2022-2023

Contamination du milieu et niveau plasmatique de pesticides chez la Cistude d'Europe, *Emys orbicularis* : une étude comparative entre cinq populations en Camargue



Mickaël Charriot

Master Gestion de l'Environnement et Ecologie du Littoral

La Rochelle Université

Sous la direction de :

Aurélie Goutte (Maître de conférences)

Leslie-Anne Merleau (Doctorante)

Présentation de la structure d'accueil

Ce stage de master 2 a été réalisé dans l'Unité Mixte de Recherche Milieux Environnementaux, Transfert et Interactions dans les hydrosystèmes et les Sols (UMR 7619 METIS) à Sorbonne Université à Paris. Cette UMR a été créée en 2014 et est dirigée par Jean-Marie Mouchel. Au sein de l'UMR se trouve le département de Biogéochimie (BIOGEO) et le département Hydrologie, Hydrogéologie et Géophysique de Sub-Surface (H2GS2). Un des objectifs de cette unité est d'approfondir les connaissances sur la circulation générale de l'eau et les transferts des éléments associés (nutriments, contaminants organiques et minéraux) dans des environnements plus ou moins dégradés par les activités humaines.

Ce stage s'est déroulé dans la première équipe (BIOGEO) dont les principaux axes de recherches sont les suivants : (i) la dynamique temporelle : paléoreconstructions et trajectoires, (ii) la caractérisation des environnements naturels et anthropisés, (iii) les interactions biogéochimiques et rôle du vivant (iv) le continuum Sol-Eau/Terre-Mer : de l'expérimentation à la modélisation. Le projet CISTOX visant à caractériser les voies d'exposition aux pesticides chez différentes populations de Cistude d'Europe, *Emys orbicularis*, en France et les effets à différents niveaux physiologiques et écologiques en fonction du contexte environnemental, agricole et hydraulique est l'un des projets de recherches du troisième axe. Ce projet est financé par le plan Ecophyto II et est en collaboration avec la Tour du Valat et le Centre d'Etudes Biologiques de Chizé (CEBC).

La Tour du Valat a été créée par Luc Hoffman en 1954 et a pour objectif de participer à la conservation des zones humides de la Méditerranée où de nombreuses activités humaines viennent quotidiennement polluer l'environnement et dégrader les écosystèmes. Le CEBC, quant à lui, a été créé en 1968 et a pour objectif de comprendre comment les espèces sont capables de s'adapter à un environnement en perpétuel changement, dans un contexte d'utilisation importante des ressources naturelles par l'Homme.

Ce stage a donc été encadré principalement par Aurélie Goutte et Leslie-Anne Merleau (UMR 7619 METIS). Hélène Blanchoud et Fabrice Alliot (UMR 7619 METIS), Anthony Olivier et Marion Vittecoq (Tour du Valat) et Olivier Lourdais (CEBC) ont également fait partie de l'encadrement.

Remerciements

Je tiens à remercier dans un premier temps ma maître de stage, Aurélie Goutte, qui m'a encadré et aidé tout au long de mon stage. Cela m'a permis de confirmer mon intérêt sur l'impact des activités humaines sur les écosystèmes et plus particulièrement sur l'aspect de l'écotoxicologie. Je te remercie également de m'avoir permis de partir en Camargue afin d'assister aux captures des cistudes. J'ai ainsi pu voir toutes les étapes de la capture aux analyses des données.

Je remercie également Leslie-Anne Merleau qui m'a accompagné durant le stage et avec qui j'ai pu échanger sur divers aspects afin de m'approprier correctement le sujet. Merci pour la visite des sites en Camargue, c'était d'agréables petites randonnées.

Un grand merci à Fabrice Alliot d'avoir été là afin de répondre à mes diverses questions sur les aspects techniques et analytiques et un grand merci à Hélène Blanchoud de m'avoir permis de présenter mes travaux lors du colloque GFP.

Merci à Anthony Olivier, Marion Vittecoq et Olivier Lourdais que j'ai pu rencontrer lors de la session terrain en Camargue. Ça a été un agréable plaisir de pouvoir découvrir la Camargue tout en travaillant et en échangeant avec vous.

Je souhaite également remercier Florence Caurant d'avoir généreusement accepté d'être ma tutrice de stage et d'avoir pris de mes nouvelles au cours de ces six derniers mois de stage, ainsi que l'ensemble des enseignants que j'ai pu rencontrer au cours de mes deux années de master à l'Université de La Rochelle.

Merci à toi, Sira pour l'aide apportée durant les expériences en laboratoire. Merci à Etienne, Gauthier et Salomé d'avoir été présents et avec qui j'ai également échangé sur différents aspects pour mon rapport de stage.

Merci Isabelle, d'avoir été présente tout au long du stage. Merci infiniment pour l'aide que tu m'as apportée, grâce à toi j'ai réussi à faire une belle carte sur QGIS !

Enfin, merci à mes amis, Modan, Eloïse, Hugo, Cassandra, Marion, Tanguy et Faël et ma famille pour leur soutien !

I. Introduction 6
II. Matériels et méthodes 10
A. Présentation des sites d'étude 10
B. Collecte des cistudes, des écrevisses et échantillonnage environnemental 13
C. Analyse des pesticides provenant du plasma des cistudes d'Europe 15
a. Extraction des pesticides présents dans le plasma des cistudes d'Europe 15
b. Analyse en chromatographie en phase liquide couplée à un spectromètre de masse en tandem 16
D. Analyse des pesticides provenant des écrevisses de Louisiane 17
a. Broyage des écrevisses 17
b. Extraction des pesticides présents dans les écrevisses 17
c. Validation de la méthode 19
E. Extraction des lipides présents dans les échantillons d'écrevisses 21
F. Analyse des pesticides provenant des échantillons d'eau et des sédiments 21
G. Analyses statistiques 21
H. Autorisation éthique animale et autorisation de capture 23
III. Résultats 23
A. Description de la contamination du milieu en Camargue 23
a. La contamination de l'eau 23
b. La contamination des sédiments 25
B. Quantification des pesticides dans le plasma des Cistude d'Europe en Camargue 26
a. Nombre de pesticides quantifié et fréquence de détection 26
b. Occurrence des pesticides en fonction des sites 26
c. Concentration des pesticides plasmatiques en fonction des sites d'étude 27
d. Effet du sexe, du stade et de la condition corporelle sur les niveaux de contamination 29
C. La contamination chez l'Ecrevisse de Louisiane 29
D. Comparaison des niveaux de contamination de l'environnement et des cistudes 30
IV. Discussion 33
V. Conclusion 37
VI. Annexes 38
VII. Bibliographie 42

Liste des figures

Figure 1 : Tendance globale actuelle de l'augmentation de la production industrielle chimique depuis 2000

Figure 2 : La Camargue et ses espaces protégés (Vincent Heurteaux)

Figure 3 : Les voies d'exposition aux pesticides chez la Cistude d'Europe (**Adaptation du projet CISTOX**)

Figure 4 : Répartition des différents sites d'échantillonnage en Camargue

Figure 5 : Les différents sites de captures des cistudes d'Europe pour cette étude. A et B : La Bélugue. C et D : La Draille Marseillaise. E et F : Esquineau. G et H : Faïsses. I et J : Canal du Fumemorte

Figure 6 : Occupation des sols en Camargue

Figure 7 : Les filets, verveux, servant à capturer les cistudes

Figure 8 : Postes de travail des différentes étapes des méthodes d'extractions. A : Poste de travail de la méthode Quechers. B : ASE. C : EZ-2. D : Visiprep 12 postes pour la SPE. E : Concentration sous N_2.

Figure 9 : Mise en évidence du dimorphisme sexuel chez la Cistude d'Europe

Figure 10 : Concentrations des résidus de pesticides en $ng.L^{-1}$ dans les prélèvements d'eau ponctuels (échelle logarithmique) en fonction des sites d'étude. A : Somme des concentrations de tous les résidus avec la bentazone, B : Somme des concentrations de tous les résidus sans la bentazone, C : Concentration en bentazone uniquement

Figure 11 : Moyenne des teneurs des résidus de pesticides en $ng.g^{-1}$ sec dans les sédiments en fonction des sites d'étude. A : Somme des concentrations de tous les résidus avec la bentazone, B : Somme des concentrations de tous les résidus sans la bentazone, C : Concentration en bentazone uniquement

Figure 12 : Concentrations des résidus de pesticides en $ng.g^{-1}$ dans le plasma des cistudes d'Europe (échelle logarithmique) en fonction des sites d'étude. A : Somme des concentrations de tous les résidus avec la bentazone, B : Concentration en bentazone uniquement

Figure 13 : Pourcentage d'individus contaminés en fonction des concentrations des résidus de pesticides de l'eau (échelle logarithmique, en $ng.L^{-1}$). A : Somme des concentrations de tous les résidus avec la bentazone, B : Somme des concentrations de tous les résidus sans la bentazone, C : Concentration en bentazone uniquement.

Figure 14 : Pourcentage d'individus contaminés en fonction des concentrations des résidus de pesticides dans les sédiments (en $ng.g^{-1}$). A : Somme des concentrations de tous les résidus avec la

bentazone, B : Somme des concentrations de tous les résidus sans la bentazone, C : Concentration en bentazone uniquement.

Liste des tableaux

Tableau 1 : Présentation des sites d'étude et des échantillons collectés

Tableau 2 : Composition des mix d'étalons internes et des mix natifs

Tableau 3 : Paramètre de la source electrospray

Tableau 4 : Comparaison des rendements entre la méthode Quechers et la méthode ASE/SPE

Tableau 5 : Résultats des tests de Kruskal-Wallis pour la comparaison de la contamination entre les sites dans l'eau, avec df le degré de liberté et p la p-value

Tableau 6 : Nombre de résidus de pesticides quantifiés par individu avec et sans bentazone

Tableau 7 : Pourcentage d'individus contaminés pas site avec n le nombre d'individu total par site

Tableau 8 : Moyennes globales de la somme des concentrations des résidus de pesticides en $ng.g^{-1}$ retrouvées dans le plasma des cistudes d'Europe et nombre moyen de composés quantifiés par individu en fonction du site, avec et sans bentazone

Tableau 9 : Résultat des modèles linéaires généralisés en fonction du site, du sexe, de la condition corporelle et du stade d'usure, avec LR le rapport de vraisemblance, df le degré de liberté et p la p-value. En vert, les p-value <0,05.

Tableau 10 : Concentrations moyennes des résidus de pesticides en $ng.g^{-1}$ (Moyenne ± SD ; Maximum) retrouvées dans le plasma des Cistudes d'Europe en fonction du site, leur limite de quantification (LOQ, en $ng.g^{-1}$) et leur fréquence de détection en pourcentage. N_{tot} : Nombre total d'individu capturé par site, n : Nombre d'individu contaminé par site ayant servi à calculer les concentrations moyennes. En jaune le pesticide avec la fréquence de détection la plus élevée. Nb : Aucune contamination n'a été détectée pour les composés suivant : 3-4 dichloroaniline, atrazine, boscalid, cyazofamide, cymoxanil, cyprodinil, DEA, DEET, DIA, diflufenican, hydroxyatrazine, imidaclopride, imidaclopride olefin, imidaclopride urea, irgarol, isoproturon, métazachlore, métolachlore ESA, métolachlore NOA, métolachlore OXA, oxadiazon, pendiméthaline, propanil, prosulfuron, simazine, tébufénozide, terbuthylazine, terbuthylazine desethyl, tétraconazole, trifloxystrobin et zoxamide.

I. Introduction

L'intensification des activités humaines depuis les dernières décennies s'accompagne d'une utilisation de plus en plus importante de produits biologiques et chimiques introduisant alors de grandes quantités de contaminants dans l'environnement tels que des métaux lourds (mercure, arsenic, cadmium, …), des polychlorobiphényles (PCBs) ou encore des pesticides (**Barraza et *al.* 2021, Persson et *al.* 2022**). Les industries chimiques viennent se placer à la seconde place mondiale des industries avec plus de 350.000 produits chimiques estimés, présentes sur le marché (**figure 1**, **Persson et *al.* 2022**). Les activités anthropiques sont la cause principale de l'érosion de la biodiversité (**Newbold et *al.* 2015**) en raison de la surexploitation des écosystèmes, de la dégradation des habitats, de l'introduction d'espèces ou encore de la pollution de l'environnement (**Köhler et Triebskorn 2013, Dudgeon et *al.* 2015**). Ainsi, en Europe, plus de 40% des cours d'eau présentent des risques de toxicité chronique liés aux contaminants organiques chez les invertébrés, les poissons et les algues et plus de 14% des cours d'eau à risques de toxicité aiguë (**Majal et *al.* 2014**).

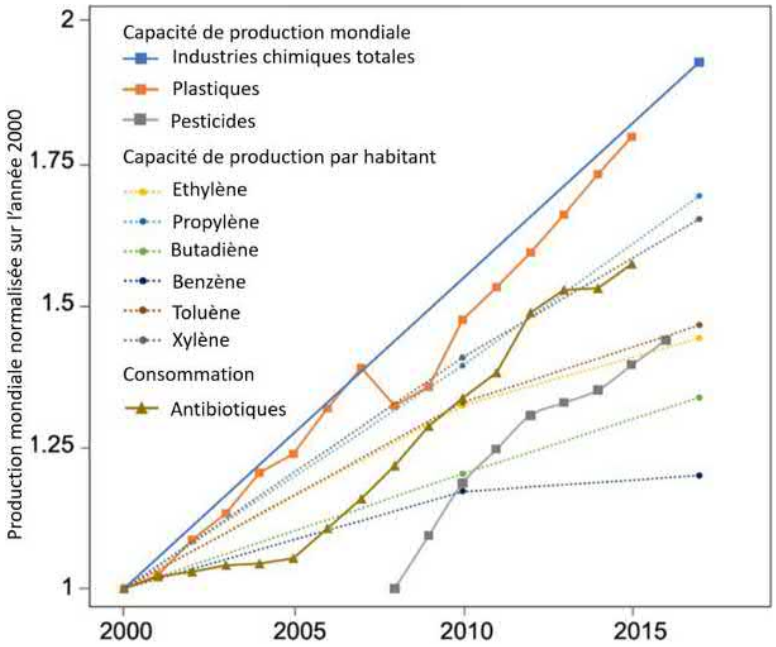


Figure 1 : *Tendance globale actuelle de l'augmentation de la production industrielle chimique depuis 2000 (**Persson et al. 2022**)*

L'agriculture fait également partie des activités qui se développent rapidement à la fois en termes d'intensification des pratiques et d'augmentation des surfaces cultivées en vue de subvenir aux besoins alimentaires de populations humaines croissantes. Ces changements sont accompagnés d'une utilisation plus importante des produits phytopharmaceutiques (PPs), avec notamment les herbicides, les fongicides et les insecticides, regroupés sous le nom de pesticides, se retrouvant alors déversés dans les écosystèmes (**Köhler et Triebskorn 2013**). Certains de ces contaminants environnementaux induisent des effets délétères (**Meyer et *al.* 2016**) à différentes échelles

biologiques et peuvent contribuer au déclin des populations animales non-cibles. **Rigal et *al.* (2023)** ont montré, en Europe, que l'utilisation des pesticides est la principale cause du déclin des populations d'oiseaux devant la perte d'habitats et les changements de température. Une étude expérimentale a montré que les pesticides sont responsables de 81%, 87% et 96% des dépassements observés du seuil de risque de toxicité aiguë pour les poissons, les invertébrés et les algues respectivement (**Majal et *al.* 2014**). Les contaminants agricoles peuvent avoir divers impacts, tels que des effets cancérigènes, des déficiences du système immunitaire ou des impacts neurotoxiques (**Crayton et *al.* 2020, Köhler et Triebskorn 2013**) sur les organismes non ciblés, comme les reptiles et les amphibiens (**Cardone 2014**). Certains pesticides seront plus ou moins persistants dans l'environnement comme par exemple, les pesticides organochlorés, faisant partie de la classe des polluants organiques persistants (POPs) qui sont, à des degrés variables résistants à la dégradation chimique et biologique (**de Solla 2015**). En revanche, d'autres pesticides ne sont pas persistants dans l'environnement et sont dégradés au bout de quelques heures. Ainsi, les espèces intègrent à différents niveaux et par différentes voies les contaminants présents dans leur environnement.

