sont associés.

Les zones humides méditerranéennes constituent des réservoirs de biodiversité mais sont fortement impactées par les activités humaines et sont exposées à des cocktails de substances toxiques (Cheiron *et al.*, 2018). Dans ce contexte, la Camargue est une zone humide d'importance internationale au titre de la convention de RAMSAR. En Camargue, la contamination des masses d'eau (canaux d'irrigation, de drainage et marais) par les rejets agricoles, industriels et urbains est désormais bien connue (Comoretto *et al.*, 2007). De par sa situation géographique, cette zone humide reçoit les polluants charriés par le Rhône notamment des polluants organiques persistants (POPs), tels que les pesticides organochlorés et des polychlorobiphényles (PCB) comme le PCB 180 qui se déverse à l'embouchure du Rhône à hauteur de 14 kg/an (Poulier *et al.*, 2019). Ces POPs sont interdits depuis plusieurs décennies, mais ils sont rémanents dans l'environnement (dû à un faible potentiel de biodégradation), se bioaccumulent dans les organismes vivants et sont toxiques (Jones & de Voogt, 1999). La contamination provient également des rejets industriels provenant des industries du Grand Port Maritime de Marseille, implanté dans le Golfe de Fos en Camargue orientale. À cela s'ajoute l'utilisation de biocides d'origine agricole (herbicides sur les cultures conventionnelles de riz ou encore de blé) et d'origine domestique (produits de soins personnels déversés dans le milieu en sortie de station d'épuration). C'est le cas, par exemple, du N,N-Diéthyl-méta-toluamide (DEET) utilisé en tant qu'insectifuge topique contre les moustiques (Aronson *et al.*, 2012 ; Weeks *et al.*, 2012). Les niveaux de polluants ont été principalement quantifiés sur des oiseaux (Berny *et al.*, 2002) et l'ichtyofaune, confirmant l'accumulation de composés organochlorés (pesticides organochlorés notamment) et de PCB (Roche *et al.*, 2002 ; Roche *et al.*, 2003 ; Oliveira Ribeiro *et al.*, 2008). Les reptiles demeurent actuellement peu étudiés en écotoxicologie alors qu'ils peuvent apporter des informations sur la contamination des milieux et son impact sur les individus notamment chez des espèces longévives (Campbell & Campbell, 2002 ; EL Hassani *et al.*, 2019 ; Gaus *et al.*, 2019) et en raison de leur faible capacité de dispersion (Ming-ch'eng Adams *et al.*, 2016). Certaines espèces de reptiles sont plus exposées notamment les espèces présentes dans les habitats anthropisés des régions méditerranéennes et en particulier les tortues (Wagner *et al.*, 2015).

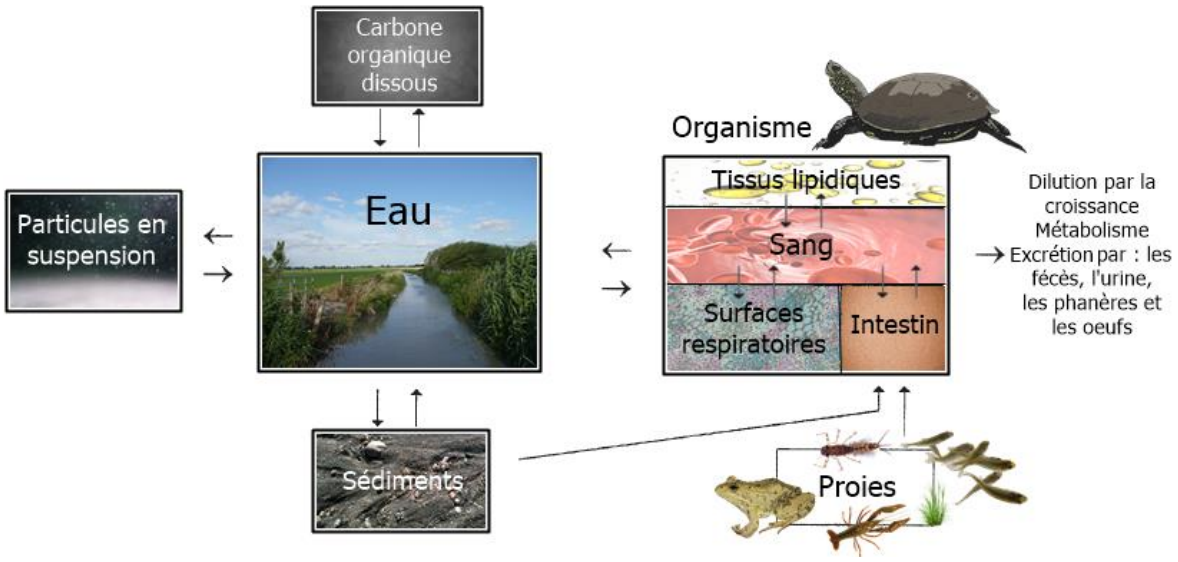


Figure 1 *Sources de contaminants et circulations possibles entre les différents compartiments concernant les cistudes d'Europe (inspirée de Arts & Wainman, 1999).*

De plus, les chéloniens atteignant tardivement leur maturité sexuelle sont exposés aux effets néfastes (à long terme) de l'utilisation de polluants sur les individus de manière plus importante au niveau de la population par rapport aux espèces atteignant leur maturité sexuelle plus rapidement (Pianka, 1970).

Dans ce contexte, le projet de recherche auquel se rattache ce stage propose d'étudier les niveaux de polluants et leurs effets chez la Cistude d'Europe, *Emys orbicularis*. Cette espèce de tortue d'eau douce longévive (espérance de vie > 40-60 ans) opportunistes, prédatrice et charognarde (Ficetola & De Bernardi, 2006) fait face à un déclin important du fait de multiples pressions anthropiques. En effet ce chélonien serait le reptile enregistrant la plus forte régression en Europe entre 1970 et 1990 (Podloucky, 1997).

Le milieu de vie aquatique et la ponte dans un milieu terrestre exposent doublement les cistudes aux altérations du milieu (Olivier, 2002 ; Olivier *et al.*, 2008) rendant cette espèce d'autant plus intéressante en tant que « sentinelle » du milieu observé. Elle est déjà utilisée comme bioindicateur des milieux vis à vis des pollutions par les éléments traces métalliques (Namroodi *et al.*, 2017 ; Guillot *et al.*, 2018 ; Beau *et al.*, 2019) qui sont les principaux polluants étudiés dans le sang, les griffes et les écailles des reptiles. La cistude fait l'objet d'un suivi par capture-marquage-recapture (CMR) en continu depuis plus de 20 ans en Camargue (Olivier *et al.*, 2010 ; Ficheux *et al.*, 2014 ; Arsovski *et al.*, 2018). Dans ce cadre, près de 1300 individus sont suivis (âge et histoire de vie connus) par la Tour du Valat au sein de sa Réserve Naturelle Régionale en Camargue dans différents types d'habitats aquatiques, mais aucune étude n'a encore évalué les niveaux de polluants et les conséquences potentielles sur ces populations (Thienpont, 2017). Cette prospection écotoxicologique s'appuiera étroitement sur ce suivi de populations.

La Camargue est une mosaïque de zones humides dont les différentes composantes reçoivent différents cocktails de contaminants selon les apports hydrauliques : les précipitations, la nappe phréatique, le Rhône ou les eaux ayant circulées dans les parcelles agricoles traitées. Le projet se base ainsi sur la comparaison de deux noyaux de population de cistudes vivant dans des habitats (canaux de drainage de parcelles agricoles/d'eau pompée directement dans le Rhône) qui diffèrent par leur exposition aux contaminants organiques historiques et persistants : polychlorobiphényles (PCB) et pesticides organochlorés. Ces polluants sont toxiques et susceptibles d'avoir des effets négatifs sur la santé des tortues, notamment en provoquant des atteintes hépatocellulaires (Keller, Kucklick, Stamper, *et al.*, 2004), en altérant leur immunité (Keller *et al.*, 2006 ; Yu *et al.*, 2012), en causant des déformations et une mortalité juvénile plus élevée (Ming-ch'eng Adams *et al.*, 2016) et en provoquant des pathologies (Orós *et al.*, 2013). La toxicité du DEET dans les écosystèmes aquatiques, quant à elle, est très peu documentée, et cette molécule n'est pas systématiquement recherchée dans les analyses d'eau, pourtant elle peut être détectée à des concentrations élevées dans les eaux usées et de surface en été (Aronson *et al.*, 2012 ; Weeks *et al.*, 2012). Cette molécule mobile se dégrade de manière modérée à rapide (demi-vie mesurée en jours ou en semaines) (Costanzo *et al.*, 2007 ; Weeks *et al.*, 2012). L'assimilation de contaminants par les organismes aquatiques peut être directe au contact des compartiments environnementaux (surface respiratoire, diffusion cutanée, ingestion de particules) et indirecte (voie trophique) (***Figure 1***). Les PCB et les pesticides organochlorés peuvent se bioaccumuler avec l'âge des organismes en raison de leur hydrophobicité et de leur faible taux de conversion métabolique (Vives *et al.*, 2005). De plus, les concentrations circulantes de contaminants peuvent changer dans le temps, notamment en période de jeûne durant laquelle le métabolisme lipidique élevé provoque une augmentation des concentrations (Bustnes *et al.*, 2012). D'autres caractéristiques telles que le sexe peuvent influencer la contamination. Il est souvent observé une plus forte contamination par les POPs chez les mâles par rapport aux femelles (Bangma *et al.*, 2019), probablement en raison d'un transfert de polluants de la mère aux œufs (Moss *et al.*, 2009).

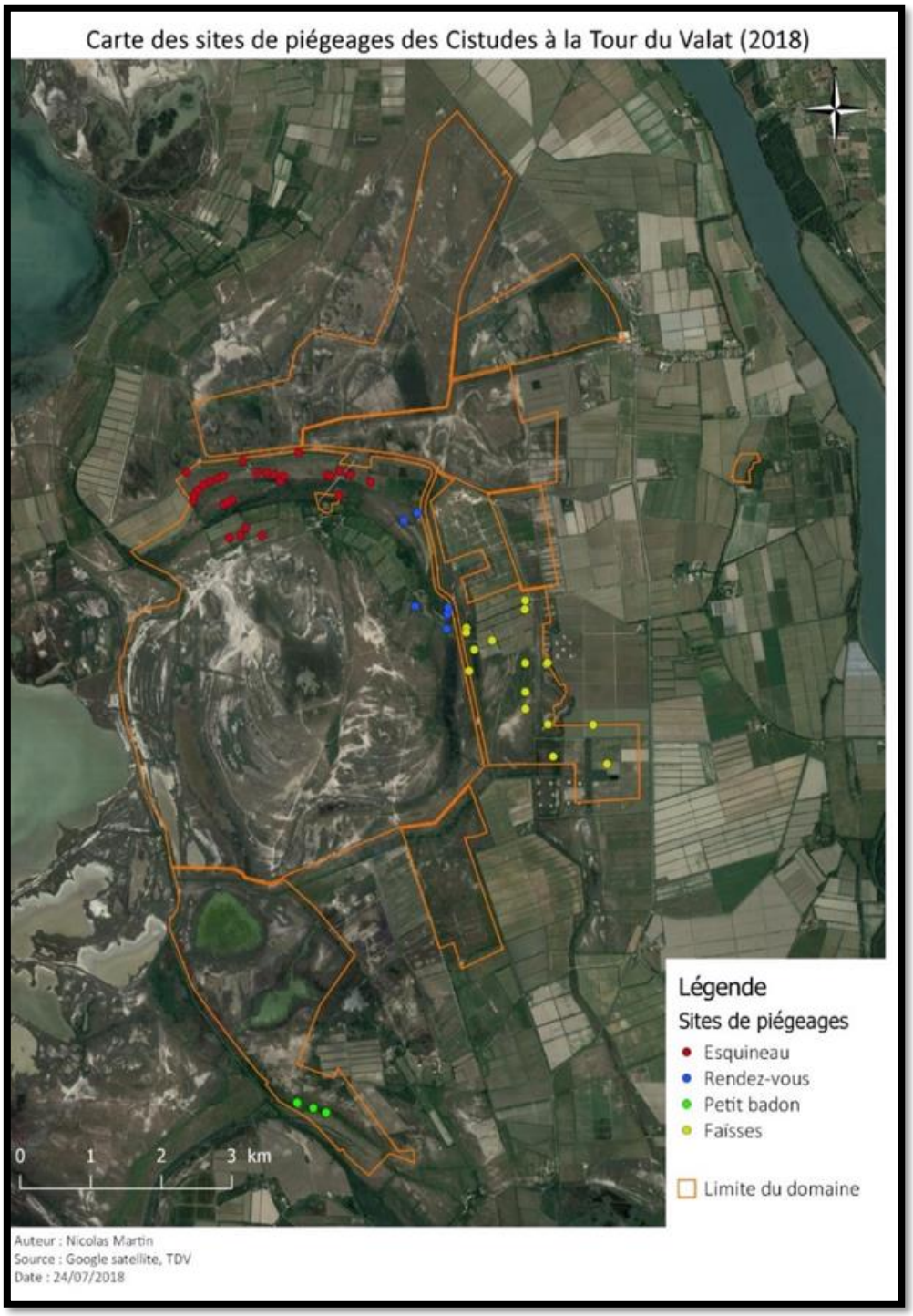


Figure 2 *Carte de la répartition des zones de piégeage des cistudes. Les populations qui concernent cette étude sont celles des Faïsses (en jaune) exposées aux polluants par le fait qu'elles soient au contact des eaux de drainage de parcelles agricoles, et la population de l'Esquineau (en rouge) en contact avec les eaux des canaux d'irrigations pompées depuis le Rhône.*

L'objectif principal de cette étude est d'étudier pour la première fois chez cette espèce les niveaux des PCB, pesticides organochlorés et du DEET chez des cistudes issues de deux noyaux de population, et notamment d'évaluer l'effet de l'habitat, de l'âge et du sexe sur les teneurs plasmatiques en polluants. Nous souhaitons investiguer les prédictions suivantes :

(1) des niveaux de POPs plus élevés chez les individus les plus âgés, en raison des processus de bioaccumulation, mais pas d'effet de l'âge sur le DEET, en raison de sa biodégradation ;

(2) des niveaux de contamination plus élevés chez les individus issus des zones les plus polluées. Les deux noyaux de populations seraient exposés de façons différentes aux polluants : (i) on attend des niveaux de POP et de DEET plus élevés à Esquineau, car le site est alimenté directement par le Rhône, tandis que celui des Faïsses reçoit des eaux de drainage de parcelles agricoles ; (ii) on prédit que la station d'épuration de la Tour du Valat puisse être une source de contamination ponctuelle par des produits domestiques (DEET) ;

(3) les individus mâles présentant des niveaux de POP plus élevés que les femelles, pour les individus sexuellement matures. On ne prédit pas de différences entre les mâles et les femelles pour les teneurs en DEET, car cette molécule dégradable et peu lipophile est moins encline à être transférée dans les œufs.

