Le Mans Université
Faculté des Sciences & Techniques
Avenue Olivier Messiaen
72085 LE MANS Cedex 09
02 43 83 26 40

Tour du Valat
Le Sambuc – 13200 Arles
04 90 97 20 13

Mémoire de fin d'études pour l'obtention du Master 2 en Toxicologie et Écotoxicologie

Projet de Recherche :

Exposition aux pesticides chez la cistude d'Europe *(Emys orbicularis)* au sein de la Réserve Naturelle Régionale de la Tour du Valat en Camargue

Présenté par Yvann Foucault

Réalisé sous la direction de :

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

En collaboration avec :

Année universitaire (2020-2021)

Remerciements

Avant tout développement sur cette expérience professionnelle très enrichissante, je tiens à remercier mes encadrants de stage pour m'avoir permis de réaliser ce stage dans les meilleures conditions malgré la pandémie de Covid-19. Un grand merci à Aurélie Goutte pour tout le temps qu'elle m'a consacré, de son accueil dans les locaux de l'UMR METIS à la Sorbonne, de m'avoir grandement aidé dans les analyses statistiques et d'avoir organisé des réunions afin de suivre l'avancement de mon stage et de mon mémoire. Je tiens aussi à remercier Anthony Olivier pour m'avoir accueilli à la Tour du Valat, pour m'avoir fait partager sa passion de la Camargue et pour m'avoir fait découvrir les cistudes d'Europe. Merci à Olivier Lourdais et Marion Vittecoq pour leurs nombreux conseils avisés bien que l'on ne se soit vus que très rarement.

Merci à Fabrice Alliot et Sira Traoré pour m'avoir énormément aidé au laboratoire, que ça soit sur l'extraction des pesticides, les analyses au LC-MS/MS ou les quantifications sur MassHunter. Je remercie également Sylvie Collin pour m'avoir permis de partager son bureau et pour les échanges concernant ses recherches.

Je tiens aussi à remercier l'ensemble du personnel de la Tour de Valat, pour leur accueil, leur gentillesse et leur écoute. Vous m'avez permis de réaliser une partie de mon stage dans un cadre magnifique et convivial. Un grand merci à tous les stagiaires et doctorants de la Tour du Valat pour l'ambiance incroyable et la solidarité que vous dégagez.

Je remercie aussi Nicolas Martin, Clément le Gac, Aésane Meric, Carole Leray, Louis Spinner et Louisiane Burkart pour avoir réalisé une grande partie des prélèvements sanguins de 2018 à 2020, sans vous ce stage n'aurait pas eu lieu.

Merci à Arthur De France d'avoir passé du temps avec moi sur le terrain, c'était agréable de travailler avec ta bonne humeur et ton efficacité. J'espère pouvoir retravailler un jour avec toi.

Enfin je remercie Sara Zeghmi, ma compagne, pour son soutien pendant toute la durée de ce stage. Merci pour tout ce que tu m'apportes, merci d'être à mes côtés, vivre avec toi me remplit de bonheur.

Liste des Abréviations

AMM : Autorisation de mise sur le marché

CMA : Concentration maximale admissible

CMR : Capture-marquage-recapture

F : Femelle

GLM : Modèles linéaires généralisés

GLMM : Modèles linéaires généralisés à effets mixtes

LC-MS/MS : Chromatographie en phase liquide couplée à un spectromètre de masse en tandem

LDD : Longueur dos droite

LOQ : Limite de quantification

M : Mâle

NQE : Norme de qualité environnementale

PP : Produit phytopharmaceutique

rpm : Rotation par minute

SEQeau : Système d'évaluation de la qualité de l'eau

SNPN : Société nationale de protection de la nature

Table des matières

I. Introduction 1
II. Matériels et Méthodes 7
1. Sites de capture des cistudes d'Europe 7
2. Méthode de piégeage et mesures biométriques 9
3. Prise de sang 11
4. Dosage des pesticides dans le plasma 11
5. Analyses statistiques 15
III. Résultats 17
1. Analyses descriptives des données brutes 17
2. Différences individuelles 21
3. Différences spatiales 21
4. Différences temporelles 23
IV. Discussion 25
V. Conclusion 31
Bibliographie 33
Annexes 37

Sommaire des Figures

Figure 1 : La Tour du Valat parmi les espaces protégés camarguais 2
Figure 2 : Le canal du Fumemorte..... 2
Figure 3 : Aire de répartition de la cistude d'Europe..... 4
Figure 4 : Dimorphisme sexuel de la cistude d'Europe..... 4
Figure 5 : Les stations de piégeages des cistudes à la Tour du Valat..... 6
Figure 6 : Les deux grands sites de capture à la Tour du Valat définis selon les types de canaux..... 6
Figure 7 : Verveux simple (à gauche) et double (à droite)..... 8
Figure 8 : Mesure de la LDD..... 8
Figure 9 : Cistude marquée à la scie à métaux 8
Figure 10 : Panel de l'ensemble des stades d'usure 10
Figure 11 : Prise de sang d'une cistude..... 10
Figure 12 : Extraction des pesticides sous une sorbonne à l'UMR METIS 12
Figure 13 : Schéma de la composition d'une LC-MS/MS 12
Figure 14 : Concentration plasmatique de la somme des pesticides (échelle logarithmique) en fonction des sites. Seules les valeurs > LOQ sont représentées..... 20
Figure 15 : Concentration plasmatique de la bentazone (échelle logarithmique) en fonction des sites. Seules les valeurs > LOQ sont représentées 20
Figure 16 : Concentration plasmatique de l'imidaclopride et de ses métabolites (échelle logarithmique) en fonction des sites. Seules les valeurs > LOQ sont représentées 22
Figure 17 : Concentration plasmatique de la somme des pesticides (échelle logarithmique) en fonction de la date et de l'année. Seules les valeurs > LOQ sont représentées..... 22
Figure 18 : Concentration plasmatique de la bentazone (échelle logarithmique) en fonction de la date. Seules les valeurs > LOQ sont représentées 24
Figure 19 : Concentration plasmatique de l'imidaclopride et de ses métabolites (échelle logarithmique) en fonction de la date. Seules les valeurs > LOQ sont représentées 24
Figure 20 : Évolution de la somme des pesticides de 2011 à 2020 dans le canal du Fumemorte (SNPN) 26
Figure 21 : Le carrefour de Fiélouse en Camargue 28

Sommaire des Tableaux

Tableau I : Répartition des 418 échantillons sanguins selon le site de capture, l'année de capture et le sexe des cistudes (F = femelle et M = mâle)..... 10

Tableau II : Paramètres de la source électrospray de la LC-MS/MS..... 12

Tableau III : Limites et fréquences de quantification des pesticides analysés lors des 3 années (en rouge les pesticides retenus et en vert les pesticides jamais détectés) 14

Tableau IV : Nombre de pesticides quantifiés par échantillons 14

Tableau V : Nombre de cistudes contaminées par les composés selon l'année et le site de capture (en rouge les pesticides retenus et en vert les pesticides jamais détectés). Les valeurs entre parenthèse au niveau des années et des sites correspondent à la répartition des 418 prises de sang 16

Tableau VI : Représentation des valeurs moyennes et maximales (moyenne ; maximale) en ng/g des composés selon l'année et le site de capture des cistudes (en rouge les pesticides retenus et en vert les pesticides jamais détectés)..... 18

Tableau VII : Système d'évaluation de la qualité de l'eau..... 26

Tableau VIII : Synthèse de la bentazone (ng/L) retrouvée dans le canal du Fumemorte (SNPN)..... 26

Sommaire des Annexes

Annexe 1 : Dérogation préfectorale pour la capture et la manipulation des cistudes à la Tour du Valat..... 37
Annexe 2 : Fiche de renseignements biométriques des individus capturés..... 39
Annexe 3 : Paramètres de l'analyse en LC-MS/MS (en orange les étalons internes et en vert les natifs) 40
Annexe 4 : Validation méthodologique de la LC-MS/MS 42
Annexe 5 : Gradient de la phase mobile de la LC-MS/MS 42

I. Introduction

La contamination des écosystèmes aquatiques par les rejets industriels, agricoles ou domestiques présente une menace potentielle pour les organismes (Malaj et al. 2014). Les pesticides ainsi que leurs produits de dégradation (aussi appelés résidus) sont particulièrement préoccupants, en raison de leur diversité, leur ubiquité et de leur toxicité sur les organismes non-cibles. L'usage des insecticides, herbicides ou encore fongicides regroupés sous le nom de pesticides ou encore de produits phytopharmaceutiques (PP), a permis d'améliorer les rendements des cultures afin de satisfaire la demande nutritionnelle liée à l'accroissement de la population mondiale. Cependant, cette utilisation a également provoqué des effets indirects et néfastes sur l'environnement (Adams et al., 1993). De nombreuses études ont montré la présence de résidus de pesticides dans les aliments (Nunes et al., 1995) ainsi que la contamination des eaux souterraines et superficielles (Di Corcia & Marchetti, 1992). Une très grande partie des pesticides répandus n'atteignent pas leurs cibles (volatilisation, ruissellement et lessivage) et se diffusent dans les compartiments de l'environnement (air, eau et sol). Leurs impacts sur les organismes dépendent à la fois de leur mode d'action, des niveaux de contamination environnementale, des durées d'exposition et de leurs sous-produits de dégradation qui peuvent être parfois plus toxiques que la molécule mère (Malaj et al. 2014).

Les zones humides comptent parmi les écosystèmes les plus exposés à des cocktails de substances toxiques, ces réservoirs de biodiversité sont fortement impactés par les activités anthropiques (Cheiron et al., 2019 ; Comoretto et al., 2007). La convention de Ramsar de 1971 est un traité international sur la conservation et l'utilisation durable des zones humides, elle vise à limiter les dégradations de ces environnements riches en biodiversité. Les zones humides méditerranéennes font partie des écosystèmes les plus divers et les plus productifs, elles fournissent des services essentiels à d'innombrables espèces animales et végétales pour leur survie. L'évaluation du niveau de contamination des organismes vivant aux pesticides dans cet écosystème est indispensable, cela permet de mettre en relation l'exposition et les effets des PP, en particulier sur les espèces bioindicatrices (Relyea, 2005).

La Camargue est la plus grande zone humide de France (150 000 hectares), abritant de nombreuses espèces menacées et protégées qui ont un fort enjeu patrimonial (Hellio et al., 2020 ; Mesléard, 2018). Afin de conserver et protéger ce territoire constituant le delta du Rhône, de multiples outils de protection de la nature ont été mis en place comme des réserves naturelles ou l'acquisition de sites par le conservatoire du littoral. La Tour du Valat est située au cœur de la Camargue (Figure 1), il s'agit d'un institut de recherche privé dont le domaine s'étend sur 2 700 hectares dont 1844 sont classés en réserve naturelle régionale. L'institut a été fondé en 1954 par le naturaliste et biologiste Luc Hoffmann afin de préserver un domaine qui héberge une grande diversité de milieux et accueille de nombreuses espèces d'oiseaux, de poissons, de reptiles ou encore d'invertébrés.

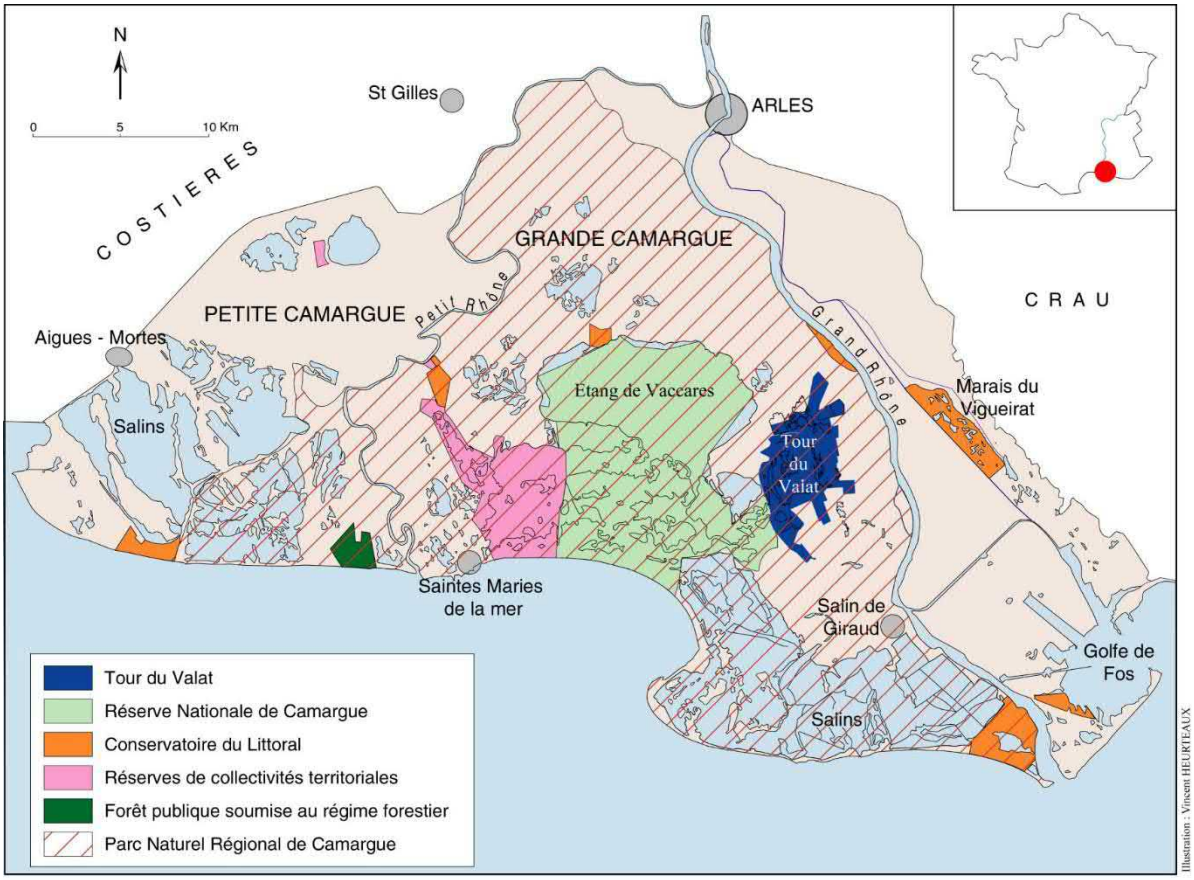


Figure 1 : La Tour du Valat parmi les espaces protégés camarguais



Figure 2 : Le canal du Fumemorte

Au-delà de son rôle de préservation de la biodiversité, la Tour du Valat réalise des programmes de recherche qui sont menés par des équipes de scientifiques à l'échelle du bassin méditerranéen, afin de mieux comprendre le fonctionnement des zones humides pour en évaluer les menaces et les enjeux. Ces études servent à renforcer les connaissances concernant le fonctionnement des écosystèmes et contribuent ainsi à leur conservation. Le bassin versant de Camargue est totalement artificialisé par l'existence d'un système de digues de protection des crues du Rhône et d'un réseau de canaux d'irrigation et de drainage comme le canal du Fumemorte (Figure 2). À part les précipitations, les approvisionnements en eaux sont anthropiques et servent principalement à l'irrigation des parcelles agricoles, cet apport se fait par une station de pompage captant l'eau douce du Rhône. Ce bassin versant reçoit non seulement les polluants charriés par le Rhône, mais il draine aussi les nombreux pesticides et leurs résidus issus notamment de la riziculture et du maraîchage (Oliveira et al., 2008). L'interconnexion des zones humides avec les zones agricoles adjacentes conduit à une contamination chronique des écosystèmes aquatiques et de leurs réseaux trophiques.