Les espèces exposées aux PPs peuvent être contaminées de différentes façons, *via* les transferts cutanés, les muqueuses respiratoires ou encore par l'alimentation (**Crayton et *al.* 2020, Meyer et *al.* 2016, de Solla 2015, figure 3**). Une fois dans l'organisme, certains pesticides peuvent être stockés dans les tissus adipeux -notamment les molécules lipophiles- tandis que d'autres seront transportés par le sang jusqu'au foie afin d'y être métabolisés (**Walker et *al.* 2012**). Lors de leur métabolisation, les pesticides sont dans un premier temps transformés en métabolites intermédiaires par ajout de groupements hydrophiles. La métabolisation des molécules permet de les rendre plus solubles afin de faciliter leur excrétion, jouant alors le rôle de détoxification dans l'organisme (**de Solla 2015, Walker et *al.* 2012**). Cependant, certains métabolites intermédiaires peuvent être plus toxiques que leurs molécules mères et générer des effets supplémentaires dans l'organisme (**Walker et *al.* 2012**), d'où l'intérêt de les prendre en compte également. Ces derniers commencent seulement à être pris en compte grâce au développement des techniques analytiques.

Les zones humides, sont des écosystèmes remarquables abritant une forte biodiversité avec plus de 100.000 espèces différentes (**Dudgeon et *al.* 2015**). Ces dernières sont particulièrement exposées aux activités humaines et à la pollution agricole. Parmi celles-ci, la Camargue, située au sud de la France, qui constitue le deuxième plus grand delta méditerranéen, le delta du Rhône, est la plus grande zone humide de France avec d'importantes superficies en lagunes, marais et roselières (**Cheiron et *al* 2018, Höhener et *al.* 2010**)**.** Cette zone humide représente une zone d'importance internationale pour la préservation et la conservation de l'environnement et de la biodiversité (**Höhener et *al.* 2010**). De ce fait, la Camargue bénéficie de nombreux statuts de protection (**figure 2**) : le Parc Naturel Régional de la Camargue classé site RAMSAR, Réserve de Biosphère et site Natura 2000 (**Cheiron et *al* 2018**), dans lequel se trouve la Réserve Naturelle

Nationale de Camargue, la Réserve Naturelle Régionale de la Tour du Valat et plusieurs sites acquis par le Conservatoire du Littoral.

La Camargue concentre de multiples activités humaines, notamment agricoles, utilisant de grandes quantités de pesticides pour le maraîchage, la viticulture, la riziculture et d'autres grandes cultures entraînant une forte pollution environnementale. La Société Nationale de Protection de la Nature (SNPN) réalise des suivis réguliers de la contamination par les pesticides, grâce à des prélèvements d'eau, notamment dans le canal du Fumemorte au niveau de l'embouchure avec l'étang du Vaccarès, où, les concentrations mesurées sont supérieures aux seuils autorisés. **Espel et *al.* (2019)** ont montré que le déclin des herbiers de zostères de l'étang du Vaccarès était en partie causé par la multiple contamination par les pesticides. La pollution par les pesticides représente donc l'une des plus grandes menaces pour la biodiversité au sein du Parc Naturel avec une grande diversité de résidus de pesticides retrouvés fréquemment dans l'environnement et notamment dans l'eau (**Cheiron et *al* 2018**). Par exemple, la riziculture nécessite l'utilisation de canaux de drainage afin de réaliser les différents cycles d'immersion des cultures entraînant alors les divers PPs dans les canaux, ce qui augmente leur dispersion ainsi que les processus de lixiviation. Les pesticides provenant de ce type de culture comptent pour 90% des pesticides détectés (**Comoretto et *al.* 2007**). Grâce au développement de nouveaux outils tels que les préleveurs passifs, il est maintenant possible d'améliorer les limites de détection actuelle permettant d'affiner les résultats.

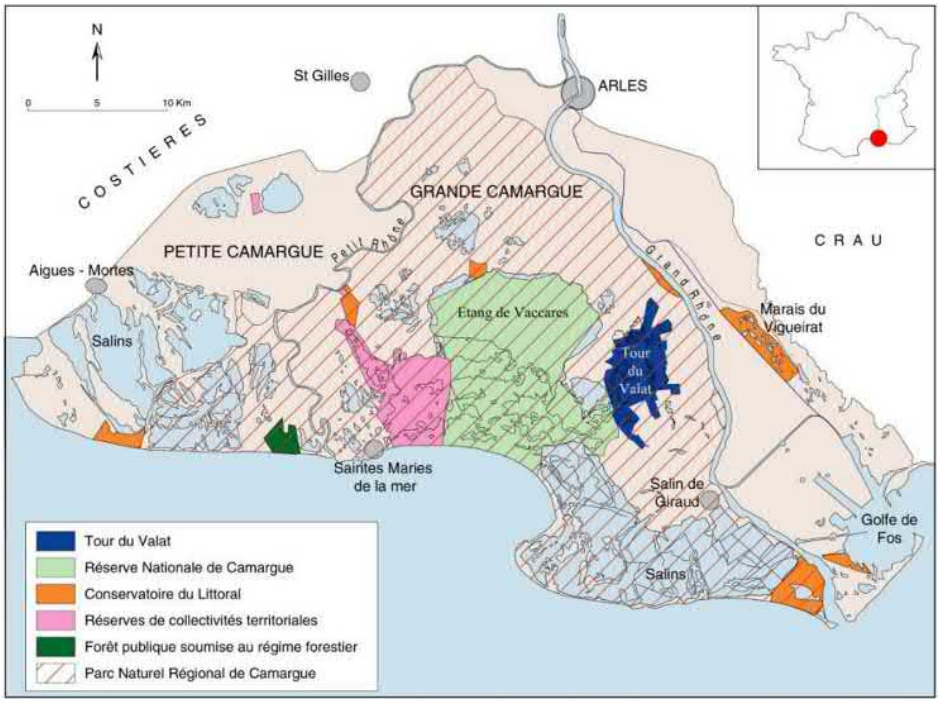


Figure 2 : *La Camargue et ses espaces protégés (Vincent Heurteaux)*

La Camargue abrite l'une des plus importantes populations françaises de Cistudes d'Europe, *Emys orbicularis* (**Olivier 2002**). Il s'agit de l'une des tortues d'eau douce les plus menacées en Europe (**Cheylan 1998**). Cette dernière est protégée dans l'Union Européenne par l'annexe II de la Directive Habitat (92/43/EEC) de la convention relative à la conservation de la vie sauvage et du milieu naturel

de l'Europe. Par ailleurs, selon la liste rouge des espèces menacées de l'Union Internationale pour la Conservation de la Nature, UICN, la Cistude d'Europe est classée dans la catégorie « Quasi menacée ». Cette tortue d'eau douce fait face à un déclin de sa population en raison de la profonde modification de son environnement (**Cheylan 1998, Thienpont 2020**). En effet, le changement climatique, les captures accidentelles, l'altération des habitats ou encore l'introduction de contaminants dans le milieu naturel représentent les principales menaces auxquelles la Cistude d'Europe, comme de nombreuses espèces de reptiles, est confrontée (**Gibbons et al 2000, Todd et al 2010**). Bien que de nombreuses études dans le domaine de l'écotoxicologie se soient intéressées aux effets des contaminants chez les mammifères ou les poissons, les études réalisées chez les reptiles et les amphibiens restent beaucoup plus limitées (**Barraza et *al.* 2021, Hopkins 2000**). Pourtant les sources d'exposition sont multiples notamment pour une espèce semi aquatique (**figure 3**)

Les tortues d'eau douce sont des espèces sédentaires pour la plupart possédant des domaines vitaux de faibles superficies, qui peuvent être utilisées comme bioindicateurs afin d'obtenir des informations sur la contamination de l'environnement au niveau d'aires géographiques restreintes (**Guillot et *al.* 2018**). La cistude d'Europe est donc une candidate idéale afin de connaître la contamination locale en pesticides au niveau de la Camargue. Par ailleurs, il s'agit d'une espèce opportuniste omnivore longévive -en vieillissant les tortues semblent avoir également un régime herbivore (***Ficetola et De Bernardi 2006***)- se nourrissant de poissons, de vers, d'insectes et principalement d'écrevisses de Louisiane, *Procambarus clarkii* (**Ducotterd et *al.* 2020, Ottonello et *al.* 2005**). Enfin, la facilité d'accès aux individus à travers leur capture grâce à des filets, et la possibilité de leur prélever du sang de manière peu invasive (**Clark et *al.* 2000**) permet d'accéder facilement à leur niveau d'exposition et ainsi le comparer à la contamination de leur milieu.

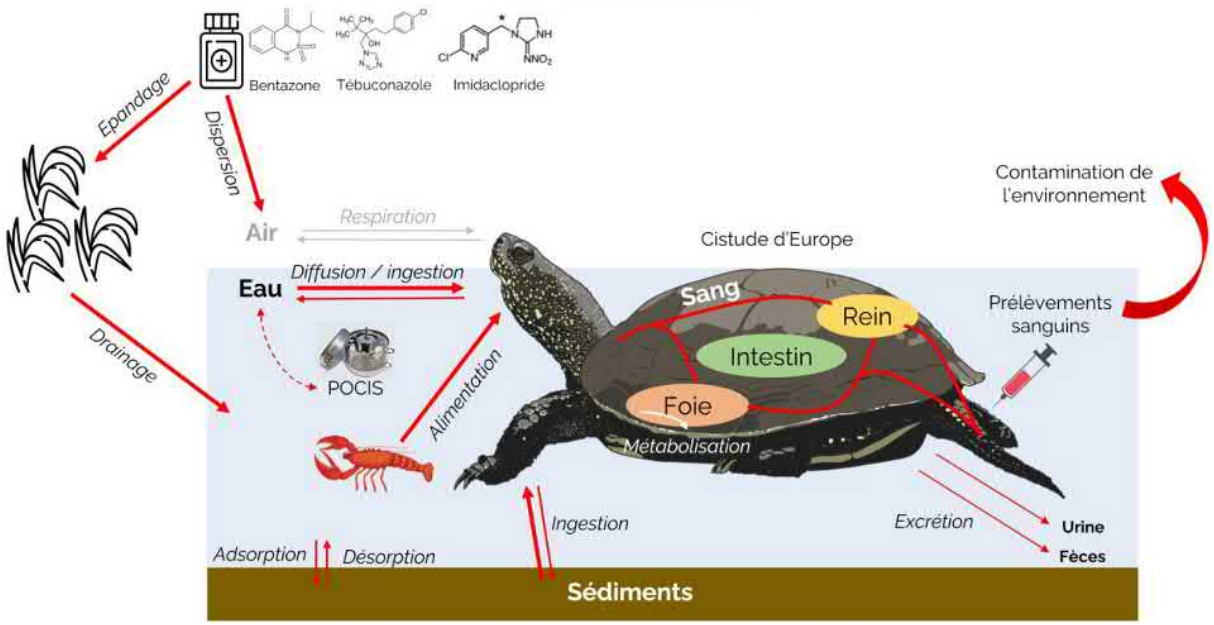


Figure 3 : *Les voies d'exposition aux pesticides chez la Cistude d'Europe (**Adaptation du projet CISTOX**)*

Le projet CISTOX piloté par le CEBC-CNRS (UMR 7372) et financé par le plan Ecophyto II vise à évaluer l'exposition de la Cistude d'Europe aux pesticides en fonction du contexte agricole et environnemental et les effets à différents niveaux physiologiques et écologiques. Lors de la première saison de capture en 2022, 5 populations ont été échantillonnées en Camargue : Draille Marseillaise, Esquineau, Faïsses, La Bélugue et Grand Badon, présentant des contextes hydrauliques et paysagers variés (**figure 4**). Ce stage a donc comme objectif d'évaluer les niveaux d'exposition et d'occurrence de 40 résidus de pesticides chez la Cistude d'Europe en Camargue en fonction du contexte agricole et environnemental. Les problématiques auxquelles cette étude répond sont les suivantes :

(i) Existe-t-il des différences de contaminations et d'occurrence aux résidus de pesticides entre les sites et notamment ceux les plus exposés aux pratiques agricoles ? Hypothèse : les sites les plus contaminés sont attendues sur les sites de drainage, tels que le site des Faïsses.

(ii) Est-ce que le niveau de contamination des cistudes d'Europe reflète les niveaux de contaminations retrouvés dans l'eau, les sédiments ou leurs proies, les écrevisses ? Hypothèse : les concentrations retrouvées dans le plasma des cistudes devraient coïncider avec les concentrations mesurées dans l'eau et les sédiments à la même période.

(iii) Est-il possible d'expliquer les variations interindividuelles des niveaux de pesticides circulants avec des paramètres individuels ? Pour cela, différents facteurs, à savoir le site, le sexe, la condition corporelle et le stade d'usure de la carapace (proxy de l'âge) ont été étudiés afin d'évaluer leur influence sur la contamination des cistudes. Hypothèse : des différences devraient être observées entre les mâles et les femelles en raison d'un possible transfert des contaminants dans les œufs diminuant alors la contamination des femelles.

Dans un premier temps, une description de la contamination du milieu sera présentée grâce à l'analyse des contaminants retrouvés dans l'eau et les sédiments. Par la suite, l'étude se concentrera sur la contamination des cistudes en fonction des différents sites. Enfin, l'étude se focalisera sur la comparaison des niveaux de contamination retrouvés dans l'eau, les sédiments, les écrevisses de Louisiane et les cistudes d'Europe.

II. Matériels et méthodes

A. Présentation des sites d'étude

Les cistudes ont été capturées l'année précédant le présent stage en Camargue sur 5 sites selon cet chronologique : Esquineau, Draille Marseillaise, Faïsses, Grand Badon et La Bélugue (**figure 4, figure 5 et tableau 1**). Chaque site a été prospecté sur une période de deux semaines, soit une campagne de terrain qui s'est déroulée du 17 mai au 27 juillet 2022. En parallèle des captures de cistudes pour la collecte d'échantillons biologiques, la contamination de l'environnement sur chacun des sites a été caractérisée *via* des prélèvements ponctuels d'eau, de sédiments, ainsi que le déploiement d'échantillonneurs passifs (Polar Organic Chemical Integrative Samplers ou POCIS)

pendant deux semaines sur chaque sites afin d'intégrer la contamination par les pesticides présents dans l'eau et améliorer les limites de détection. L'alimentation représente l'une des voies d'entrée des pesticides au sein d'un organisme (**figure 3**). Ainsi, pour chaque site échantillonné, des écrevisses de Louisiane (*Procambarus clarkii*) ont été attrapées dans les verveux afin de mesurer leur teneur en pesticides. En effet, cette espèce constitue une des proies principales des cistudes en Camargue (**Ottonello et *al.* 2005**) et possiblement une voie de contamination pour ces dernières.