La quantification des niveaux de polluants est réalisée à l'aide d'une chromatographie en phase gazeuse couplée d'une spectrométrie de masse en tandem (GC/MSMS) a été réalisée à partir d'échantillons de plasma sanguin prélevés en 2018.

Ce travail permettra de mesurer et détecter les différences interindividuelles de bioaccumulation des polluants persistants et non persistant (DEET) chez la cistude en Camargue. Il s'inscrit dans un projet plus large dont l'objectif ultime est de comprendre les effets physiologiques (hormonaux, immunologiques) et comportementaux (locomotion) des contaminants aquatiques (éléments traces métalliques, pesticides actuellement utilisés) sur une communauté de reptiles en Camargue. Il s'agit d'un projet financé par l'agence de l'eau Rhône Méditerranée Corse. *In fine* le projet permettra un couplage entre l'étude des contaminants aquatiques (répartition en Camargue grâce à une espèce sentinelle), de leurs effets immédiats (comportement et physiologie) et à long terme (démographie) chez une espèce longévive.

2. Matériel et méthodes

Les sites

Les sites visés par l'étude se trouvent au sein de la Réserve Naturelle de la Tour du Valat située dans le Parc Naturel Régional de Camargue. Les deux zones d'échantillonnage des tortues (***Figure 2***) sont : (1) Des canaux de drainage du bassin du Fumemorte et des marais mis en eau par ces canaux (population des Faïsses) (2) et une zone de marais et de canaux d'irrigation dont l'eau provient du Rhône (population de l'Esquineau). La zone de l'Esquineau occupe une superficie de 125 hectares (ha), elle est composée de 16 ha de marais et d'une pelouse sèche de 27 ha parcourue de 8 kilomètres de canaux d'irrigation. Le site des Faïsses concerne 100 ha qui se composent de 4 ha de marais et d'une pelouse sèche de 30 ha parcourus par 3 km de canaux de drainage (Olivier, 2002 ; Martin, 2018).

Captures et prélèvements : méthode d'échantillonnage

Les cistudes sont piégées au printemps et en été (d'avril à août) dans ces deux zones à l'aide de filets verveux (**Figure 3**) simples (1 aile centrale) ou doubles (2 ailes latérales) qui sont posés du lundi au vendredi matin et relevés quotidiennement pour récupérer les cistudes et contrôler le bon état du matériel. Une partie de la chambre terminale des filets doit impérativement se trouver hors de l'eau pour que les animaux ne se noient pas.

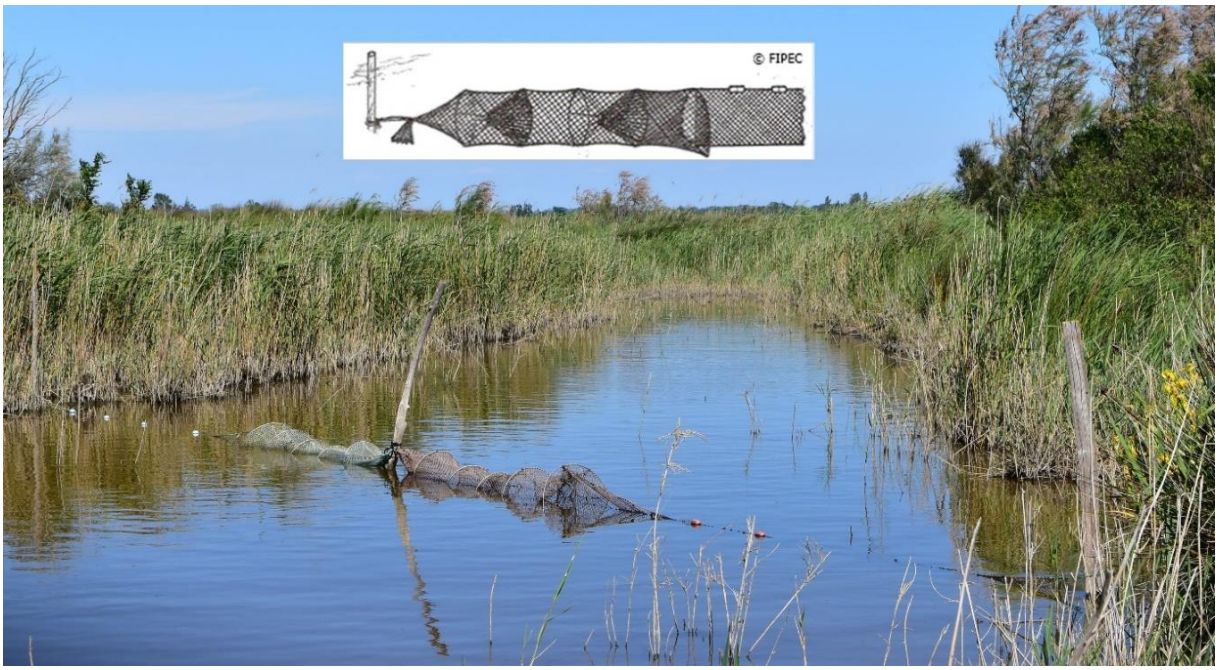


Figure 3 *Photographie d'un filets verveux posés en vue de capturer des cistudes dans la zone de Mon Canard Sud, site des Faïsses (photo : Aésane Meric).*

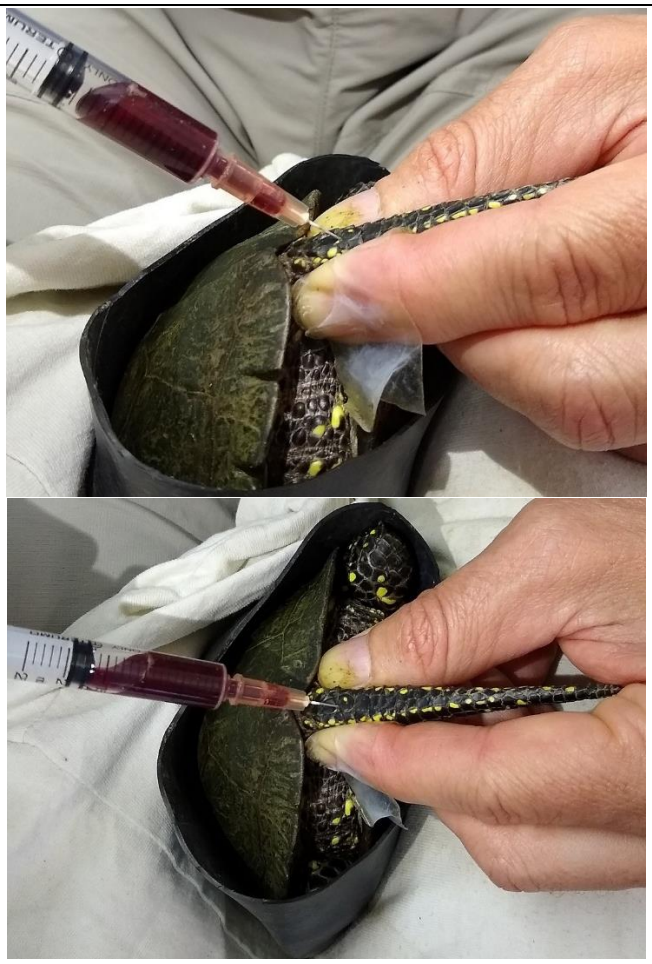


Figure 4 *Contention des tortues et placements pour la prise de sang (photo : Aésane Méric).*

Ils sont ensuite ramenés au laboratoire pour réaliser des mesures biométriques, indispensables pour le suivi CMR, et des prises de sang. Les individus sont tous marqués individuellement et donc identifiables. Le marquage se fait à l'aide d'une scie à métaux servant à pratiquer de légères entailles sur la carapace au niveau des plaques pygales et écailles nuccales qui correspondent chacune à un numéro (***annexe 1***). La somme des numéros de chaque écaille marquée donne le numéro d'identification de l'individu permettant le suivi. Lors de chaque capture, l'animal est mesuré, pesé et sexé. D'autres mesures biométriques sont réalisées dont l'ensemble se trouve sur la fiche descriptive de **l'*annexe 2***. Par exemple, le stade de croissance est défini d'après la lisibilité des stries de croissance situées sur le plastron de l'animal (carapace ventrale). La lecture des stries de croissance permet de déterminer l'année de naissance de l'animal si la première capture intervient dans les 5 premières années de vie (Olivier, 2002). Les tortues sont ensuite relâchées dans la journée sur leur lieu de capture. Il est nécessaire de rappeler que la capture de reptiles protégés comme la cistude d'Europe est réglementée et nécessite l'obtention d'une dérogation préfectorale (***annexe 3***).

Les prises de sang se font dans la queue au niveau de la veine coccygienne dorsale. Cette méthode a l'avantage de nécessiter une contention simple, le sang peut être collecté de manière non destructive sur des tortues vivantes et peut être échantillonné à plusieurs reprises pour une surveillance continue (Keller, Kucklick, Harms, *et al.*, 2004). La seringue Terumo Company® (Somerset, États-Unis) est préalablement imprégnée d'héparine pour empêcher la coagulation du sang lors du prélèvement. L'animal est maintenu entre les genoux de l'opérateur, une légère extension de la queue vers le bas est réalisée pour introduire l'aiguille BD® (Franklin Lakes, États-Unis) entre deux écailles (***Figure 4***).

Le volume idéal de sang prélevé se situe entre 1,5 et 2ml, les individus de moins de 300 grammes ne sont pas échantillonnés. Les échantillons sanguins analysés dans ce rapport proviennent de la saison de terrain précédente. 48 échantillons sont issus de la population des Faïsses (28 femelles et 20 mâles) et 126 de la population de l'Esquineau (76 femelles et 50 mâles). 66 échantillons étaient associés à des individus d'âge connus allant de 5 à 31 ans (33 femelles et 19 mâles provenant de l'Esquineau ; 9 femelles et 6 mâles provenant des Faïsses).

La séparation du plasma avec les cellules sanguines se fait par centrifugation à 3000 rotations par minute (rpm) pendant 3 mins. Le plasma est ensuite congelé à -18 °C dans des tubes Eppendorf, les dosages étant réalisés ultérieurement.

Analyses de chimie analytique : dosage des contaminants plasmatiques

Nous recherchons 18 PCB interdits depuis 1987, dont 7 sont des congénères « indicateurs » (IUPAC nos 28, 52, 101, 118, 138, 153, 180) et 12 PCB de type dioxine (77, 81, 105, 114, 118, 123, 126, 156, 157, 167, 169, 189), ainsi que 16 pesticides organochlorés et dérivés interdits depuis au moins depuis 1998 : PeCB (pentachlorobenzene), alpha-, beta- et delta- HCH (Hexachlorocyclohexane), HCB (Hexachlorobenzene), lindane, quintozene, Heptachlore, Heptachlore epoxide, Heptachlore endo-epoxide, Aldrine, Isobenzane, Isodrine, Endrine, 44'-DDE (Dichlorodiphenyldichloroethylene), 44'-DDT (Dichlorodiphenyltrichloro-ethane), 44'-DDD (dichlorodiphenyldichloroethane)). Le N,N-Diéthyl-méta-toluamide (DEET), également recherché, est autorisé et commercialisé pour l'usage domestique uniquement.

« Dopage »

Les échantillons sont décongelés par série de 16 pour ensuite être passés au vortex 5 secondes. 100 µL de plasma sont prélevés et déposés en flacon ambré de 4 mL. A l'aide d'une seringue analytique automatique manuelle eVol® (SGE Analytical Science, Australie), 10 µL d'Étalons Internes (EI), qui vont servir à la quantification, à 1 ng/µL de PCB 30 et PCB 107 sont ajoutés dans chaque flacon ainsi que 5 µL de EI de Lindane-d_6 à 10 ng/µL.

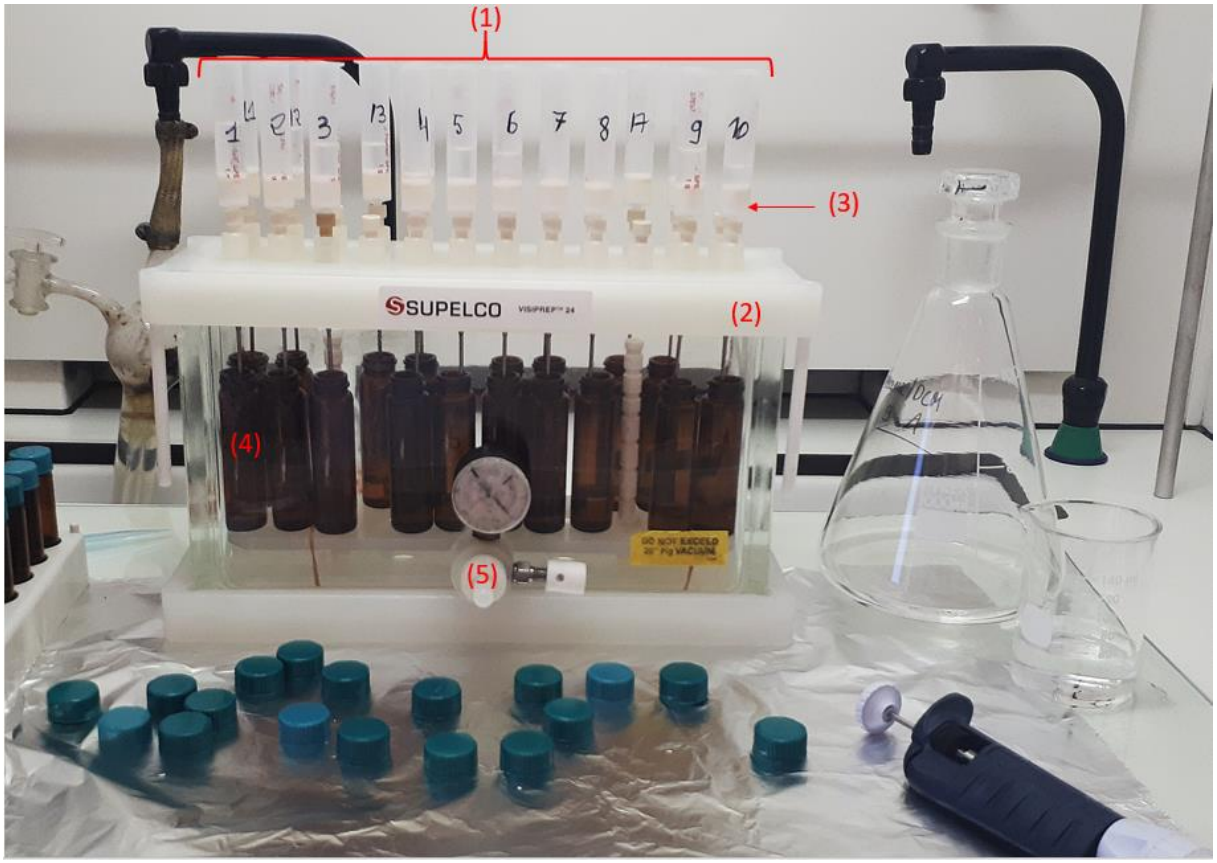


Figure 5 *Photographie de l'étape de SPE : Les activités nécessitant l'utilisation de solvants sont toujours réalisées sous une sorbonne. Les cartouches (1) sont montées sur le collecteur à vide (2). Les extraits sont purifiés sur une phase de silice acidifiée (3) retenant les molécules d'intérêt. Les extraits élués sont ensuite récupérés dans des flacons ambrés de 22 mL (4). Une pompe peut être utilisée pour aider à la migration des solutions dans les phases en la connectant sur le collecteur en (5) en créant du vide dans l'enceinte en verre.*

Les PCB 30 et 107 ont été fournis par Cluzeau Info Labo (Sainte-Foy-la-Grande, France) et le Lindane-d_6 par LGC standards (Molsheim, France). La seringue analytique est, au préalable, purgée dans un bain d'hexane Merck (Darmstadt, Allemagne) puis d'acétone Merck (Darmstadt, Allemagne). Les échantillons sont passés au vortex 10 secondes puis laissés une nuit à 4 °C.