Tous les mois depuis 2011, 800 molécules sont recherchées dans le canal du Fumemorte par la société nationale de protection de la nature (SNPN). On estime que 90% des pesticides retrouvés dans les lagunes et les canaux de Camargue sont issus de la culture de riz (Comoretto et al., 2008). En particulier, la vidange des rizières suite aux applications en pré- et post-semis des graines dans les champs provoque des pics de concentration d'herbicides (bentazone, oxadiazon, propanile) d'avril à juin (Cormoretto et al., 2008). En mai 2018, les teneurs en oxadiazon, un herbicide faiblement biodégradable, avec une demi-vie dans l'eau de 585 jours à 20°C, étaient de 3400 ng/L soit plus de 10 fois supérieures à la norme de qualité environnementale (NQE) exprimée en concentration maximale admissible (CMA) dans l'eau du canal du Fumemorte (Cheiron et al., 2019). La pollution par les herbicides est considérée être responsable de l'effondrement en surface des herbiers de zostères de l'étang du Vaccarès (Espel et al., 2019), réceptacle du canal du Fumemorte. Les niveaux de pesticides actuellement utilisés n'ont pas été décrits dans la faune camarguaise. Seuls les polluants historiques persistants (PCB, pesticides organochlorés) bannis depuis plusieurs décennies ont été étudiés dans les oiseaux, reptiles et poissons en Camargue (Burkart et al., 2021). Chez les vertébrés, les pesticides peuvent induire des effets délétères variés, avec des répercussions possibles sur les populations et les communautés biologiques (Köhler & Triebskorn, 2013).

Les espèces prédatrices et longévives présentent des niveaux de contamination parfois élevés et vont jouer un rôle de sentinelle de l'état des milieux (Slimani et al., 2018). C'est notamment le cas des polluants organiques dits persistants, qui sont bioaccumulables (la contamination augmente au cours de la vie de l'organisme) et bioamplifiables (la contamination augmente des proies aux prédateurs), en raison de leur faible biodégradabilité et de leur caractère lipophile. Les polluants plus hydrosolubles (log Kow plus bas) et plus facilement biodégradables ont un faible potentiel bioaccumulateur et bioamplifiable (Goutte et al., 2020). Après métabolisation, ils sont rapidement éliminés et ne sont pas ou peu détectables dans l'organisme. Toutefois, si l'exposition est supérieure à l'élimination alors on devrait avoir une bioaccumulation du polluant dans l'organisme.

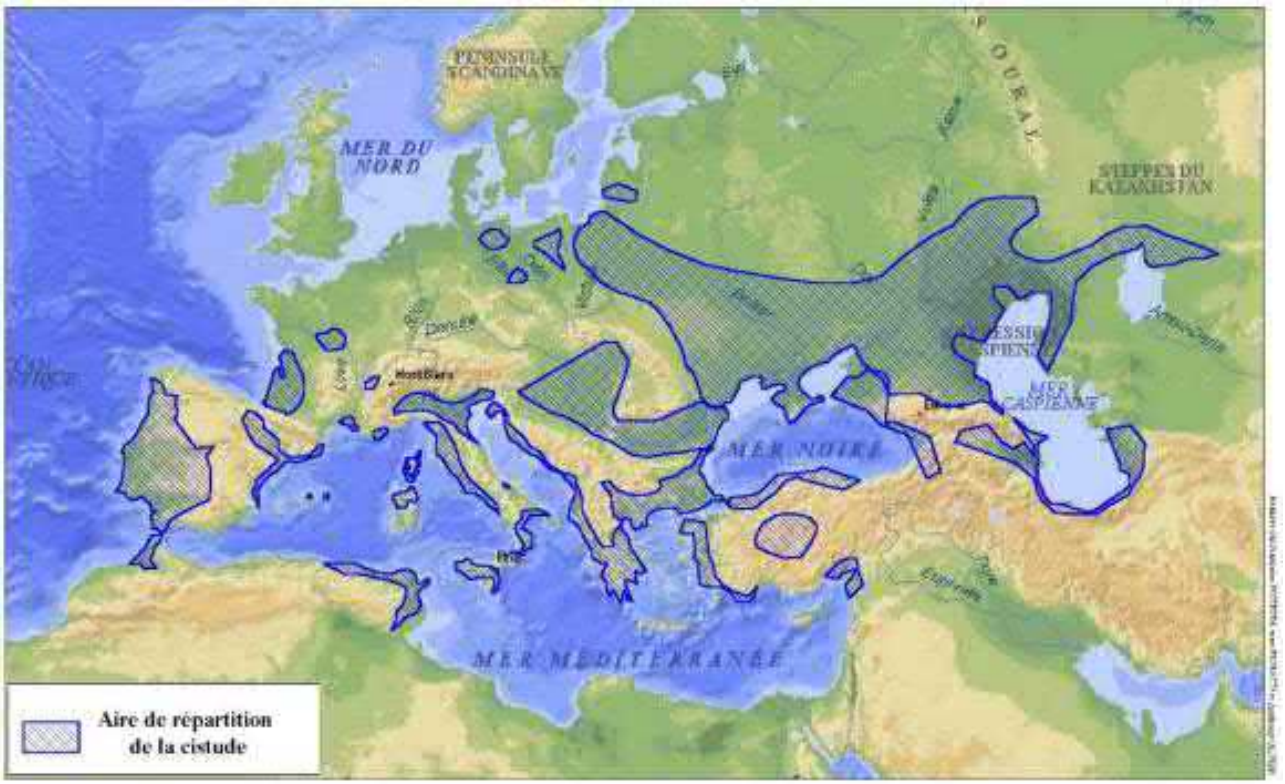


Figure 3 : Aire de répartition de la cistude d'Europe



Caractéristiques morphologiques de la femelle, ©Aésane Meric, 2019



Caractéristiques morphologiques du mâle, ©Aésane Meric, 2019

Figure 4 : Dimorphisme sexuel de la cistude d'Europe

La cistude d'Europe *Emys orbicularis* est une tortue aquatique prédatrice susceptible d'être exposée à de forts niveaux de contamination en raison de son niveau trophique (Wagner et al., 2015). Elle est considérée comme une espèce bioindicatrice du fait de son abondance en Camargue, de sa sensibilité à l'environnement (bioaccumulation et bioamplification), de sa longévité (> 40-60 ans), de sa faible capacité de dispersion, de son métabolisme bas, de sa sédentarité et de la facilité de capture (Namroodi et al., 2017). En Europe, ce reptile a connu une forte régression entre 1970 et 1990 (Figure 3 ; Podloucky, 1997) à cause des pressions anthropiques, de la disparition des zones humides, des introductions d'espèces exotiques (par exemple la tortue de Floride qui la concurrence) ou encore du faible taux de survie à l'état juvénile (90% des juvéniles subissent la prédation). Cette espèce vivant dans les zones humides est considéré comme menacée et protégée par la convention de Berne de 1979. Le déclin de cette espèce peut provoquer des problèmes trophiques (absence de prédateur), il est nécessaire de la protéger des pesticides car on sait notamment que chez les tortues d'eau douce, le sexe des individus peut être modifié par les polluants (Matsumuto et al., 2014). D'autres études ont montré que l'exposition aux herbicides peut altérer les défenses oxydatives (Héritier et al., 2017) et que des dommages sur les chromosomes ont également pu être mis en relation avec les contaminants (Matson et al., 2005). Ces effets peuvent se répercuter de l'échelle des individus et à celle des populations (Salice et al., 2014).

La cistude d'Europe a des pattes palmées avec de fortes griffes qui facilitent les déplacements dans l'eau comme sur terre. La dossière (face dorsale) est ovale, de couleur vert olive à noir, fréquemment ornée de points ou stries jaunes. La face ventrale appelée plastron est plutôt claire avec quelques motifs noirs. Elle est principalement charognarde mais elle se nourrit aussi d'animaux vivants comme les larves d'amphibien, les mollusques et les insectes aquatiques (Ottonello et al., 2005). En Camargue, sa proie principale est l'écrevisse de Louisiane *Procambarus clarkii*, c'est une espèce exotique introduit à la fin du 19ème siècle en Europe. La cistude participe ainsi à l'équilibre écologique des zones humides. Le dimorphisme sexuel (Figure 4) est marqué et se distingue sur quatre facteurs : la taille de la carapace, la forme du plastron, la forme de la queue et la couleur de l'iris. Ainsi en Camargue les femelles peuvent mesurer jusqu'à 20 cm, elles ont un plastron plat, une queue longue et effilée, et un iris jaune (Olivier, 2002). Les mâles sont plus petits (16 cm maximum) avec un plastron concave parfaitement adapté à l'accouplement, une queue courte et épaisse, et un iris de couleur orange à brunâtre. La période de reproduction est d'avril à juillet puis de novembre à mars, la cistude hiberne au fond de l'eau dans une zone riche en végétation (Biot, 2017).

À la Tour du Valat, les cistudes sont marquées depuis 1976 et un suivi scientifique à long terme par capture-marquage-recapture (CMR) a débuté en 1997 sur cette espèce (Olivier et al., 2010 ; Ficheux et al., 2014), permettant ainsi d'estimer les dynamiques des populations sur une longue période. Dans ce cadre, près de 1400 individus sont suivis (âge et histoire de vie connus) par la Tour du Valat au sein de sa Réserve Naturelle Régionale dans différents types d'habitats aquatiques mais peu de travaux ont encore évalué les niveaux de polluants et les conséquences potentielles sur ces populations (Burkart et al., 2021).

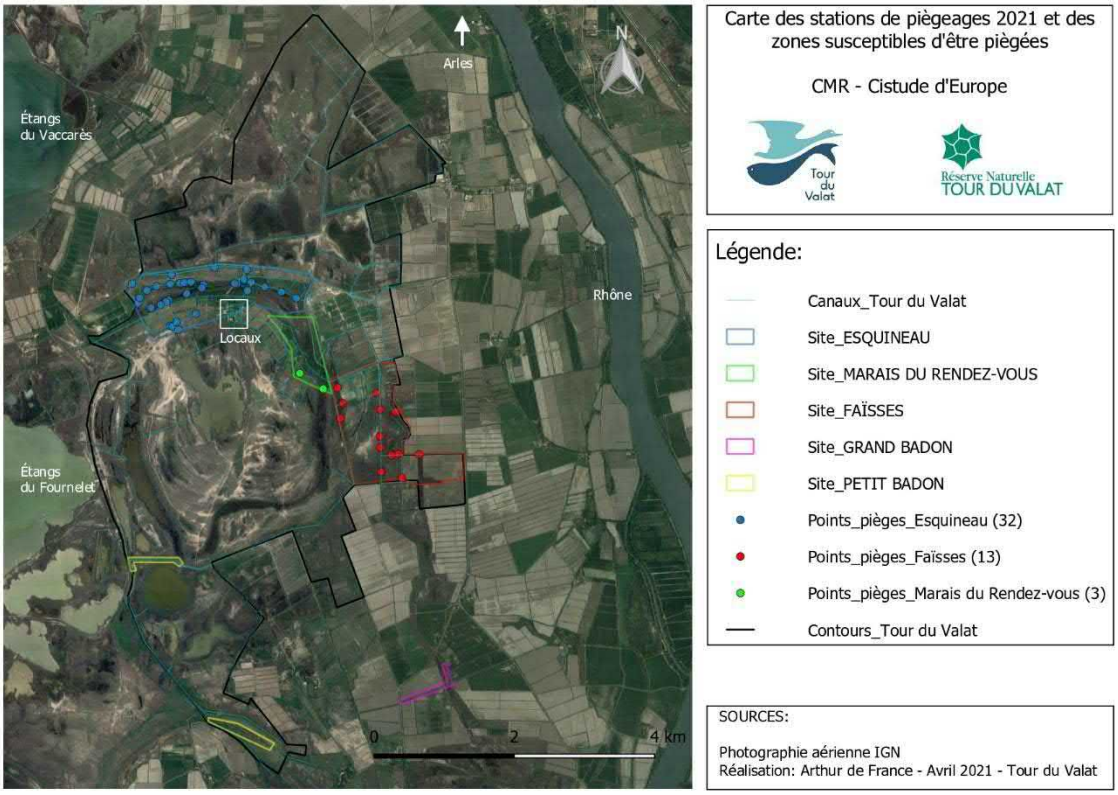
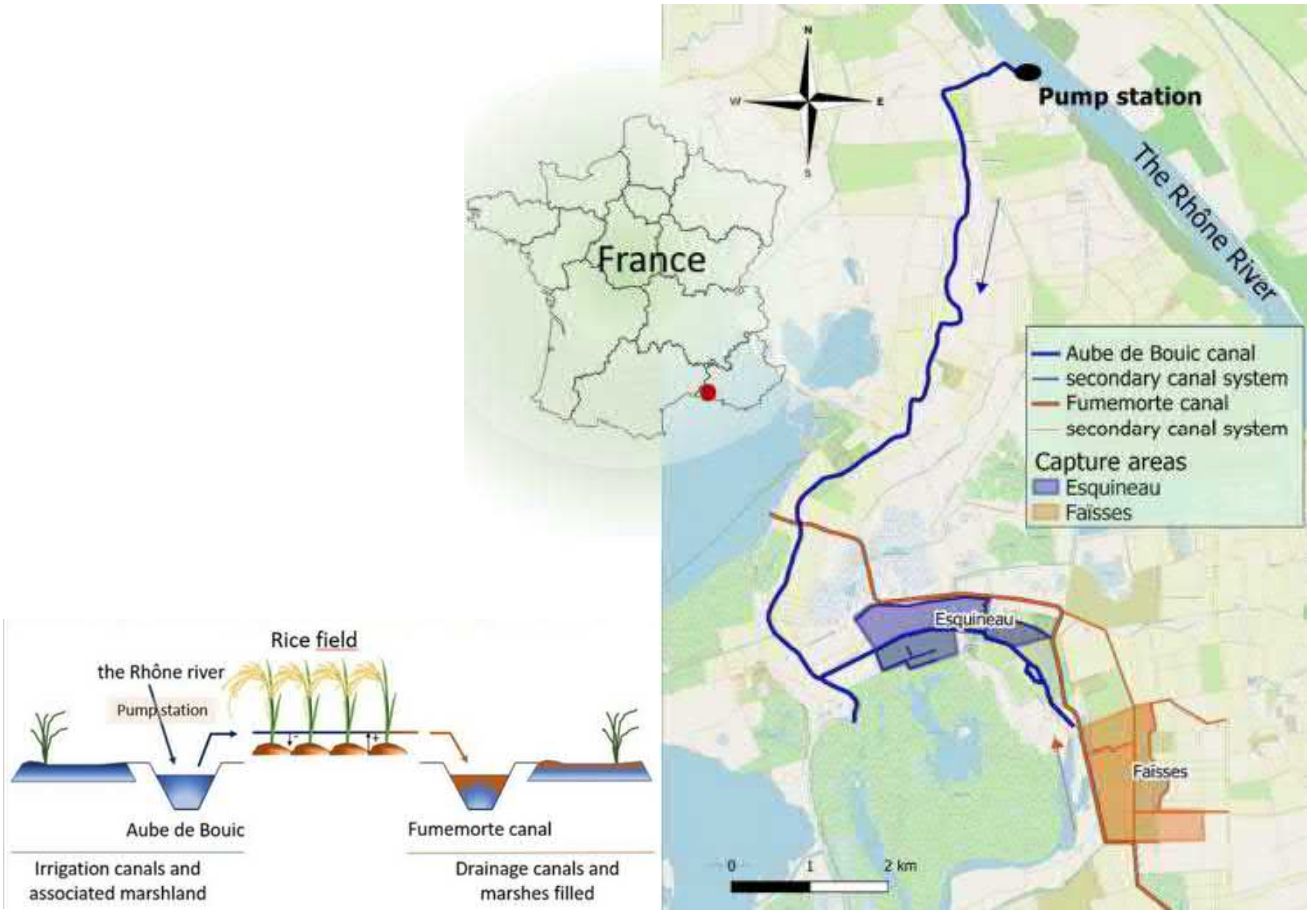


Figure 5 : Les stations de piégeages des cistudes à la Tour du Valat



Source : Burkart et al. 2021

Figure 6 : Les deux grands sites de capture à la Tour du Valat définis selon les types de canaux

Cette étude fait ainsi suite à un premier volet d'analyse de la contamination des cistudes sur le domaine de la Tour du Valat qui était sur les PCBs et les pesticides organochlorés (Burkart et al., 2021). L'objectif principal est de caractériser les niveaux d'exposition et l'occurrence à une trentaine de pesticides et à leurs métabolites principaux dans le plasma de cistudes d'Europe en Camargue. Ce projet vise à étudier les facteurs qui influencent la contamination telles que les variations individuelles (âge, sexe, taille et poids), des variations spatiales (prélèvement des cistudes à Esquineau ou Faïsses) et des variations temporelles (fluctuation selon les mois lors d'une même année de prélèvement, et entre les années de prélèvements). Ceci nous permettra également de vérifier que la cistude d'Europe est une bonne espèce bioindicatrice.