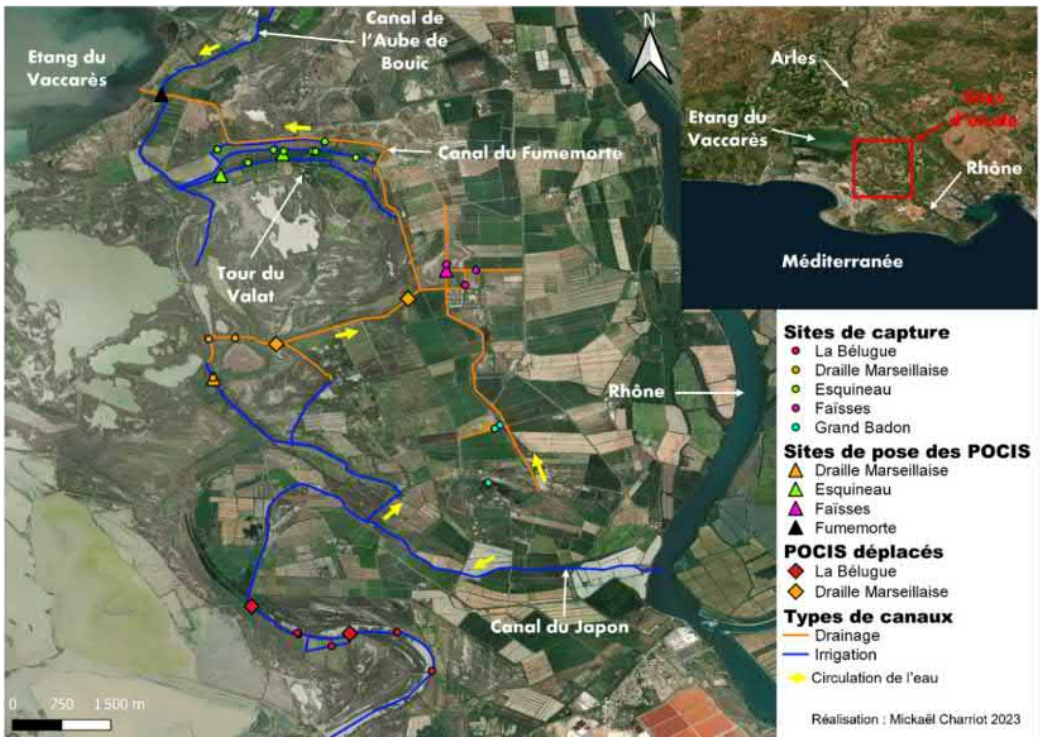


Figure 4 : *Répartition des différents sites d'échantillonnage en Camargue*

Les sites d'Esquineau et de la Draille Marseillaise sont situés au sein de la Réserve Naturelle Régionale de la Tour du Valat tandis que Faïsses se situe également sur le domaine de la Tour du Valat, mais en dehors de la Réserve Régionale. Le site d'Esquineau, est alimenté par le canal de l'Aube de Bouic, canal dont l'eau est pompée dans le Rhône plus en amont et qui est utilisé par les agriculteurs pour irriguer leurs cultures. Deux préleveurs passifs POCIS ont été déployés sur ce site. La Draille Marseillaise se situe à proximité de deux canaux différents, un canal secondaire de drainage qui se jette dans le canal du Fumemorte, qui draine l'eau depuis les parcelles agricoles, et le canal du Japon dont l'eau provient du Rhône et qui est utilisé pour l'irrigation. Le canal du Fumemorte quant à lui, se déverse dans l'étang du Vaccarès. Un POCIS a été placé au niveau du canal du Japon et un autre au niveau du bras du Fumemorte en aval. Ce dernier a été déplacé après trois jours du fait de l'assèchement temporaire du canal et a été reposé au niveau de ce même canal plus en amont. Le site des Faïsses est irrigué par deux canaux secondaires du canal du Fumemorte. Deux POCIS ont été déployés, l'un se situant au niveau d'un des deux canaux secondaires du Fumemorte et le second au niveau de l'embouchure du Fumemorte (en noir **figure 4**) au niveau de l'étang du Vaccarès. Le site du Grand Badon se trouve dans le domaine privé du Grand Badon drainé

par le canal du Fumemorte. A proximité du site, il y a des parcelles cultivées en agriculture biologique. Il n'y a pas eu de pose de POCIS car le site se situe sur une propriété privée. Pour finir, le site de La Bélugue, propriété du Conservatoire du Littoral, se trouve près d'un des canaux secondaires du canal du Japon, un POCIS a été déployé et déplacé au bout de six jours en raison de l'abaissement du niveau d'eau (**figure 4**). Il a été repositionné en amont du ce même canal. Les dates précises de déploiement des POCIS sont indiquées dans le **tableau 1**.

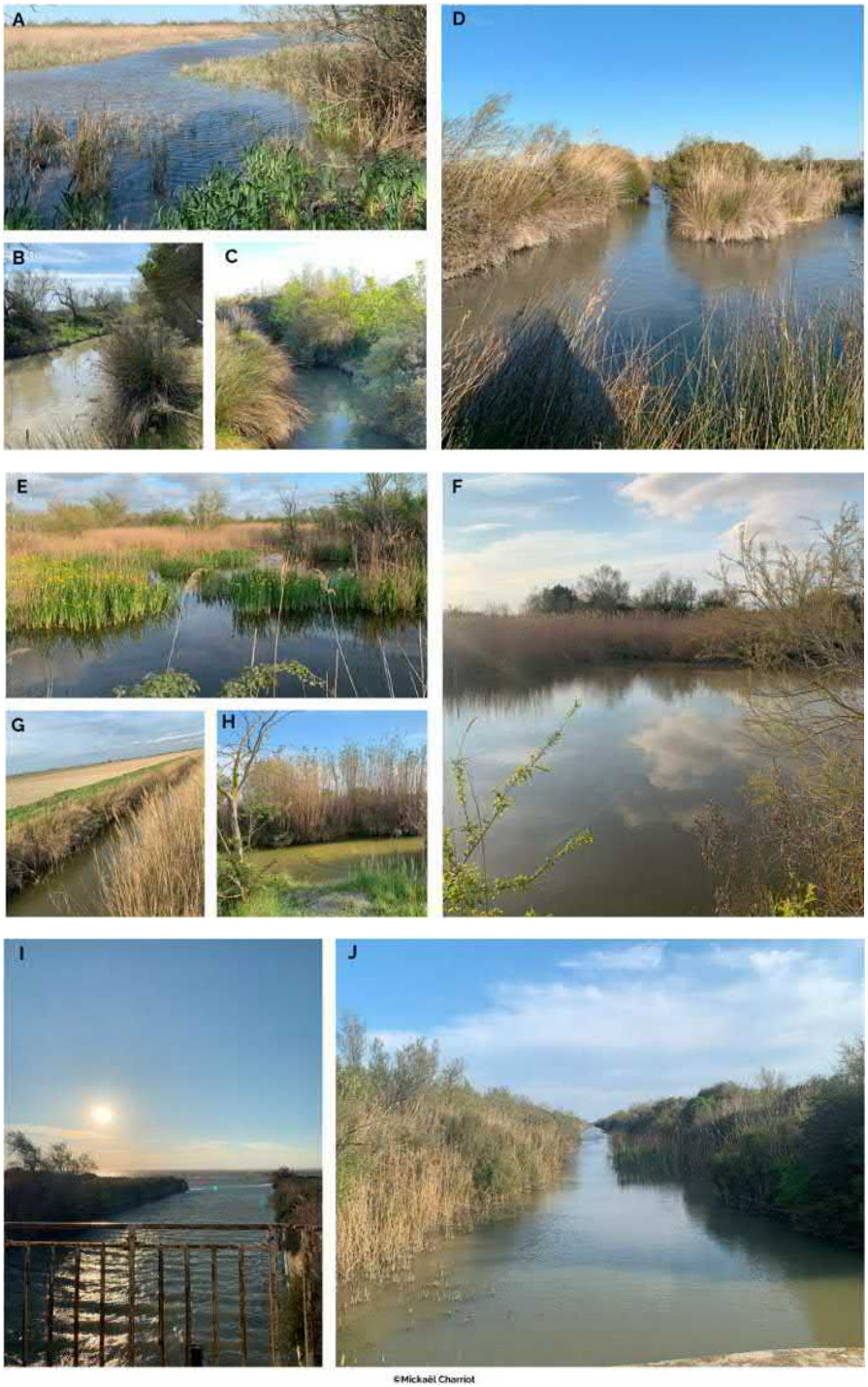


Figure 5 : *Les différents sites de captures des cistudes d'Europe pour cette étude. A et B : La Bélugue. C et D : La Draille Marseillaise. E et F : Esquineau. G et H : Faïsses. I et J : Canal du Fumemorte*

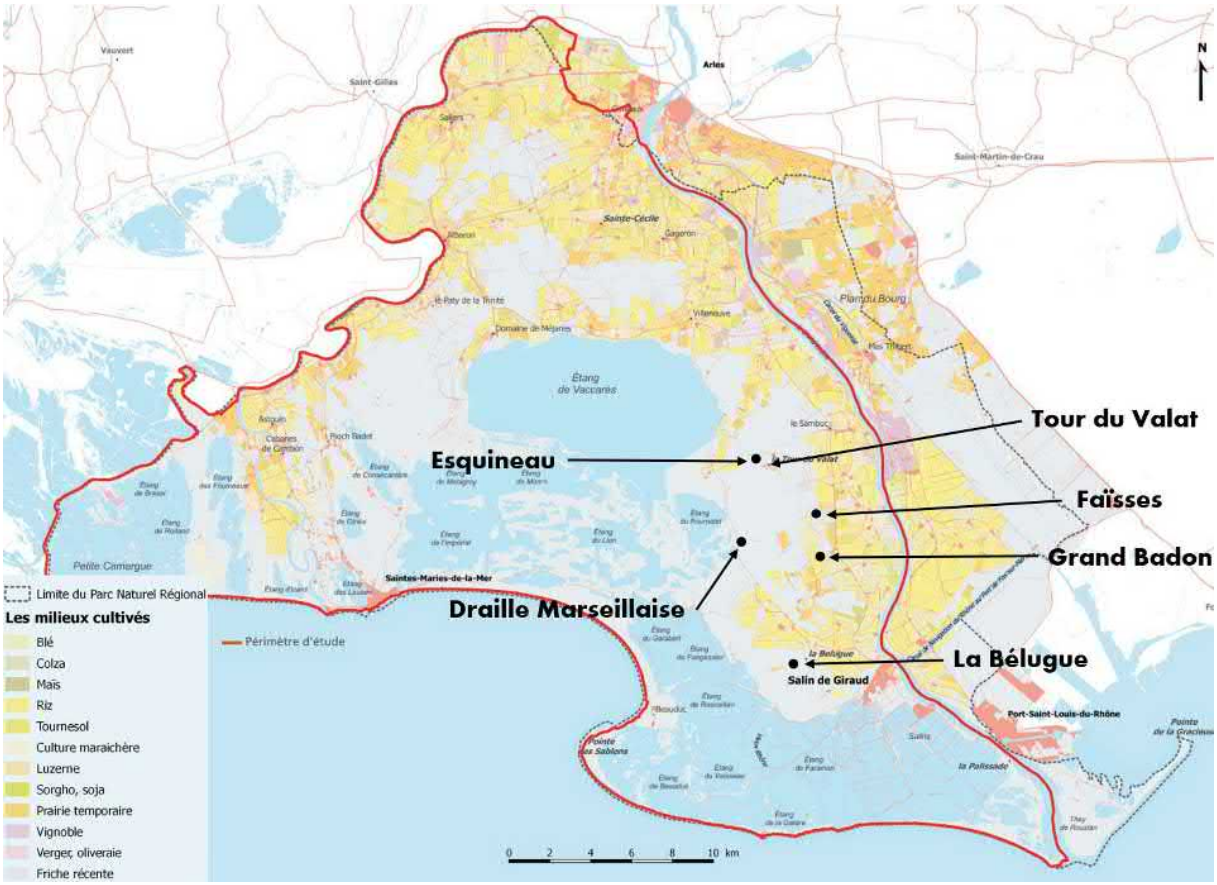


Figure 6 : *Occupation des sols en Camargue (***Parc naturel régional de Camargue 2017**)

La Camargue représente une zone d'étude idéale quant à la contamination de l'environnement et des organismes aux pesticides. En effet, cette dernière est majoritairement occupée par une activité agricole importante (**figure 6,** Parc naturel régional de Camargue 2017). Sur les 101 243 ha que représente le parc naturel régional de Camargue, 24% (soit 24 000 ha) sont utilisés pour l'agriculture.

B. Collecte des cistudes, des écrevisses et échantillonnage environnemental

Pour chacun des sites, des cistudes d'Europe ont été capturées à l'aide de verveux (**figure 7**). La période de capture s'est étendue entre mi-mai 2022 et fin juillet 2022 (**tableau 1**), période qui correspond à l'utilisation des pesticides pour lutter contre les adventices et diverses espèces d'insectes et champignons ravageurs de cultures ainsi qu'à la principale période d'activité des cistudes d'Europe (Cadi et *al. 2004*, Duguy et Baron 1998). Pour chaque site, les captures sont faites le matin. La pause des verveux a lieu le lundi matin et ces derniers sont retirés le vendredi. Les verveux sont des filets présentant deux chambres les unes à la suite des autres en entonnoir (**figure 7**) afin d'entraîner l'individu à l'extrémité du filet, dont une partie de la dernière chambre se situe en dehors de l'eau afin de permettre aux tortues de respirer.



Figure 7 : *Les filets, verveux, servant à capturer les cistudes*

Une fois capturées, les cistudes sont transportées dans les locaux de la Tour du Valat et un prélèvement sanguin est effectué au niveau de la veine coccygienne dorsale (**figure 3**) pour les individus dont le poids est supérieur à 300 g. Pour ce faire, l'individu est placé entre les genoux du manipulateur et une extension de la queue est réalisée afin de faciliter l'introduction de l'aiguille BD® (Franklin Lakes, Etat-Unis). La seringue utilisée, Terumo Company® (Somerset, Etats-Unis), est imbibée d'héparine pour éviter la coagulation du sang. Environ 1,5 mL de sang sont prélevés. Les échantillons sont ensuite passés à la centrifugeuse pendant 3 minutes à 3000 rotations par minute (rpm) pour séparer les cellules sanguines du plasma. Un sous-échantillon de plasma est prélevé et congelé à -18°C avant analyse pour déterminer les teneurs en pesticides. Après exposition, les pesticides sont transportés dans le sang (**Walker et *al.* 2012**). Ce dernier représente donc une matrice d'intérêt pour mesurer la charge en contaminants au niveau individuel. Il s'agit de plus d'un prélèvement non léthal et peu invasif pour les individus.

Tableau 1 : *Présentation des sites d'étude et des échantillons collectés*

Domaine	Sites	Date d'échantillonnage	Mâles capturés	Femelles capturées	Ecrevisses collectées	POCIS installés	Date déploiement POCIS
Tour du Valat	Esquineau	Du 17/05/2022 au 25/05/2022	12	11	5	2	Du 18/05/2022 au 01/06/2022
	Draille Marseillaise	Du 30/05/2022 au 10/06/2022	10	12	11	2	Du 30/05/2022 au 13/06/2022
	Faïsses	Du 14/06/2022 au 23/06/2022	9	11	8	2	Du 13/06/2022 au 27/06/2022
Mas du Grand Badon	Grand Badon	Du 27/06/2022 au 15/07/2022	7	9	9	0	-
Conservatoire du Littoral	La Bélugue	Du 19/07/2022 au 27/07/2022	11	10	7	1	Du 18/07/2022 au 01/08/2022

Des données biométriques sont relevées tels que le poids, la longueur de la dossière, la longueur du plastron ou la largeur de la dossière. Un pied à coulisse est utilisé pour les différentes mesures de taille. Le sexe est déterminé sur la base du dimorphisme sexuel. Les mâles ont un plastron concave, l'iris orangé et une queue plus courte tandis que les femelles ont un plastron plat, l'iris jaune et une queue plus fine et allongée. La classe d'âge est estimée en fonction du stade d'usure des écailles (4 stades, **Burkart et *al.* 2021**). Au total, 102 cistudes d'Europe et 40 écrevisses de Louisiane ont été capturées, 25 échantillons d'eau ponctuels et 22 échantillons de sédiments ont été prélevés et 7 préleveurs passifs, POCIS (Polar Organic Chemical Integrative Samplers), ont été déployés.

C. Analyse des pesticides provenant du plasma des cistudes d'Europe

Dans le but d'extraire et quantifier les pesticides circulant dans les cistudes, 102 échantillons de plasma ont été analysés à l'UMR METIS 7619, Sorbonne Université. Le choix des pesticides recherchés s'est effectué sur la base des analyses de contaminants effectuées dans le canal du Fumemorte par la SNPN (Société Nationale de Protection de la Nature) et en extrayant les données de la Banque Nationale des Ventes Distributeurs (BNV-d) afin d'obtenir une liste des pesticides achetés par les agriculteurs des sites étudiés dans le cadre du projet CISTOX.

Les dates d'utilisation des pesticides pour les différents traitements effectués par les agriculteurs ne sont pas connues, tout comme les quantités et les pesticides utilisés. Les pesticides qui ont donc été recherchés durant les analyses sont les suivants :

1) Pesticides utilisés comme herbicides/fongicide dans la riziculture : bentazone, carbendazime, oxadiazon, penoxsulam, propanil, tébuconazole, tébufénozide, terbuthylazine et un de ses métabolites (terbuthylazine desethyl).

2) Autres pesticides : 3,4 dichloroaniline, ametoctradin, atrazine et ses trois métabolites (deisopropylatrazine (DIA), diethylatrazine (DEA) et hydroxyatrazine), boscalid, chlortoluron, cyazofamide, cymoxanil, cyprodinil, DEET, diflufenican, imidaclopride et ses deux métabolites (imidaclopride olefin et imidaclopride urée), irgarol, isoproturon, métazachlore, métolachlore et ses trois métabolites (métolachlore ESA, métolachlore NOA et métolachlore OXA), nicosulfuron, pendiméthaline, prosulfuron, simazine, spiroxamine, tétraconazole, trifloxystrobine et zoxamide.

a. Extraction des pesticides présents dans le plasma des cistudes d'Europe

Dans un premier temps, les échantillons sont préparés afin de pouvoir les analyser en chromatographie en phase liquide couplée à un spectromètre de masse en tandem (LC-MS/MS, LC (1260) triple Quad (6465), Agilent). Les 102 échantillons ont été répartis aléatoirement (Randomisation sur R avec le package OSAT) en six lots afin d'éviter la perte de tous les échantillons d'un même site en cas de problème de manipulation, de matériel ou de contamination.