Extraction liquide/liquide

2 mL de solution hexane/dichlorométhane (DCM) Merck (Darmstadt, Allemagne) (9:1 ; v/v) sont ajoutés dans chaque échantillon qui sont ensuite passés au vortex 5 secondes puis centrifugés 2 mins à 2000 rpm avec une centrifugeuse MEGA Star 600 VWR® (Leuven, Belgique). Les surnageants sont récupérés et mis en flacon ambré de 15 mL. Cette étape est répétée 3 fois en tout. Les échantillons sont reconcentrés sous flux d'azote (réglé sous une pression de 2 bars) à 62 °C jusqu'à obtenir 0,5 mL environ.

Purification-extraction en phase solide (SPE) (***Figure 5***)

La SPE (Solid Phase Extraction) est réalisée à l'aide de cartouches constituées de deux frittés 6 mL en polyéthylène Sigma-Aldrich (Bellefonte, États-Unis), préalablement nettoyés à l'acétone, entre lesquels se trouve 1 g de silice acidifiée à 44% de H_2SO_4 Sigma-Aldrich 21334-U (Bellefonte, États-Unis) inséré à partir de poudre en vrac. Ces cartouches sont montées sur un collecteur à vide Visiprep® (Bellefonte, États-Unis) et sont conditionnées en y versant 15 mL d'hexane/DCM (9 : 1 ; v/v) en 3 fois qu'on laissera s'écouler jusqu'à obtenir un ménisque au-dessus de la phase. On y verse par la suite les extraits. Les flacons sont rincés avec 200 µL d'hexane/DCM (9:1 ; v/v) en 2 fois. Les produits de rinçage sont également versés dans les cartouches associées aux extraits. Les extraits sont ensuite élués avec 15 mL d'hexane/DCM (9:1 ; v/v) en 3 fois puis récupérés dans des flacons ambrés de 22 mL. Les extraits sont ensuite reconcentrés dans un évaporateur centrifuge série EZ-2 Genevac® (Ipswich, Royaume-Unis) avec un programme basse pression de 20 mins à 37 °C comprenant une première phase de 5 mins et une phase finale de 15 mins qui descendra graduellement jusqu'à 30 bars environ, puis sous flux d'azote à 62 °C jusqu'au ménisque.

Mise en flacons

Les extraits purifiés sont enfin transférés en flacon d'injection ambré de 2 mL avec des restricteurs à fond conique de 250 µL avec un rinçage du flacon avec 2 fois 50 µL d'hexane. Les extraits sont ensuite reconcentrés sous flux d'azote. Les flacons sont ensuite étiquetés et conservés à -18 °C en vue du dosage.

Chromatographie en phase gazeuse et spectrométrie de masse en tandem

Les extraits sont injectés en GC-MS/MS (***Figure 6 et 7***). Les analyses ont été effectuées à l'aide d'un ensemble 7890A GC System d'Agilent Technologies (Les Ulis, France) couplé à un spectromètre de masse 7000B Triple Quad d'Agilent Technologies (France), fonctionnant en source d'ionisation à impact électronique (+70eV) et en mode d'acquisition MRM (Multiple Reaction Monitoring). Une colonne HT-8 phase phényl 8% (équivalent) polycarborane-siloxane 50 m x 220 µm de diamètre interne (i.d) et 0,25 µm de film (SGE Analytical Science, Australie) a été utilisée comme phase stationnaire. Des extraits de 1 µL ont été injectés en mode « pulsed splitless » à 280°C. La température de la source d'ionisation a été fixée à 300°C. Un flux d'hélium (99,999% ; Air liquide, Paris, France), en pression constante de 40 psi, a servi de gaz vecteur. La température du four a été programmée à 70°C pendant 2 mins suivie d'une montée à 170°C (0 min) à 30 °C/min, avant de terminer à 300°C pendant 3 mins. De l'azote (99,999% ; Air liquide, Paris, France) a été utilisé en tant que gaz de collision à 1,5 mL/min. La température des quadripôles et de la ligne de transfert ont été fixés à 150°C et 250°C respectivement.

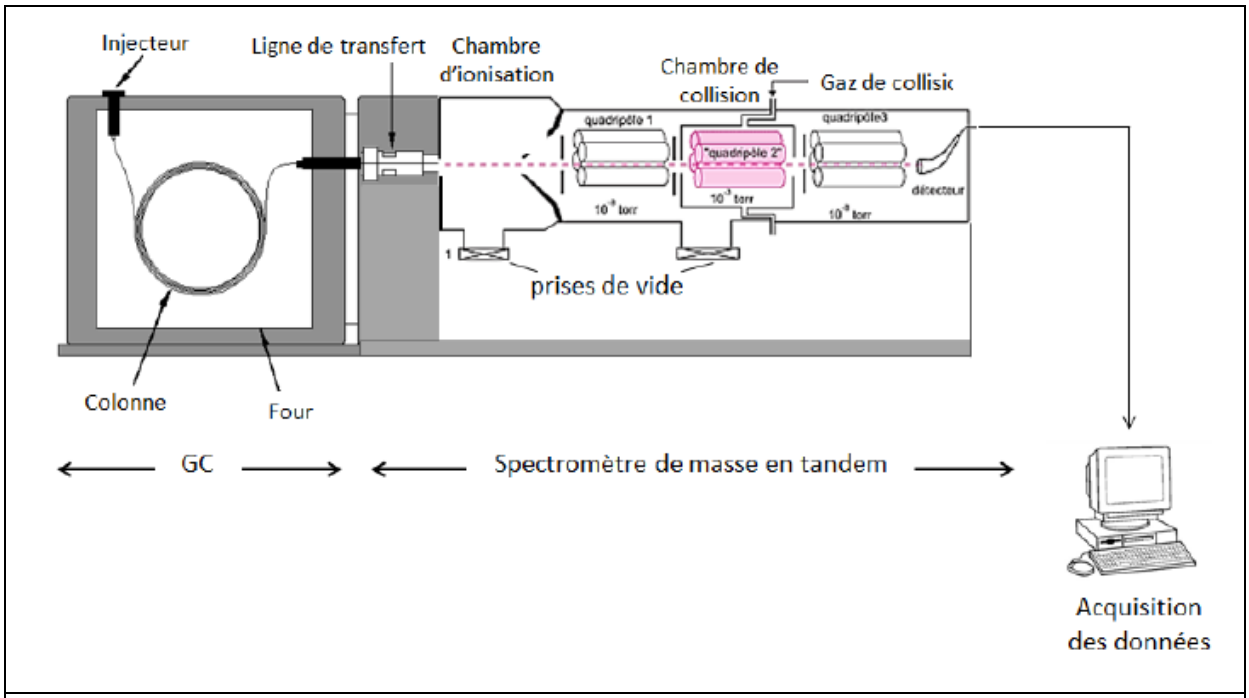


Figure 6 *Schéma de la composition d'un GC/MSMS. Chromatographie en phase gazeuse : l'extrait est vaporisé à l'entrée de la colonne, qui renferme une phase stationnaire (substance active qui est ici le phényl 8% (équivalent) polycarborane-siloxane), puis il est transporté à travers celles-ci à l'aide du gaz vecteur (hélium). Les différentes molécules de l'extrait vont se séparer et sortir de la colonne les unes après les autres après un certain laps de temps qui est fonction de l'affinité de la phase stationnaire avec ces molécules.*

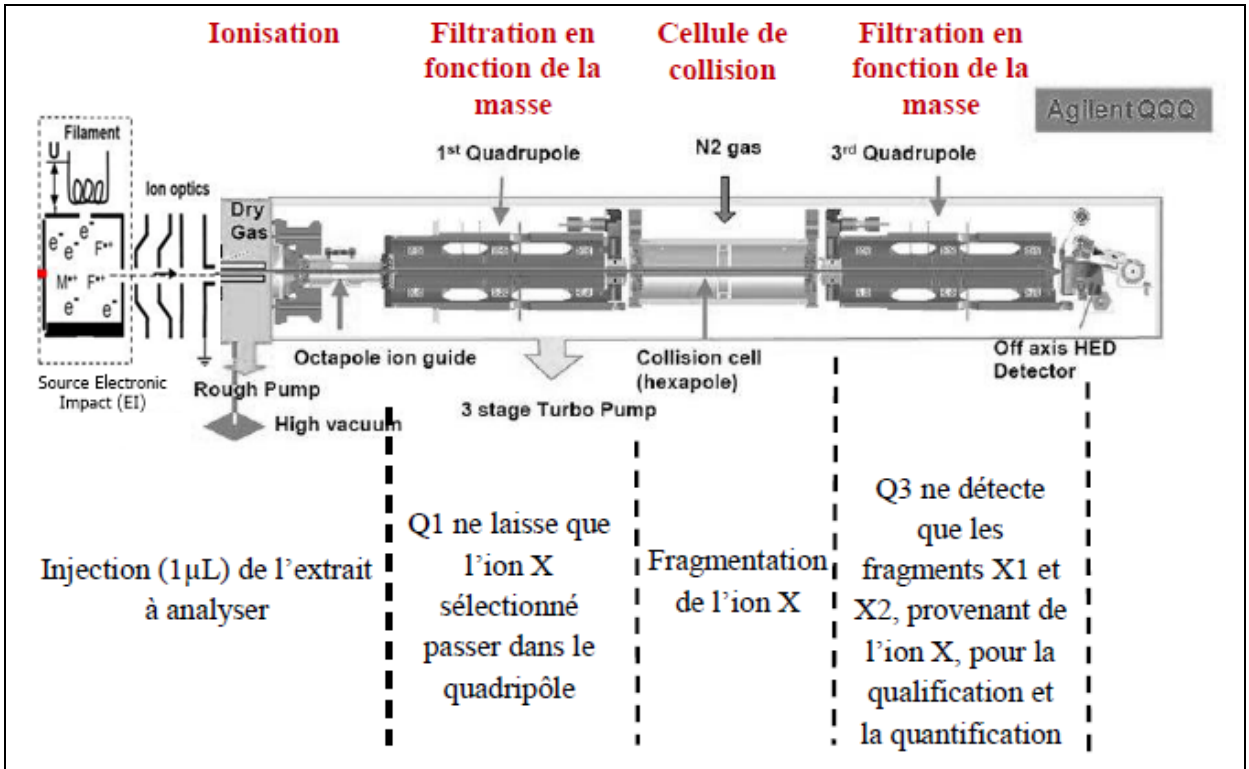


Figure 7 *Schéma du fonctionnement du spectromètre de masse en tandem.*

Les temps de rétention, les ions précurseurs et produits, ainsi que les énergies de collision sélectionnées figurent en ***annexe 4***. Des courbes de calibration, basées sur 7 points de gammes (***annexe 5***), ont été construites en utilisant des méthodes de régression linéaire (R^2). La quantification des composés a été effectuée en calculant la proportion de l'aire du pic par rapport à celui de l'EI de référence. Les limites de quantification (LQ) des molécules sont représentées en ***annexe 6*** avec la validation méthodologique rendant compte du rendement de la méthode. L'acquisition des données a été réalisée à l'aide du logiciel Mass Hunter Quantitative Analysis (version B.04, Agilent Technologie).

Des échantillons contrôles, appelés « blancs » suivent le même protocole. Ils seront retranchés au moment de la quantification quand ils représentent au moins 25 % de la quantité présente dans les extraits.

Analyses statistiques

Les analyses ont été réalisées à l'aide du logiciel R version 3.3.2 et avec les librairies lmtest,et pscl. En premier lieu, des analyses de corrélation entre variables quantitatives (poids et âges) sont réalisées à l'aide du test de corrélation de Pearson si les conditions d'applications de ce test paramétrique sont vérifiées. Le lien entre deux variables qualitatives (sexe, site, stade, jour de capture) est analysé par un test de Chi^2. Pour tester le lien entre une variable quantitative et une variable qualitative, le test de Wilcoxon est utilisé dans le cas où l'on compare deux groupes (exemple mâle/femelle) et Kuskal-Wallis s'il s'agit de plus de 2 groupes (comme la variable « stade de croissance »).

Les analyses d'occurrence des molécules dans le plasma des cistudes en fonction du site de capture, du sexe, du poids et du stade de développement des tortues ainsi que de la date d'échantillonnage du sang (regroupée par quinzaine) sont réalisées au moyen de tests du Chi^2. Seules les molécules ayant été détectées au moins une fois sont analysées. Les analyses se poursuivent à travers des modèles linéaires généralisés (GLM) binomiaux avec plusieurs variables explicatives afin de réduire le risque d'erreur de type II. Le meilleur modèle expliquant l'occurrence de la molécule en question est choisi à travers la comparaison des Critères d'Information d'Akaike (AIC) de chaque modèle.

Les présupposés de chaque modèle retenu sont vérifiés *a posteriori* à travers les sorties graphiques du modèle. La normalité des résidus du modèle est vérifiée à l'aide du test de Shapiro, l'homoscédasticité est vérifié avec le test de Breusch-Pagan et l'autocorrélation avec le test de Durbin-Watson. Les valeurs de p sont toutes fixées au seuil de 0,05.