Plusieurs hypothèses peuvent être envisagées : nous attendons des niveaux de pesticides persistants plus élevés chez les individus les plus âgés, en raison des processus de bioaccumulation des polluants. Ensuite, les cistudes capturées à Esquineau doivent être moins contaminées qu'à Faïsses car son eau provient de parcelles agricoles. Enfin, les tortues prélevées plus tard dans la saison (juillet/aout) doivent être plus contaminées que celles capturées tôt (avril/mai) dans la mesure où la contamination des masses d'eau (canal du Fumemorte) augmente au cours du temps et coïncide avec les périodes de traitement.

Cette étude est le premier volet d'un projet plus large qui vise à étudier les impacts des produits phytopharmaceutiques en Camargue chez *Emys orbicularis* avec une évaluation des effets potentiels à l'échelle écophysiologique (stress oxydatif, perturbation endocrinienne, raccourcissement des télomères), comportementale et démographique.

II. Matériels et Méthodes

1. Sites de capture des cistudes d'Europe

Les sites de capture de cistudes se trouvent au sein de la Réserve Naturelle Régionale de la Tour du Valat (Figure 5). Les échantillonnages dans cette étude se font sur les sites Esquineau et Faïsses, ils sont caractérisés selon le type de canaux qui les desservent (Figure 6) :

- Esquineau : sur une superficie de 125 hectares, le site comprend 16 hectares de marais et 27 hectares de pelouse sèche parcourue de 8 kilomètres de canaux d'irrigation. L'eau de ces canaux provient de la station de pompage du Rhône, cela permet d'irriguer les cultures agricoles en aval à travers un dense réseau de canaux d'irrigation comme le canal de l'Aube de Bouic.
- Faïsses : sur une superficie de 100 hectares, le site est composé de 4 hectares de marais et d'une pelouse sèche de 30 hectares parcourue de 3 kilomètres de canaux de drainage. L'eau de ces canaux provient directement des parcelles agricoles (c'est de l'eau en surplus qui est évacuée des champs et qui va se jeter dans l'étang du Vaccarès via le canal du Fumemorte). Les canaux de drainage sont le réceptacle de divers PP, issus principalement de la riziculture et, plus récemment, du maraîchage intensif (Cormoretto et al., 2007).



Figure 7 : Verveux simple (à gauche) et double (à droite)



Figure 8 : Mesure de la LDD

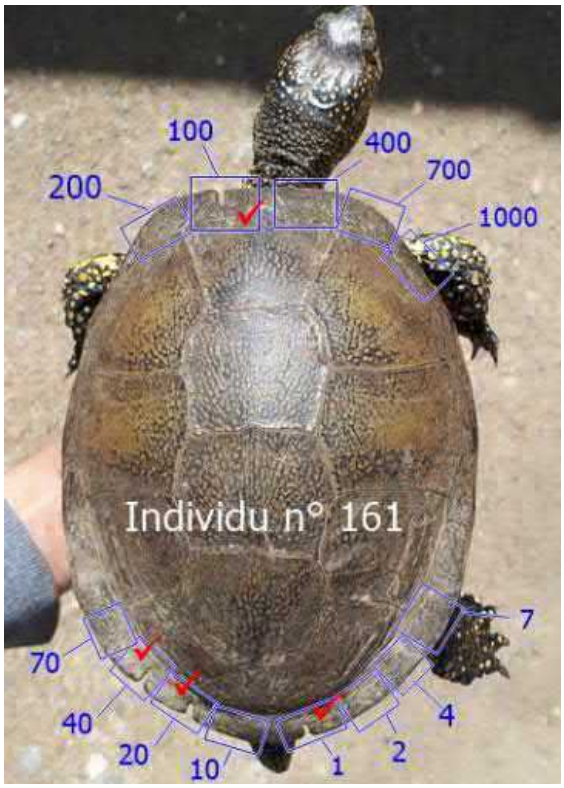


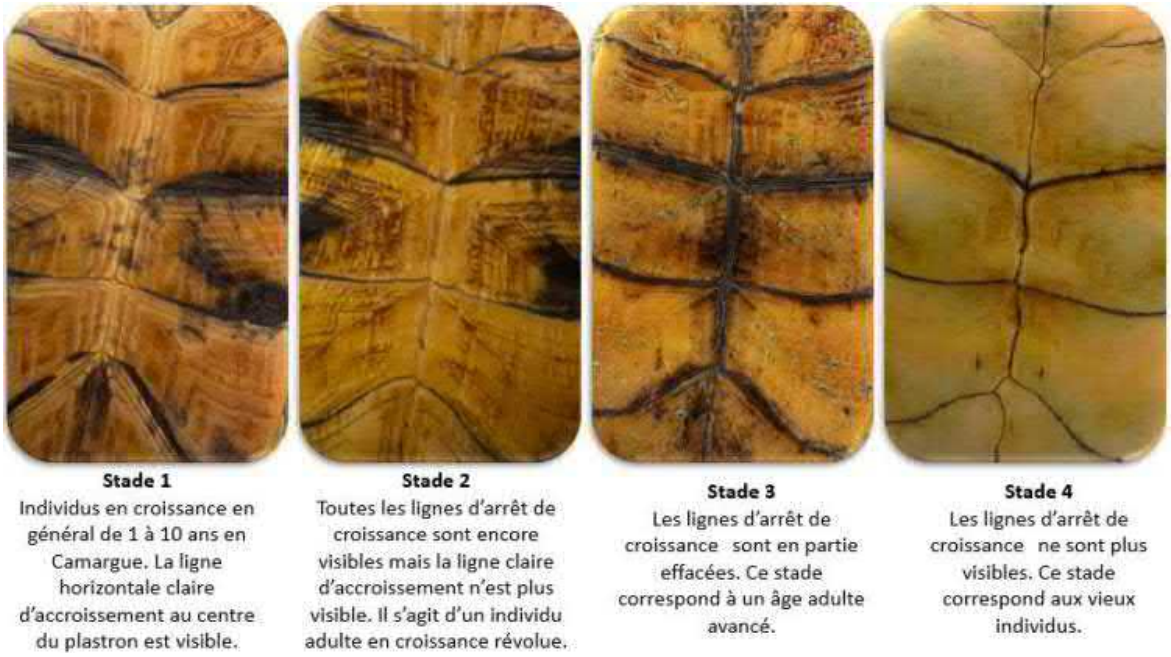
Figure 9 : Cistude marquée à la scie à métaux

2. Méthode de piégeage et mesures biométriques

La capture et la manipulation d'espèces protégées comme la cistude d'Europe est réglementée et nécessite l'obtention d'une dérogation préfectorale (Annexe 1). La présente étude est conforme à la réglementation concernant l'expérimentation animale et respecte la règle des 3R (réduire, remplacer et raffiner (dossier APAFIS n° 17899-201812022345423 v2)). Depuis 1997, la Tour du Valat mène une étude de marquage-capture-recapture (CMR) sur la cistude d'Europe impliquant un suivi annuel qui fait suite à une étude commencée dès 1976 par Alan Johnson. Ce suivi sur près de 1400 individus permet notamment d'estimer les dynamiques des populations sur le long-terme (plus de 20 ans).

La période d'échantillonnage s'étend de début avril jusqu'à début août, pendant la principale phase d'activité des cistudes (de la fin de l'hibernation à la fin de la période de reproduction), cette période correspond aussi à la principale phase d'épandage de pesticides dans les champs. Le piégeage se déroule généralement du lundi au vendredi durant la matinée. Le lundi il y a la pose des verveux (Figure 7), les trois jours suivants on relève ce qui a été capturé et le vendredi les verveux sont enlevés. Les verveux simples (1 aile centrale) sont posés dans les marais, perpendiculairement à la berge. Les verveux doubles (2 ailes latérales) sont posés dans les canaux pour que leurs ailes entravent intégralement les deux extrémités du cours d'eau. Les verveux sont constitués de chambres successives en entonnoir, par instinct les tortues vont pénétrer jusque dans la dernière chambre où elles sont retenues captives jusqu'au moment où nous les prélevons. Il est donc primordial qu'une partie de la chambre terminale ne soit pas sous l'eau pour que les animaux ne se noient pas. Après avoir fait les examens biométriques et les prélèvements, les individus sont relâchés non loin de leurs sites de capture pour minimiser le stress. Cette espèce fortement sédentaire a un taux de recapture élevé (60%).

Une fois les cistudes capturées, elles sont marquées sauf si elles le sont déjà. Ce marquage consiste à faire une incision à l'aide d'une scie à métaux sur les écailles marginales de la dossière. Chacune des écailles correspond à un numéro, ainsi la lecture des marques se fait grâce à la somme de l'ensemble de ces numéros (Figure 9). Il est important que les écailles marquées soient en bon état. Cette méthode de marquage n'engendre aucun problème de gêne ou même de mortalité pour les cistudes. De plus, elle n'est pas invasive, peu coûteuse, facile à réaliser et très fiable à long terme. Toutes les cistudes capturées sont ramenées au laboratoire pour réaliser des mesures biométriques, ces mesures suivent une fiche de renseignement d'identité (Annexe 2). Les mesures les plus importantes sont la longueur dos droit (LDD), qui correspond à la longueur de la dossière de la tête à la queue, elle est déterminée grâce à un pied à coulisse d'une précision millimétrique (Figure 8) ; La masse de l'individu en gramme grâce à une balance de précision (modèle : Mettler Toledo PB3001-S) contrôlée et calibrée annuellement. D'autres caractéristiques sont renseignées comme le sexe, la date et le site de prélèvement (Faïsses ou Esquineau). Le stade de croissance (Figure 10) 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 capture intervient dans les 5 premières années de vie (Olivier at al., 2010). L'âge, l'histoire de vie, les déplacements et la croissance des individus peuvent être ainsi connus.



Source : Nicolas Martin, 2018

Figure 10 : Panel de l'ensemble des stades d'usure



Figure 11 : Prise de sang d'une cistude

Tableau I : Répartition des 418 échantillons sanguins selon le site de capture, l'année de capture et le sexe des cistudes (F = femelle et M = mâle)

	2018	2019	2020	Total par site
Esquineau	29F et 22M	31F et 21M	34F et 16M	94F et 59M
Faïsses	72F et 49M	43F et 30M	37F et 24M	152F et 103M
Autres sites	2F et 8M	0F et 0M	0F et 0M	2F et 8M
Total par année	103F et 79M	74F et 51M	71F et 40M	248F et 170M

3. Prise de sang

L'assimilation de pesticides par les organismes aquatiques peut être directe au contact des compartiments environnementaux (surface respiratoire, diffusion cutanée, ingestion de particules) et indirecte (voie trophique), une fois dans l'organisme ces polluants peuvent être transportés par le sang. L'utilisation d'échantillons sanguins pour les analyses de micropolluants est une technique validée et éprouvée pour de nombreux vertébrés sauvages, dont les tortues (Keller et al., 2004 ; Meyer et al., 2016). Ainsi 418 échantillons sanguins ont été prélevés en 2018 (n=182), 2019 (n=125) et 2020 (n=111) sur des cistudes à Esquineau et Faïsses. Les prises de sang sont faites dans la queue au niveau de la veine coccygienne dorsale (Figure 11). Cette méthode a l'avantage de nécessiter une contention simple, le sang peut être collecté de manière rapide et peu stressante sur des tortues vivantes, un individu peut être échantillonné à plusieurs reprises pour une surveillance continue. 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. Le volume idéal de sang prélevé se situe entre 1,5 et 2mL, les individus de moins de 300g ne sont pas sélectionnés. Après la prise de sang, une séparation du plasma avec les cellules sanguines se fait par centrifugation à 3000 rotations par minute (rpm) pendant 3 minutes. En attendant les analyses au laboratoire, le plasma est congelé à -18 °C dans des tubes Eppendorf.

Les 418 échantillons sanguins peuvent être répartis selon le site de capture, l'année de capture et le sexe des cistudes (Tableau I). Quelques individus (n=10) proviennent d'un autre site que d'Esquineau ou de Faïsses, il s'agit des cistudes capturées à la main le long des chemins et des routes aux abords de la Tour du Valat, elles n'appartiennent à aucun des deux sites principaux. Sur les 418 prélèvements sanguins, 195 échantillons sont associés à des individus d'âge connus allant de 4 à 32 ans (119 femelles et 76 mâles).

4. Dosage des pesticides dans le plasma

Les teneurs en pesticides sont analysées dans un laboratoire spécialisé dans l'étude des transferts environnementaux des micropolluants organiques au sein de l'UMR METIS, Sorbonne Université, Paris. Au total, 29 pesticides ont été recherchés dans les 418 échantillons :

- 10 utilisés en riziculture et maraîchage en Camargue et détectés dans les canaux de drainage par la SNPN (bentazone, carbendazime, 3,4-dichloroaniline, oxadiazon, penoxsulam, propanile, tébuconazole, tébufenozide, terbuthylazine et son métabolite, le déséthylterbuthylazine).
- 19 autres (atrazine et ses métabolites (deisopropylatrazine, diethylatrazine et hydroxyatrazine), chlortoluron, diflufenican, imidaclopride et ses métabolites (imidaclopride olefin et imidaclopride urée), irgarol, isoproturon, métazachlore, S-métolachlore et ses métabolites (métolachlore ESA et métolachlore OXA), nicosulfuron, pendimethaline, prosulfuron, simazine).