Les analyses sont réalisées sous sorbonne afin d'éviter tout risque de contamination et tout risque sur la santé. Ces dernières sont issues du protocole utilisé par **Dong X et *al.*, 2014**. Un lot

d'échantillons est décongelé et chaque échantillon est vortexé quelques secondes. Pour chaque échantillon, 100 µL de plasma sont prélevés et déposés dans un nouveau tube eppendorf. Par la suite, 10 µL de chaque mix d'étalons internes (**tableau 2**) à 5 ng.µL^{-1}, soit 50 ng de chaque composé sont ajoutés dans les tubes eppendorf à l'aide d'une pipette automatique eVol® (SGE Analytical Science, Australie). Les mix vont permettre de quantifier les teneurs en pesticides présents dans les échantillons. Les échantillons sont vortexés quelques secondes puis laissés une nuit à 4°C.

Le lendemain, 200 µL d'acétonitrile sont ajoutés dans chaque tube eppendorf contenant les échantillons qui sont par la suite passés au vortex pendant 30 secondes. Les échantillons sont ensuite centrifugés à 6000 rpm pendant 3 minutes. Après centrifugation, le surnageant des échantillons est récupéré et transféré à l'aide d'une micropipette dans des filtres-tubes en nylon (0,2 µm, VWR). Les filtres vont permettre de retenir de potentielles particules encore présentes dans l'échantillon. Les échantillons sont à nouveau centrifugés à 6000 rpm pendant 1 minute. Les extraits sont transférés dans des vials de 2 mL dans lesquels sont placés des inserts droits de 400 µL. Lorsqu'un échantillon est transféré dans un vial, le filtre-tube de nylon est rincé avec 75 µL d'acétonitrile afin de récupérer un maximum d'extraits. Les vials sont par la suite conservés à -18°C avant leur analyse en LC-MS/MS.

En plus des échantillons, un échantillon contrôle (blanc) a été préparé pour quatre des six séries suivant le même protocole en remplaçant le plasma par 100 µL d'acétonitrile.

Tableau 2 : *Composition des mix d'étalons internes et des mix natifs*

Mix El 14 pesticides	**Mix El 5 pesticides « Camargue »**	**Mix Natifs pesticides 20**	**Mix Natifs pesticides 10**	**Mix Natifs 13 pesticides « Camargue »**
Atrazine 13C, Carbendazime D3, DEA 13C, Diflufenican D3, Hydroxyatrazine 13C, imidaclopride D4, métaldéhyde D16, Metformine D6, Nicosulfuron D6, Tébuconazole D6, Bentazone D6, Métolachlore D6 (propyl D6), Terbuthylazine D5 (ethyl D5), Isoproturon D6 (dimethyl D6)	Boscalid d4, Cyprodinil d5, DEET d7, Azoxystrobin d4, Trifloxystrobin d6	Chlortoluron, DEA, DIA, Hydroxyatrazine, Imidaclopride, Imidaclopride olefin, Imidaclopride urea, Irgarol, Isoproturon, Metazachlor, Metolachlor, Metolachlor OXA, Metolachlor ESA, Metolachlor NOA, Nicosulfuron, Prosulfuron, Simazine, Tebuconazole, Pendimethaline	3, 4-Dichloroaniline, Bentazone, Carbendazim, Diflufenican, Oxadiazon, Penoxsulam, Propanil, Tebufenozide, Terbuthylazine, Terbuthylazine desethyl	Fludioxonil, Boscalid, Azoxystrobin, Ametoctradin, Chlorpyrifos methyl, Cyazofamid, Cymoxanil, Cyprodinil, Spiroxamine, Trifloxystrobi, Tetraconazole, Zoxamide, DEET

b. Analyse en chromatographie en phase liquide couplée à un spectromètre de masse en tandem

En bref, 10 µL de l'échantillon sont injectés dans le système puis séparés sur une colonne de type C18 (Zorbax Eclipse Plus C18 (2,1 x 150 mm ; 3,5 µm, Agilent)thermostatée à 40°C via un gradient de

phase mobile constituée d'eau ultra pure (EMQ) et d'acétonitrile avec 0,1% d'acide formique (**voir tableau a en annexe**). Le débit utilisé est de 0,3 mL.min^{-1} avec un temps d'analyse de 15 min. Le spectromètre est équipé avec une source electrospray utilisée en mode positif. Les caractéristiques de la source sont présentées dans le **tableau 3**.

Tableau 3 : *Paramètres de la source electrospray*

Paramètre	Valeur
Température gaz (°C)	300
Débit gaz (L.min^{-1})	7
Nébuliseur (psi)	15
Capillaire (V)	4000
Température Sheath gaz (°C)	250
Débit Sheath gaz (°C)	11
Nozzle (V)	1500

L'acquisition du signal en MS/MS (mode dMRM) permet d'obtenir deux transitions pour chaque composé analysé avec des énergies spécifiques pour chaque molécule (**voir tableau b en annexe**).

Après analyse en LC-MS/MS, les résultats sont traités grâce au logiciel Agilent MassHunter Workstation Quantitative Analysis for QQQ (version 10.0) afin d'obtenir les quantités pour chacun des composés, par la méthode de l'étalonnage interne, en prenant en compte les limites de quantifications (LOQ), qui sont différentes pour chaque composé et chaque matrice (**voir tableau c en annexe**).

D. Analyse des pesticides provenant des écrevisses de Louisiane

a. Broyage des écrevisses

Dans un premier temps, les 40 écrevisses congelées et conservées à -18°C sont lyophilisées pendant 48 h (Lyophilisateur Alpha 1-4). Le taux d'humidité est déterminé à partir de leur poids avant et après lyophilisation. Les cistudes ne consommant *à priori* pas l'exosquelette des écrevisses, celui-ci a donc été retiré avant les analyses. A l'aide d'une pince fine, un maximum de tissus mous et d'organes internes sont retirés délicatement et déposés dans une coupelle propre puis broyés dans un mortier en quartz jusqu'à obtention d'une fine poudre. Le broyat est ensuite pesé et transféré dans son tube initial. Entre chaque échantillon, le matériel utilisé est nettoyé à l'aide d'éthanol afin d'éviter la contamination de l'échantillon suivant.

b. Extraction des pesticides présents dans les écrevisses

Deux méthodes sont appliquées (Quechers et ASE/SPE), et leur rendement et leur répétabilité comparés, pour déterminer la plus adéquate pour extraire et doser les teneurs en pesticides sur les échantillons d'écrevisses : la méthode Quechers (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe, Agilent : 5982-1010) et la méthode ASE/SPE (Accelerated Solvent Extraction/Solid Phase Extraction). Pour cela, deux écrevisses provenant du site Esquineau et prélevées en 2019, sont utilisées. La même liste de pesticides que pour le plasma des cistudes a été recherchée.

Méthode Quechers

Environ 500 mg de l'échantillon sont déposés dans chacun des quatre tubes Falcon de 50 mL auxquels sont ajoutés environ 500 mg de NaCl et 2 g de Na_2SO_4 anhydre. Par la suite, 10 µL des deux mix d'étalons internes -utilisés pour l'extraction des pesticides dans le plasma des cistudes- sont ajoutés dans chacun des tubes et 10 µL des trois natifs, à 5 $ng.\mu L^{-1}$ soit 50 ng de chaque composé (**tableau 2**), sont ajoutés dans les tubes falcon. Les tubes sont ensuite placés une nuit à 4°C.

Le lendemain, 6 ml d'acétonitrile sont ajoutés à l'aide d'une micropipette dans chaque tube, qui sont ensuite vortexés 1 min puis passés aux ultra-sons (Branson 3800) pendant 5 min afin de permettre une meilleure extraction. Les échantillons sont ensuite centrifugés pendant 5 min à 4350 rpm. Le surnageant est récupéré et déposé dans des flacons ambrés de 15 mL puis 6 mL d'acétonitrile sont à nouveau déposés dans les tubes des échantillons et les mêmes étapes sont réalisées afin de maximiser l'extraction. Ensuite, l'échantillon est transféré du flacon ambré au tube phase dispersive de 15 mL (Agilent 5982-1010, SPE dispersive EMR), il est vortexé 1 min et centrifugé 5 min à 4350 rpm. Après centrifugation, le surnageant est récupéré et transféré dans de nouveaux flacons ambrés. L'échantillon est reconcentré sous N_2 en faisant évaporer l'acétonitrile à 40°C (**figure 8A, 8E**), puis déposé dans un filtre tube en nylon et le flacon ambré est rincé deux fois de suite avec 100 µL d'acétonitrile. Après l'avoir passé à la microcentrifugeuse 2 min à 6000 rpm, l'échantillon est mis en vial dans un insert droit de 400 µL et placé à -18°C en attendant les analyses en LC-MS/MS.

Méthode ASE/SPE

Pour la méthode ASE/SPE, un filtre en fibre de verre de 27 mm de diamètre préalablement passé au four à 400°C, est déposé au fond de la cellule ASE de 10 mL. Ensuite, dans un bécher, environ 500 mg d'échantillon sont ajoutés, 1 g de dispersant préalablement passé au four à 400°C et 1 g de NA_2EDTA sont également ajoutés. A l'aide d'une spatule le tout est mélangé et disposé grâce à un entonnoir ad hoc, nettoyé à l'acétone, dans la cellule ASE. Pour finir, 10 µl des mix d'étalons internes et des natifs, soit 50 ng de chaque composé, sont ajoutés dans la cellule et cette dernière est complétée avec du dispersant avant d'être refermée. Une feuille d'aluminium est placée de chaque côté de la cellule, qui est placée à 4°C pendant une nuit. Tout comme pour la méthode Quechers, quatre réplicas sont faits pour le même échantillon afin de tester la répétabilité.

Le lendemain, les cellules sont déposées dans l'ASE (ASE 350, ThermoFisher, **Figure 8B**) avec les paramètres suivants : méthanol à 70°C, deux phases statiques de 10 min, un volume de rinçage de 60% et une purge de 100 s. Une fois l'extraction terminée, les échantillons sont récupérés dans des flacons de 60 mL et ces derniers sont déposés dans un EZ-2 (GeneVac®, **figure 8C**) pendant environ 25 min afin de reconcentrer les échantillons et d'éliminer le méthanol. Pour maximiser la concentration des échantillons, ceux-ci sont déposés sous N_2 à 40°C. Pour terminer, les échantillons sont transférés dans des erlens dans lesquels ont été préalablement ajoutés 0,2 g de Na_2EDTA. Les

flacons sont rincés deux fois avec de l'EMQ et 100 mL sont ajoutés dans chaque erlen. Les échantillons peuvent être extraits en SPE.

Afin de réaliser la SPE, des cartouches OASIS HLB de 6 mL (Waters) sont disposées sur le système Visiprep 12 postes et des aiguilles en métal sont placées au niveau des pores utilisés. Le système est ensuite mis sous vide grâce à une pompe. Les cartouches sont conditionnées avec 5 mL de méthanol puis 5 mL d'EMQ en n'allant pas à sec pour ne pas faire sécher les cartouches. Après le conditionnement, des cartouches de 60mL sont disposées par-dessus les cartouches de 5 mL grâce à des adaptateurs et les échantillons y sont transférés pour être filtrés (**Figure 8D**). A la fin de la filtration, 15 mL d'EMQ sont utilisés pour rincer les cartouches et ces dernières sont laissées 20 min afin qu'elles sèchent. Par la suite, des flacons ambrés sont déposés sous chaque cartouche et 10 mL de méthanol sont ajoutés dans chaque cartouche OASIS HBL pour faire une élution permettant de transférer les pesticides piégés dans les cartouches. Les échantillons sont par la suite concentrés avec l'EZ-2 puis sous N_2. Ensuite, les échantillons sont transférés dans des filtres tubes en nylon et les flacons ambrés sont rincés avec 100 µL du mélange EMQ/Méthanol (50/50) puis avec 70 µL de méthanol deux fois. Puis, les échantillons sont centrifugés 1 min à 5000 rpm et le filtrat est transféré dans des vials contenant un insert droit de 400 µL. Le tube est rincé une fois avec 50 µL d'EMQ/Méthanol (50/50). Les vials sont préservés à -18°C en attendant l'analyse en LC-MS/MS.

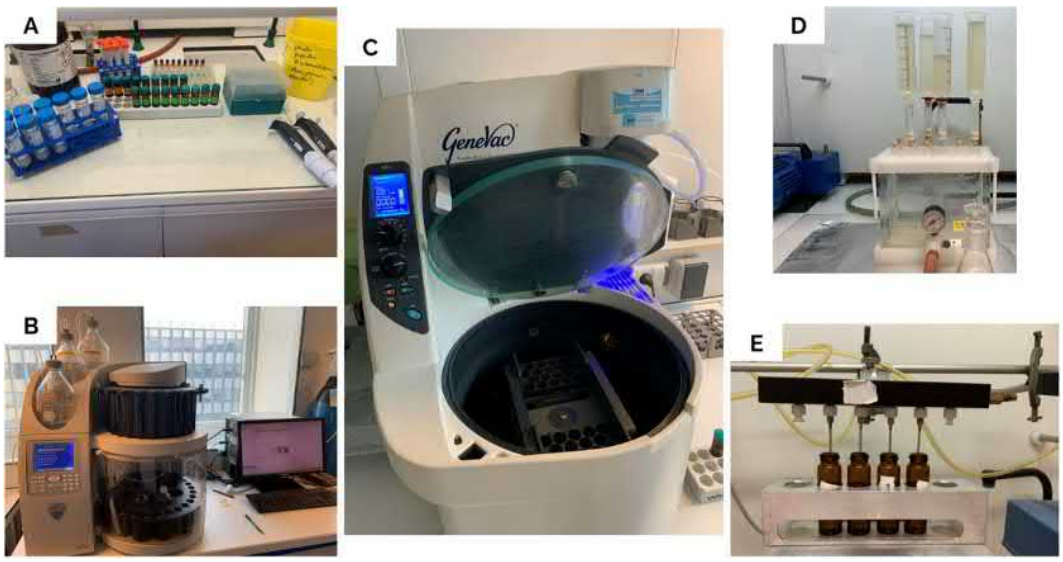


Figure 8 : *Postes de travail des différentes étapes des méthodes d'extractions. A : Poste de travail de la méthode Quechers. B : ASE. C : EZ-2. D : Visiprep 12 postes pour la SPE. E : Concentration sous N_2.*

c. Validation de la méthode

Les résultats suggèrent que la méthode Quechers est la plus appropriée car cette dernière offre un meilleur rendement pour un grand nombre de composés ainsi qu'une répétabilité plus élevée que la méthode ASE/SPE (**tableau 4**).

Tableau 4 : *Comparaison des rendements entre la méthode Quechers et la méthode ASE/SPE*

Composés	Quechers		ASE	
	Rendement	SD	Rendement	SD
3,4 dichloroaniline	60,4	36,0	59,1	8,9
Ametoctradin	118,2	10,2	140,4	6,3
Atrazine	92,7	24,3	109,9	10,3
Bentazone	89,1	39,4	117,0	10,9
Boscalid	72,3	14,0	48,5	23,5
Carbendazime	49,8	30,0	62,0	7,4
Chlortoluron	100,2	14,9	119,2	6,9
Cyazofamide	88,0	17,8	98,9	24,0
Cymoxanil	5,6	83,1	91,3	34,2
Cyprodinil	100,3	16,2	108,8	5,7
DEA	107,1	24,0	108,2	26,0
DEET	126,6	20,9	111,0	3,8
DIA	82,7	3,0	406,6	56,0
Diflufenican	88,0	31,4	149,9	57,6
Hydroxyatrazine	114,6	24,8	103,1	5,8
Imidaclopride	117,6	11,1	118,8	41,2
Imidaclopride olefin	60,3	37,9	168,6	46,3
Imidaclopride urea	67,9	6,8	152,4	19,6
Irgarol	103,0	20,0	91,1	5,4
Isoproturon	126,7	21,4	140,0	3,1
Métazachlore	112,8	3,9	310,4	11,7
Métolachlore ESA	93,1	21,9	16,5	17,5
Métolachlore NOA	5,2	18,2	10,2	57,6
Métolachlore	129,6	21,4	126,0	2,5
Métolachlore OXA	144,3	22,6	248,5	10,4
Nicosulfuron	116,0	17,8	122,1	2,2
Oxadiazon	69,6	45,2	76,2	10,9
Pendimethaline	48,1	38,1	29,2	11,2
Penoxsulam	92,	30,4	76,3	3,4
Propanil	57,0	36,0	65,0	6,8
Prosulfuron	102,1	22,3	74,1	10,1
Simazine	79,9	19,3	146,8	84,7
Spiroxamine	153,7	15,2	94,6	4,6
Tébuconazole	99,4	25,1	111,5	1,5
Tébufénozide	74,3	38,8	55,4	6,4
Terbuthylazine	82,4	32,1	93,6	10,3
Terbuthylazine desethyl	73,8	24,6	63,0	7,1
Tétraconazole	101,6	14,6	129,3	4,7
Trifloxystrobin	113,1	35,7	104,6	2,6
Zoxamide	64,4	23,3	22,4	6,9

Les pesticides provenant des échantillons d'écrevisses ont donc été extraits grâce à la méthode Quechers selon les étapes décrites précédemment. Il est à noter que seuls les mix d'étalons internes

sont utilisés pour doper les échantillons, que des lots d'échantillons sont randomisés manuellement afin de répartir les différents sites dans différents lots. Enfin, les échantillons sont analysés en LC-MS/MS et les résultats sont traités grâce au logiciel Agilent MassHunter Workstation Quantitative Analysis for QQQ.