Les concentrations plasmatiques par molécule pour chaque individu étant une variable expliquée avec une distribution caractéristique des « zero-atlered » data (un grand nombre de 0 dû à la non détection chez un grand nombre d'individus), les tests se basent sur des modèles « zero-altered » (Zuur *et al.*, 2009). Les données sont, au préalable, transformée en appliquant un facteur 100 et en transformant les valeurs en chiffre entier. Des comparaisons sont réalisées entre les modèles « zero-altered Poisson » (ZAP) et « zero-altered negative binomial » (ZANB) pour chaque investigation d'une corrélation entre les concentrations plasmatiques pour un contaminant avec les variables explicatives (âge, stade de croissance, sexe et zone d'origine des individus). Le modèle le plus approprié est choisi suite à la comparaison des AIC de chaque modèle, choisissant celui ayant le moins élevé (Zuur *et al.*, 2009). La normalité des résidus du modèle est vérifiée par une analyse graphique. Seules les molécules ayant une occurrence élevée (>20%), relativement au jeu de données, sont analysées. Enfin, des GLM quadratiques sont réalisés pour regarder l'influence de la date sur l'occurrence et les concentrations du DEET dans le sang des cistudes. La concentration s'exprimerait comme une fonction polynominale de degré 2 de la variable « date » attestant d'un pic de contamination durant la saison de capture.

Tableau 1: Tableau décrivant la contamination plasmatique totale (tous polluants confondus, ayant des seuils de détections différents) en fonction du site de capture et du sexe des tortues.

Site	Sexe des tortues	Concentration plasmatique moyenne totale en polluants (ng/mL)	Nombre d'individus contaminés	Proportion des individus contaminés par au moins 1 polluant (%)
Faïsses	Femelles	23,4	24	85,7
	Males	37,7	19	95,0
Esquineau	Femelles	51,4	54	71,1
	Males	53,2	40	80,0

Tableau 2: Tableau descriptif des données relatant des valeurs (détectées) minimales, maximales, moyennes des concentrations et les limites de quantification (ng/ml), du pourcentage d'occurrence (pourcentage des tortues capturées chez lesquelles on a détecté la molécule). En rose : les molécules jamais détectées, en jaune : les molécules dîtes d'occurrence élevée (>20%).

Molécules	Moyenne	Minimum	Maximum	Occurrence (%)	Limite de quantification (en ng/mL)
PeCB				0	0,6
Alpha HCH	0,027	2,3	2,39	1,15	1,9
DEET	42,905	4,04	573,98	43,68	2
beta HCH	0,061	0,89	3,22	4,02	0,9
HCB	0,036	0,18	1	10,34	0,2
Lindane				0	1,7
Delta HCH	0,042	1,32	2,22	2,3	1,3
Quintozene				0	1,6
pcb 28	0,105	1,05	3,16	5,75	1
Heptachlor				0	2,8
pcb 52	0,593	0,2	10,18	44,83	0,2
Aldrin	0,013	1,03	1,16	1,15	1
Isobenzan	0,06	0,67	2,02	5,17	0,6
Isodrin	0,017	1,09	1,86	1,15	1
Endrin				0	1
Heptachlor epoxid	0,243	1,56	7,81	6,32	1,2
Heptachlor-endo-epoxide	0,928	1,56	12,19	22,41	1,2
pcb 101	0,041	2,38	4,82	1,15	2,3
44'-DDE	0,046	1,4	2,33	2,3	1,1
pcb 81	0,025	1,02	2,1	1,72	0,9
pcb 77	0,019	1,15	2,18	1,15	1
pcb 123	0,015	2,61	2,61	0,57	2,6
pcb 114				0	2,8
pcb 118				0	3,1
44'-DDD	0,168	1,71	9,77	4,02	1,1
pcb 153	0,198	0,18	1,57	41,38	0,2
pcb 105				0	2,1
44'-DDT	0,037	2,82	3,62	1,15	2,4
pcb 138	0,183	0,93	7,28	7,47	1,8
pcb 126				0	2,3
pcb 156				0	1,3
pcb 157				0	1,1
pcb 167				0	1
pcb 180	0,02	0,37	0,83	2,87	0,3
pcb 169	0,011	1,86	1,86	0,57	1,4
pcb 189	0,018	0,49	1,14	2,3	0,4

3. Résultats

Analyses descriptives du jeu de données

Les échantillons sanguins sont plus de 2 fois plus nombreux sur le site de l'Esquineau (126 échantillons contre 48 aux Faïsses) reflétant la taille des noyaux de population, cependant le sex-ratio est sensiblement le même entre les deux sites (58,3% de femelle aux Faïsses contre 60,3 % à l'Esquineau). On dénombre 37 individus chez lesquels on ne détecte aucun polluant au-dessus de la limite de quantification, ce qui représente 10,4% des individus aux Faïsses et 24,4 % des individus de l'Esquineau. D'après le ***Tableau 1***, la proportion de tortues non contaminées est plus forte pour les femelles que pour les mâles, et cela dans les deux sites. La concentration plasmatique moyenne tous polluants confondus suit la même tendance même si l'écart entre mâle et femelle est plus important au Faïsses (14 ng/mL de plus chez les mâles en moyenne) qu'à l'Esquineau (1,8 ng/mL de plus chez les mâles en moyenne seulement). Plus globalement, on détecte une contamination plasmatique globale moyenne des tortues (mâles et femelles confondus) de 29,3 ng/mL aux Faïsses et de 52,1 ng/mL à l'Esquineau, attestant d'une contamination quasiment 2 fois plus élevée des individus pour ce dernier site.

Sur les 36 molécules recherchées, 12 molécules ne sont jamais détectées dans les échantillons de sang quel que soit le site de capture (***Tableau 2***), il s'agit de 5 pesticides organochlorés (PeCB, Lindane, Quintozene, Heptachlor, Endrine) et les PCB 118, 105, 114, 126,156, 157 167 qui sont, à l'exception du premier, tous de type dioxine. Quatre composés se détachent en termes d'occurrence de détection, le DEET, l'Heptachlore-endo-epoxide, le PCB 52 et le 153 qui sont retrouvés chez 44 %, 22%, 45% et 41% des individus respectivement. Il est à noter une concentration moyenne très élevée du DEET par rapport aux autres composants qui est de 42,9 ng/mL de plasma avec une valeur minimale détectée de 4 ng/mL et des valeurs maximales pouvant être 140 fois plus élevées.

Le nombre de polluant détecté au moins une fois sur l'ensemble des échantillons est différents d'un site à l'autre : on en dénombre 24 pour le site de l'Esquineau et 16 pour le site des Faïsses. Les 8 molécules qui sont uniquement détectées à l'Esquineau sont : l'alpha-HCH, l'Isodrine, l'Heptachlore-epoxide, le 44'-DDT et les PCB 28, 101, 123,169.

Les tableaux décrivant les différences de nombre et de pourcentage d'individus contaminés ainsi que les concentrations moyennes détectées par molécules en fonction du sexe des cistudes pour les deux sites d'étude sont disponibles ***en annexe 7***.

Le contaminant majoritaire présent dans les cistudes est toujours le DEET où il représente 93 % de la concentration totale moyenne en polluants recherchés dans le sang chez les mâles et 95% chez les femelles du site des Faïsses ainsi que 90% et 93% chez les mâles et les femelles du site de l'Esquineau respectivement. Le deuxième contaminant majoritaire est toujours l'Heptachlore-endo-epoxide, il compose de 1 à 3 % la concentration totale moyenne de la contamination chez les cistudes. La variance des concentrations observées pour ces deux contaminants prépondérants est nettement plus importante chez les tortues de l'Esquineau que celles des Faïsses. En effet, la variance du DEET est plus de 3 fois plus importante chez les mâles de l'Esquineau, et plus de 10 fois plus élevée pour les femelles du même site par rapport à celles des Faïsses. Cette tendance se dessine également pour la variance des concentrations de l'Heptachlore-endo-epoxide qui chez les femelles est 3 fois plus élevée et 2 fois plus élevée chez les mâles pour le site de l'Esquineau.

La ***figure 8*** permet de voir plus en détail la contamination moyenne des polluants à plus faible concentration que le DEET. Nous pouvons voir sur cette figure, une fois le DEET retiré des données, que la proportion des contaminants plasmatiques n'est pas très différente d'un site à l'autre ou en fonction du sexe des tortues.

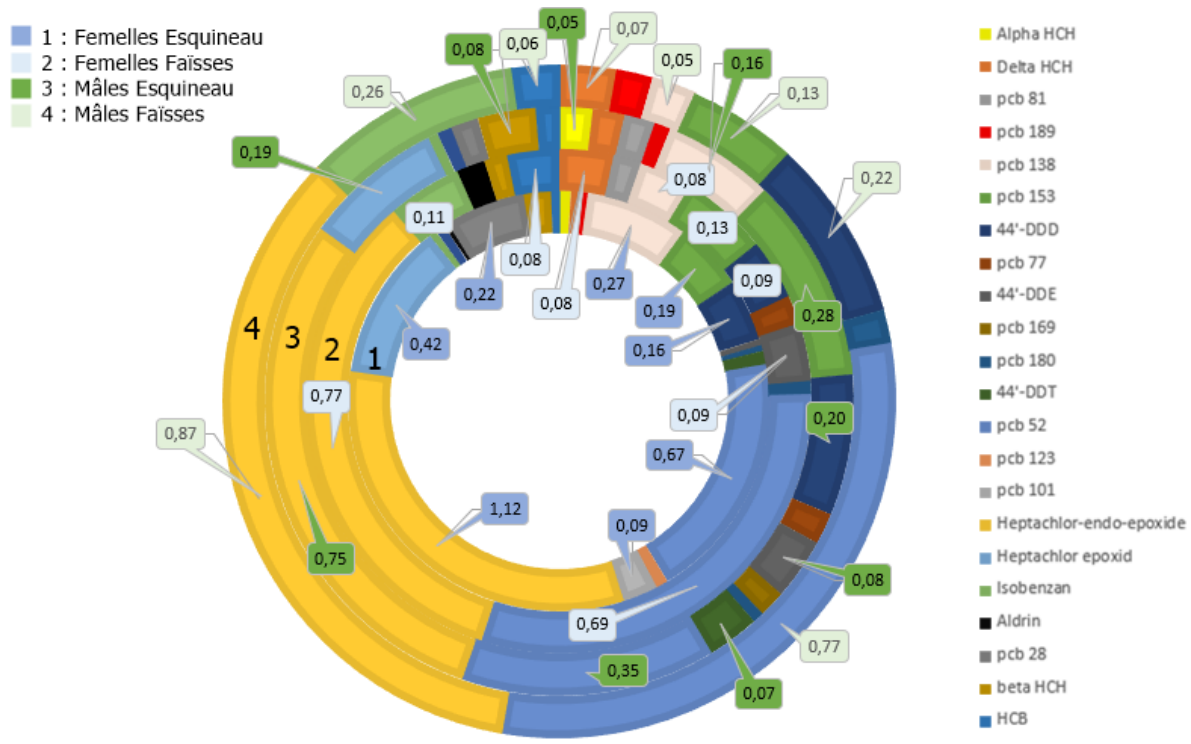


Figure 8 *Graphique représentant les concentrations moyennes par polluant (ng/mL) et leur proportion, excepté le DEET, en fonction du sexe et du site de capture des individus. Seuls les contaminants ayant une concentration moyenne supérieure à 0,05 ng/mL (> à 2% de la concentration moyenne totale des contaminants excepté le DEET) possèdent une étiquette indiquant la valeur de la concentration moyenne.*

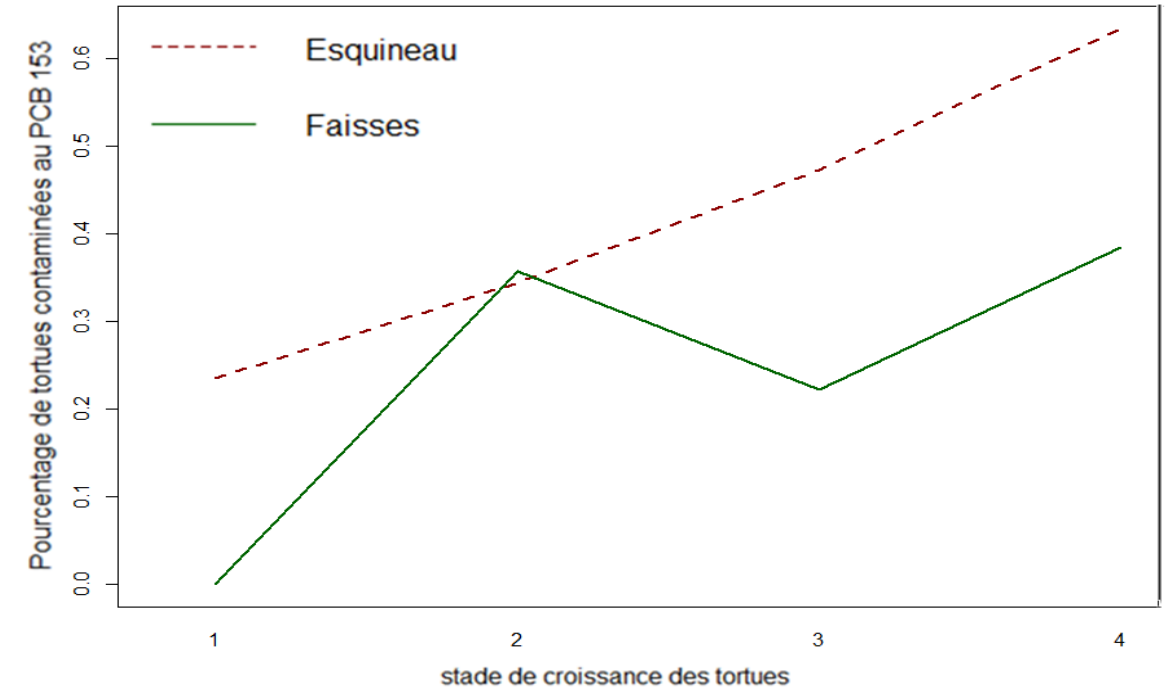


Figure 9 *Graphique présentant le pourcentage de cistudes contaminées par le PCB 153 en fonction de leur stade de croissance et du site de capture.*

On note cependant une forte proportion de la contamination à l'Isobenzan des tortues mâles et femelles du site des Faïsses par rapport à celles de l'Esquineau.

Corrélation entre variables explicatives

Les variables « âge » et « stade de croissance » sont corrélées (*Kruskal-Wallis chi-squared = 50.89, df = 3, p < 0.0001*). Concernant la variable « poids », sa corrélation avec l'âge des individus est significative (*t = 3.65, df = 64, p = 0.0005*) indiquant que les individus les plus âgés sont les plus lourds. Il en est de même pour la variable « sexe » indiquant que les femelles étaient significativement plus lourdes que les mâles (*W = 474, p < 0.0001*). La variable « poids » étant corrélée à toutes les autres variables explicatives, sauf aux variables « site » et « jour de capture », elle ne sera pas utilisée dans les modèles utilisant les variables lui étant corrélées.