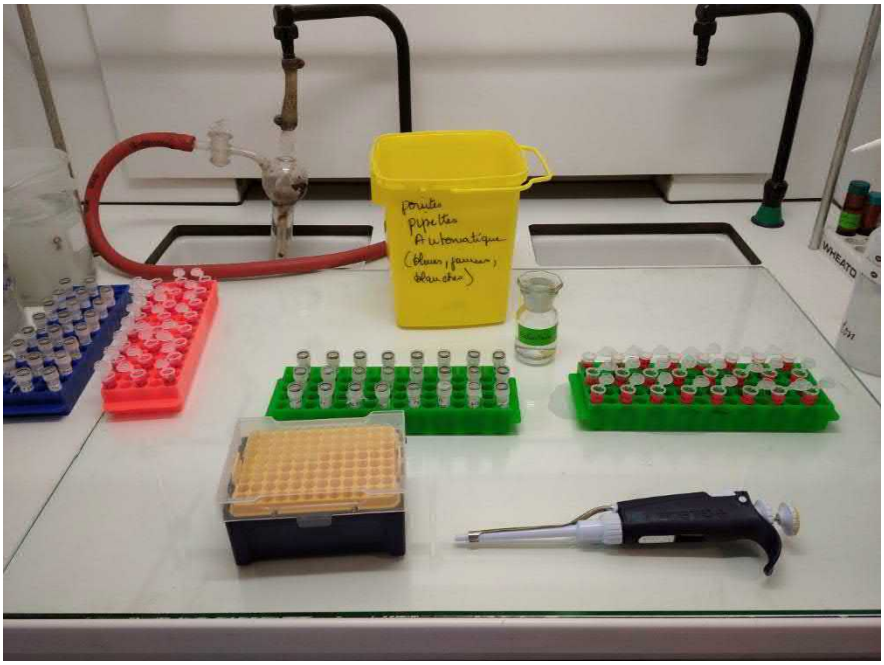


Figure 12 : Extraction des pesticides sous une sorbonne à l'UMR METIS

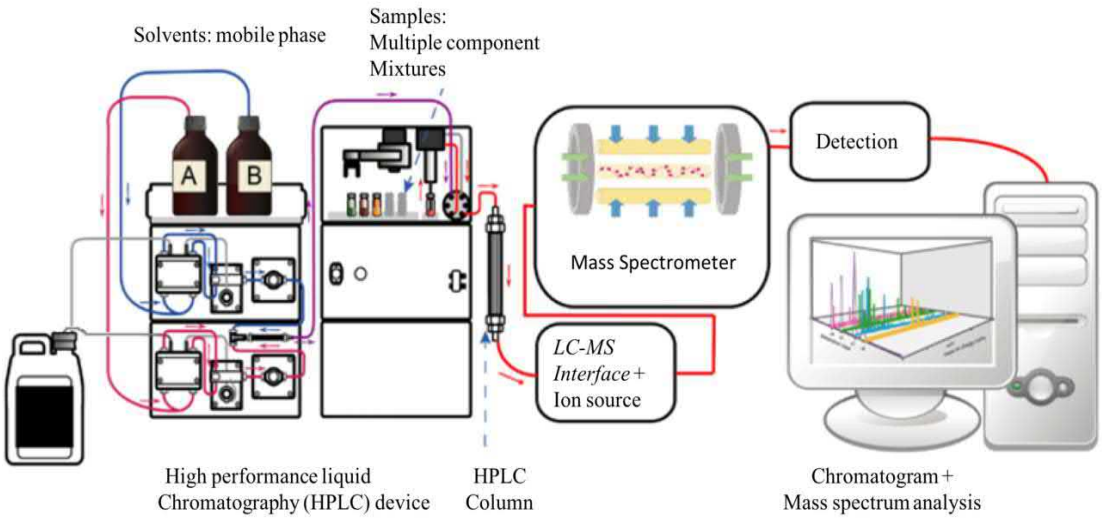


Figure 13 : Schéma de la composition d'une LC-MS/MS

Tableau II : Paramètres de la source électrospray de la LC-MS/MS

Paramètres	Valeurs
Température Gaz (°C)	320
Débit gaz (l/min)	8
Nébuliseur (psi)	35
Capillaire (V)	3000

L'extraction et la purification des pesticides dans le plasma des cistudes s'inspire d'un protocole de 2014 sur la détermination d'herbicides dans du sérum humain (Xinfeng et al., 2014). Les manipulations doivent se faire sous une sorbonne (Figure 12) car il s'agit de produits chimiques qui peuvent avoir des effets délétères sur la santé. Les échantillons sont décongelés puis passés au vortex pendant 5 secondes, ensuite 100µL de plasma (100µL d'acétonitrile pour le blanc) sont prélevés et déposés dans un nouveau eppendorf. À l'aide d'une seringue analytique automatique manuelle eVol® (SGE Analytical Science, Australie), on ajoute 10µL du mix d'étalons internes contenant 14 molécules marquées à 5ng/µL soit 50ng de chaque composé, ce mix servira à la quantification. Les échantillons sont ensuite passés au vortex pendant 5 secondes puis laissés une nuit à 4 °C. L'extraction continue le lendemain avec l'ajout de 200µL d'acétonitrile puis avec un passage au vortex pendant 30 secondes, ensuite les échantillons sont centrifugés pendant 3 minutes à 6000rpm. Le surnageant est récupéré puis transféré dans des filtres/tubes en nylon de 0,2µm de porosité (VWR, Fontenay sous Bois). Une centrifugation est de nouveau réalisée pendant 1 minute à 6000rpm. L'extrait est récupéré puis transféré dans des vials de 2mL (avec insert droit de 400µL), les tubes en nylon sont rincés une fois avec 75µL d'acétonitrile puis transféré dans les vials. Les vials sont conservés à -18°C avant leur analyse en chromatographie en phase liquide couplée à un spectromètre de masse en tandem (LC-MS/MS).

L'analyse des niveaux de polluants des 418 échantillons est réalisée en LC-MS/MS (Figure 13 ; Annexe 3). La validation méthodologique se base sur le rendement et les limites de quantification de cette analyse chimique (Annexe 4). Dix µL de l'extrait sont injectés dans l'appareil (LC : 1200 ; MS/MS : 6410B ; Agilent Technologies, Les Ulis). Concernant la chromatographie en phase liquide, la colonne utilisée est la suivante : Zorbax Eclipse Plus C18 (2,1 x 150 mm; 3,5µm) de chez Agilent Technologies. Cette colonne va permettre de séparer les composés en jouant sur le gradient de la phase mobile avant leur ionisation dans la source électrospray (Tableau II) et leur détection dans le spectromètre de masse via deux transitions ioniques. La phase mobile de la LC est définie selon un gradient (Annexe 5), avec un solvant A (Acétonitrile + 0,1% d'acide formique) et un solvant B (EMQ + 0,1% d'acide formique). La quantification s'effectue ensuite grâce à une gamme de calibration en étalonnage interne via le logiciel Mass Hunter d'Agilent. Il faut aussi tenir compte de la limite de quantification (LOQ) qui varie en fonction des pesticides analysés (Tableau III). Les résultats des teneurs plasmatiques en pesticides seront exprimés en ng/g (la densité du plasma étant de 1).

Tableau III : Limites et fréquences de quantification des pesticides analysés lors des 3 années (en rouge les pesticides retenus et en vert les pesticides jamais détectés)

Composés	Limites de quantification (ng/g)	Fréquences de quantification (%)
Atrazine	0.32	0.48
Bentazone	0.51	36.36
Carbendazime	40.00	0.00
Chlortoluron	0.25	0.72
Diethylatrazine	0.81	0.72
Desethylterbuthylazine	1.00	2.15
Deisopropylatrazine	0.79	0.24
3,4-dichloroaniline	0.47	3.11
Diflufenican	0.18	2.63
Hydroxyatrazine	2.65	0.00
Imidaclopride	0.51	5.02
Imidaclopride_olefin	0.27	3.59
Imidaclopride_uree	0.45	0.96
Irgarol	0.21	0.96
Isoproturon	0.26	0.24
Metazachlore	0.66	0.72
Metolachlore_ESA	0.17	4.07
S_metolachlore	0.15	2.15
Metolachlore_OXA	2.81	0.00
Nicosulfuron	0.58	4.55
Oxadiazon	1.06	3.11
Pendimethaline	0.65	0.00
Penoxsulam	0.14	0.72
Propanile	0.51	1.91
Prosulfuron	0.16	0.00
Simazine	0.22	0.48
Tebuconazole	0.09	4.55
Tebufenozide	0.11	1.67
Terbuthylazine	0.53	1.20
Atrazine et ses 3 métabolites	-	1.44
Imidaclopride et ses 2 métabolites	-	8.85
S_metolachlore et ses 2 métabolites	-	5.74
Terbuthylazine et son métabolite	-	3.35
Somme des pesticides	-	55.26

Tableau IV : Nombre de pesticides quantifiés par échantillons

Nombre de pesticides quantifiés par échantillons	0	1	2	3	4	5	6	7	8	Total
Nombre d'échantillons	187	165	43	12	5	3	0	2	1	418
Pourcentage d'échantillons (%)	44.74	39.47	10.29	2.86	1.20	0.72	0	0.48	0.24	100

5. Analyses statistiques

Les analyses ont été réalisées à l'aide du logiciel R version 4.0.3 et avec les librairies lmerTest, lubridate, lme4 et date. En premier lieu, la normalité des variables quantitatives (poids, LDD et âges) année par année a été testé grâce au test de Shapiro. Les données ne proviennent pas d'une distribution normale, ainsi des analyses de corrélation de Spearman ont été réalisées pour montrer le lien entre deux variables quantitatives. Le lien entre deux variables qualitatives (sexe, site, stade et date 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 (comme la variable sexe) et Kruskal-Wallis s'il s'agit de plus de 2 groupes (comme la variable stade de croissance). La corrélation entre le poids, la LDD, le stade et l'âge des cistudes a été démontré avec une p-value > 0.05, ainsi ces quatre variables ne doivent pas être inclues dans le même modèle.

Les analyses se poursuivent à travers une régression via des modèles linéaires généralisés (GLM) binomiaux, ce test permet de prendre en compte individuellement chaque année. Les effets du sexe, du site, de la date de capture et du stade des cistudes sont testés en fonction de la teneur et de l'occurrence en pesticides dans le plasma. Pour chaque modèle, nous avons utilisé une élimination en amont pour supprimer progressivement les variables non significatives (p-value > 0.05). Seuls les pesticides dont la fréquence de quantification dans le plasma est supérieure ou égal à 5% ont été inclus dans les analyses statistiques (Tableau III), cela concerne la bentazone (36,36%) et l'imidaclopride (5,02%). Tous les autres pesticides ont une fréquence de quantification trop faible pour être analysés, les résultats ne seront donc pas fiables pour ces pesticides avec si peu de valeurs quantifiées. L'imidaclopride est regroupée avec ses 2 métabolites (imidaclopride olefin et urée) lors des tests afin d'avoir une puissance statistique plus importante, la fréquence de quantification passe ainsi de 5,02% à 8,85%. En plus des analyses sur la teneur et l'occurrence de l'imidaclopride et de la bentazone, la somme des pesticides est aussi testée (c'est-à-dire que pour chaque cistude, on regroupe la quantification des 29 pesticides) afin d'avoir un point de vue général de la contamination aux pesticides chez la cistude, la fréquence de quantification est de 55,26%.

Les dernières analyses statistiques concernent une régression via des modèles linéaires généralisés à effets mixtes (GLMM), ce test permet de prendre en compte les 3 années ensembles. L'effet année peut ainsi être ajouté aux effets du sexe, du site, de la date de capture et du stade des cistudes. De plus, ce modèle prend en compte qu'une cistude peut être échantillonnée plusieurs fois (comme la cistude n°821 qui a eu un prélèvement sanguin par année (de 2018 à 2020)). L'occurrence et la teneur en pesticides ont été testés avec les mêmes conditions que le GLM vu précédemment.

Tableau V : Nombre de cistudes contaminées par les composés selon l'année et le site de capture (en rouge les pesticides retenus et en vert les pesticides jamais détectés). Les valeurs entre parenthèse au niveau des années et des sites correspondent à la répartition des 418 prises de sang

	2018 (182)			2019 (125)		2020 (111)	
Composés	Esquineau (121)	Faïsses (51)	Autres (10)	Esquineau (73)	Faïsses (52)	Esquineau (61)	Faïsses (50)
Atrazine	2	0	0	0	0	0	0
Bentazone	20	47	3	2	33	9	38
Carbendazime	0	0	0	0	0	0	0
Chlortoluron	2	0	0	0	0	1	0
Diethylatrazine	3	0	0	0	0	0	0
Desethylterbuthylazine	7	2	0	0	0	0	0
Deisopropylatrazine	1	0	0	0	0	0	0
3,4-dichloroaniline	13	0	0	0	0	0	0
Diflufenican	10	0	0	0	1	0	0
Hydroxyatrazine	0	0	0	0	0	0	0
Imidaclopride	7	4	0	3	4	2	1
Imidaclopride_olefin	4	2	0	4	3	2	0
Imidaclopride_uree	2	0	0	2	0	0	0
Irgarol	4	0	0	0	0	0	0
Isoproturon	1	0	0	0	0	0	0
Metazachlore	2	1	0	0	0	0	0
Metolachlore_ESA	2	2	0	5	3	3	2
S_metolachlore	6	0	0	2	0	0	1
Metolachlore_OXA	0	0	0	0	0	0	0
Nicosulfuron	4	5	4	4	2	0	0
Oxadiazon	7	0	0	0	5	1	0
Pendimethaline	0	0	0	0	0	0	0
Penoxsulam	2	0	0	1	0	0	0
Propanile	5	2	0	1	0	0	0
Prosulfuron	0	0	0	0	0	0	0
Simazine	1	1	0	0	0	0	0
Tebuconazole	14	3	0	0	0	2	0
Tebufenozide	7	0	0	0	0	0	0
Terbuthylazine	4	0	0	1	0	0	0
Atrazine et ses 3 métabolites	6	0	0	0	0	0	0
Imidaclopride et ses 2 métabolites	12	6	0	7	7	4	1
S_metolachlore et ses 2 métabolites	8	2	0	6	3	3	2
Terbuthylazine et son métabolite	11	2	0	1	0	0	0
Somme des pesticides	62	49	6	21	36	19	38

III. Résultats

1. Analyses descriptives des données brutes

Tout d'abord, les variables poids, LDD et âge des cistudes sont corrélés (coefficients de corrélation de Spearman : LDD-poids = 0.94 ; Age-poids = 0.46 ; Age-LDD = 0.46; p-value <0.005 pour les 3 tests). Le poids, LDD et âge varient aussi avec le stade (df = 3, Kruskal-Wallis Chi^2 = 73.144 pour poids-stade ; 71.663 pour LDD-stade et 142.31 pour Age-stade; p-value < 0.005 pour les 3 tests).

D'après le Tableau III, 55,26% des échantillons analysés ont au moins un pesticide quantifié sur les 29, soit 231 des 418 plasmas. On remarque aussi que 24 des 29 pesticides recherchés sont quantifiés dans le plasma des cistudes. Les cinq molécules qui n'ont jamais été détectées dans les 418 échantillons sont la carbendazime, l'hydroxyatrazine, le métolachlore OXA, le pendiméthaline et le prosulfuron. Seulement deux molécules ont une fréquence de quantification supérieur à 5%, il s'agit de la bentazone avec 152 échantillons contaminés sur 418 soit 36,36% et de l'imidaclopride avec 21 échantillons contaminés sur 418 soit 5,02%. En regroupant l'imidaclopride avec ses deux métabolites (olefin et urée), il y a 37 contaminations soit 8,85%. Les 22 autres pesticides ont une fréquence de quantification allant de 0,24% à 4,55% (sans compter le regroupement de pesticides avec leurs métabolites) soit de 1 à 19 échantillons contaminés.

Les échantillons pour lesquels aucun pesticide n'a été détecté sont au nombre de 187 sur 418 soit 44,74% (Tableau IV). On peut retrouver de 1 à 8 pesticides différents dans le plasma, allant de 165 échantillons dans lesquels seul 1 pesticide a été quantifié, à 1 échantillon chez qui 8 pesticides différents dépassent les limites de quantification. Le Tableau V permet de déterminer le nombre de cistudes contaminées par les pesticides selon l'année et le site de capture (occurrence). En 2018 pour la somme des pesticides, au moins un polluant a été quantifié dans 117 cistudes sur 182, soit 64,29% des individus. En 2019, on passe à 45,60% (57 sur 125) et en 2020 à 51,35% (57 sur 111). De même, la quantification d'au moins un pesticide est moins élevé à Esquineau (40,0% des échantillons, 102 sur 255) comparé à Faïsses (80,39%, 123 sur 153 échantillons).