E. Extraction des lipides présents dans les échantillons d'écrevisses

Durant l'étape de broyage, certains broyats (9 sur les 40) avaient un aspect encore humide après broyage, ils ont donc été à nouveau lyophilisés pendant 48 h pour éliminer toute humidité résiduelle. Cet aspect persistant après la deuxième lyophilisation, des extractions de lipides ont été réalisées sur tous les échantillons afin de déterminer les teneurs en lipides qui pourraient avoir un effet sur l'aspect des broyats et sur les analyses. Les analyses réalisées sont issues du protocole de **Labadie et *al.* 2010**.

Pour cela, environ 100 mg d'échantillon (M_{ech}) sont déposés dans un tube Falcon et 5 mL du mélange hexane/Isopropanol (60/40) sont ajoutés. L'échantillon est ensuite vortexé 30 s, passé aux ultra-sons 15 min et centrifugé 10 min à 2500 rpm. Le surnageant est récupéré dans un flacon ambré et 5 ml sont à nouveau ajoutés et les étapes sont répétées. L'échantillon est concentré sous flux d'azote et sur plaque chauffante, puis l'extrait est transféré dans un eppendorf avec une membrane 0,8 µm (Vivaclean centrifugal filters, Sartorius). Le flacon ambré est rincé deux fois avec 200 µl du mélange et l'eppendorf est centrifugé 5 min à 6000 rpm. Par la suite, 200 µl du mélange sont déposés dans l'eppendorf qui est à nouveau centrifugé. Le filtrat est transféré dans des tubes ambrés préalablement pesés sans le bouchon (Mt) puis mit sous flux d'azote jusqu'à évaporation à sec. Le tube est pesé (M1) et est de nouveau mit sous flux d'azote quelques minutes pour être à nouveau pesé (M2). Si M1 et M2 sont différents, une nouvelle pesée (M3) est réalisée après passage sous flux d'azote. Le taux de lipide est ainsi calculé : $((M2-Mt)/M_{ech})*100$.

F. Analyse des pesticides provenant des échantillons d'eau et des sédiments

Les échantillons de sédiments sont lyophilisés et tamisés et les pesticides sont extraits à l'aide de la méthode ASE/SPE sachant que seuls les mix d'étalons internes sont utilisés. Ils seront exprimés en $ng.g^{-1}$ de poids sec. Concernant les échantillons d'eau, 500 mL d'eau sont filtrés sur des filtres en fibre de verre de type GF/F de 0,7 µm puis, dans un erlen, les 10 µL des deux mix d'étalons internes sont ajoutés et laissés une nuit à 4°C. Les pesticides sont extraits grâce à la méthode SPE en utilisant des cartouches OASIS HBL de 60 mg. Pour finir, les échantillons sont analysés en LC-MS/MS et les résultats sont traités grâce au logiciel Agilent MassHunter Workstation Quantitative Analysis for QQQ.

G. Analyses statistiques

Toutes les analyses statistiques et les figures ont été réalisées grâce au logiciel R Studio (Version RStudio 2021.09.2+382). Les packages utilisés sont les suivants : car, DHARMa, emmeans, flextable, ggeffects, readxl, rstatix, scales, stats et tidyverse. Les tableaux ont été réalisés grâce au logiciel R

Studio et Excel. Une analyse en composante principale (ACP) a été réalisée pour obtenir un aperçu général des données et comparer les résultats selon les sites, le sexe des individus, leur stade et leur condition corporelle.

La condition corporelle est estimée en utilisant les résidus de la régression linéaire du log du poids en fonction du log de la longueur de la dossière et du sexe des individus (Log(Poids) ~ Sexe + Log(LoD), LoD : Longueur de la Dossière). Cela a également permis de mettre en évidence le dimorphisme sexuel observable chez cette espèce (**figure 9**).

Un modèle linéaire généralisé (GLM) est réalisé afin d'identifier les facteurs influençant la condition corporelle nouvellement créée. Les résultats indiquent que seul le stade d'usure influence la condition corporelle, avec les stades 1 et 2 différents du stade 4 ainsi qu'entre le stade 1 et 3. Cela montre donc que les individus de stade 4 ont une condition corporelle plus élevée que les autres stades. Ainsi, les GLM utilisés par la suite tiendront compte de ce lien entre les deux variables.

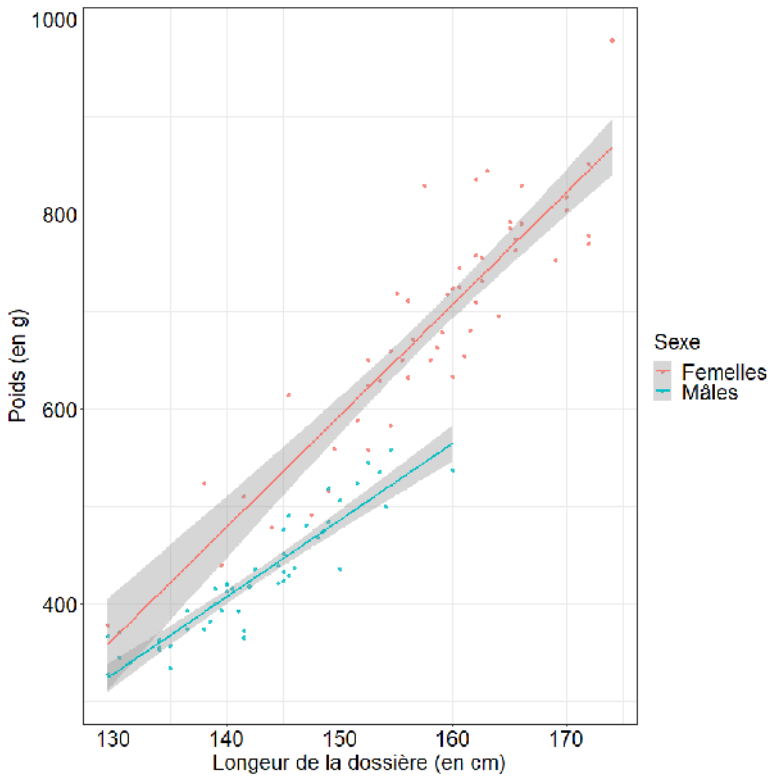


Figure 9 : *Mise en évidence du dimorphisme sexuel chez la Cistude d'Europe*

Afin de comparer les différences de contamination chez les cistudes d'Europe, des GLM (famille = binomiale pour l'occurrence et famille = gaussienne pour les concentrations) sont réalisés pour comparer l'occurrence (Présence/Absence) ou la somme des concentrations des résidus de pesticides des individus en fonction du site, du sexe, de la condition corporelle et/ou du stade. Les conditions de normalité et d'homogénéité des variances sont vérifiées. Les variables non-significatives sont supprimées progressivement du modèle global jusqu'à ce qu'il ne reste que des variables explicatives et statistiquement significatives ($p < 0.05$). Lorsque la variable site est identifiée

comme explicative, des tests Post-Hoc Tukey sont réalisés afin d'identifier les différences entre sites deux à deux.

H. Autorisation éthique animale et autorisation de capture

Les captures ont fait l'objet d'une autorisation dérogatoire à l'article L.411-1 du Code de l'Environnement, par arrêté préfectoral de la Direction départementale des Territoires et de la Mer des Bouches-du-Rhône. Le projet a été autorisé par le ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche après avis favorable du comité d'éthique COMETHEA Poitou-Charentes.

III. Résultats

A. Description de la contamination du milieu en Camargue

a. La contamination de l'eau

Les 40 résidus de pesticides ont été recherchés dans la phase dissoute de 25 prélèvements ponctuels d'eau. Les résultats de ces prélèvements d'eau montrent que des différences de contaminations sont observables entre les 5 sites ($p = 0,003$, **tableau 5**). En effet, les sommes des concentrations des résidus de pesticides avec la bentazone sont les plus élevées au niveau du canal du Fumemorte (12954,3 $ng.L^{-1}$), aux Faïsses (7083,1 $ng.L^{-1}$) et à La Bélugue (2271,6 $ng.L^{-1}$) et les plus faibles au niveau de la Draille Marseillaise (Canal Japon, 36,9 $ng.L^{-1}$) et Esquineau (18,1 $ng.L^{-1}$, **Figure 10A**). En supprimant les valeurs de la bentazone, les sommes de tous les composés diminuent drastiquement pour trois sites : le canal du Fumemorte (200,3 $ng.L^{-1}$), le site des Faïsses (119,3 $ng.L^{-1}$) et à la Bélugue (47,9 $ng.L^{-1}$, **Figure 10B**). En ne considérant que la bentazone, les résultats sont similaires ($p = 0,023$, **tableau 5**) avec le canal du Fumemorte, le site des Faïsses et la Bélugue, les sites les plus contaminés (**Figure 10C**). Il est à noter que les concentrations en bentazone sont, pour les sites les plus contaminés, supérieures à 1000 $ng.L^{-1}$ alors que pour le reste des résidus de pesticides, les concentrations sont majoritairement comprises entre 1 et 10 $ng.L^{-1}$, soit de l'ordre de grandeur des LOQ dans l'eau (entre 0,52 et 8,00 $ng.L^{-1}$, **voir tableau c annexe**).

Tableau 5 : *Résultat des tests de Kruskal-Wallis pour la comparaison de la contamination entre les sites dans l'eau, avec df le degré de liberté et p la p-value*

Test de Kruskal-Wallis		**Site**		
		X^2	**df**	**p**
Contamination de l'eau	**Avec la bentazone**	20,014	6	0,003
	Sans la bentazone	14,115	6	0,028
	Uniquement la bentazone	13,046	5	0,023

Des résultats similaires aux prélèvements d'eau ont été observés pour les préleveurs passifs. Les concentrations en $ng.L^{-1}$ pour les POCIS sont des valeurs estimées à partir des taux d'échantillonnage (RS, $L.j^{-1}$) de chaque composé issus de la littérature. Pour la bentazone, des concentrations sont seulement mesurées pour le canal du Fumemorte, le site des Faïsses et la

Bélugue, respectivement 2976,5 ng.L^{-1}, 7870 ng.L^{-1} et 393,8 ng.L^{-1}. Ces concentrations sont bien supérieures à celles des autres composés qui, dans la majorité, sont comprises entre 0.01 ng.L^{-1} et 10 ng.L^{-1}. Par ailleurs, les limites de quantifications des POCIS étant plus faibles que celles des autres matrices, il a donc été possible de quantifier certains composés n'ayant pas été détectés dans l'eau ou le plasma comme l'ametoctradin, l'atrazine ou encore le chlortoluron.

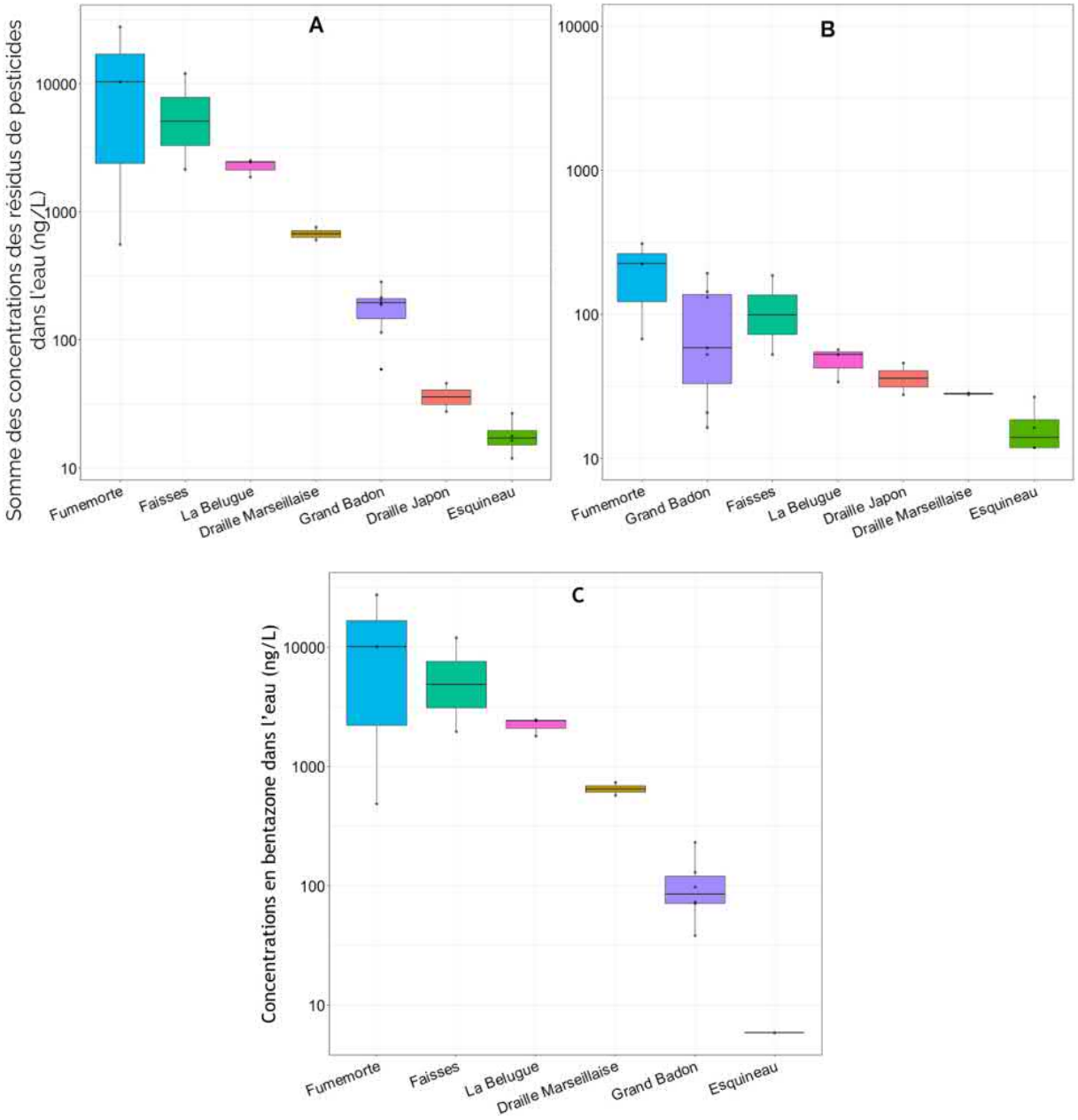


Figure 10 : *Concentrations des résidus de pesticides en ng.L^{-1} dans les prélèvements d'eau ponctuels (échelle logarithmique) en fonction des sites d'étude. A : Somme des concentrations de tous les résidus avec la bentazone, B : Somme des concentrations de tous les résidus sans la bentazone, C : Concentration en bentazone uniquement.*