Analyses statistiques des données d'occurrence (0/1) des contaminants en fonction du site, de la date de prélèvement, du sexe, de l'âge et du stade de croissance des tortues

Tous les modèles sélectionnés par la comparaison des AIC étaient composés des variables « site » et « stade » en tant que variables explicatives, avec une fonction lien de type « log ». Aucune relation entre l'occurrence des contaminants et le sexe ou le poids des tortues n'a été décelée. Il en est de même concernant les corrélations entre la date d'échantillonnage et l'occurrence des contaminants plasmatiques.

Cependant l'occurrence est significativement plus élevée pour le DEET (Z = 2.7, *p = 0.007*), l'Hexachlorobenzene (HCB) (Z = 2.2, *p = 0.03*), le PCB 52 (Z = 3.8, *p = 0.0001*) et l'Isobenzan (Z = 2.4, *p = 0.02*) chez les tortues du site de Faïsses comparées à celles de l'Esquineau.Comme illustré par la ***figure 9***, la variable « occurrence du PCB 153 » est corrélée au stade de croissance (Z = 3.12, *p = 0.002*) tout comme à l'âge (*p = 0.02)* indiquant que l'occurrence de ce contaminant augmente avec l'âge des tortues quel que soit le site. L'occurrence de ce polluant est également corrélée au site (Z = -2.1, *p = 0.04*) décelant un taux significativement plus élevé à l'Esquineau qu'aux Faïsses.

Analyses statistiques des données de concentration des contaminants en fonction du site, de la date de prélèvement, du sexe, de l'âge et du stade de croissance des tortues

Toutes les comparaisons entre les modèles ZAP et ZANB ont conclu que ces derniers étaient les plus statistiquement appropriés (comparaison des AIC d'après Zuur *et al.*, 2009).

Les concentrations plasmatiques en contaminant chez les tortues, toutes molécules confondues, sont significativement plus élevées chez les tortues vivant à l'Esquineau que sur le site des Faïsses (Z= -2.54, *p = 0,01).* Cependant, aucune différence n'a été trouvée concernant les différences de concentration entre mâles et femelles ou en fonction du stade de croissance en utilisant l'ensemble du jeu de données. Concernant le sous échantillon composé uniquement des individus d'âge connus, nous décelons une différence significative de la concentration totale en polluant dans le plasma en fonction de l'âge (Z = -2.35, *p = 0,02*) indiquant que les individus sont plus contaminés dans les premières années de vie et que la concentration plasmatique diminue avec l'âge comme il est illustré par la ***Figure 10***. Les molécules concernées par les analyses des données de concentrations individuelles sont uniquement celles qui ont été détectées chez au moins 20% des individus échantillonnés (DEET, Heptachlo-endo-epoxide, PCB 52 et 153). Cependant, on ne trouve aucune corrélation entre les concentrations de PCB 52 et PCB 153 avec les variables explicatives. Concernant le DEET, les concentrations plasmatiques sont négativement corrélées à l'âge (Z = -2.19, *p = 0,03*) et significativement moins élevées chez les tortues des Faïsses que chez celles de l'Esquineau (Z = -4.33, *p < 0.0001*).

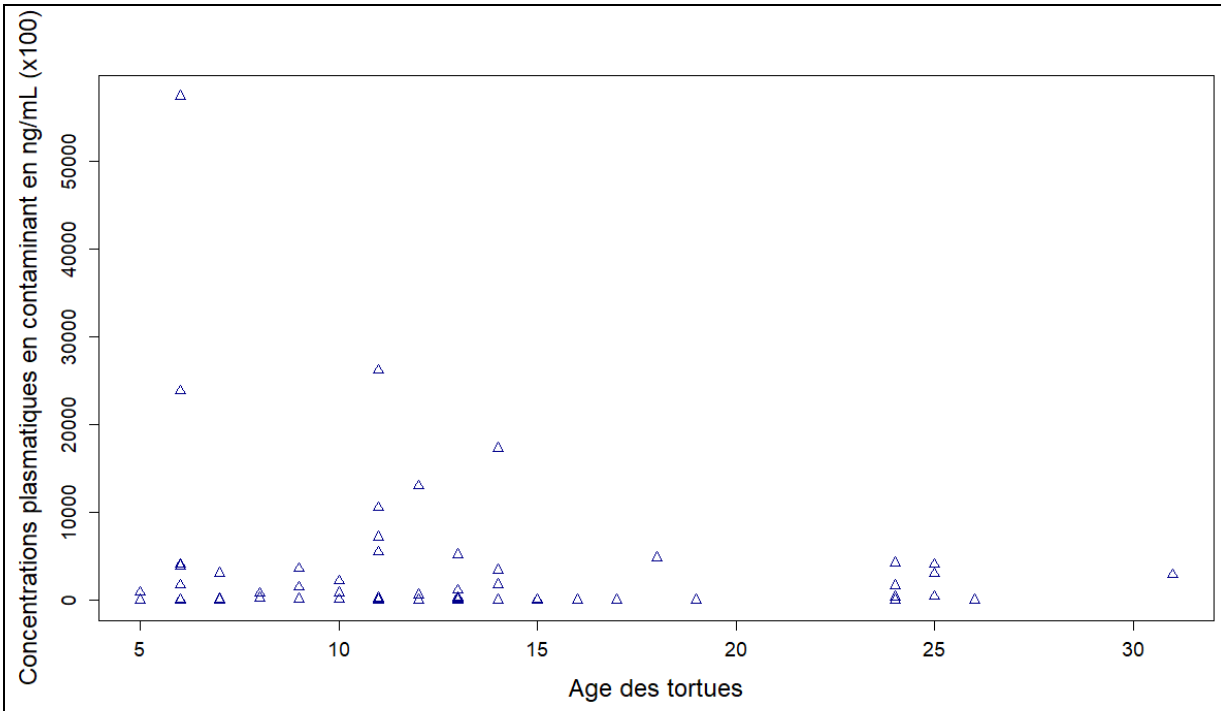


Figure 10 *Graphiques représentant la concentration plasmatique (tous polluants confondus) en ng/mL (facteur 100) en fonction de l'âge des tortues.*

Il en est de même pour les concentrations en Heptachlor-endo-epoxide qui sont significativement plus importantes chez les tortues de l'Esquineau ($Z = -2.54$, $p = 0.01$) mais également significativement moins importantes chez les tortues mâles que chez les femelles.

Enfin les concentrations plasmatiques de DEET ne sont pas corrélées avec la date du prélèvement sanguin.

4. Discussion

Notre objectif était de clarifier les niveaux de contamination des individus de deux noyaux de population de cistude d'Europe en Camargue, concernant des polluants historiques interdits (pesticides organochlorés et PCB) et un produit actuellement utilisé comme anti-moustique (DEET). Nous constatons que d'une manière globale le plasma des tortues est plutôt peu contaminé par les POPs dont font partit les pesticides organochlorés et les PCB recherchés, et ce malgré des limites de quantification basses dans le plasma (0,2 à 3,1 ng/mL). On ne trouve pas de différence significative parmi les différences énoncées dans les analyses descriptives : il n'y a pas de différence significative dans le nombre de polluants retrouvés ou la variance des concentrations entre les sites ou entre les mâles et les femelles d'un même site. Seules des tendances se dessinent, nous permettant des statuer de manière mesurée.

Comme attendu, le plasma des individus de l'Esquineau est significativement plus contaminé en termes de concentration totale que celui des tortues provenant de la zone des Faïsses. Le site de l'Esquineau reçoit en effet de l'eau directement pompée dans le Rhône, historiquement pollué par les POPs liés à l'activité industrielle et directement rejetés dans le fleuve (Mourier *et al.*, 2014). Les canaux de drainage du site des Faïsses reçoivent de l'eau issue du Rhône également mais celle-ci a d'abord transité par les parcelles agricoles (rizières principalement), ce qui constitue une phase d'épuration supplémentaire concernant les polluants historiques et qui pourrai justifier les niveaux de contaminations des animaux plus bas pour ce site (Roche *et al.*, 2009). Ces contaminants interdits depuis plus de 30 ans ont un poids moléculaire élevé et une demi-vie de l'ordre du siècle, et sont piégés dans les sédiments à des teneurs encore élevées.

Les analyses d'eau menées en 2018 par la Réserve Naturelle Nationale de Camargue rendent compte de l'absence de détection de PCB ou de pesticides organochlorés dans le canal de Fumemorte, ce qui suggère un faible transport de ces polluants du Rhône vers le site d'étude. Cette faible contamination peut aussi s'expliquer par l'abondance de macrophytes favorisant les processus d'auto-épuration et de dégradation des polluants (Roche *et al.*, 2009)**.**
L'influence du contexte hydrologique dans la contamination des animaux sauvages peut avoir une importance à l'image de la comparaison de nos résultats avec une étude menée sur les anguilles (Oliveira Ribeiro *et al.*, 2008) dans la même zone d'étude mais au niveau de gros canaux, caractérisés par un débit et une circulation de l'eau plus élevée pouvant provoquer la remise en suspension plus importante de sédiment dans ces zones.
Il est important de rappeler que la contamination des cistudes dépend non seulement de l'exposition directe depuis les compartiments environnementaux (air, eau, sédiment), mais aussi :
(1) de l'exposition par voie trophique. Des analyses de la contamination des écrevisses de Louisiane (*Procambarus clarkii*) constituerait une bonne base afin de définir une potentielle contamination par voie trophique des tortues. En effet il s'agit d'une espèce invasive et d'une composante importante du régime alimentaire des cistudes en Camargue (Ottonello *et al.*, 2005), en cela nous la proposons en tant modèle d'étude approprié.

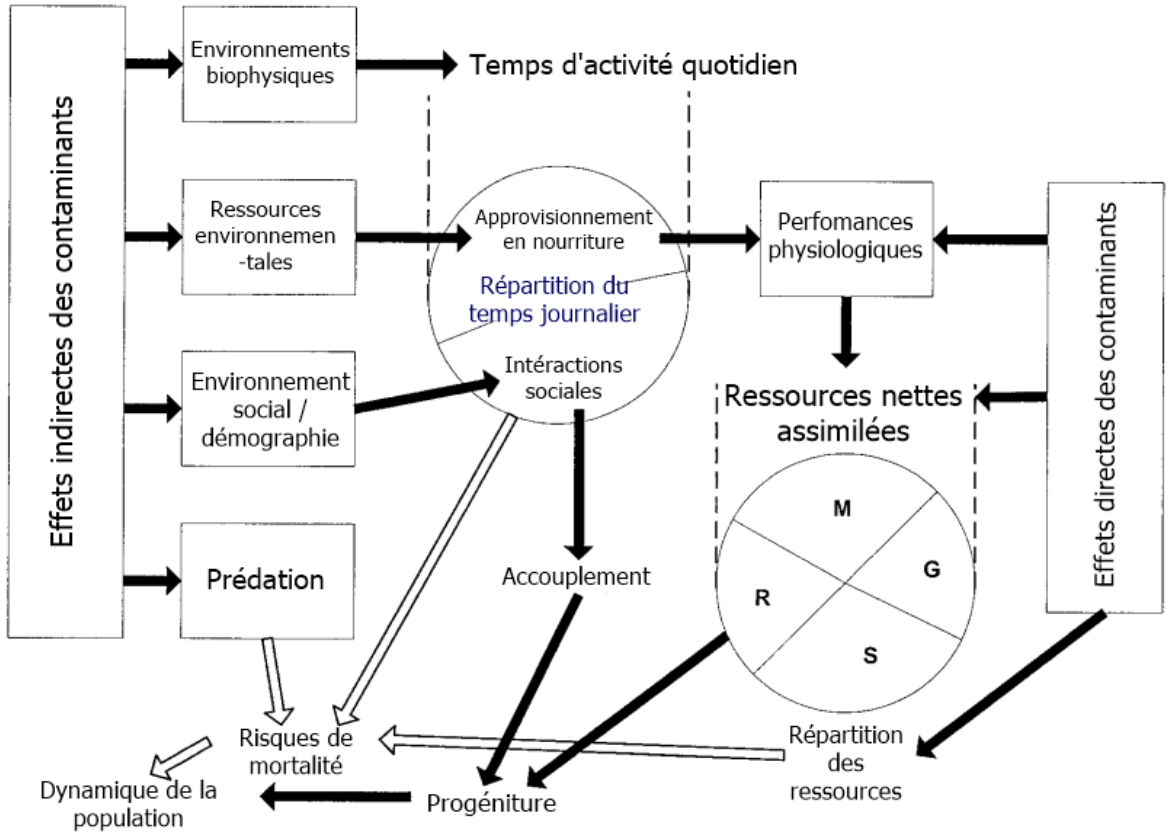


Figure 11 *Résumé des facteurs affectant l'activité quotidienne et les répartitions de l'allocation dédiée aux ressources des organismes. L'allocation du temps disponible résulte en un budget quotidien d'activité / temps, et chaque allocation différente entraîne potentiellement un risque de mortalité différent. Les taux de réussite alimentaire et d'assimilation déterminent la quantité nette de ressources assimilées (énergie, eau, nutriments, etc.) pouvant être affectées aux fonctions concurrentes de croissance (G), de stockage (S), de métabolisme de maintien et d'activité (M) et de reproduction (R) (illustration traduite issue de Congdon* et al.*, 2001)*

(2) de la remobilisation des graisses, qui varie en fonction de l'état nutritionnel des animaux, dans lesquelles ces molécules très lipophiles peuvent être stockées (Lydersen *et al.*, 2002).
Ainsi il serait approprié pour la suite des investigations sur la contamination plasmatique des cistudes d'établir des liens avec la contamination de ses proies mais également avec le taux de lipides sanguins (Landrum & Fisher, 1999).
Les analyses démontrent cependant une plus forte occurrence de certains polluants sur le site des Faïsses. Ce résultat n'est pas contradictoire avec les niveaux de concentration plus élevés à 'Esquineau, il témoigne d'une exposition plus homogène en adéquation avec les niveaux de variance rencontrés entre les deux sites.