Tableau VI : Représentation des valeurs moyennes et maximales (moyenne ; maximale) en ng/g des composés selon l'année et le site de capture des cistudes (en rouge les pesticides retenus et en vert les pesticides jamais détectés)

	2018		2019		2020	
Composés	Esquineau	Faïsses	Esquineau	Faïsses	Esquineau	Faïsses
Atrazine	0.01 ; 0.76	-	-	-	-	-
Bentazone	0.53 ; 19.72	25.24 ; 131.69	0.05 ; 2.54	6.26 ; 54.19	1.39 ; 58.60	31.87 ; 150.97
Carbendazime	-	-	-	-	-	-
Chlortoluron	0.01 ; 1.14	-	-	-	0.01 ; 0.52	-
Diethylatrazine	0.06 ; 3.83	-	-	-	-	-
Desethylterbuthylazine	0.10 ; 4.88	0.04 ; 1.15	-	-	-	-
Deisopropylatrazine	0.03 ; 3.56	-	-	-	-	-
3,4-dichloroaniline	0.10 ; 1.80	-	-	-	-	-
Diflufenican	0.07 ; 2.57	-	-	0.01 ; 0.33	-	-
Hydroxyatrazine	-	-	-	-	-	-
Imidaclopride	0.09 ; 3.83	0.10 ; 1.87	0.04 ; 1.29	0.09 ; 1.75	0.02 ; 0.68	0.02 ; 1.13
Imidaclopride_olefin	0.03 ; 1.39	0.03 ; 1.04	0.06 ; 1.30	0.04 ; 0.89	0.01 ; 0.38	-
Imidaclopride_uree	0.01 ; 0.98	-	0.07 ; 3.03	-	-	-
Irgarol	0.01 ; 0.45	-	-	-	-	-
Isoproturon	0.01 ; 0.45	-	-	-	-	-
Metazachlore	0.03 ; 2.40	0.01 ; 0.74	-	-	-	-
Metolachlore_ESA	0.01 ; 0.78	0.01 ; 0.33	0.03 ; 0.87	0.01 ; 0.20	0.02 ; 0.64	0.01 ; 0.25
S_metolachlore	0.02 ; 1.25	-	0.01 ; 0.18	-	-	0.01 ; 0.43
Metolachlore_OXA	-	-	-	-	-	-
Nicosulfuron	0.02 ; 0.85	0.07 ; 0.86	0.07 ; 2.05	0.08 ; 2.50	-	-
Oxadiazon	0.08 ; 1.86	-	-	0.40 ; 11.31	0.07 ; 4.04	-
Pendimethaline	-	-	-	-	-	-
Penoxsulam	0.01 ; 0.61	-	0.01 ; 0.20	-	-	-
Propanile	0.04 ; 2.19	0.07 ; 2.27	0.01 ; 0.74	-	-	-
Prosulfuron	-	-	-	-	-	-
Simazine	0.01 ; 0.52	0.01 ; 0.34	-	-	-	-
Tebuconazole	0.19 ; 4.57	0.03 ; 0.70	-	-	0.01 ; 0.16	-
Tebufenozide	0.04 ; 1.21	-	-	-	-	-
Terbuthylazine	0.08 ; 3.46	-	0.01 ; 0.72	-	-	-
Atrazine et ses 3 métabolites	0.10 ; 3.83	-	-	-	-	-
Imidaclopride et ses 2 métabolites	0.13 ; 3.83	0.13 ; 1.87	0.17 ; 4.00	0.13 ; 1.75	0.03 ; 0.68	0.02 ; 1.13
S_metolachlore et ses 2 métabolites	0.03 ; 1.25	0.01 ; 0.33	0.04 ; 0.87	0.01 ; 0.20	0.02 ; 0.64	0.02 ; 0.63
Terbuthylazine et son métabolite	0.18 ; 4.88	0.04 ; 1.15	0.01 ; 0.72	-	-	-
Somme des pesticides	1.59 ; 19.72	25.61 ; 131.69	0.35 ; 4.00	6.88 ; 54.19	1.52 ; 58.87	31.91 ; 150.97

Concernant la bentazone (Tableau V), il y a 38,46% (70 sur 182) d'individus contaminés en 2018, puis 28,0% (35 sur 125) en 2019 et 42,34% (47 sur 111) en 2020. Pour le site Esquineau, on est à 12,16% (31 sur 255) d'échantillons contaminés par la bentazone et 77,12% (118 sur 153) à Faïsses. Pour l'imidaclopride et ses métabolites, il y a 9,89% (18 sur 182) individus contaminés en 2018, puis 11,2% (14 sur 125) en 2019 et 4,50% (5 sur 111) en 2020. Pour le site Esquineau, on est à 9,02% (23 sur 255) échantillons contaminés par l'imidaclopride et ses métabolites et 9,15% (14 sur 153) à Faïsses. D'après le Tableau V, les données brutes sur l'occurrence de la bentazone et des pesticides regroupés laissent penser que la proportion de cistudes contaminées par les pesticides est plus faible en 2019 et qu'il y ait davantage de contaminations sur le site Faïsses par rapport à Esquineau. En 2018, 10 cistudes échantillonnées ont été prise à la main ou sur un autre site, 3 échantillons contiennent de la bentazone avec notamment une valeur très importante de 522,84 ng/g.

On s'intéresse maintenant aux valeurs moyennes et maximales (Tableau VI). Tout d'abord, la somme des pesticides permet de dire que la concentration plasmatique moyenne d'une cistude en pesticides est de 9,87 ng/g avec les années et sites confondus. Plus précisément, en 2018 avec les sites confondus, on a une moyenne de 11,29 ng/g de pesticides par cistudes, en 2019 de 3,06 ng/g et en 2020 de 8,58 ng/g. Pour le site Esquineau avec les 3 années confondues, on est à 1,22 ng/g et 21,30 ng/g pour Faïsses. Concernant les valeurs maximales des pesticides regroupés, d'une part il y a de plus forte valeur en 2018 et 2020 (selon les sites) par rapport à 2019, d'autre part le site Faïsses (131,69 ng/g ; 54,19 ng/g ; 150,97 ng/g) a des valeurs maximales plus importantes que Esquineau (19,72 ng/g ; 4,00 ng/g ; 58,87 ng/g).

La concentration moyenne de la bentazone dans un échantillon est de 9,36 ng/g avec les années et sites confondus (Tableau VI). Sur tous les prélèvements de 2018, on a une moyenne de 10,46 ng/g de la bentazone par cistudes, en 2019 de 2,63 ng/g et en 2020 de 15,12 ng/g. Pour le site Esquineau avec les 3 années confondues, on est à 0,60 ng/g et 20,96 ng/g pour Faïsses. Enfin pour l'imidaclopride et ses métabolites, la concentration moyenne est de 0,10 ng/g par échantillon lors des années et sites confondus. Pour 2018, on a une moyenne de 0,12 ng/g d'imidaclopride par cistudes puis en 2019 de 0,15 ng/g et en 2020 de 0,03 ng/g. Pour le site Esquineau avec les 3 années confondues, on est à 0,11 ng/g et 0,09 ng/g pour Faïsses.

Le Tableau VI qui fait référence à la concentration des pesticides a des résultats semblables au Tableau V sur l'occurrence des pesticides. Il semblerait que pour la bentazone et les pesticides regroupés, il y a une plus forte concentration sur le site Faïsses par rapport à Esquineau, mais aussi que les cistudes ont un plus faible niveau de pollution en 2019.

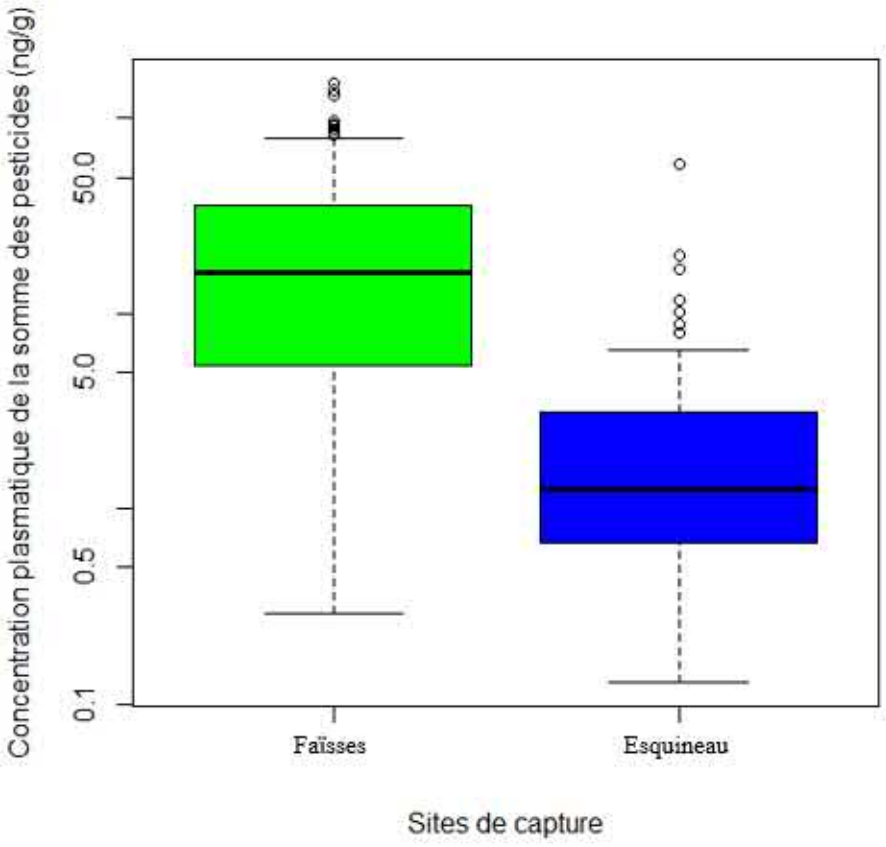


Figure 14 : Concentration plasmatique de la somme des pesticides (échelle logarithmique) en fonction des sites. Seules les valeurs > LOQ sont représentées

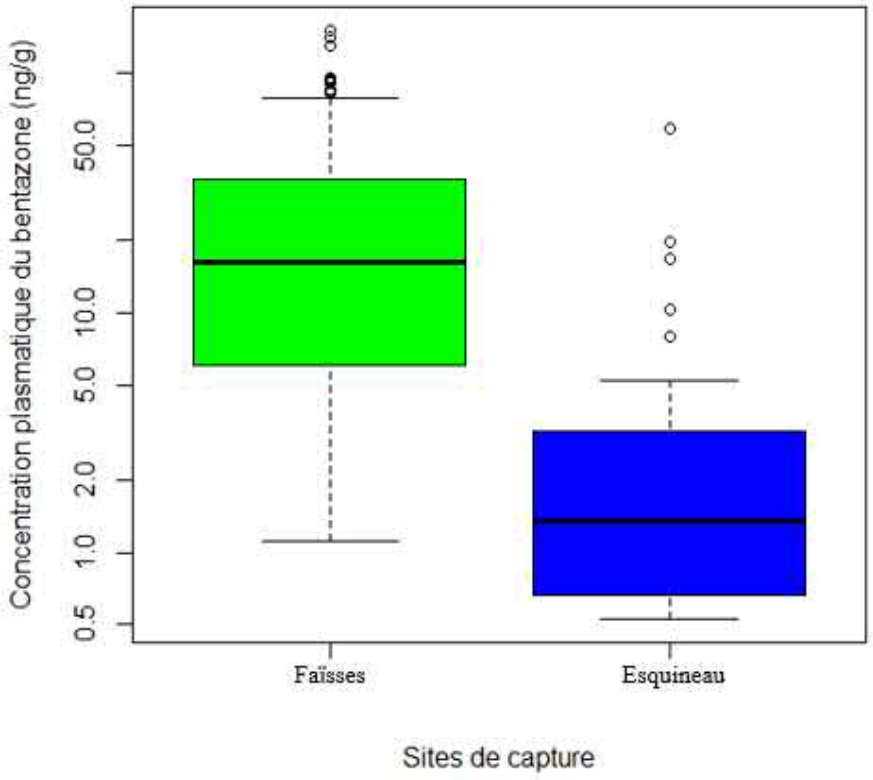


Figure 15 : Concentration plasmatique de la bentazone (échelle logarithmique) en fonction des sites. Seules les valeurs > LOQ sont représentées

2. Différences individuelles

Les variables corrélées (poids, LDD, stade de croissance et âge des cistudes) ne doivent pas été inclues dans le même modèle statistique, seul la variable « stade de croissance » est utilisé dans les GLM et GLMM. Ces modèles statistiques ont montré que la concentration et l'occurrence des pesticides ne sont pas expliqués par le sexe et les stades de croissance des cistudes (les p-value sont toutes supérieur à 0,05).

3. Différences spatiales

Les modèles GLM et GLMM ont montré qu'il y a un effet site très marqué pour la somme des pesticides et la bentazone. Les échantillons provenant du site Faïsses sont beaucoup plus contaminés que ceux venant du site Esquineau. Que ça soit l'occurrence ou la concentration, la p-value est toujours inférieur à 0,05 pour ces deux modèles. Comme par exemple pour le GLMM :

- Occurrence de la bentazone : Estimate de Faïsses = 0,65 avec p-value < 2.2e-16
- Concentration de la bentazone : Estimate de Faïsses = 20,35 avec p-value < 2.2e-16
- Occurrence de la somme des pesticides : Estimate de Faïsses = 0,40 avec p-value < 2.2e-16
- Concentration de la somme des pesticides : Estimate de Faïsses = 20,09 avec p-value < 2.2e-16

Pour la bentazone et les pesticides regroupés, les échantillons de Faïsses ont une occurrence et une concentration plus élevée que ceux venant d'Esquineau. Les boîtes à moustaches (Figures 14 et 15) montrent que la médiane et les quartiles sont plus importants sur le site Faïsses, mais aussi que les valeurs maximales à Esquineau sont plus faibles.

Concernant l'imidaclopride, les modèles statistiques ont montré aucune relation entre la variable site et les pesticides présent dans les échantillons. Que ça soit la concentration ou l'occurrence des pesticides, les p-value sont toutes supérieur à 0,05. La médiane et les quartiles sont très proches entre les sites (Figure 16).

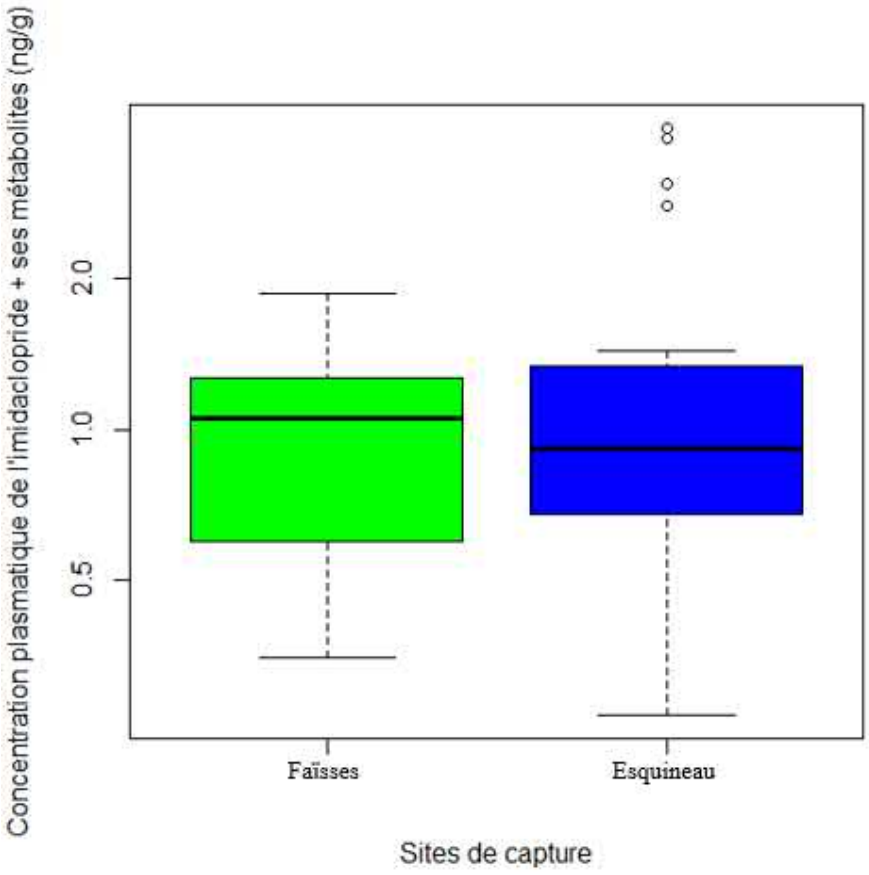


Figure 16 : Concentration plasmatique de l'imidaclopride et de ses métabolites (échelle logarithmique) en fonction des sites. Seules les valeurs > LOQ sont représentées