b. La contamination des sédiments

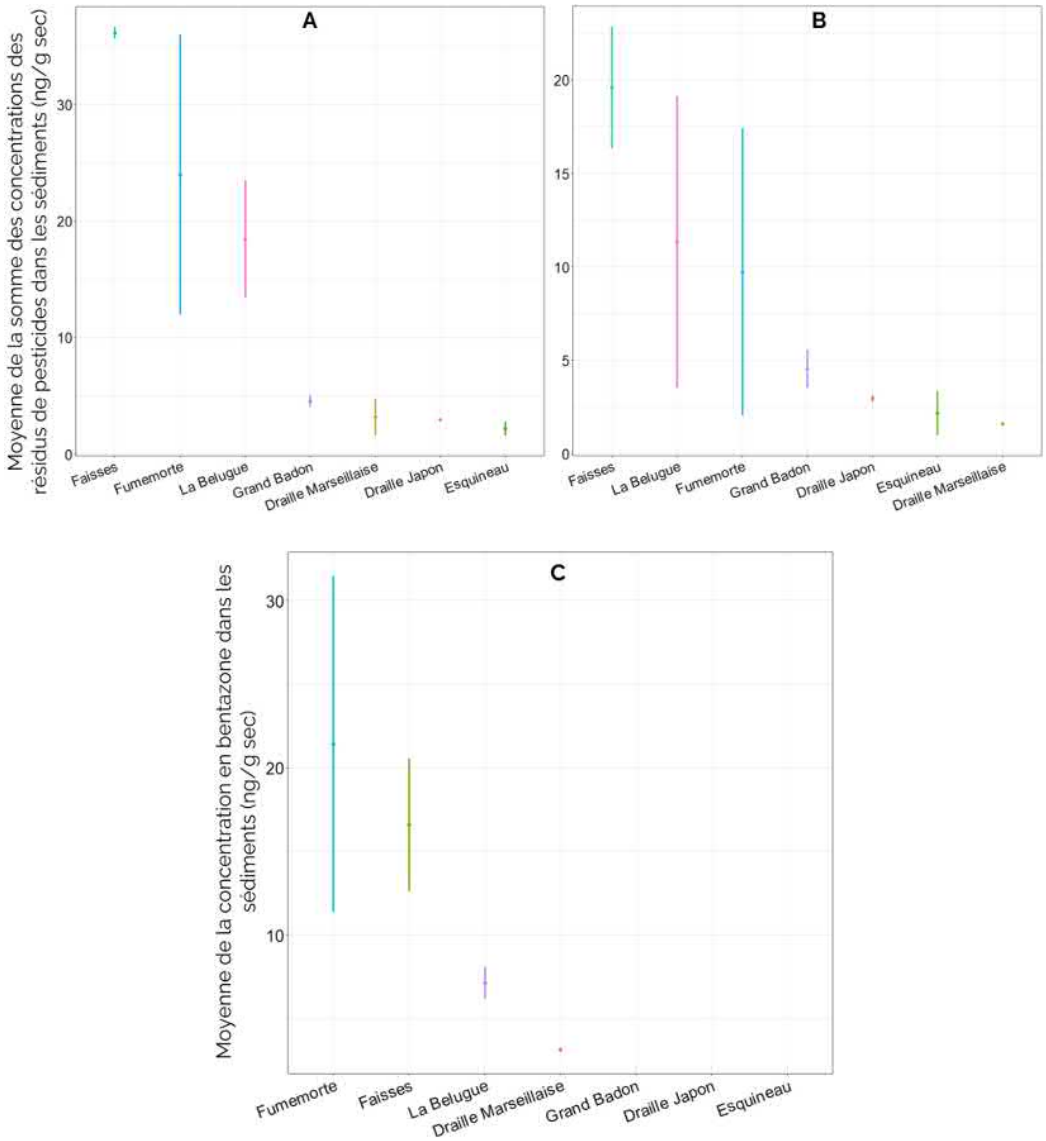


Figure 11 : *Moyenne des teneurs des résidus de pesticides (en ng.g^{-1}, ±écart-type) sec dans les sédiments en fonction des sites d'étude. A : Somme des concentrations de tous les résidus avec la bentazone, B : Somme des concentrations de tous les résidus sans la bentazone, C : Concentration en bentazone uniquement.*

Les résultats indiquent que, pareillement à la contamination de l'eau, les sites les plus contaminés, en somme des résidus, sont le site des Faïsses, le canal du Fumemorte, et la Bélugue et les sites les moins contaminés sont Esquineau et la Draille Marseillaise (**Figure 11A**). De même, tout comme pour l'eau, les teneurs en bentazone uniquement sont supérieures à celles des autres composés, ici, 21,8 ng.g^{-1} dans le canal du Fumemorte et 16,6 ng.g^{-1} pour Faïsses (**Figure 11C**). A noter, la non-détection de la bentazone dans les sédiments à Esquineau et Grand Badon. Lorsque la bentazone n'est pas considérée, les résultats montrent que cette dernière ne compte que pour moitié dans la contamination des sédiments comparé à la contamination de l'eau. En effet, les concentrations en oxadiazon retrouvées aux Faïsses (15,0 ng.g^{-1}) sont semblables à celles de la bentazone (**Figure 11B**).

B. Quantification des pesticides dans le plasma des Cistude d'Europe en Camargue

a. Nombre de pesticides quantifié et fréquence de détection

Les analyses révèlent que sur les 40 pesticides recherchés, 8 d'entre eux sont détectés et quantifiés sur au moins un individu et les 32 restants ne sont pas détectés ou sont inférieurs aux limites de quantification. Sur les 102 cistudes capturées, 58 n'ont aucun composé détecté, soit 56,9%, tandis que pour 35,3% d'entre elles seul 1 résidu de pesticides est détecté, quel qu'il soit. Le nombre de composés maximal retrouvé sur une même tortue est de 4 (**tableau 6**). Parmi les 8 composés détectés et quantifiés, la bentazone, un herbicide utilisé en riziculture, montre la fréquence de détection la plus élevée (35,3%, **tableau 10**) tout site confondu. En comparaison, les autres composés ont des fréquences de détection allant de 0 à 5,9%. De ce fait, lorsque la bentazone n'est plus considérée, le nombre d'individus pour lesquels aucun pesticide n'est détecté est de 91, soit 89,2% des individus (**tableau 6**). Ainsi, pour la suite de l'étude, les analyses ont été effectuées soit en considérant tous les résidus de pesticides, soit en considérant tous les résidus de pesticides hormis la bentazone, soit en ne considérant que la bentazone.

Tableau 6 : *Nombre de résidus de pesticides quantifiés par individu avec et sans bentazone*

Avec bentazone	**Nombre de composés quantifiés**	0	1	2	4	**Total**
	Nombre de cistudes contaminées	58	36	5	3	102
	Pourcentage de cistudes contaminées	56,9	35,3	4,9	2,9	100
Sans bentazone	**Nombre de composés quantifiés**	0	1	2	4	**Total**
	Nombre de cistudes contaminées	91	6	2	3	102
	Pourcentage de cistudes contaminées	89,2	5,9	2,0	2,9	100

b. Occurrence des pesticides en fonction des sites

En considérant la probabilité d'être contaminé par au moins un pesticide, les résultats révèlent que des différences apparaissent entre les sites (**tableau 9**). En effet, il s'avère, lorsque tous les composés sont considérés ($p < 0,001$), que les tortues vivant au niveau du site des Faïsses sont plus contaminées (90%) que les cistudes venant de la Draille Marseillaise (22,7%), de Esquineau (13%) et du Grand Badon (31,3%, **tableau 7**). En revanche, lorsque la bentazone est retirée, il n'y a plus de différence d'occurrence des pesticides dans le plasma des cistudes ($p = 0,169$, **tableau 9**). Il est à noter que seul 10% des individus sont contaminés lorsqu'il n'y a pas de bentazone au niveau des Faïsses. De plus, les résultats indiquent que le pourcentage de tortues contaminées avec et sans bentazone varie peu pour le site de Grand Badon (31,3 % et 18,8% respectivement) et très peu à Esquineau (13% et 8,7% respectivement, **tableau 7**). Cela indique que peu de cistude sont

contaminées par la bentazone pour ces derniers. Pour ce qui est de la bentazone seule, des différences apparaissent entre les sites ($p < 0,001$, **tableau 9**). C'est aux Faïsses que les cistudes sont les plus contaminées (85%) tandis qu'à la Draille Marseillaise, Grand Badon et Esquineau il y a respectivement 22,7%, 12,5% et 4,3% de cistudes contaminées.

Tableau 7 : *Pourcentages d'individus contaminés par site avec n le nombre d'individu total par site*

Site	Tous les composés avec bentazone	Tous les composés sans bentazone	Bentazone uniquement
Draille Marseillaise (n = 22)	22,7	4,5	22,7
Esquineau (n = 23)	13,0	8,7	4,3
Faïsses (n = 20)	90,0	10,0	85,0
Grand Badon (n = 16)	31,3	18,8	12,5
La Bélugue (n = 21)	61,9	14,3	52,4

c. Concentration des pesticides plasmatiques en fonction des sites d'étude

La moyenne des sommes des concentrations globales des résidus de pesticides varie significativement en fonction des sites. Elle est la plus élevée pour les individus du site des Faïsses ($23,59 \pm 30,08$ ng.g^{-1}) et la plus faible pour ceux de La Bélugue ($3,75 \pm 2,28$ ng.g^{-1}, **tableau 8, figure 12A**). Les concentrations en bentazone sont bien supérieures à celles des autres résidus de pesticides. Ainsi, en soustrayant la bentazone, les moyennes diminuent légèrement à l'exception de Faïsses, chez qui la moyenne diminue drastiquement passant de $23,59 \pm 30,08$ ng.g^{-1} à $5,92 \pm 7,24$ ng.g^{-1} (**tableau 8**). Si la bentazone n'est pas prise en compte, aucune différence de concentration n'est observée entre les sites. Enfin, si seule la bentazone est considérée, les concentrations sont respectivement de $24,3 \pm 30.9$ ng.g^{-1} (Faïsses), $7,4 \pm 8.8$ ng.g^{-1} (Grand Badon), $4,2 \pm 1,9$ ng.g^{-1} (La Bélugue), 6,2 ng.g^{-1} (Esquineau) et $3,2 \pm 1,3$ ng.g^{-1} (Draille Marseillaise, **tableau 8**). Ici, les différences sont significatives entre Faïsses-Draille Marseillaise et Faïsses-La Bélugue (**tableau 8, figure 12B**).

Il est à noter que les cistudes capturées au niveau de la Draille Marseillaise proviennent de deux réseaux hydrauliques : l'un appartenant au canal du Japon, le second est un canal secondaire du Fumemorte (**figure 4**). Les cinq individus chez qui la bentazone a été quantifiée ont tous été capturés dans le canal de drainage.

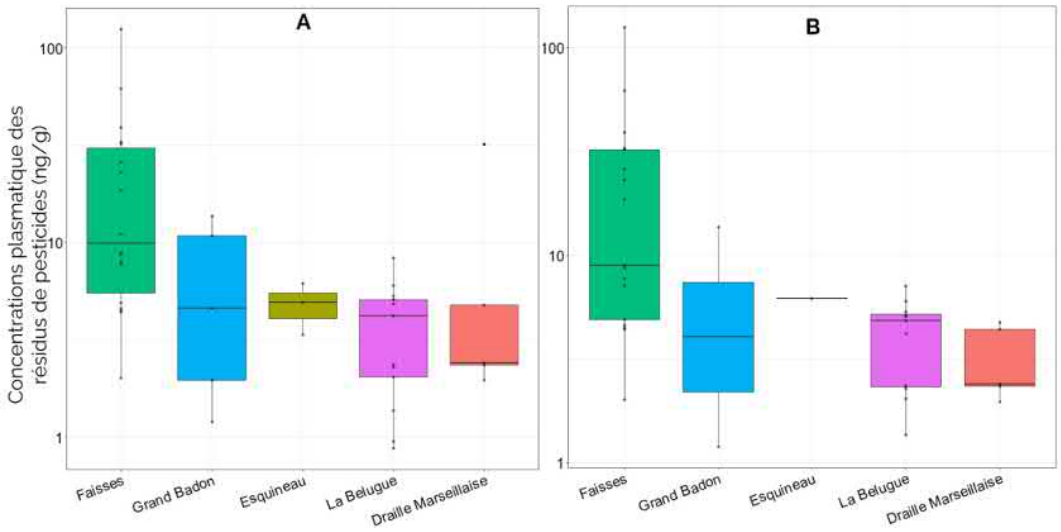


Figure 12 : *Concentrations des résidus de pesticides en ng.g^{-1} dans le plasma des cistudes d'Europe (échelle logarithmique) en fonction des sites d'étude. A : Somme des concentrations de tous les résidus avec la bentazone, B : Concentration en bentazone uniquement*

Tableau 8 : *Moyennes globales de la somme des concentrations des résidus de pesticides en ng.g^{-1} retrouvées dans le plasma des cistudes d'Europe et nombre moyen de composés quantifiés par individu en fonction du site, avec et sans bentazone*

Site	Moyenne ± SD		Nombre de composés moyen quantifiés par individu	
	Avec Bentazone	Sans Bentazone	Avec Bentazone	Sans Bentazone
Draille Marseillaise	8,71 ± 13,10	27,63	0,3	0,05
Esquineau	4,82 ± 1,42	4,14 ± 1,11	0,2	0,1
Faïsses	23,59 ± 30,08	5,92 ± 7,24	1,1	0,3
Grand Badon	6,46 ± 5,55	5,80 ± 4,57	0,8	0,6
La Bélugue	3,75 ± 2,28	1,01 ± 0,18	0,7	0,1

Les sessions de capture se sont déroulées durant deux semaines consécutives pour chacun des sites (**tableau 1**). En regardant les concentrations mesurées dans le plasma des cistudes pour la bentazone en fonction des jours de capture pour chaque site aucune différence n'apparaît. Cependant, il est à noter que pour le site des Faïsses, bien qu'il n'y ait pas de différence de concentration au cours du temps, une tendance à l'augmentation des concentrations semble se dessiner au cours des deux semaines de captures.

Tableau 9 : *Résultat des modèles linéaires généralisés en fonction du site, du sexe, de la condition corporelle et du stade d'usure, avec LR le rapport de vraisemblance, df le degré de liberté et p la p-value. En vert, les p-value <0,05.*

Modèle	Site			Sexe			Condition corporelle			Stade		
	LR X^2	df	p	LR X^2	df	p	LR X^2	df	p	LR X^2	df	p
Tous les composés : GLM(Occurrence)	38,951	4	< 0,001	4,055	1	0,044	0,407	1	0,523	3,685	3	0,298
Tous les composés sans bentazone : GLM(Occurrence)	6,439	4	0,169	2,638	1	0,104	1,519	1	0,218	4,964	3	0,175
Bentazone : GLM(Occurrence)	42,608	4	< 0,001	2,414	1	0,120	2,916	1	0,088	1,966	3	0,580
Tous les composés : GLM(Somme)	19,852	4	0,001	0,129	1	0,720	0,900	1	0,343	5,430	3	0,143
Bentazone : GLM(Concentration)	18,348	4	0,001	3,022	1	0,082	0,118	1	0,731	2,147	3	0,542
GLM(Condition corporelle)	2,265	4	0,687	1,326	1	0,249	-	-	-	20,352	3	0,0001

d. Effet du sexe, du stade et de la condition corporelle sur les niveaux de contamination

Aucun effet significatif du sexe ou du stade des individus n'a été observé, que ce soit en considérant la somme des concentrations des résidus de pesticides ou l'occurrence y compris pour la bentazone seule (**tableau 9**) à une exception. En effet, quand tous les composés sont pris en compte, il apparaît que les mâles vivant au niveau de La Bélugue ont une probabilité plus élevée d'être contaminés que les femelles (p = 0,012) puisque 10 mâles sur 11 sont contaminés contre 3 femelles sur 10. Lorsque la bentazone n'est plus considérée, il n'y a plus de différence entre le sexe au niveau de ce site, avec 3 mâles contaminés sur 11 et aucune femelles contaminées. Cette relation n'est pas significative (p = 0,059) en considérant que la bentazone même s'il semble que les mâles soient plus contaminés que les femelles (8 mâles sur 11 contaminés et 3 femelles sur 10). Pour ce qui est de la condition corporelle, il n'y a pas de différence d'occurrence ou de probabilité d'être contaminé. Les individus capturés aux Faïsses semblent avoir une probabilité plus importante d'être contaminés par la bentazone que ceux venant du site de l'Esquineau.

C. La contamination chez l'Ecrevisse de Louisiane

Au total, 40 écrevisses de Louisiane ont été capturées et les 40 résidus de pesticides ont été recherchés. Les résultats montrent que les écrevisses sont très peu contaminées. En effet, seuls 5 individus (12,5%) présentent une contamination à l'ametoctradin (de 2,5 à 58,9 $ng.g^{-1}$). Aucune écrevisse n'est contaminée à la bentazone quel que soit le site. Par ailleurs, les écrevisses présentant des taux de lipides supérieures, à savoir entre 15% et 36%, ne montrent pas de contamination plus importante comparé aux autres écrevisses.