Le niveau de contamination n'est généralement pas plus élevé chez les individus les plus âgés. On constate une augmentation de l'occurrence dans le sang en fonction de l'âge uniquement pour le PCB 153, c'est-à-dire qu'on a plus de risque de détecter du PCB 153 chez les individus âgés. L'effet inverse est observé pour la somme totale de polluants avec un déclin des concentrations avec l'âge.
Les tortues les plus âgées marquées à la Tour du Valat étaient déjà présentes dans le milieu (marquage pour les premières en 1976) lorsque les polluants chimiques industriels (PCB) étaient encore rejetés dans le Rhône suggérant que, potentiellement, ces tortues étaient exposées à une pollution plus importante et plus systématique expliquant les données d'occurrence. Cependant, la concentration totale en contaminant du plasma des tortues diminue avec l'âge, suggérant une potentielle détoxification. Si cette concentration détectée provient d'une remobilisation des graisses, alors cette corrélation indique que les tortues plus âgées remobilisent significativement moins leurs réserves lipidiques que les jeunes qui peuvent présenter de grandes variations dans la teneur en lipide dans leur plasma (Kakizoe *et al.*, 2007). Il est aussi possible que la niche trophique, le métabolisme et le comportement change au cours de la vie, modifiant alors les dynamiques d'exposition à ces polluants. Une dernière hypothèse, dans la mesure où cette étude est transversale et non longitudinale, serait que les individus les plus contaminés soient progressivement éliminés de la population par mortalité accrue dues à une plus forte sensibilité aux pathogènes et/ou un manque de réactivité face aux perturbations environnementales, de telle sorte que seuls les individus les moins contaminés atteignent des âges élevés (Congdon *et al.*, 2001). Les contaminations peuvent modifier la balance d'allocation du temps à différentes activités essentielles pour les individus influençant leur taux de survie (***Figure 11***).

Nous ne trouvons pas support à l'hypothèse selon laquelle les individus mâles présenteraient une contamination plus élevée que les femelles. Le seul résultat établissant une corrélation entre le sexe et la concentration plasmatique d'un contaminant indique même l'inverse de ce qui était attendu.

Le DEET est un contaminant qui diffère très fortement des POPs (molécule autorisée à usage restreint, métabolisable, demi-vie de l'ordre de la semaine). Sa détection est très élevée tant en termes d'occurrence qu'en concentration retrouvée dans le plasma. Ce contaminant est également moins observé chez les tortues du site des Faïsses par rapport à celles de l'Esquineau. Ce contaminant étant très métabolisable, les concentrations retrouvées indiqueraient une exposition forte et continue des tortues de Camargue. Il est à noter que le site de l'Esquineau pourrait recevoir indirectement (par infiltration) les eaux de sortie de station d'épuration de la Tour du Valat.
Ainsi, il est possible que les concentrations de DEET retrouvées soient dues à l'utilisation d'insectifuge topique à une échelle locale (domaine de la Tour). Plus généralement, ce polluant pourrait être un marqueur de la contamination due à l'afflux touristique en Camargue, ou du début de l'utilisation de ce type de produit par les habitants dans une zone très concerné par

l'affluence de moustiques du printemps à l'automne. La quantification du DEET s'est faite par rapport au Lindane-D_6, étalon interne dont les propriétés chimiques diffèrent du DEET. Ainsi la quantification a pu intégrer la molécule mère, ainsi que les produits de dégradation, de structure proche de la molécule mère (Weeks *et al.*, 2012). Les métabolites identifiés sont le N, N-diéthyl-m-toluamide-N-oxyde (I), le Néthyl-m-toluamide-N-oxyde (II) et le N-éthyl-m-toluamide (III). D'après une étude, la toxicité du métabolite III est similaire à celle du DEET, tandis que le métabolite I était beaucoup moins toxique (Aronson *et al.*, 2012). La fourchette mesurée des concentrations aquatiques de toxicité aiguës pour ces molécules est de 4 à 388 mg / L et de 0,5 à 24 mg / L dans l'eau concernant de la toxicité chroniques pour les daphnies et les algues vertes (Weeks *et al.*, 2012). La valeur basse de la fourchette de concentration dans l'eau provoquant une toxicité chronique est inférieure à la valeur maximale de la concentration en DEET retrouvé dans le sang de tortue (535 ng/ml). Cette donnée indique que les tortues peuvent être exposées à des concentrations de DEET dans l'eau pouvant provoquer une toxicité chronique et/ou que le DEET est très facilement absorbé par les organismes aquatiques.
De plus, cette molécule n'est pas recherchée dans les analyses d'eau menées par les collectivités en charge de la surveillance de la qualité de l'eau. Il serait donc nécessaire de rechercher cette molécule afin de la doser pour comprendre de quelle manière elle est absorbée (voie directe ou indirecte) par les organismes et de pouvoir calculer le facteur de d'intégration de cette molécule dans les différents compartiments (biotiques et abiotiques).
Les résultats de concentrations (tous polluants confondus) sont largement influencés par les données concernant uniquement le DEET puisque les concentrations sont nettement plus importantes pour ce polluant par rapport aux molécules de types PCB et pesticides organochlorés. Ces résultats corroborent avec une certaine logique selon laquelle les molécules autorisées sont plus présentes dans le milieu que les molécules interdites même si ces dernières sont persistantes comme en atteste les analyses d'eau du canal de Fumemorte (SNPN & RNN Camargue, 2018). En effet, 68 molécules autorisées y sont détectées contre 13 interdites sur les 705 recherchées au total.
Cependant, un biais est toujours possible concernant ce polluant. En effet, cette molécule étant utilisée par le personnel de la Tour du Valat ayant accès au laboratoire utilisé pour réaliser les prises de sang, une contamination extérieure reste possible.

Cette étude exploratoire de la contamination du plasma des cistudes de Camargue nous amène à considérer désormais d'autres polluants en privilégiant des pesticides recherchés dans les analyses d'eau pour cette zone et les éléments traces. La poursuite de la campagne de prélèvements sanguins en 2019 (auquel je participe lors de ce stage) va permettre de compléter le jeu de données et notamment d'approfondir la problématique du DEET. Les molécules actuellement autorisées sont généralement dîtes moins néfastes pour les écosystèmes que les contaminants historiques du fait de leur dégradation rapide. Cependant, leur quantification ainsi que celle de leurs métabolites dans le plasma des cistudes constituent un volet de recherche important. La toxicité de ces molécules due à une exposition courte (période de traitement des cultures) mais à des concentrations très importantes n'est pas connue. Le plasma reste, dans ce contexte, un compartiment intéressant pour le dosage de ces molécules puisqu'elles ne sont pas bioaccumulables.

Pour la présente étude, l'utilisation du plasma se justifie par le fait que les concentrations de composés tels que les organochlorés toxiques mesurés dans le sang sont significativement corrélées aux concentrations trouvées dans les échantillons de graisse (Keller, Kucklick, Harms, *et al.*, 2004), mais aussi de foie, de rein et de muscle (Van de Merwe *et al.*, 2010) suggérant que le sang de tortue est une alternative moins invasive aux prélèvements de tissus adipeux et aux organes accumulateurs pour mesurer la bioaccumulation relative.

Il en est de même concernant les PCB (Dabrowska *et al.*, 2006). Ce choix est d'autant plus justifié que l'espèce est intégralement protégée en France depuis 1979 (arrêté du 24/04/1979. Elle a depuis été inscrite à l'annexe 2 de l'arrêté du 19/11/2007 (fixant les listes des amphibiens et reptiles protégés et les modalités de leur protection, NOR : DEVN0766175A). Ce classement interdit (sauf dérogation) d'utiliser des méthodes destructives. De plus, contrairement aux éléments traces métalliques, les polluants organiques ne bioaccumulent pas ou très peu dans les tissus inertes (écailles, carapaces, griffes) rendant ces tissus inappropriés. Précisément, les PCB sont des composés lipophiles, avec un K_{ow} (coefficient de partage octanol/eau) compris entre 4,69 et 8,05 suivant leur niveau de chloration (Zhou *et al.*, 2005), et apolaires sans affinité pour la bioaccumulation dans les tissus kératinisés composés de lipides polaires (Birkby *et al.*, 1982). Le sang offre une vision dynamique de la contamination des individus puisqu'il illustre la partie potentiellement toxique en circulation. En effet les molécules étant hautement lipophiles finissent par se retrouver stockées dans les réserves lipidiques de l'organisme, loin de leurs sites récepteurs concernés par une action toxique (Arts & Wainman, 1999).

Cette étude nous permet d'améliorer nos protocoles d'échantillonnage pour la session de terrain en cours. Le nombre d'échantillon par site sera plus équilibré nous permettant de réduire les biais liés aux différences d'effectif. De plus, pour éviter toutes contaminations extérieures, l'utilisation de produit anti-moustique au laboratoire et pendant les sessions de captures sera proscrite. Concernant les analyses statistiques, du fait du très grand nombre de zéros, des modèles ZANB ont été utilisés pour établir des relations entre les données de concentrations et les variables explicatives. Ces modèles sont mieux adaptés aux données de comptage. Les analyses futures pour les données récoltés cette année seront réalisées à l'aide du package Lmec (Linear Mixed-Effects Models with Censored Responses) permettant le remplacement des valeurs de concentration inférieures à la LQ par des données aléatoires comprises entre 0 et la LQ en respectant la distribution observée. Des GLM pourront être ainsi utilisés de manière optimale.

5. Conclusion

Cette étude exploratoire de la contamination plasmatique des cistudes d'Europe en Camargue révèle de faibles détections de pesticides organochlorés et de PCB chez cette espèce sentinelle rendent compte d'un milieu où l'exposition des organismes aquatiques à ces polluants reste limitée du fait, certainement, des conditions hydrologiques de la zone d'étude. Cependant malgré que la contamination des POPs se détecte à l'état de trace nous décelons tout de même un effet du site de capture sur la contamination globale. L'observation de DEET à une occurrence et des concentrations élevées nous permet de mettre en évidence une différence d'exposition des animaux par rapport aux différents types de polluants rejetés dans l'environnement (molécule interdite/autorisée, persistante/dégradable, de rejet industriel/domestique, à l'échelle locale/régionale). Les perspectives envisagées suite à cette étude concernent le recentrage des analyses sur des polluants cibles à plus fortes probabilités de présence pour un suivi de l'exposition des animaux aquatiques. Il est également prévu de rechercher des polluants dans d'autres compartiments biologiques que le plasma. En effet, des cellules sanguines, des griffes et fèces sont en cours de prélèvement afin de rechercher, par exemple, des éléments traces métalliques. Cela dans le but d'évaluer les concentrations entre différents items corporels d'un même individu tout en cherchant des corrélations avec son âge, ses traits d'histoire de vie, sa physiologie (stress oxydatif, osmolarité du plasma), son immunité (parasite sanguin), son comportement et sa condition physique (couleur, symétrie).

Bibliographie

Aronson D., Weeks J., Meylan B., Guiney P.D., & Howard P.H. 2012. Environmental release, environmental concentrations, and ecological risk of N,N-Diethyl-m-toluamide (DEET). *Integrated Environmental Assessment and Management*. 8(1), p. 135-166.

Arsovski D., Olivier A., Bonnet X., Drilholle S., Tomović L., Béchet A., Golubović A., & Besnard A. 2018. Covariates streamline age-specific early life survival estimates of two chelonian species. *Journal of Zoology*. 306(4), p. 223-234.

Arts M.T. & Wainman B.C., éd. 1999. *Lipids in Freshwater Ecosystems*. New York, NY : Springer New York

Bangma J.T., Ragland J.M., Rainwater T.R., Bowden J.A., Gibbons J.W., & Reiner J.L. 2019. Perfluoroalkyl substances in diamondback terrapins (Malaclemys terrapin) in coastal South Carolina. *Chemosphere*. 215, p. 305-312.

Beau F., Bustamante P., Michaud B., & Brischoux F. 2019. Environmental causes and reproductive correlates of mercury contamination in European pond turtles (Emys orbicularis). *Environmental Research*. 172, p. 338-344.

Berny P., Sadoul N., Dol S., Videman B., Kayser Y., & Hafner H. 2002. Impact of local agricultural and industrial practices on organic contamination of little egret (*Egretta garzetta*) eggs in the rhône Delta, Southern France. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 21(3), p. 520-526.

Birkby C.S., Wertz P.W., & Downing D.T. 1982. The polar lipids from keratinized tissues of some vertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*. 73(2), p. 239-242.

Bustnes J.O., Moe B., Hanssen S.A., Herzke D., Fenstad A.A., Nordstad T., Borgå K., & Gabrielsen G.W. 2012. Temporal Dynamics of Circulating Persistent Organic Pollutants in a Fasting Seabird under Different Environmental Conditions. Disponible sur : < https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/es301746j > (Consulté le 6 février 2019).

Campbell K.R. & Campbell T.S. 2002. A logical starting point for developing priorities for lizard and snake ecotoxicology: A review of available data. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 21(5), p. 894-898.

Cheiron A., Befeld S., & Bricault B. 2018. *Rapport d'activité 2017 de la Réserve Naturelle Nationale de Camargue. Société nationale de protection de la nature – Réserve Naturelle Nationale de Camargue, 242 p*.

Comoretto L., Arfib B., & Chiron S. 2007. Pesticides in the Rhône river delta (France): Basic data for a field-based exposure assessment. *Science of The Total Environment*. 380(1), p. 124-132.

Congdon J.D., Dunham A.E., Hopkins W.A., Rowe C.L., & Hinton T.G. 2001. Resource allocation-based life histories: A conceptual basis for studies of ecological toxicology. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 20(8), p. 1698-1703.

Costanzo S.D., Watkinson A.J., Murby E.J., Kolpin D.W., & Sandstrom M.W. 2007. Is there a risk associated with the insect repellent DEET (N,N-diethyl-m-toluamide) commonly found in aquatic environments? *Science of The Total Environment*. 384(1), p. 214-220.

Dabrowska H., Fisher S.W., Estenik J., Kidekhel R., & Stromberg P. 2006. Polychlorinated Biphenyl Concentrations, Congener Profiles, and Ratios in the Fat Tissue, Eggs, and Plasma of Snapping Turtles (Chelydra s. serpentina) from the Ohio Basin of Lake Erie, USA. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 51(2), p. 270-286.

EEA. 2019. European Environment Agency. Disponible sur : < https://www.eea.europa.eu/fr/themes/water > (Consulté le 11 février 2019).

EL Hassani M.S., El Hassan E.M., Slimani T., & Bonnet X. 2019. Morphological and physiological assessments reveal that freshwater turtle (*Mauremys leprosa*) can flourish under extremely degraded-polluted conditions. *Chemosphere*. 220, p. 432-441.

Ficetola G.F. & De Bernardi F. 2006. Is the European « pond » turtle *Emys orbicularis* strictly aquatic and carnivorous? *Amphibia-Reptilia*. 27(3), p. 445-447.

Ficheux S., Olivier A., Fay R., Crivelli A., Besnard A., & Béchet A. 2014. Rapid response of a long-lived species to improved water and grazing management: The case of the European pond turtle (Emys orbicularis) in the Camargue, France. *Journal for Nature Conservation*. 22(4), p. 342-348.

Gaus C., Villa C.A., Dogruer G., Heffernan A., Vijayasarathy S., Lin C.-Y., Flint M., Hof C.M., & Bell I. 2019. Evaluating internal exposure of sea turtles as model species for identifying regional chemical threats in nearshore habitats of the Great Barrier Reef. *Science of The Total Environment*. 658, p. 732-743.