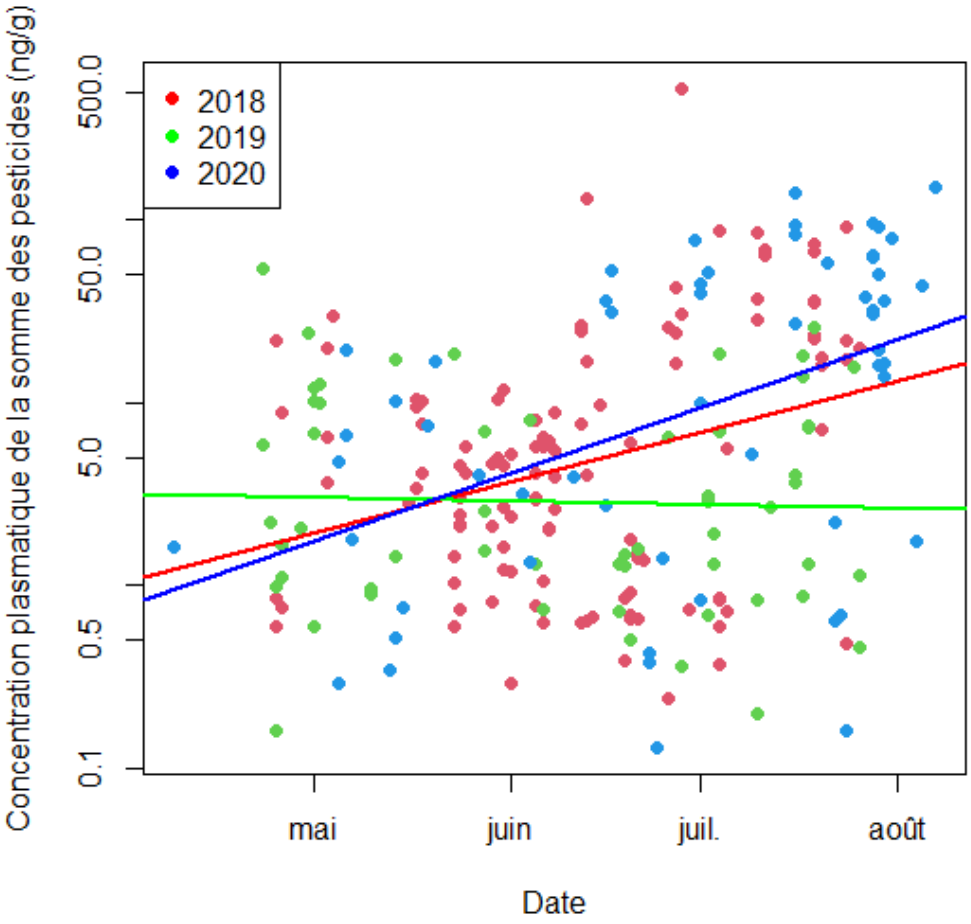


Figure 17 : Concentration plasmatique de la somme des pesticides (échelle logarithmique) en fonction de la date et de l'année. Seules les valeurs > LOQ sont représentées

4. Différences temporelles

Les GLM et GLMM ont montré que les concentrations de la bentazone et de la somme des pesticides dans les échantillons augmentent au cours de la saison (d'avril à août) lors des années 2018 et 2020 (Figure 17 et Figure 18). Pour l'année 2019, il n'y a pas de relation significative entre la concentration en pesticides et la date d'échantillonnage.

L'occurrence de la bentazone et de la somme des pesticides augmente significativement uniquement en 2020 (Figure 17 et Figure 18)

Pour l'imidaclopride et ses métabolites, la concentration et l'occurrence augmentent au cours de la saison en 2019 (Figure 19). En 2020, malgré une tendance, il n'y a que 5 échantillons contaminés (trop faible fréquence de quantification pour valider les modèles).

En plus de l'effet de la date de capture (au cours de la saison pour une année), il y a une différence entre les 3 années de prélèvements. Les analyses montrent que la somme des pesticides et la bentazone sont plus faibles (occurrence et concentration) en 2019 par rapport aux deux autres années (2018 et 2020). Le GLMM a permis d'établir cette relation en prenant en compte une p-value de 0,05 :

- Concentration de bentazone en 2019 : Estimate de -9,101 avec p-value de 0,002
- Occurrence de bentazone en 2019 : Estimate de -0,141 avec p-value de 0,002
- Concentration de pesticides regroupés en 2019 : Estimate de -9,362 avec p-value de 0,002
- Occurrence de pesticides regroupés en 2019 : Estimate de -0,193 avec p-value de 0,002

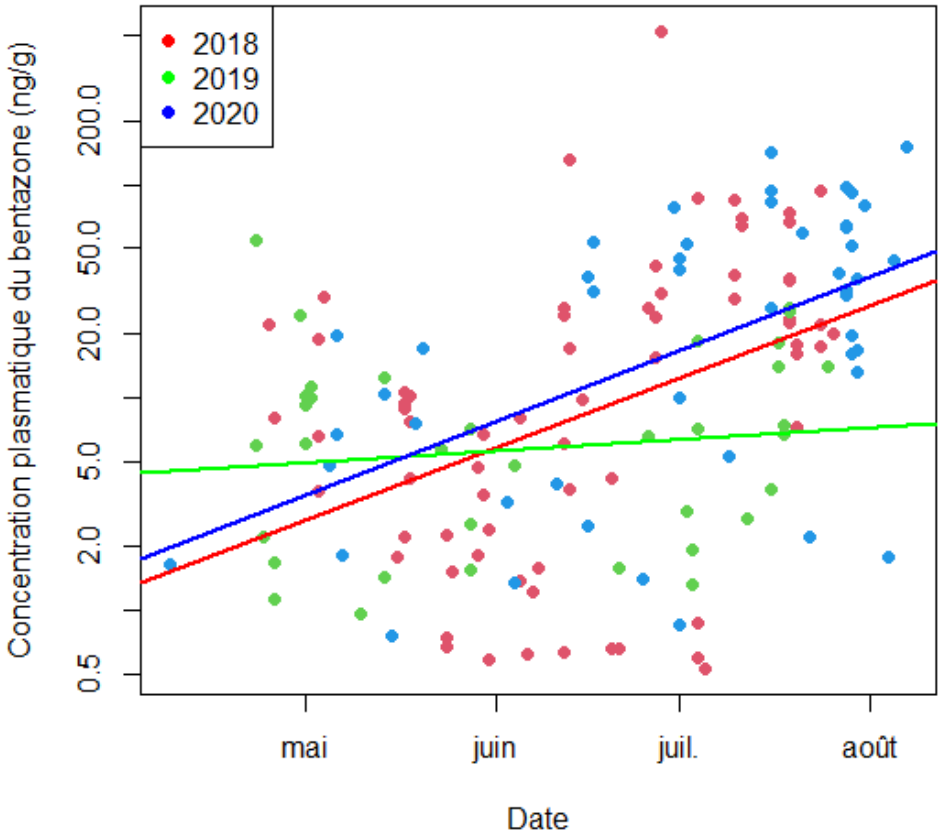


Figure 18 : Concentration plasmatique de la bentazone (échelle logarithmique) en fonction de la date. Seules les valeurs > LOQ sont représentées

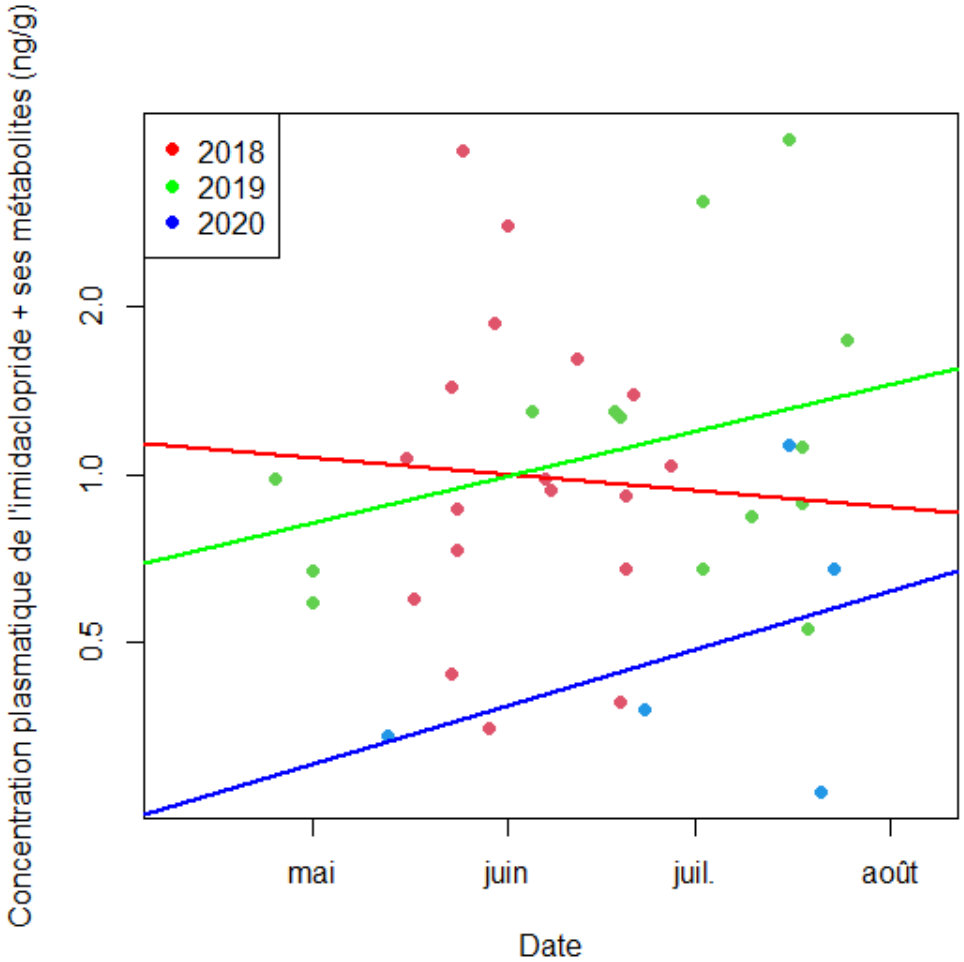


Figure 19 : Concentration plasmatique de l'imidaclopride et de ses métabolites (échelle logarithmique) en fonction de la date. Seules les valeurs > LOQ sont représentées

IV. Discussion

Notre objectif était de caractériser les niveaux d'exposition à une trentaine de pesticides et leur occurrence dans le plasma de cistudes d'Europe en Camargue, mais aussi de déterminer les facteurs qui influencent la contamination telles que les variations individuelles, spatiales et temporelles. Pour la grande majorité des pesticides recherchés (27/29), les niveaux et l'occurrence de contamination trouvés dans le plasma sont faibles et souvent inférieurs aux limites de quantification. Cette faible contamination pourrait notamment s'expliquer par l'abondance de macrophytes en Camargue, favorisant les processus d'autoépuration et de dégradation des polluants (Roche et al., 2009). De plus, les reptiles peuvent métaboliser et excréter efficacement la plupart des pesticides. On estime que les 29 pesticides ne sont pas quantifiés dans 44,74% des échantillons. La limite de quantification est faible pour la plupart des pesticides sauf pour la carbendazime (LOQ = 40 ng/g), ce qui explique pourquoi ce fongicide n'a jamais été détectée dans les 418 échantillons.

Les variables individuelles testées (sexe et stade de croissance des cistudes) ne semblent pas avoir de lien avec la concentration et l'occurrence des pesticides. L'hypothèse que des niveaux de pesticides persistants soit plus élevés chez les individus les plus âgés n'est pas soutenue par nos résultats, cependant cela est potentiellement lié aux faibles niveaux et occurrence de pesticides persistants détectés. En effet, ces liens n'ont pu être testés statistiquement que pour la bentazone et l'imidaclopride (fréquence de quantification suffisante), ces deux pesticides ne sont pas considérés comme persistants dans l'eau ce qui peut expliquer cette absence de corrélation entre stade de croissance et niveau de contamination. La bentazone est considérée comme peu bioaccumulable et peu bioamplifiable (Akoijam & Singh, 2014), la molécule se dégrade assez rapidement par photolyse dans l'eau (demi-vie de 62 heures à 20°C). De même pour l'imidaclopride (Al Housari et al., 2011) qui est rapidement photolysé en milieu aquatique (demi-vie de 5 heures à 20°C). Les niveaux dans le plasma de ces deux pesticides semblent ainsi refléter l'exposition récente dans l'environnement.

Comme attendu, nous avons observé des différences significatives dans le taux de contamination en pesticides entre les deux sites d'échantillonnage. L'hypothèse selon laquelle les cistudes capturées à Esquineau sont moins contaminées qu'à Faïsses est validée, le système hydraulique (eau d'irrigation/de drainage) pourrait influencer cette différence de contamination. Les canaux de drainage du site des Faïsses reçoivent de l'eau issue du Rhône mais celle-ci a d'abord transité par les parcelles agricoles (rizières principalement), ce qui constitue une phase d'enrichissement en pesticides très importante (Oliveira et al., 2008 ; Comoretto et al., 2008).

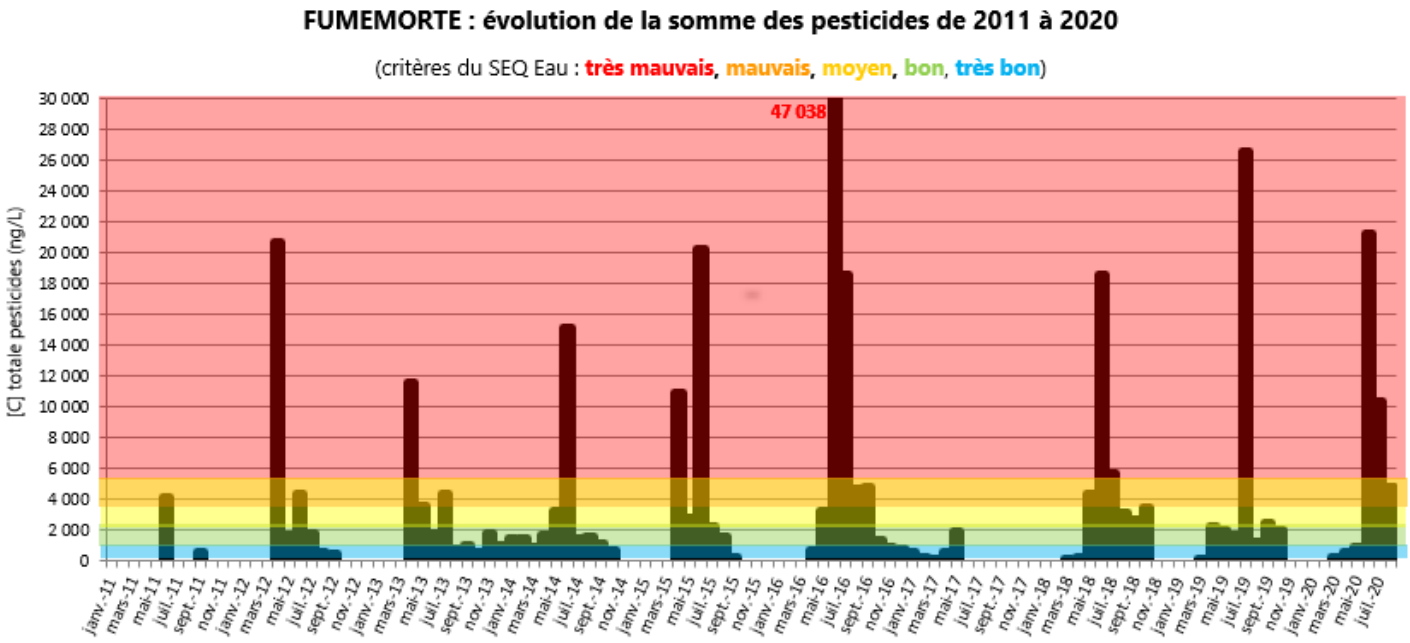


Figure 20 : Évolution de la somme des pesticides de 2011 à 2020 dans le canal du Fumemorte (SNPN)

Tableau VII : Système d'évaluation de la qualité de l'eau

Critères du SEQeau	Couleur associé
Très bon	
Bon	
Moyen	
Mauvais	
Très mauvais	

Tableau VIII : Synthèse de la bentazone (ng/L) retrouvée dans le canal du Fumemorte (SNPN)

	2018	2019	2020
Mars	74	66	138
Avril	171	117	146
Mai	180	683	140
Juin	16 497	253	18 690
Juillet	4 501	20 660	9 095
Aout	2 064	386	3 262
Septembre	788	1 148	2 434
Octobre	1 829	611	88

La majorité des pesticides analysés dans cette étude sont fréquemment utilisés dans les exploitations agricoles en Camargue, ce qui corrobore le fait qu'on retrouve une plus grande diversité, occurrence et concentration des 29 pesticides dans les échantillons de plasma venant des cistudes capturées dans les eaux de drainage de Faïsses.