D. Comparaison des niveaux de contamination de l'environnement et des cistudes

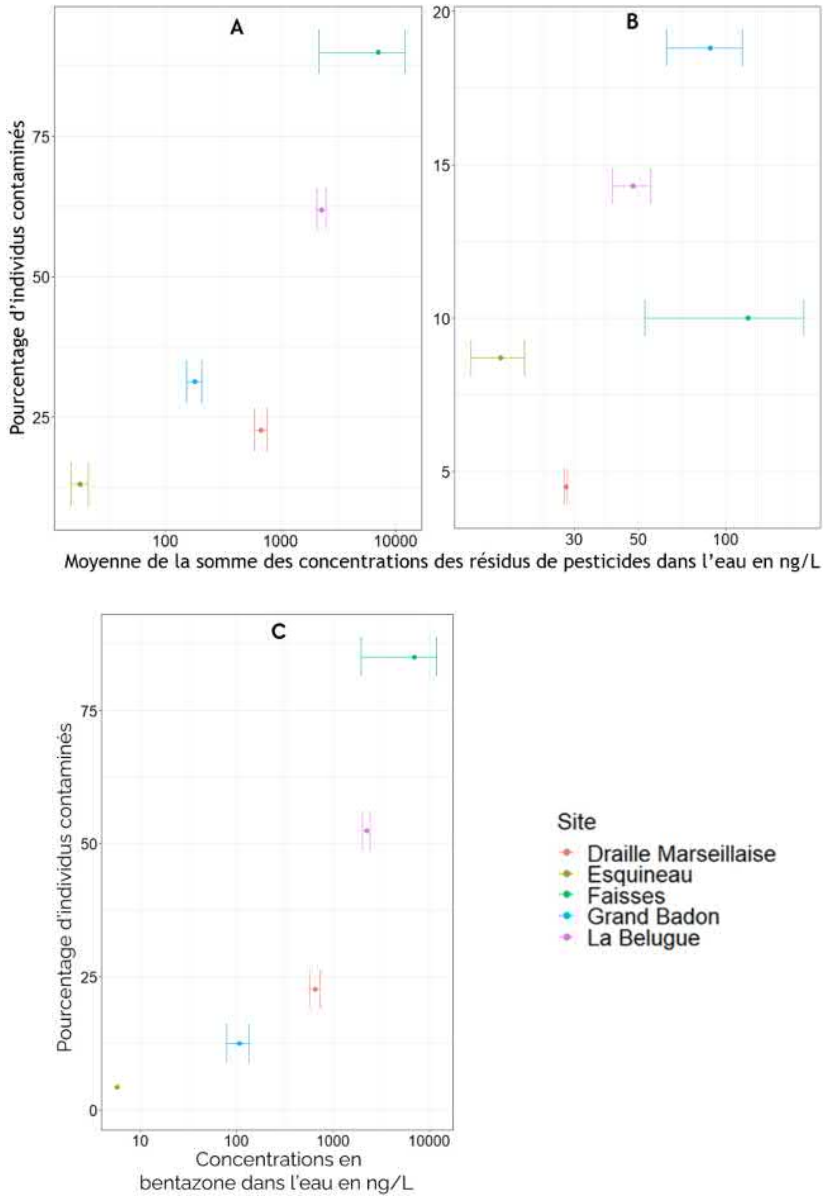


Figure 13 : *Pourcentage d'individus contaminés en fonction des concentrations des résidus de pesticides de l'eau (échelle logarithmique, en ng.L^{-1}). A : Somme des concentrations de tous les résidus avec la bentazone, B : Somme des concentrations de tous les résidus sans la bentazone, C : Concentration en bentazone uniquement.*

Les analyses des sommes des concentrations des résidus de pesticides des prélèvements d'eau ponctuels avec la bentazone indiquent que plus l'eau est contaminée et plus la probabilité de détecter des pesticides dans les tortues est élevée (**figure 13A**). Cette même relation est encore plus nette lorsque la bentazone seule est considérée (**figure 13C**). En considérant uniquement les composés autres que la bentazone, la relation reste globalement la même puisque les sites les plus contaminés au niveau de l'eau, ici, Faïsses, Grand Badon et La Bélugue ont un pourcentage d'individus contaminés plus élevé comparé à ceux de l'Esquineau et de la Draille Marseillaise (**figure 13B**). A noter tout de même que malgré l'absence de différence significative, c'est au niveau de

Grand Badon qu'il y a le plus d'individus contaminés alors que c'est aux Faïsses que la concentration dans l'eau est la plus élevée.

Des résultats similaires sont observés lorsque les concentrations considérées sont celles retrouvées dans les échantillons de sédiments (**figure 14**). En effet, les sites les plus contaminés, Faïsses et La Bélugue (**figure 14A**) présentent le plus d'individus contaminés en comparaison avec les autres sites. Comme indiqué précédemment, seuls les sédiments prélevés au niveau des Faïsses, de la Draille Marseillaise et de La Bélugue sont contaminés par la bentazone. Ici aussi, c'est aux Faïsses que le plus grand nombre d'individus est contaminé par ce composé, là, où les sédiments sont les plus contaminés.

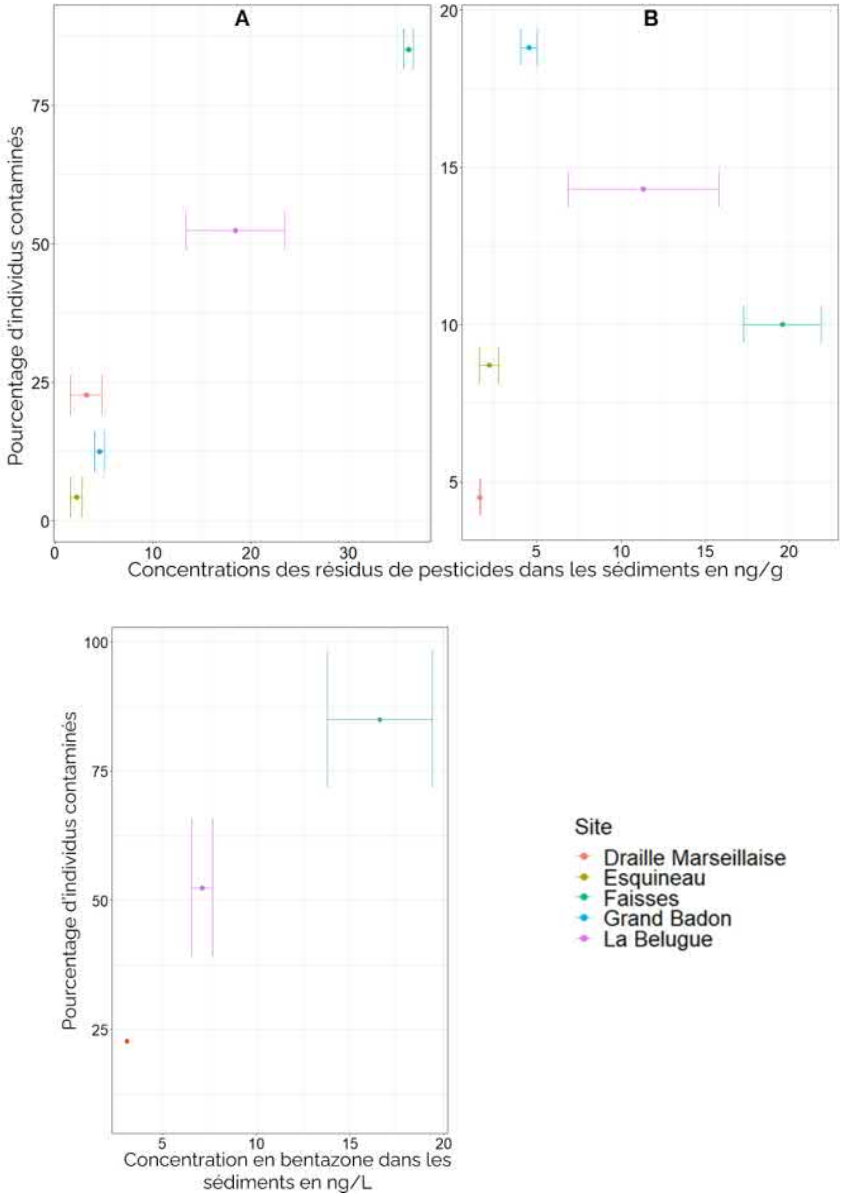


Figure 14 : *Pourcentage d'individus contaminés en fonction des concentrations des résidus de pesticides dans les sédiments (en ng.g^{-1}). A : Somme des concentrations de tous les résidus avec la bentazone, B : Somme des concentrations de tous les résidus sans la bentazone, C : Concentration en bentazone uniquement.*

Tableau 10 : *Concentrations moyennes des résidus de pesticides en ng.g^{-1} (Moyenne ± SD ; Maximum) retrouvées dans le plasma des Cistudes d'Europe en fonction du site, leur limite de quantification (LOQ, en ng.g^{-1}) et leur fréquence de détection en pourcentage. N_{tot} : Nombre total d'individu capturé par site, n : Nombre d'individu contaminé par site ayant servi à calculer les concentrations moyennes. En jaune le pesticide avec la fréquence de détection la plus élevée. Nb : Aucune contamination n'a été détectée pour les composés suivant : 3-4 dichloroaniline, atrazine, boscalid, cyazofamide, cymoxanil, cyprodinil, DEA, DEET, DIA, diflufenican, hydroxyatrazine, imidaclopride, imidaclopride olefin, imidaclopride urea, irgarol, isoproturon, métazachlore, métolachlore ESA, métolachlore NOA, métolachlore OXA, oxadiazon, pendiméthaline, propanil, prosulfuron, simazine, tébufénozide, terbuthylazine, terbuthylazine desethyl, tétraconazole, trifloxystrobin et zoxamide.*

		Réserve naturelle régionale de la Tour du Valat				**Domaine de la Tour du Valat**		**Mas du Grand Badon**		**Conservatoire du Littoral**		
		Draille Marseillaise N_{tot} = 22		**Esquineau N_{tot} = 23**		**Faïsses N_{tot} = 20**		**Grand Badon N_{tot} = 16**		**La Bélugue N_{tot} =21**		
Composé	**LOQ**	**Moy±SD ; Max**	**n**	**Moy±SD ; Max**	**n**	**Moy±SD ; Max**	**n**	**Moy±SD ; Max**	**n**	**Moy±SD ; Max**	**n**	**Fréquence de détection**
Ametoctradin	1,70	-	0	2,7	1	2,52	1	2,05	1	-	0	2,94
Bentazone	1,16	3,18±1,31 ; 4,77	5	6,19	1	24.28±30,86 ; 125,87	17	7,44±8,84 ; 13,69	2	4,16±1,86 ; 7,11	11	35,29
Carbendazime	25,00	27,63	1	-	0	-	0	-	0	-	0	0,98
Chlortoluron	1,43	-	0	3,35	1	5,67	1	6,29	1	-	0	2,94
Métolachlore	1,11	-	0	-	0	-	0	1,45	1	-	0	0,98
Penoxsulam	0,79	-	0	-	0	0,8	1	0,92	1	0,91±0.05 ; 0,95	2	3,92
Spiroxamine	0,80	-	0	-	0	1,09	1	0,92±0,08 ; 0,97	3	-	0	3,92
Tébuconazole	0,80	-	0	2,22	1	1,76	1	1,31±0,36 ; 1,7	3	1,21	1	5,88

IV. Discussion

Ce stage vise à caractériser les voies d'exposition de 40 résidus de pesticides dans cinq populations de Cistude d'Europe en Camargue sur des sites choisis pour leur contexte hydrologique, environnemental et agricole. Les résultats de l'analyse des pesticides dans le plasma des cistudes montrent que c'est aux Faïsses que les individus sont les plus contaminés et ce, principalement par un herbicide très employé en riziculture : la bentazone. Cela vient confirmer la première hypothèse qui était que les tortues qui vivent dans les canaux de drainage, qui bordent les parcelles agricoles seraient les plus contaminées par rapport à celles vivant dans le même type de canaux mais situés plus loin des parcelles agricoles (Draille Marseillaise, La Bélugue), et à celle se trouvant dans les canaux d'irrigation, dont l'eau est pompée du Rhône (Esquineau). Par ailleurs, les concentrations mesurées dans l'eau et les sédiments sont les plus élevées au niveau du site des Faïsses. Plus le site est contaminé, plus il y a une forte probabilité que les cistudes capturées sur ce site soient contaminées. Cela confirme la seconde hypothèse concernant les concentrations retrouvées dans les cistudes qui devraient refléter les concentrations retrouvées dans l'eau et les sédiments. En revanche, le sexe des individus, leur stade et leur condition corporelle ne semblent pas expliquer les variations interindividuelles de contamination des tortues en Camargue.

Le premier objectif était de comparer la contamination des populations de cistudes entre les sites, en fonction du contexte hydrologique et agricole, qui est assez complexe, en raison de la gestion de l'eau (canaux d'irrigation et de drainage) et des difficultés à récupérer des données sur l'occupation des sols et la période de traitement par des substances phytosanitaires. La comparaison des teneurs en résidus de pesticides dans le plasma des cistudes provenant des cinq sites a permis de mettre en évidence que les individus vivant au site des Faïsses ont une probabilité plus élevée d'être contaminés et présentent les concentrations les plus fortes. Sur les quarante résidus de pesticides recherchés, la bentazone représente le composé majoritaire par laquelle les tortues sont contaminées. Les résultats sont similaires à ceux obtenus par **Merleau et *al.* (in prep)**, où la concentration moyenne en bentazone retrouvée dans le plasma des cistudes d'Europe aux Faïsses est de 27,17±31,08 $ng.g^{-1}$ (cette étude : 24,3±30,9 $ng.g^{-1}$). En Camargue, une grande partie du territoire est utilisée pour l'agriculture comme indiqué par la **figure 6** avec approximativement 10 400 ha utilisés pour la riziculture sur les 24 000 ha destinés à l'agriculture (**Parc naturel régional de Camargue 2017**). Pour une saison de récolte, la riziculture nécessite le pompage de près de 23 000 $m^3.ha^{-1}$ d'eau par rizière, ce qui représente jusqu'à 11 000 m^3 d'eau évapotranspirés et 12 000 m^3 d'eau déversée dans les canaux de drainage. En étant drainée, cette eau exporte les pesticides épandus dont la bentazone -pesticide majoritairement utilisé en riziculture- dans les canaux de drainage (**Comoretto et *al.* 2007**), comme le canal du Fumemorte (**figure 4,** **Parc naturel régional de Camargue 2008**). Or, les cistudes vivant dans le site des Faïsses se situent à proximité directe (quelques mètres) de parcelles agricoles, notamment en riziculture, dans des canaux secondaires du canal du Fumemorte, qui concentre les eaux de drainage et dont les mesures dans l'eau révèlent des concentrations les plus élevées en bentazone. Pour le site de Grand Badon, bien que les

concentrations en bentazone des cistudes soient les plus élevées derrière Faïsses, cela ne représente que deux individus sur les seize individus capturés, les 14 autres individus ayant des niveaux inférieurs à la LOQ. Ce site se trouve inclus dans une propriété en agriculture biologique, mais aussi à proximité du canal du Fumemorte. Il est tout à fait possible que les deux cistudes présentant de fortes contaminations aient été capturées après un passage dans le Fumemorte. En effet, la contamination par la bentazone de l'eau au niveau de Grand Badon est la seconde plus faible et se trouve non loin de la source du Fumemorte. Contrairement à Grand Badon, La Bélugue présente plus d'individus contaminés (52,5%) mais avec des concentrations plus faibles qu'aux Faïsses. Ce site se trouve à l'aval du canal du Japon, dont l'eau est pompée du Rhône afin de permettre aux agriculteurs d'irriguer leurs parcelles. Etant dans un canal d'irrigation, les tortues ne devraient pas être exposées à une contamination importante. Or, la concentration de bentazone mesurée dans l'eau est la seconde plus élevée derrière le site des Faïsses. Le site se trouve à l'aval du canal, il est possible que ce dernier ait accumulé une certaine quantité de pesticides et particulièrement de la bentazone en transitant dans les zones agricoles. Les cistudes capturées au niveau de la Draille Marseillaise proviennent pour moitié du canal du Japon (irrigation) et pour moitié d'un canal secondaire du canal du Fumemorte (**figure 4**). Bien que très proches l'un de l'autre (les deux canaux sont distants de 4 m au plus proche), seules les cistudes ayant été capturées au niveau du Fumemorte sont contaminées par la bentazone. Par ailleurs, la bentazone n'a pas été détectée ni dans les prélèvements d'eau ni dans les POCIS au niveau du canal du Japon. Cela montre donc que les cistudes sont exposées aux pesticides en partie par l'eau. Enfin, les cistudes vivant dans l'Esquineau sont les moins contaminées avec seulement 1 individu sur 23 contaminé par la bentazone. Le site est irrigué par l'eau provenant du canal de l'Aube de Bouic dont l'eau pompée vient du Rhône plus en amont. Les cistudes vivent dans des marais et des roubines d'irrigation et aucune parcelle agricole n'est située à proximité immédiate. Bien que le canal du Fumemorte passe aux abords des canaux secondaires d'irrigation, les cistudes restent peu contaminées.