Goutte A., Barbraud C., Meillère A., Carravieri A., Bustamante P., Labadie P., Budzinski H., Delord K., Cherel Y., Weimerskirch H., & Chastel O. 2014. Demographic consequences of heavy metals and persistent organic pollutants in a vulnerable long-lived bird, the wandering albatross. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*. 281(1787), p. 20133313.

Guillot H., Bonnet X., Bustamante P., Churlaud C., Trotignon J., & Brischoux F. 2018. Trace Element Concentrations in European Pond Turtles (Emys orbicularis) from Brenne Natural Park, France. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 101(3), p. 300-304.

Jones K.C. & de Voogt P. 1999. Persistent organic pollutants (POPs): state of the science. *Environmental Pollution*. 100(1), p. 209-221.

Kakizoe Y., Sakaoka K., Kakizoe F., Yoshii M., Nakamura H., Kanou Y., & Uchida I. 2007. Successive changes of hematologic characterisitics and plasma chemistry values of juvenile loggerhead turtles (*Caretta caretta*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*. 38(1), p. 77-84.

Keller J.M., Kucklick J.R., Harms C.A., & McClellan-Green P.D. 2004. Organochlorine contaminants in sea turtles: Correlations between whole blood and fat. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 23(3), p. 726-738.

Keller J.M., Kucklick J.R., Stamper M.A., Harms C.A., & McClellan-Green P.D. 2004. Associations between Organochlorine Contaminant Concentrations and Clinical Health Parameters in Loggerhead Sea Turtles from North Carolina, USA. *Environmental Health Perspectives*. 112(10), p. 1074-1079.

Keller J.M., McClellan-Green P.D., Kucklick J.R., Keil D.E., & Peden-Adams M.M. 2006. Effects of Organochlorine Contaminants on Loggerhead Sea Turtle Immunity: Comparison of a Correlative Field Study and *In Vitro* Exposure Experiments. *Environmental Health Perspectives*. 114(1), p. 70-76.

Landrum P.F. & Fisher S.W. 1999. Influence of Lipids on the Bioaccumulation and Trophic Transfer of Organic Contaminants in Aquatic Organisms. Dans : Arts M.T., Wainman B.C. (éd.). *Lipids in Freshwater Ecosystems*. New York, NY : Springer New York, p. 203-234.

Lydersen C., Wolkers H., Severinsen T., Kleivane L., Nordøy E.S., & Skaare J.U. 2002. Blood is a poor substrate for monitoring pollution burdens in phocid seals. *Science of The Total Environment*. 292(3), p. 193-203.

Martin N. 2018. *Rapport de master 2 : Suivi à long terme d'une population de cistudes d'Europe en Camargue*. IUT Avignon

Ming-ch'eng Adams C.I., Baker J.E., & Kjellerup B.V. 2016. Toxicological effects of polychlorinated biphenyls (PCBs) on freshwater turtles in the United States. *Chemosphere*. 154, p. 148-154.

Moss S., Keller J.M., Richards S., & Wilson T.P. 2009. Concentrations of persistent organic pollutants in plasma from two species of turtle from the Tennessee River Gorge. *Chemosphere*. 76(2), p. 194-204.

Mourier B., Desmet M., Van Metre P.C., Mahler B.J., Perrodin Y., Roux G., Bedell J.-P., Lefèvre I., & Babut M. 2014. Historical records, sources, and spatial trends of PCBs along the Rhône River (France). *Science of The Total Environment*. 476-477, p. 568-576.

Namroodi S., Zaccaroni A., Rezaei H., & Hosseini S.M. 2017. European pond turtle (*Emys orbicularis persica*) as a biomarker of environmental pollution in Golestan and Mazandaran provinces, Iran. *Veterinary Research Forum*. 8(4), p. 333-339.

Oliveira Ribeiro C.A., Vollaire Y., Coulet E., & Roche H. 2008. Bioaccumulation of polychlorinated biphenyls in the eel (*Anguilla anguilla*) at the Camargue Nature Reserve – France. *Environmental Pollution*. 153(2), p. 424-431.

Olivier A. 2002. *Ecologie, traits d'histoire de vie et conservation d'une population de Cistude d'Europe Emys orbicularis en Camargue.* Ecole Pratique des Hautes Etudes, 165 p.

Olivier A., Barbraud C., Rosecchi E., Germain C., & Cheylan M. 2010. Assessing spatial and temporal population dynamics of cryptic species: an example with the European pond turtle. *Ecological Applications*. 20(4), p. 993-1004.

Olivier A., Pichard A., Filleux M., Arnaud A., Contournet P., & Willm L. 2008. Inventaires écologiques concernant des espèces de vertébrés de l'annexe 2 de la Directive « Habitats » liés à l'élaboration du DOCOB NATURA 2000 de la SIC FR 9301592 « Camargue » Amphibiens, reptiles et mammifères. , p. 64.

Orós J., Monagas P., Calabuig P., Luzardo O.P., & Camacho M. 2013. Pansteatitis associated with high levels of polychlorinated biphenyls in a wild loggerhead sea turtle *Caretta caretta*. *Diseases of Aquatic Organisms*. 102(3), p. 237-242.

Ottonello D., Salvidio S., & Rosecchi E. 2005. Feeding habits of the European pond terrapin Emys orbicularis in Camargue (Rhône delta, Southern France). *Amphibia-Reptilia*. 26(4), p. 562-565.

Pianka E.R. 1970. On r- and K-Selection. *The American Naturalist*. 104(940), p. 592-597.

Podloucky R. 1997. *Emys orbicularis* (Linnaeus, 1758). Dans : *Atlas of amphibians and reptiles in Europe*. , p. 170-171.

Poulier G., Launay M., Le Bescond C., Thollet F., Coquery M., & Le Coz J. 2019. Combining flux monitoring and data reconstruction to establish annual budgets of suspended particulate matter, mercury and PCB in the Rhône River from Lake Geneva to the Mediterranean Sea. *Science of The Total Environment*. 658, p. 457-473.

Relyea R.A. 2005. The Impact of Insecticides and Herbicides on the Biodiversity and Productivity of Aquatic Communities. *Ecological Applications*. 15(2), p. 618-627.

Roche H., Buet A., & Ramade F. 2003. Mise en évidence et validation de biomarqueurs écotoxicologiques dans la population d'anguilles d'un étang de la réserve naturelle nationale de Camargue, le Vaccarès, exposée à des polluants organiques persistants. *Revue d'Écologie*. (1), p. 77-102.

---. 2002. Relationships between persistent organic chemicals residues and biochemical constituents in fish from a protected area: the French National Nature Reserve of Camargue. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. 133(3), p. 393-410.

Roche H., Vollaire Y., Martin E., Rouer C., Coulet E., Grillas P., & Banas D. 2009. Rice fields regulate organochlorine pesticides and PCBs in lagoons of the Nature Reserve of Camargue. *Chemosphere*. 75(4), p. 526-533.

Rowe C.L. 2008. « The Calamity of So Long Life »: Life Histories, Contaminants, and Potential Emerging Threats to Long-lived Vertebrates. *BioScience*. 58(7), p. 623-631.

Slimani T., El Hassani M.S., El Mouden E.H., Bonnet M., Bustamante P., Brischoux F., Brault-Favrou M., & Bonnet X. 2018. Large-scale geographic patterns of mercury contamination in Morocco revealed by freshwater turtles. *Environmental Science and Pollution Research*. 25(3), p. 2350-2360.

SNPN & RNN Camargue. 2018. *Synthèse des contaminants chimiques dans les eaux des canaux de drainage, campagne 2018*.

Thienpont S. 2017. La Cistude d'Europe (*Emys orbicularis*) Plan national d'actions 2011-2015 Ministère de l'Ecologie, de l'Energie, du Développement durable et de la Mer. Disponible sur : < https://docplayer.fr/73540468-La-cistude-d-europe-emys-orbicularis-plan-national-d-actions.html > (Consulté le 31 janvier 2019).

Van de Merwe J.P., Hodge M., Olszowy H.A., Whittier J.M., & Lee S.Y. 2010. Using blood samples to estimate persistent organic pollutants and metals in green sea turtles (*Chelonia mydas*). *Marine Pollution Bulletin*. 60(4), p. 579-588.

Vives I., Grimalt J.O., Ventura M., Catalan J., & Rosseland B.O. 2005. Age dependence of the accumulation of organochlorine pollutants in brown trout (*Salmo trutta*) from a remote high mountain lake (Redó, Pyrenees). *Environmental Pollution*. 133(2), p. 343-350.

Wagner N., Mingo V., Schulte U., & Lötters S. 2015. Risk evaluation of pesticide use to protected European reptile species. *Biological Conservation*. 191, p. 667-673.

Weeks J.A., Guiney P.D., & Nikiforov A.I. 2012. Assessment of the environmental fate and ecotoxicity of N,N-diethyl-m-toluamide (DEET). *Integrated Environmental Assessment and Management*. 8(1), p. 120-134.

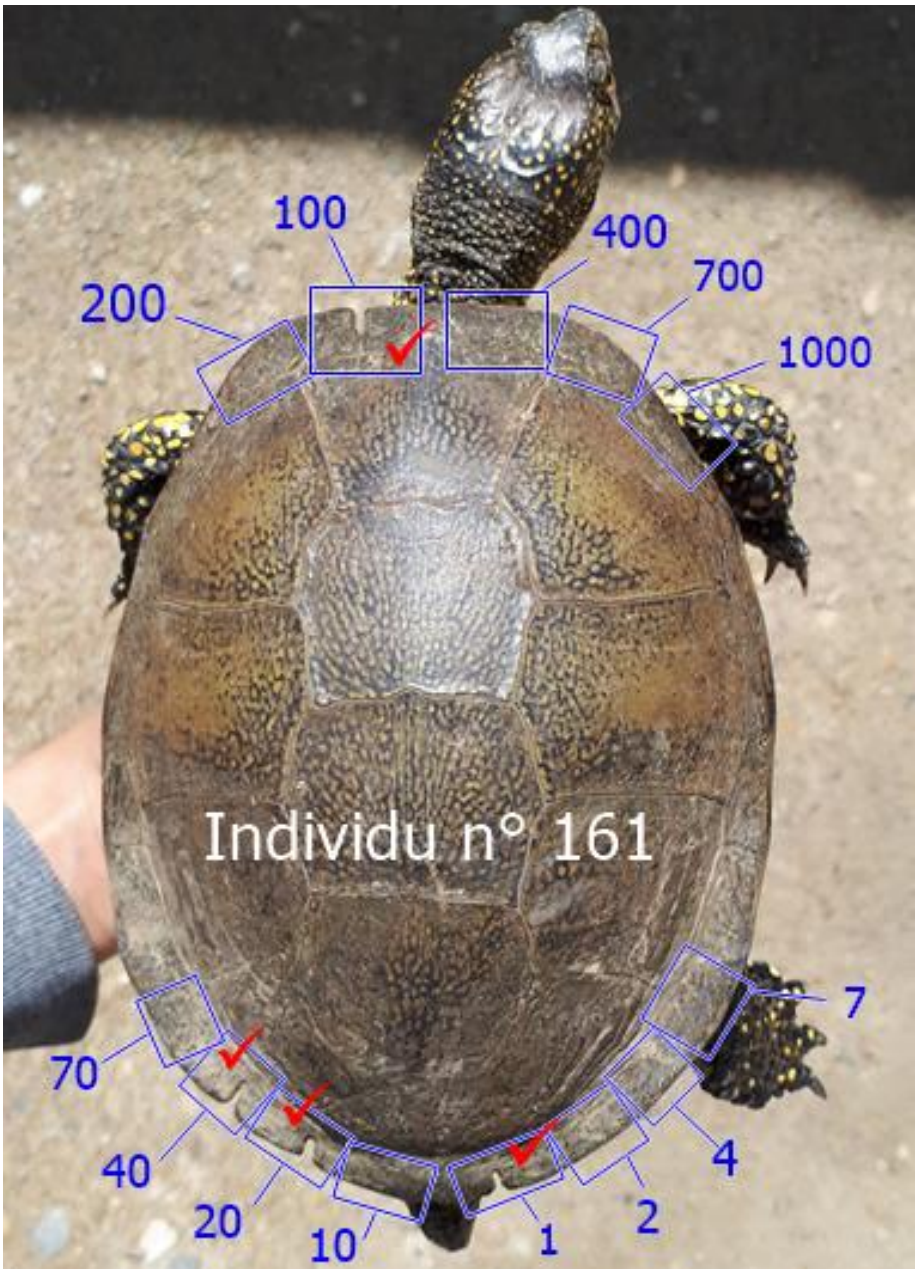
Yu S., Halbrook R.S., & Sparling D.W. 2012. Accumulation of Polychlorinated Biphenyls (PCBs) and Evaluation of Hematological and Immunological Effects of PCB Exposure on Turtles. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 88(6), p. 823-827.

Zhou W., Zhai Z., Wang Z., & Wang L. 2005. Estimation of n-octanol/water partition coefficients (Kow) of all PCB congeners by density functional theory. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*. 755(1), p. 137-145.

Zuur A., Ieno E.N., Walker N., Saveliev A.A., & Smith G.M. 2009. *Mixed Effects Models and Extensions in Ecology with R*. Springer Science & Business Media, 579 p.

Annexes

Annexe 1 : Photographie d'une cistude marquée à la scie à métaux. Certaines écailles correspondent à un numéro. Les numéros de chaque écaille entaillée sont additionnés pour donner le numéro de suivi de l'individu.



Annexe 2 : Fiche de renseignements biométriques des individus capturés.

CISTUDE TdV – Fiche de biométrie

Numéro :

Date : **Observateur :**

Site : **Marqueur :**

Station :

Engin :

……

Sexe : **Féconde (O/N) :**

Couleur de l'iris : **Masse (g) :**

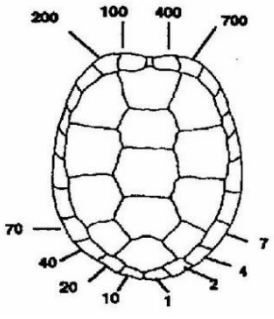
Longueur dos droite : **Largeur dos droite :**

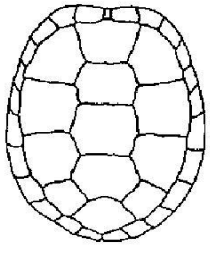
Longueur plastron : **Largeur plastron :**

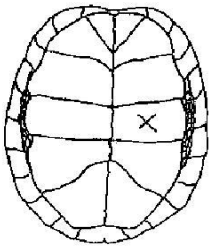
Hauteur plastron : **Longueur écaille ventrale (x) :**

Stade d'usure :

Observations :……







Annexe 3 : Dérogation pour la capture et la manipulation de cistudes à la Tour du Valat.