L'analyse statistique des différences temporelles d'exposition des cistudes aux pesticides a confirmé l'hypothèse suivante : les tortues prélevées plus tard dans la saison (juillet/aout) sont plus contaminées que celles capturées tôt (avril/mai), dans la mesure où la contamination des masses d'eau (canal du Fumemorte) augmente au cours du temps et coïncide avec les périodes de traitement. Cette augmentation saisonnière est uniquement valable pour la bentazone et la somme des pesticides en 2018 et 2020. La bentazone est peu persistante dans l'eau, ainsi on peut penser qu'il n'y a pas un phénomène d'accumulation des pesticides dans l'eau au cours de la saison, mais plutôt une amplification du nombre de traitements dans les parcelles agricoles d'avril à août. Les modèles statistiques ont aussi montré que la concentration et l'occurrence en bentazone sont plus faibles en 2019, cela peut s'expliquer par un contexte agricole différent lors de cette année-là. Le plus probable est que la bentazone a était remplacé par d'autres pesticides en 2019, notamment s'il y a eu une rotation de culture. L'augmentation de la concentration et de l'occurrence d'imidaclopride dans le plasma des cistudes en 2019 conforte cette hypothèse.

Depuis plusieurs années, la SNPN recherche dans les zones humides de Camargue plus de 800 molécules provenant des secteurs agricoles, industriels et domestiques. La qualité de l'eau du canal du Fumemorte est souvent analysée car ce canal charrie l'eau de drainage venant des parcelles agricoles (Cheiron et al., 2019). Une relation de comparaison peut se faire entre ce que trouve la SNPN dans la masse d'eau de ce canal et ce qu'on a trouvé dans les échantillons de plasma des cistudes. La quantification des pesticides dans le Fumemorte (Figure 20) montre une contamination d'avril à septembre, les pics de contaminations en 2018, 2019 et 2020 sont localisés principalement en juin et juillet. La qualité de l'eau est définie comme très mauvaise sur cette période (Tableau VII). La SNPN confirme nos résultats sur le fait que l'augmentation au cours de la saison dans le plasma des cistudes est dûe à une amplification des traitements agricoles en juin et juillet. Le ruissèlement des pesticides dans les champs en Camargue est beaucoup plus important en fin de saison. Les modèles statistiques ont montré qu'il n'y a pas d'augmentation saisonnière de bentazone en 2019 dans le plasma des cistudes, cependant on observe un pic de contamination dans la masse d'eau du Fumemorte en juillet beaucoup plus important que les autres années (Tableau VIII). On peut penser que l'échantillonnage des cistudes en juillet a eu lieu avant ou après le pic de contamination dans le Fumemorte. Le prélèvement d'eau dans le Fumemorte par la SNPN se situe en même temps qu'une période d'échantillonnage à Faïsses et Esquineau. Les cistudes n'ont donc pas été contaminées par ce pic de bentazone pour une raison qu'on ignore.



Figure 21 : Le carrefour de Fiélouse en Camargue

Les exploitations agricoles en Camargue utilisent une multitude de cultures différentes, ainsi les pesticides utilisés sont très diversifiés. Cela peut être des fongicides (culture hors-sol pour les tomates), des herbicides (riziculture) ou des insecticides (vigne et culture de l'asperge). La culture du riz est majoritaire en Camargue, on estime que 90% des pesticides retrouvés dans les lagunes et les canaux de cette écosystème sont issus de la riziculture (Comoretto et al., 2008). Lors des 3 années d'échantillonnage, certaines cistudes (n=44) ont été capturées près de parcelles agricoles cultivées en conventionel, une majorité (61,36%) est contaminée par la bentazone. La cistude n°1321 a été capturée à la main au niveau du carrefour de Fiélouse (Figure 21) et son niveau de bentazone est très important (522,84 ng/g). Un champ cultivant principalement du riz est au pied de ce carrefour, on peut donc penser que la cistude a été fortement exposée à ce pesticide. La bentazone est un herbicide approuvé par l'Union Européenne et entrant dans la composition des préparations dont l'AMM a été retirée en France (en 2009) mais pour lesquelles des dérogations existent. Les résultats de notre étude corroborent une certaine logique selon laquelle les molécules autorisées (y compris par dérogation) sont plus présentes dans le milieu que les molécules interdites. La 3,4-dichloroaniline était un herbicide très présent dans le Fumemorte (1175 ng/L en 2011 selon la SNPN) avant son interdiction en 2008, maintenant il y a quasiment disparu (11 ng/L en 2020 selon la SNPN). Les parcelles agricoles ne sont pas forcément les seuls sources de contaminations, d'autres apports de polluants peuvent être envisagés comme le Rhône. C'est un fleuve qui peut transporter de nombreux polluants vers son delta.

La quantification des pesticides dans le plasma des cistudes constitue un volet de recherche important car le sang est un milieu facilement accessible et de composition constante. 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. Le sang offre une vision dynamique de la contamination des individus puisqu'il illustre la partie potentiellement toxique en circulation.

L'influence du contexte hydrologique dans la contamination des cistudes est important à prendre en compte (Relyea, 2005). Les espèces animales vivant dans un milieu lotique (eau courante) peuvent avoir une contamination moins importante que celles vivant dans un milieu lentique (eau calme). Les canaux larges, caractérisés par un débit et une circulation de l'eau plus élevés peuvent provoquer la remise en suspension de polluants. Il est important de rappeler que la contamination des cistudes dépend non seulement de l'exposition directe depuis les compartiments environnementaux (air, eau et sol), mais aussi de l'exposition par voie trophique (Wagner et al., 2015). Des analyses de la contamination par 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). Si l'exposition aux pesticides peu persistants est supérieure à l'élimination alors on devrait avoir une bioaccumulation du polluant dans l'organisme. Il est aussi possible que la niche trophique, le métabolisme et le comportement de la cistude changent au cours de la vie, modifiant alors les dynamiques d'exposition à ces polluants.

Ce projet nous a permis de vérifier que la cistude d'Europe est une bonne espèce bioindicatrice pour l'étude des pesticides qui sont actuellement utilisé en Camargue. Cette tortue donne des renseignements toxicologiques, que ça soit pour les métaux (Beau F et al., 2019 ; Guillot et al., 2018), les microplastiques (Banaee et al., 2021) ou les PCB (Burkart et al., 2021). Chez les cistudes, les pesticides peuvent induire des effets délétères variés, avec des répercussions possibles sur les populations et les communautés biologiques (Köhler & Triebskorn, 2013). D'autres contaminants peuvent nuire à la cistude comme des bactéries engendrant des pathologies de la carapace (Kovačević et al., 2019 ; Biot, 2017). Cette étude est le premier volet d'un projet plus large qui vise à étudier les impacts des produits phytopharmaceutiques en Camargue chez *Emys orbicularis* avec une évaluation des effets potentiels à l'échelle écophysiologique (stress oxydatif, perturbation endocrinienne et raccourcissement des télomères), comportementale (faible perception du risque et réponses altérées face à un prédateur) et démographique (baisse des taux de survie des adultes et un déclin populationnel, notamment sur le site Faïsses qui est davantage exposé aux PP). D'autres effets peuvent être attendus comme une hausse de la susceptibilité aux infections parasitaires dans le sang et une réversion sexuelle.

V. Conclusion

Cette étude exploratoire de la contamination plasmatique des cistudes d'Europe en Camargue révèle de faibles détections et concentrations de pesticides chez cette espèce bioindicatrice. La majorité des pesticides sont retrouvés à l'état de trace et, pour la plupart, en dessous des limites de quantification. Seul la bentazone atteint une occurrence (36% de quantification) et une concentration élevées (9,36 ng/g en moyenne par échantillon). Nous observons une différence significative de contamination entre les sites de capture et les dates de capture (au cours de la saison d'une même année et entre les années de prélèvements) des cistudes. Les niveaux de contaminations semblent être plus important chez les cistudes échantillonnées près des canaux de drainage, les parcelles agricoles sont des sources de pollutions non-négligeable pour la faune et la flore. 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. La recherche de contaminations dans d'autres compartiments biologiques que le plasma tels que les griffes et fèces sont en cours de prélèvement à la Tour du Valat, permettant ainsi d'étudier la présence d'éléments traces métalliques.

Bibliographie

Adams N., Bealing D., & Betton C.I. 1993. Volume 1: General principles and overview. In “Handbook of ecotoxicology”. Calow P. (ed). Blackwell Scientific , Cambrige , MA, USA. pp 1-5.

Al Housari F., Höhener P & Chiron S. 2011. Factors responsible for rapid dissipation of acidic herbicides in the coastal lagoons of the Camargue (Rhône River Delta, France). The science of the total environnement. pp 582-587.

Akoijam R., & Singh B. 2014. Persistence and Metabolism of Imidacloprid in Rice. Bulletin of Environmental contamination and Toxicology. Volume 92. pp 609–615.

Banaee M,. Gholamhossein A., Sureda A,. Soltanian S., Saeed Fereidouni M & Ibrahim A. 2021. Effects of microplastic exposure on the blood biochemical parameters in the pond turtle (Emys orbicularis). Environmental Science and Pollution Research. pp 9221–9234.

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. pp 338-344.

Biot L. 2017. Synthèse des connaissances actuelles sur la Cistude d’Europe (Emys orbicularis) et étude d’une pathologie de carapace. Thèse de l’Université de Toulouse. pp 188.

Burkart L., Olivier A., Lourdais O., Vittecoq M., Blouin-Demers G., Alliot F., Le Gac C., Martin N., & Goutte A. 2021. Determinants of Legacy Persistent Organic Pollutant Levels in the European Pond Turtle (Emys orbicularis) in the Camargue Wetland, France. Environmental Toxicology. pp 1-8.

Cheiron A., Befeld S., & Bricault B. 2019. Rapport d’activité 2018 de la Réserve Naturelle Nationale de Camargue. Société nationale de protection de la nature – Réserve Naturelle Nationale de Camargue. pp 216.

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. pp 124-132.

Comoretto L., Arfib B., Talva R., Chauvelon P., Pichaud M., Chiron S., & Höhener P. 2008. Runoff of pesticides from rice fields in the Ile de Camargue (Rhône river delta, France): Field study and modeling. Environmental Pollution. pp 486-493.

Di Corcia A., & Marchetti M. 1992. Method Development for Monitoring Pesticides in Environmental Waters: Liquid-Solid Extraction Followed by Liquid chromatography. Environ. Sci. Technol. pp 66-74.

Espel D., Diepens N., Boutron O., & Buffan-Dubau E. 2019. Dynamics of the seagrass Zostera noltei in a shallow Mediterranean lagoon exposed to chemical contamination and other stressors. Estuarine Coastal and Shelf Science. pp 1-12.

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). pp 342-348.

Forson D., & Storfer A. 2006. Atrazine increases ranavirus susceptibility in the tiger salamander, Ambystoma tigrinum. Ecological Applications 16.6. pp 2325-2332.

Goutte A., Alliot F., C. Budzinski H., Simonnet-Laprade C., Santos R., & Labadie P. 2020. Trophic transfer of micropollutants and their metabolites in an urban riverine food web. Environmental Science and Technology 54(13). pp 8043-8050.

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 volume. pp 300–304.

Hellio J.F., Van Ingen N., & Roché J.E. 2020. Rapport d'activité 2019 Tour du Valat. Baldini G. (ed). Tour du Valat, Le Sambuc-13200, Arles, France. pp 70.

Héritier L., Meistertzheim A. L., & Verneau O. 2017. Oxidative stress biomarkers in the Mediterranean pond turtle (Mauremys leprosa) reveal contrasted aquatic environments in Southern France. Chemosphere, 183. pp 332–338.

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). pp 726-738.

Köhler H.R., & Triebskorn R. 2013. Wildlife ecotoxicology of pesticides: can we track effects to the population level and beyond? Science, 341(6147). pp 759-765.

Kovačević S., Ozvegy J., Krstić N., Rusvai M., Jakab C., Stanimirović Z & Becskei Z. 2019. Skin and skeletal system lesions of european pond turtles (Emys orbicularis) from natural habitats. Acta Veterinaria Hungarica. pp 180–193.

Malaj E., Von der Ohe P., Grote M., & Kühne R. 2014. Organic chemicals jeopardize the health of freshwater ecosystems on the continental scale. Proceedings of the National Academy of Sciences 111.26. pp 9549-9554.

Mesléard F. 2018. La faune aquatique des rizières de Camargue , in Mouret J.-C. & Leclerc B. (coord.), Le Riz et la Camargue. Vers des agroécosystèmes durables. Cardère – Educagri. pp 349-361.

Meyer E., Eskew E.A., Chibwe L., Schrlau J., Massey Simonich S.L., & Todd B.D. 2016. Organic 418 contaminants in western pond turtles in remote habitat in California. Chemosphere. 154, 419. pp 326-334.

Matson C. W., Palatnikov G., Islamzadeh A., Mcdonald T. J., Autenrieth R. L., Donnelly K. C., & Bickham J. W. 2005. Chromosomal damage in two species of aquatic turtles (Emys orbicularis and Mauremys caspica) inhabiting contaminated sites in Azerbaijan. Ecotoxicology. pp 13.

Matsumoto Y., Hannigan B., & Crews D. 2014. Embryonic PCB exposure alters phenotypic, genetic, and epigenetic profiles in turtle sex determination, A biomarker of environmental contamination. Endocrinology. pp 10.

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). pp 333-339.

Nunes A.N., Oliveira E., & Fontes D. 1995. Official methods of analysis of AOAC International. 16th Edition. Cunnif P. (ed). Arlington, VA: AOAC international, ISBN/ISSN 0935584544. pp 21-34.

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. pp 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. pp 1-165.

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). pp 993-1004.

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 (2005). pp 562-565.

Podloucky R. 1997. Emys orbicularis (Linnaeus, 1758). In "Atlas of amphibians and reptiles in Europe". pp 170-171.

Relyea R.A. 2005. The Impact of Insecticides and Herbicides on the Biodiversity and Productivity of Aquatic Communities. Ecological Applications. pp 618-627.

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). pp. 526-533.

Salice C. J., Rowe C. L., & Eisenreich K. M. 2014. Integrative demographic modeling reveals population level impacts of PCB toxicity to juvenile snapping turtles. Environmental Pollution. pp 7.

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). pp 2350-2360.

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

Xinfeng D., Zhihong S., Shuxuan L., & Hanwen S. 2014. Rapid simultaneous determination of herbicides in human serum by UPLC-ESI-MS. pp 6939-6947.

Annexes

Annexe 1 : Dérogation préfectorale pour la capture et la manipulation des cistudes à la Tour du Valat

RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
PRÉFET DES BOUCHES-DU-RHÔNE

DIRECTION DÉPARTEMENTALE DES TERRITOIRES ET DE LA MER DES BOUCHES-DU-RHÔNE
SERVICE MER, EAU ET ENVIRONNEMENT
PÔLE NATURE ET TERRITOIRES
RAA de la Préfecture des Bouches-du-Rhône
N°13-2020-098 du 1er avril 2020

Arrêté préfectoral n°13-2020-03-27-007 portant autorisation dérogatoire à l'article L.411-1, au titre de l'article L.411-2 du Code de l'Environnement, au bénéfice de la Fondation Tour du Valat, pour procéder à des fins scientifiques à la capture, au transport, au prélèvement de matériel biologique, au marquage et au relâcher sur site de spécimens de l'espèce Cistude d'Europe *(Emys Orbicularis)*, au cours des années 2020 et 2021.

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 la directive européenne 92/43 du 21 mai 1992, concernant la conservation des habitats naturels ainsi que de la faune et de la flore sauvages ;

Vu le Code de l'Environnement, articles L.411-1, L.411-2, 4°, d ;

Vu le décret n° 2004-374 du 29 avril 2004 modifié, relatif aux pouvoirs des Préfets, à l'organisation et à l'action des services de l'État dans les régions et les départements ;

Vu l'arrêté ministériel du 19 novembre 2007 fixant la liste des amphibiens et des reptiles protégés sur l'ensemble du territoire et les modalités de leur protection ;

Vu l'arrêté ministériel du 19 février 2007 modifié, fixant les conditions de demande d'instruction des dérogations définies au 4ème alinéa de l'article L.411-1, au titre de l'article L.411-2 du Code de l'Environnement ;

Vu l'arrêté préfectoral du 11 février 2020 portant délégation de signature à Monsieur Jean-Philippe D'ISSERNIO, Directeur Départemental des Territoires et de la Mer des Bouches-du-Rhône ;

Vu l'arrêté préfectoral du 12 février 2020 portant délégation de signature aux agents de la Direction Départementale des Territoires et de la Mer des Bouches-du-Rhône, ci-après dénommée « la DDTM 13 » ;

Considérant la demande de la Fondation Tour du Valat, ci-après dénommée « la TdV », fondation scientifique privée reconnue d'utilité publique, formulée en date du 2 mars 2020 pour poursuite d'une étude démographique et l'acquisition de données écotoxicologiques sur l'espèce protégée Cistude d'Europe *(Emys orbicularis)*, sous la signature de son directeur général, monsieur Jean JALBERT ;

Considérant que cette étude contribue à l'amélioration des connaissances démographiques et biologiques sur une espèce protégée ;

Considérant que cette étude s'inscrit dans le cadre des Plans nationaux d'actions en faveur de la Cistude d'Europe ;

Considérant l'avis du Conseil Scientifique Régional du Patrimoine Naturel (CSRPN PACA), en date du 24 mars 2020 ;

Considérant que la présente autorisation dérogatoire ne nuira pas au maintien, dans un état de conservation favorable, des populations de Cistude d'Europe qu'elle concerne ;

Sur proposition du Directeur Départemental des Territoires et de la Mer des Bouches-du-Rhône ;

ARRÊTE :

Article 1er, objectif et espèce concernée:

Le présent arrêté autorise à titre dérogatoire, sur une l'espèce protégée Cistude d'Europe *(Emys orbicularis)* :
1) la capture d'individus à l'aide de pièges ;
2) leur transport vers les locaux du bénéficiaire ;
3) le prélèvement de matériel biologique (sang) sur ces individus ;
4) leur marquage par encoche sur les écailles ;
5) le transport et le relâché sur le site de capture.
Cette autorisation dérogatoire intervient dans le cadre d'une double étude démographique et écotoxicologique sur les populations de Cistude d'Europe du delta du Rhône.

Article 2, bénéficiaire :

La présente autorisation dérogatoire est octroyée à la Fondation Tour du Valat, sise Le Sambuc 13200 Arles, représentée par son directeur général, monsieur Jean JALBERT ;

Article 3, mandataires :

1) Au titre de coordinateur de l'étude :

- Anthony OLIVIER, Garde technicien commissionné de la Réserve naturelle régionale de la Tour du Valat, formé à la conception de projets scientifiques et à l'utilisation d'animaux de la faune sauvage à des fins scientifiques, disposant de plusieurs années d'expérience sur l'écologie de la Cistude d'Europe.

2) Au titre de personnel intervenant sur les spécimens vivants :

- Anthony OLIVIER, Garde technicien commissionné de la Réserve naturelle régionale de la Tour du Valat ;
- Marion VITTECOQ, docteur en biologie, chargée de recherche, formée à la conception de projets scientifiques et à l'utilisation d'animaux de la faune sauvage à des fins scientifiques, référente bien-être animal de la TdV ;
- Olivier LOURDAIS, docteur en biologie, chargé de recherche, formateur à la conception de projets scientifiques et à l'utilisation d'animaux de la faune sauvage à des fins scientifiques, expert en herpétologie ;
- Aurélie GOUTTE, docteur en écologie, experte en écotoxicologie de la faune aquatique ;
- Paco BUSTAMANTE, docteur en écologie, expert en écotoxicologie, formé à la conception de projets scientifiques et à l'utilisation d'animaux de la faune sauvage à des fins scientifiques ;
- Louisiane BURKART, titulaire d'un Master en biologie.

Chaque personnel intervenant sur les spécimens vivant est tenu est tenu de porter sur soi une copie du présent acte afin de pouvoir la présenter lors d'un éventuel contrôle.

Article 4, territoire concerné :

La présente autorisation dérogatoire est applicable sur les territoires communaux d'Arles, des Saintes-Maries-de-la-Mer, de Port-Saint-Louis-du-Rhône et de Fos-sur-Mer.

Annexe 2 : Fiche de renseignements biométriques des individus capturés

Réserve Naturelle TOUR DU VALAT

CISTUDE TdV – Fiche de biométrie

Tour du Valat

Numéro :

Date :

Site :

Observateur :

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) :

Âge :

Stade d'usure :

Année de naissance :

.....

Prélèvements sanguins : oui ☐ | Vaucheria : oui ☐

Queue coupée: oui ☐ |Borgne: gauche ☐ droit ☐ |Anomalie d'écaillure: oui ☐

Dossière abimée : Faiblement ☐ - Gravement ☐

Plastron abimé : Faiblement ☐ - Gravement ☐

Nombre de griffe manquante :

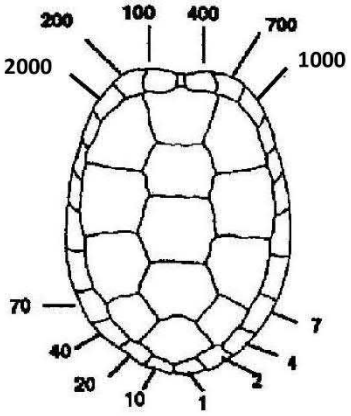
Antérieure gauche	Antérieure droite
Postérieure gauche	Postérieure droite

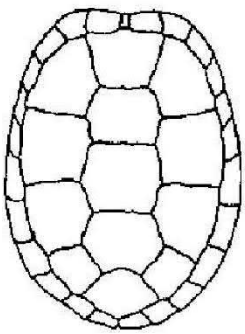
.....

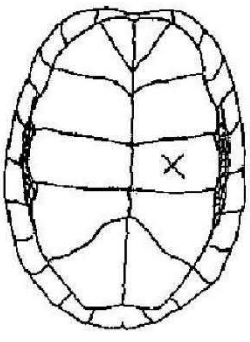
Observations :

LAC :

.....







Annexe 3 : Paramètres de l'analyse en LC-MS/MS (en orange les étalons internes et en vert les natifs)

Nom composé	Ion parent	Ion fils	Fragmenteur (V)	Energie de collision (V)	Temps de rétention (min)	Transition Quantification
3,4-dichloroaniline	162	127	100	17	5.2	X
3,4-dichloroaniline	162	74.1	100	60	5.2	
atrazine	216	174.1	130	16	5	X
atrazine	216	104.1	130	30	5	
atrazine 13C	219.7	106	110	30	5	
atrazine 13C	219.7	70	110	42	5	X
bentazone	241.3	199	70	9	5.2	
bentazone	241.3	107	70	25	5.2	X
bentazone d6	247.3	200.1	100	9	5.2	X
bentazone d6	247.3	108.1	100	25	5.2	
carbendazim	192.2	160	100	13	2.8	X
carbendazim	192.2	132.1	100	29	2.8	
carbendazim d3	195.2	160.1	100	13	2.8	X
carbendazim d3	195.2	132.1	100	33	2.8	
chlortoluron	213	140.1	100	15	5.1	
chlortoluron	213	72.1	100	15	5.1	X
diethylatrazine	188	146	105	16	3.5	X
diethylatrazine	188	104	105	24	3.5	
diethylatrazine 13C	191.6	149.1	110	14	3.5	
diethylatrazine 13C	191.6	106	110	26	3.5	
deisopropylatrazine	174.1	96	110	16	2.8	
deisopropylatrazine	174.1	68.2	110	28	2.8	X
diflufenican	395	266.1	110	22	7.4	X
diflufenican	395	246.1	110	38	7.4	
diflufenican D3	398.3	268.1	110	22	7.4	X
diflufenican D4	398.3	248.1	110	38	7.4	
hydroxyatrazine	198.2	156.1	100	13	3	X
hydroxyatrazine	198.2	114.1	100	21	3	
hydroxyAtrazine 13C	201.2	159.1	110	14	3	X
hydroxyAtrazine 13C	201.2	116.2	110	18	3	
imidaclopride	256	209	80	10	4.1	X
imidaclopride	256	175	80	18	4.1	
imidaclopride D4	260	213	80	14	4.1	
imidaclopride D4	260	179	80	14	4.1	X
imidaclopride olefin	254	236	80	6	3.6	
imidaclopride olefin	254	205	80	6	3.6	X
imidaclopride olefin	254	171	80	14	3.6	
imidaclopride urea	212	128	110	14	3.6	
imidaclopride urea	212	126	110	22	3.6	X
imidaclopride urea	212	99	110	14	3.6	
irgarol	254.1	198	110	16	5.3	X
irgarol	254.1	83.1	110	28	5.3	

Nom composé	Ion parent	Ion fils	Fragmenteur (V)	Energie de collision (V)	Temps de rétention (min)	Transition Quantification
isoproturon	207.1	165.2	100	10	5.3	
isoproturon	207.1	72.1	100	25	5.3	X
isoproturon d6	213.3	78.1	100	17	5.3	
isoproturon d6	213.3	52.2	100	13	5.3	X
metazachlor	278.7	211	110	6	5.7	
metazachlor	278.7	135.2	80	18	5.7	X
metolachlore ESA	330.4	298.1	100	10	5	X
metolachlore ESA	330.4	202.1	100	30	5	
metolachlore	284	252	95	8	6.5	X
metolachlore	284	176.2	95	24	6.5	
metolachlore d6	290.8	258.2	100	9	6.5	X
metolachlore d6	290.8	182.2	100	17	6.5	
metolachlore OXA	280	248.7	110	6	5.2	
metolachlore OXA	280	131.4	110	34	5.2	X
nicosulfuron	411.4	213	140	12	4.8	
nicosulfuron	411.4	182	140	20	4.8	X
nicosulfuron d6	417.4	106	110	34	4.8	X
nicosulfuron d7	417.4	86.1	110	58	4.8	
oxadiazon	345	303.1	100	9	7.7	X
oxadiazon	345	220	100	13	7.7	
pendimethaline	282.2	212.2	85	4	7.9	X
pendimethaline	282.2	193.8	85	12	7.9	
penoxsulam	484.4	195.1	130	25	6.2	X
penoxsulam	484.4	124.1	130	49	6.2	
propanil	218	162	100	13	6	
propanil	218	127	100	25	6	X
prosulfuron	420.4	167.1	140	28	6.3	
prosulfuron	420.4	141.1	140	12	6.3	X
simazine	202	132.1	100	20	4.4	
simazine	202	104.1	100	20	4.4	X
tebuconazole	308.2	125.1	130	44	6.4	
tebuconazole	308.2	70.1	130	20	6.4	X
tebuconazole d6	314.8	72.1	110	22	6.4	X
tebuconazole d7	314.8	57.2	110	34	6.4	
tebufenozide	353.5	133.1	100	13	6.8	X
tebufenozide	353.5	105.1	100	45	6.8	
terbutylazine	230.7	174.1	100	13	5.8	X
terbutylazine	230.7	68.1	100	37	5.8	
terbutylazine d5	235.7	179.1	130	9	5.8	
terbutylazine d5	235.7	69	130	33	5.8	X
desethylterbutylazine	202.6	146	100	9	4.5	X
desethylterbutylazine	202.6	43.1	100	41	4.5	

Annexe 4 : Validation méthodologique de la LC-MS/MS

COMPOSES	LOQ (ng/g)	Rendement faible conc	SD faible (%)	Rendement forte conc	SD forte (%)
atrazine	0.32	80	3	101	4
bentazone	0.51	98	17	113	6
carbendazim	0.63	101	11	100	1
chlortoluron	0.25	90	1	107	2
diethylatrazine	0.81	92	2	106	3
desethylterbuthylazine	1.00	106	7	115	5
deisopropylatrazine	0.79	64	4	89	6
3,4-dichloroaniline	0.47	73	12	97	5
diflufenican	0.18	82	3	108	1
hydroxyatrazine	2.65	88	5	104	2
imidaclopride	0.51	79	5	106	2
imidaclopride olefin	0.27	77	5	97	3
imidaclopride urea	0.45	83	7	100	4
irgarol	0.21	96	2	114	0
isoproturon	0.26	116	4	112	4
metazachlor	0.66	93	6	114	3
metolachlore ESA	0.17	77	5	108	3
metolachlore	0.15	116	8	120	5
metolaclore OXA	2.81	79	6	96	6
nicosulfuron	0.58	84	8	111	3
oxadiazon	1.06	105	30	114	5
pendimethaline	0.65	82	13	108	4
penoxsulam	0.14	69	20	113	3
propanil	0.51	75	10	107	5
prosulfuron	0.16	85	6	110	0
simazine	0.22	69	7	95	4
tebuconazole	0.09	114	5	112	4
tebufenozide	0.11	138	22	177	7
terbuthylazine	0.53	89	7	114	5

Annexe 5 : Gradient de la phase mobile de la LC-MS/MS

Temps (min)	Débit (mL/min)	% Solvant B
0.5	0.3	95
10	0.3	0
14	0.3	0
15	0.3	95
18.5	0.3	95

Résumé

Les zones humides comptent parmi les écosystèmes les plus exposés à des cocktails de substances toxiques, l'évaluation du niveau de contamination des organismes vivant permet d'avoir un point de vue général de la dégradation de ces milieux. Ce projet propose d'étudier la contamination plasmatique d'une espèce bioindicatrice en Camargue, la cistude d'Europe *Emys orbicularis*, par une trentaine de pesticides actuellement utilisés dans les parcelles agricoles du delta du Rhône. Nous avons examiné si la concentration et l'occurrence des polluants dans le plasma dépendent de facteurs individuelles (âge, sexe, taille et poids), spatiales (site d'échantillonnage) et temporelles (date d'échantillonnage). 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 liquide couplée à un spectromètre de masse en tandem (LC-MS/MS). Nous observons une différence significative de contamination entre les sites de capture et les dates de capture (au cours de la saison d'une même année et entre les années de prélèvements) des cistudes. La majorité des pesticides sont retrouvés à l'état de trace et, pour la plupart, en dessous des limites de quantification. Seul la bentazone atteint une occurrence (36% de quantification) et une concentration élevées (9,36 ng/g en moyenne par échantillon). Les niveaux de la bentazone augmentent dans le plasma des cistudes échantillonnées à proximité des parcelles agricoles, mais aussi au cours de la saison pour les années 2018 et 2020.

Mots clés : Camargue, Emys orbicularis, pesticide, bentazone, plasma.

Abstract

The wetlands are among the most exposed ecosystem to a mixture of toxics substances. The evaluation of the contaminants in the organisms allows to give a general vue of the degradation of these wetlands. The aim of this project is to evaluate the plasmatic contamination of a bioindicator specie in Camargue, the pond turtle *Emys orbicularis* by thirty pesticides that are currently used in the agricultural parcel in the Rhone's Delta. To achieve this goal, we examined whether the concentration and occurrence of pollutants in plasma depend on individual factors (age, sex, height and weight), spatial (sampling site) or temporal (date of sampling). Blood samples are taken from turtles of populations monitored for more than 20 years within the Natural Reserve of La Tour du Valat. The pollutant assays are made in purified extracts of plasma using liquid chromatography coupled to a tandem mass spectrometer (LC-MS/MS). We can observe a significant difference in contamination between the capture sites and the capture dates (during the season of the same year and between years of sampling) of pond turtles. We observe a significant difference in contamination between the capture sites and the capture dates (during the season of the same year and between the years of sampling) of pond turtles. Most pesticides are found in trace amounts and, for the most part, below the limits of quantification. Only bentazon reached a high occurrence (36% quantification) and a high concentration (9.36 ng/g on average per sample). The levels of bentazon increase in the plasma of pond turtles sampled near agricultural plots, but also during the season for the years 2018 and 2020.

Key words: Camargue, Emys orbicularis, pesticide, bentazone, plasma.