Liberté • Égalité • Fraternité
RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
PREFET DES BOUCHES-DU-RHONE

DIRECTION DE LA CITOYENNETE, DE LA LEGALITE
ET DE L'ENVIRONNEMENT
Bureau de l'utilité publique
de la concertation et de l'environnement

DIRECTION REGIONALE DE L'ENVIRONNEMENT
DE L'AMENAGEMENT ET DU LOGEMENT

ARRÊTÉ
portant dérogation à la législation relative aux espèces protégées

Le Préfet de la région Provence, Alpes, Côte d'Azur,
Préfet de la zone de défense et de sécurité sud
Préfet des Bouches du Rhône,

VU le code de l'environnement, notamment ses articles L.171-7, L.171-8, L.411-1, L.411-2, L415-3 et R.411-1 à R411-14,

VU l'arrêté interministériel du 19 février 2007 modifié, fixant les conditions de demande et d'instruction des dérogations définies au 4° de l'article L.411-2 du code de l'environnement portant sur des espèces de faune et de flore protégées,

VU l'arrêté du 19 novembre 2007 fixant les listes des amphibiens et des reptiles protégés sur l'ensemble du territoire et les modalités de leur protection,

VU la demande de dérogation déposée le 23 janvier 2018 par le Conservatoire d'espaces naturels Provence-Alpes-Côte d'Azur (CEN PACA), composée du formulaire CERFA n°13616*01, daté du 23 janvier 2018 et de ses pièces annexes,

VU l'avis du 14 mars 2018 formulé par le conseil scientifique régional du patrimoine naturel (CSRPN) de Provence-Alpes-Côte d'Azur (PACA),

VU la consultation du public réalisée sur le site internet de la DREAL PACA du 28 février 2018 au 15 mars 2018,

Considérant l'importance que revêt une meilleure connaissance de la Cistude d'Europe, Emys orbicularis, notamment de sa répartition sur la région, à travers des inventaires et suivis de populations, afin de pouvoir y assurer sa conservation,

Sur proposition de la directrice régionale de l'environnement, de l'aménagement et du logement,

ARRETE

Article 1 : Identité du bénéficiaire de la dérogation

Conservatoire d'espaces naturels Provence-Alpes-Côte d'Azur (CEN PACA), Appartement n°5, 96 rue Droite, 04 200 Sisteron et ses mandataires Cédric Roy (coordinateur), Julien Renet, Philippe Vandewalle, Benjamin Bricault, Silke Befeld, Anthony Olivier, Vincent Rivière, Joel Torres, Stéphanie Bertrand, Vincent Morcillo, Serge Rouberty, Laetitia Poulet, Elodie Gerbeau, Christian Reljic, Gérald Bosio, Roland Koning et Isabelle Quoniam.

Article 2 : Nature de la dérogation

Le bénéficiaire et ses mandataires, ces derniers sous la responsabilité et la coordination du bénéficiaire, sont autorisés à capturer, marquer et relâcher sur place un nombre indéterminé d'individus de Emys orbicularis. La capture peut être effectuée à la main, à l'aide d'une épuisette, de cages « Fesquet », de nasses ou de verveux, toujours avec une partie émergée pour permettre la respiration des individus capturés. Des stagiaires sont autorisés à participer aux captures, en présence et sous la responsabilité de l'un des mandataires.

Le mandataire Anthony Olivier, de la Tour du Valat, est autorisé à prélever des échantillons de sang sur les individus capturés. La présente dérogation vaut autorisation de transport du matériel biologique vers le centre d'études biologiques de Chizé, 405, route de Prissé la Charrière, 79360 Villiers-en-Bois et vers le laboratoire « littoral environnement et sociétés » (LIENS), situé respectivement bâtiment ILE, 2 rue Olympe de Gouges, 17 000 La Rochelle et bâtiment Marie Curie, avenue Michel Crépeau, 17 042 La Rochelle.

Les mandataires Vincent Rivière et Joël Torres sont autorisés à équiper d'un émetteur 3 individus femelles au total dans le cadre de leur recherche de sites de ponte des individus capturés.

Les captures peuvent être organisées sur toute la zone de présence de l'espèce au sein des cantons d'Arles, Berre l'Etang, Chateaurenard, Istres, Marignane, Martigues, Pélissanne, Salon de Provence, et Trets.

La présente autorisation ne dispense pas d'autres accords ou autorisations qui pourraient être par ailleurs nécessaires pour la réalisation de l'opération, notamment l'autorisation des propriétaires des sites concernés.

Article 3 : Durée de validité de l'autorisation

La présente décision est accordée pour les années 2018 et 2019.

Article 4 : Suivi

Sous réserve des dispositions spécifiques prévues à l'article 2, le bénéficiaire rendra compte à la direction régionale de l'environnement, de l'aménagement et du logement PACA, sous la forme d'un rapport de synthèse, des conditions d'exécution de la présente dérogation.
Les données d'inventaire seront versées au système d'information sur la nature et les paysages (base régionale SILENE) par le bénéficiaire.

Annexe 4 : Tableau des caractéristiques méthodologiques relatives aux analyses GC-MS/MS (Tr : temps de rétention, EC : énergie de collision (eV)). En vert : les pesticides organochlorés, en jaune : les PCB, en blanc : les EI.

Segments	Composé	Tr	Precursor ion	Product ion	EC
I : de 6 à 23,5 min	PeCB	14,5	250	215	25
			250	142	40
	alpha-HCH	14,5	217	181	10
			181	145	20
	DEET	16	119	91	10
			119	65	30
	beta-HCH	19,4	181	145	20
			217	181	10
	HCB	19,5	249	214	13
			284	249	18
	PCB_30	19,8	256	186	25
			256	151	25
	Lindane d6	21,4	224	187	10
			224	150	20
	Lindane	21,4	217	181	10
			181	145	20
	delta-HCH	21,7	217	181	10
			181	145	20
	Quintozene	22-34	237	119	25
				143	30
II : de 23,5 à 35,5 min	PCB_28	24	256	186	25
			256	151	25
	Aldrin	26,8	263	193	35
			261	191	30
	Heptachlor	24,5-34 (24,3)	272	237	15
			274	237	15
	Isodrin	27,3	263	193	30
			263	191	30
	Isobenzan	27,4	311	241	25
			313	243	25
	PCB_52	25,7	292	222	27
			292	220	27
	Heptachlor epoxid	29,4	353	263	10
			355	265	15
	Heptachlor-exo-epoxide (cis-, isomer B	29,5	353	263	25
			353	282	20
	Endrin	29,3	261	191	30
			263	193	30
	Heptachlor-endo-epoxide (trans-, isomer A) 2 pics	29,8 et 31,6 (29,8)	289	253	15
			289	219	15
	PCB_101	31,5	326	256	27

			326	254	27
	44'-DDE	33,3	246	176	20
			318	248	20
	PCB 81	34,3	292	222	27
			292	220	27
	PCB 77	35,2	292	222	27
			292	220	27
III: de 35,5 à 52 min	PCB_107	36	326	256	27
			326	254	27
	PCB 123	36,2	326	256	27
			326	254	27
	PCB_118	36,5	326	256	27
			326	254	27
	PCB 114	37	326	256	27
			326	254	27
	PCB_153	37,5	360	290	27
			360	325	12
	44'-DDD	37,1	235	165	20
			235	199	15
	PCB 105	38,4	326	256	27
			326	254	27
	44'-DDT	39,2	235	165	20
				199	15
	PCB_138	39,4	360	290	27
			360	325	12
	PCB 126	40,9	326	256	27
			326	254	27
	PCB 167	41,8	360	290	27
			360	325	12
	PCB 156	43,4	360	290	27
			360	325	12
	PCB 157	43,8	360	290	27
			360	325	12
	PCB_180	43,9	394	324	20
			394	359	20
	PCB 169	46,2	360	290	27
			360	325	12
	PCB 189	48,4	394	324	20
			394	359	20

Annexe 5 : Tableau récapitulatif de l'élaboration des gammes de calibration servant à la construction des courbes d'étalonnage sur GC-MS/MS.

N° gamme	Concentration solution (ng/µL)	1	2	3	4	5	6	7
Masse vial Mix pest (26) (ng)	-	5	10	25	50	100	200	500
Masse vial PCB dioxine like (12) ng		5	10	25	50	100	200	500
Masse vial PeCB/DEET ng		5	10	25	50	100	200	500
Masse vial EI 2 PCB (ng)		10						
Masse vial EI organochl (ng)	-	50						
Volume Mix pest (µl)	1	5	10	25	50	100	-	-
	10	-	-	-	-	-	20	50
Volume Mix PCB dioxine like (µL)	1	5	10	25	50	100	-	-
	10	-	-	-	-	-	20	50
Volume PeCB/DEET (µL)	1	5	10	25	50	100	-	-
	10	-	-	-	-	-	20	50
Volume Mix EI PCB (µl)	1	10						
Volume EI organochlorés (Lindane-d6)	10	5						
Volume isooctane (µl)	-	370	355	310	250	85	325	235
		Dans vial avec restricteur 400 µL						

Annexe 6 : Tableaux récapitulatifs des limites de quantification et de la validation méthodologique de par le rendement des analyses.

RENDEMENT MANIP Plasma PCB/OCP					
	Moyenne	SD (%)	Rendement	Erreur relative	Justesse (%)
Famille/composé					
PeCB	85	9	85	-15	85
Alpha HCH	79	5	79	-21	79
DEET	76	58	76	-24	76
beta HCH	92	3	92	-8	92
HCB	76	3	76	-24	76
Lindane	105	3	105	5	95
Delta HCH	104	3	104	4	96
Quintozene	80	5	80	-20	80
pcb 28	100	1	100	0	100
Heptachlor	114	11	114	14	86
Aldrin	96	5	96	-4	96
pcb 52	104	2	104	4	96
Isodrin	4	57	4	-96	4
Isobenzan	104	8	104	4	96
Endrin	9	18	9	-91	9
Heptachlor epoxid	35	16	35	-65	35
pcb 101	112	2	112	12	88
44'-DDE	103	1	103	3	97
pcb 81	110	5	110	10	90
pcb 77	141	3	141	41	59
pcb 123	88	6	88	-12	88
pcb 118	190	3	95	-5	95
pcb 114	92	6	92	-8	92
44'-DDD	144	7	144	44	56
pcb 153	93	3	93	-7	93
pcb 105	101	1	101	1	99
44'-DDT	117	4	117	17	83
pcb 138	159	3	80	-20	80
pcb 126	106	5	106	6	94
pcb 167	103	2	103	3	97
pcb 156	114	1	114	14	86
pcb 157	124	6	124	24	76
pcb 180	111	7	111	11	89
pcb 169	115	2	115	15	85
pcb 189	137	4	137	37	63

Limite de quantification	
	LOQ (ng/mL)
Famille/composé	
PeCB	0,6
Alpha HCH	1,9
DEET	2,0
beta HCH	0,9
HCB	0,2
Lindane	1,7
Delta HCH	1,3
Quintozene	1,6
pcb 28	1,0
Heptachlor	2,8
Aldrin	1,0
pcb 52	0,2
Isodrin	1,0
Isobenzan	0,6
Endrin	1,0
Heptachlor epoxid	1,2
pcb 101	2,3
44'-DDE	1,1
pcb 81	0,9
pcb 77	1,0
pcb 123	2,6
pcb 118	3,1
pcb 114	2,8
44'-DDD	1,1
pcb 153	0,2
pcb 105	2,1
44'-DDT	2,4
pcb 138	1,8
pcb 126	2,3
pcb 167	1,0
pcb 156	1,3
pcb 157	1,1
pcb 180	0,3
pcb 169	1,4
pcb 189	0,4

Annexe 7 : Tableau décrivant les différences de nombre et de pourcentage d'individus contaminés ainsi que les concentrations moyennes détectées par molécules en fonction du sexe des cistudes (en jaune : les molécules avec plus de 20% d'occurrence).

Annexe 7.1 : Tableau descriptif pour le site de l'Esquineau.

	Nombre d'individus contaminés		Pourcentage d'individus contaminés		Concentrations moyennes détectées (ng/mL)	
	Femelles	Mâles	Femelles	Mâles	Femelles	Mâles
Alpha HCH	1	1	1%	2%	0,031	0,046
DEET	29	18	38%	36%	47,883	50,650
beta HCH	3	3	4%	6%	0,074	0,081
HCB	4	5	5%	10%	0,020	0,031
Delta HCH	1	1	1%	2%	0,019	0,045
pcb 28	9	1	12%	2%	0,215	0,037
pcb 52	32	13	42%	26%	0,666	0,354
Aldrin	1	0	1%	0%	0,014	0,000
Isobenzan	2	1	3%	2%	0,019	0,014
Isodrin	1	1	1%	2%	0,025	0,022
Heptachlor epoxid	8	3	11%	6%	0,423	0,193
Heptachlor-endo-epoxide	16	9	21%	18%	1,122	0,748
pcb 101	2	0	3%	0%	0,095	0,000
44'-DDE	1	2	1%	4%	0,018	0,085
pcb 81	1	1	1%	2%	0,013	0,042
pcb 77	0	1	0%	2%	0,000	0,044
pcb 123	1	0	1%	0%	0,034	0,000
44'-DDD	3	1	4%	2%	0,165	0,195
pcb 153	34	24	45%	48%	0,186	0,284
44'-DDT	1	1	1%	2%	0,037	0,072
pcb 138	6	4	8%	8%	0,273	0,155
pcb 180	2	1	3%	2%	0,016	0,016
pcb 169	0	1	0%	2%	0,000	0,037
pcb 189	2	1	3%	2%	0,016	0,023

Annexe 7.2: Tableau descriptif pour le site des Faïsses.

	Nombre d'individus contaminés		Pourcentage d'individus contaminés		Concentrations moyennes détectées (ng/mL)	
	Femelles	Mâles	Femelles	Mâles	Femelles	Mâles
DEET	16	13	57%	65%	21,107	35,142
beta HCH	1	0	4%	0%	0,035	0,000
HCB	5	4	18%	20%	0,075	0,058
Delta HCH	1	1	4%	5%	0,079	0,070
pcb 52	18	15	64%	75%	0,694	0,768
Aldrin	1	0	4%	0%	0,041	0,000
Isobenzan	3	3	11%	15%	0,109	0,263
Heptachlor-endo-epoxide	7	7	25%	35%	0,766	0,872
44'-DDE	1	0	4%	0%	0,085	0,000
pcb 81	1	0	4%	0%	0,042	0,000
pcb 77	1	0	4%	0%	0,041	0,000
44'-DDD	1	2	4%	10%	0,089	0,220
pcb 153	9	5	32%	25%	0,128	0,133
pcb 138	2	1	7%	5%	0,079	0,054
pcb 180	1	1	4%	5%	0,019	0,042
pcb 189	0	1	0%	5%	0,000	0,044