Il est important de noter que les sessions de captures au sein de chacun des sites ne se sont pas effectuées en même temps, en raison des contraintes logistiques et techniques. Le prélèvement de divers échantillons (eau, POCIS, sédiments, cistudes) a été privilégié sur un même laps de temps de deux semaines, en échantillonnant les sites de mi-mai à fin juillet. Ainsi, les différences observables entre les sites pourraient être dues à la temporalité des captures. Lors d'études précédentes sur les sites d'Esquineau et de Faïsses, le suivi des cistudes a été réalisé d'avril à début août et il a été constaté que la date de prélèvement sanguin était un facteur prépondérant sur l'occurrence et les niveaux de bentazone chez les cistudes (**Merleau et *al.* in prep**). Comme indiqué précédemment, les dates exactes d'épandage des pesticides ne sont pas connues. Or, selon la SNPN, un pic de concentration en pesticides est observable entre juin et juillet. **Comoretto et *al.* (2007)** ont mis en évidence deux pics de concentrations dont un en juin causé majoritairement par deux herbicides : le MCPA (2-méthyl-4-chlorophénoxyacétique) et la bentazone. Ce pic a été observé environ 1 à 2 semaines après l'épandage et les concentrations ont drastiquement diminué au cours des 2 semaines suivantes, indiquant alors que les organismes d'eau douce n'ont été exposés à des

grandes concentrations que pendant un maximum de deux semaines. Les cistudes des sites d'Esquineau et la Draille Marseillaise ont été capturées du mois de mai au début du mois de juin 2022, probablement avant le pic annuel de bentazone. Les autres sites ont été échantillonnés de mi-juin à fin juillet, soit pendant la période présumée d'épandage ou durant les deux semaines suivantes. Ainsi, les fortes concentrations retrouvées au niveau des Faïsses pourraient également provenir d'une augmentation saisonnière de l'utilisation de la bentazone et donc de la contamination de l'eau.

Cette étude a mis en évidence une corrélation entre la contamination des cistudes et les concentrations en résidus de pesticides retrouvées dans l'eau, avec une relation encore plus marquée pour la bentazone (**figure 12**). Cette relation est également visible par la contamination des sédiments bien que moins importante. Ainsi, il apparaît que l'une des voies principales d'exposition aux pesticides recherchés dans cette étude chez ces tortues vienne de l'eau, soit par diffusion, soit par ingestion. Elles sont, dans une moindre mesure, exposées par l'ingestion et/ou le contact avec les sédiments. En effet, les sols ont plus ou moins la capacité d'adsorber les résidus de pesticides, cette capacité étant plutôt mauvaise pour la bentazone (**Boivin et *al.* 2005**), ce qui peut donc expliquer la relation moins marquée. Au cours de cette étude, seuls l'eau et les sédiments ont été analysés, cependant, une contamination atmosphérique aurait également pu être une source d'exposition supplémentaire. En effet, les cistudes ont une respiration pulmonaire, ce qui implique une possible contamination par des composés plutôt volatiles. Toutefois, pour ce qui est de la bentazone, celle-ci est très peu volatile suggérant alors une absence de contamination par l'air. Enfin, les différences de contaminations entre les sites pourraient être expliquées par des différences de contaminations des écrevisses de Louisiane. En effet, les cistudes se trouvent au sommet de leur chaîne trophique et pourraient ainsi bioamplifier les pesticides en se nourrissant. Cependant, cela ne s'avère pas le cas pour cette espèce puisque les écrevisses, principales proies des tortues en Camargue (**Ottonello et *al.* 2005**), ne sont pas contaminées par la bentazone. Par conséquent, l'alimentation chez cette espèce ne semble pas représenter l'une des principales voies d'exposition aux pesticides recherchés dans cette étude. Bien que se nourrissant principalement d'Ecrevisses de Louisiane, la Cistude d'Europe est une espèce omnivore (**Ottonello et *al.* 2005**) impliquant alors une possible contamination *via* d'autres proies.

Les différences de niveaux de pesticides entre les mâles et les femelles ont également été testées, en partant de l'hypothèse d'une moindre contamination des femelles, en raison du transfert maternel. **Bellot et *al* (2022)** ont montré chez le Moineau Domestique (*Passer domesticus*) qu'un transfert de tébuconazole, un fongicide, est observable de la mère à l'œuf, lorsque cette dernière y est exposée de façon chronique. Il est donc envisageable que chez la Cistude d'Europe les femelles soient capables elles aussi de transférer certains résidus de pesticides lors de la ponte des œufs comme c'est le cas chez de nombreux reptiles y compris chez les tortues (**Barraza et *al* 2021**). Par ailleurs, **Kadokami et *al.* (2004)** ont montré que chez les grenouilles, le transfert maternel permet aux femelles de diminuer la concentration des polluants de leurs tissus et préférentiellement des composés ayant un faible coefficient de partage octanol-eau (K_{ow}). Cependant, les résultats de cette

étude ont montré qu'il n'y avait pas de différence entre les mâles et les femelles concernant les concentrations mesurées ni même pour l'occurrence des pesticides. Ce qui suggère une potentielle absence de transfert maternel pour ces pesticides, et notamment pour la bentazone chez cette espèce. **Merleau et *al* (in prep)** ont également mis en évidence l'absence de différence de contamination entre le sexe des individus chez cette espèce venant des sites d'Esquineau et de Faïsses au cours des années 2018 à 2020. Une différence a tout de même été observée à La Bélugue avec plus de mâles contaminés par la bentazone que de femelles. Il est possible que cette différence soit due (i) aux déplacements réalisés par les mâles en recherche d'une partenaire pour l'accouplement, bien que la taille du domaine vital des mâles et des femelles n'est pas significativement différente (**Cadi et *al.* 2004**) ou (ii), à des différences de régime alimentaire ou de métabolisme.

La condition corporelle et le stade d'usure des individus ont également été pris en compte durant ces analyses. De nombreux polluants, autres que les pesticides comme le mercure, peuvent être bioaccumulés et bioamplifiés au sein des organismes (**Golet et Haines 2001**). En effet, il a été montré, chez la Tortue Serpentine (*Chelydra serpentina*), que les concentrations en mercure retrouvées dans les muscles et le sang étaient similaires, suggérant une possible bioaccumulation (**Golet et Haines 2001**). Ainsi, les cistudes plus âgées pourraient potentiellement présenter des concentrations de résidus de pesticides plus élevées. Cependant, aucune différence n'a été observée entre les 4 stades d'usure soulignant l'absence de bioaccumulation. Les composés étudiés sont majoritairement hydrophiles, peu persistant dans l'environnement avec des temps de demi-vie cours. La bentazone est faiblement métabolisée mais est en revanche rapidement excrétée par les urines et donc peu bioaccumulable (**EFSA 2015**). **Merleau et *al* (in prep)** ont également montré que des cistudes capturées plusieurs années de suites présentaient des concentrations en bentazone variables, indiquant l'absence de bioaccumulation. La condition corporelle n'apparaît pas comme un facteur influençant la contamination des cistudes.

L'utilisation des POCIS a permis de mettre en évidence que certains composés sont présents dans l'eau alors qu'ils n'ont ni été détectés dans les prélèvements d'eau ponctuels, ni dans les sédiments ni dans le plasma des cistudes. Leur utilisation permet ainsi d'améliorer les limites de détection des composés. Par exemple, l'atrazine, un herbicide interdit en France depuis 2003 a été détecté grâce aux préleveurs passifs, mettant en évidence la persistance de certaines molécules dans l'environnement. Les divers autres résidus de pesticides autre que la bentazone retrouvés dans les échantillons d'eau et de sédiments montrent que l'environnement est contaminé par une large gamme de pesticides. Malgré cette contamination, les cistudes ne présentent une importante contamination que par la bentazone et une contamination plus anecdotique par quelques autres pesticides indiquant soit une dégradation rapide des molécules, soit une possible rapide excrétion de celles-ci chez les tortues. L'absence de détection des résidus de pesticides dans le plasma des cistudes ne signifie pas pour autant qu'elles ne sont pas affectées. En effet, il est possible que certains composés soient plus toxiques que d'autres, pouvant alors impacter la physiologie des tortues sur une courte période.

V. Conclusion

Cette étude a permis de mettre en lumière l'une des voies principales d'exposition aux pesticides chez la Cistude d'Europe, à savoir l'eau, tout en montrant que le site des Faïsses présente les individus les plus contaminés. Le contexte hydraulique de la Camargue permet de mieux comprendre les raisons de cette forte contamination. En effet, le canal du Fumemorte représente une interface d'exposition aux pesticides entre les parcelles agricoles et les cistudes. Les grandes quantités de pesticides transportées par ce canal de drainage comparé au canal de l'Aube de Bouic (irrigation) mettent en avant les flux importants de polluants dans les zones agricoles. Par la suite, le projet va s'intéresser aux effets physiologiques et écologiques des pesticides chez cette espèce afin de mieux rendre compte des impacts que peuvent avoir une exposition sur le long terme.

Actuellement, une campagne de capture de Cistudes d'Europe se déroule dans trois nouvelles zones : le Grand Port Maritime de Marseille (en Camargue), en Nouvelle-Aquitaine et en Brenne. Ces nouveaux sites présentent des contextes agricoles et environnementaux différents de ceux retrouvés dans cette présente étude. L'objectif étant d'améliorer l'état des connaissances de la contamination par les produits phytopharmaceutiques à une plus large échelle et des différences de contaminations en fonction des aires géographiques en France. La Cistude d'Europe bénéficie d'un plan de protection national. Ainsi, dans une optique de gestion et de conservation de la biodiversité et plus particulièrement de cette tortue d'eau douce, il serait possible d'envisager des mesures de sauvegardes spécifiques en fonction des sites en partie grâce aux connaissances apportées par cette étude.

VI. Annexes

Tableau a : Gradient de la phase mobile

Temps (min)	Débit (mL.min^{-1})	% Solvant
0	0,3	95
0,5	0,3	95
10	0,3	0
14	0,3	0
15	0,3	95
17,5	0,3	95

Tableau b : *Paramètres des analyses en LC-MS/MS (en orange : les étalons internes, 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	15	9,16	X
3,4 dichloroaniline	162	74	100	60	9,16	
Ametoctradin	276,4	175,9	170	41	9,76	
Ametoctradin	276,4	149	170	41	9,76	X
Atrazine	216,6	173,9	120	13	8,89	X
Atrazine	216,6	96,3	120	25	8,89	
Atrazine 13C	219,7	106	110	30	8,88	
Atrazine 13C	219,7	70	110	42	8,88	X
Azoxystrobine	404,4	372	110	9	10,03	X
Azoxystrobine	404,4	329	110	29	10,03	
Azoxystrobine d4	408,4	376	110	9	10,02	X
Azoxystrobine d4	408,4	348,2	110	25	10,02	
Bentazone	241,3	199	80	5	8,72	X
Bentazone	241,3	107	80	25	8,72	
Bentazone d6	247,3	200	80	5	8,7	X
Bentazone d6	247,3	107,9	80	29	8,7	
Boscalid	343	307	130	17	10,21	X
Boscalid	343	140	130	13	10,21	
Boscalid d4	347	310,9	130	17	10,19	X
Boscalid d4	347	140	130	13	10,19	
Carbendazime	192,2	160	110	17	4,92	X
Carbendazime	192,2	132	110	33	4,92	
Carbendazime d3	195,2	160	110	17	4,9	X
Carbendazime d3	195,2	132	110	33	4,9	
Chlortoluron	213,6	140,1	110	15	8,6	
Chlortoluron	213,6	71,9	110	21	8,6	X
Cyazofamid	325,8	108	80	9	10,94	X
Cyazofamid	325,8	44,1	80	29	10,94	
Cymoxanil	199	128	100	9	5,47	X

Cyprodinil	226,3	92,9	140	37	9,5	X
Cyprodinil	226,3	76,9	140	53	9,5	
Cyprodinil d5	231,3	93,9	150	41	9,44	X
Cyprodinil d5	231,3	80	150	45	9,44	
DEA	188,6	145,9	100	13	6,74	X
DEA	188,6	103,8	100	25	6,74	
DEA 13C	191,6	149,1	110	14	6,74	X
DEA 13C	191,6	106,1	110	25	6,74	
DEET	192,2	118,9	110	17	8,94	X
DEET	192,2	90,9	110	33	8,94	
DEET d7	199,3	126	110	17	8,9	X
DEET d7	199,3	98	110	33	8,9	
DIA	174,6	96	110	16	5,76	
DIA	174,6	68,2	150	29	5,76	X
DIA d5	179	101	110	17	5,72	
DIA d5	179	68,9	110	33	5,72	X
Diflufenican	395,3	266	140	25	11,66	X
Diflufenican	395,3	246	110	38	11,66	
Diflufenican d3	398,3	267,9	140	25	11,64	X
Diflufenican d3	398,3	248	110	38	11,64	
Fludioxonil	249,2	170,8	90	9	5	
Fludioxonil	249,2	92,8	90	53	5	X
Hydroxyatrazine	198,2	156	120	17	5,47	X
Hydroxyatrazine	198,2	68,9	120	41	5,47	
Hydroxyatrazine 13C	201,2	159,2	60	17	5,47	X
Hydroxyatrazine 13C	201,2	70,9	60	41	5,47	
Imidaclopride	256,6	210,2	90	13	6,74	
Imidaclopride	256,6	176,1	90	17	6,74	X
Imidaclopride d4	260,7	214,3	90	13	6,73	
Imidaclopride d4	260,7	180,1	90	21	6,73	X
Imidaclopride olefin	254,6	237,2	90	5	6	
Imidaclopride olefin	254,6	206	90	9	6	X
Imidaclopride urée	212,6	129,2	120	17	6,13	X
Imidaclopride urée	212,6	126	110	22	6,13	
Irgarol	254,3	198	110	17	8,92	X
Irgarol	254,3	83	110	29	8,92	
Isoproturon	207,2	165,1	100	9	8,91	
Isoproturon	207,2	72	100	21	8,91	X
Isoproturon d6	213,3	78	110	21	8,88	X
Isoproturon d6	213,3	52	110	17	8,88	
Métazachlore	278,7	210,9	80	5	9,34	
Métazachlore	278,7	135	80	21	9,34	X
Métolachlore	284,8	252,9	80	13	10,73	X
Métolachlore	284,8	176,9	80	25	10,73	
Métolachlore d6	290,8	259	110	13	10,68	X
Métolachlore d6	290,8	183	110	29	10,68	

Métolachlore ESA	330,4	298,1	110	9	7,16	X
Métolachlore ESA	330,4	202,1	110	29	7,16	
Métolachlore NOA	330,4	284,2	110	9	6,71	
Métolachlore NOA	330,4	162,2	110	21	6,71	X
Métolachlore NOA	330,4	132	110	65	6,71	
Métolachlore OXA	280,3	212	80	5	9,34	
Métolachlore OXA	280,3	134,1	80	21	9,34	X
Nicosulfuron	411,4	213	140	12	7,62	
Nicosulfuron	411,4	182	110	17	7,62	X
Nicosulfuron d6	417,4	182,1	170	21	7,6	X
Nicosulfuron d6	417,4	83	170	65	7,6	
Oxadiazon	345	303,1	100	9	12,37	X
Oxadiazon	345	220	100	13	12,37	
Pendimethaline	282,3	212	80	5	12,46	X
Pendimethaline	282,3	193,8	85	12	12,46	
Penoxsulam	484,4	195	170	29	9,2	X
Penoxsulam	484,4	124	160	53	9,2	
Propanil	218	162	100	13	9,6	X
Propanil	218	127	100	25	9,6	
Prosulfuron	420,4	167	110	17	9,74	
Prosulfuron	420,4	141,2	110	17	9,74	X
Simazine	202	132,1	100	20	8,03	X
Simazine	202	104,1	100	20	8,03	
Spiroxamine	298,5	144,1	120	17	8,42	X
Spiroxamine	298,5	100	120	33	8,42	
Tébuconazole	308,8	125,9	120	45	10,31	
Tébuconazole	308,8	69,9	120	21	10,31	X
Tébuconazole d6	314,8	125,9	120	45	10,29	
Tébuconazole d6	314,8	72,1	110	22	10,29	X
Tébufénozide	353,4	132,9	80	17	10,8	X
Tébufénozide	353,4	105,1	80	45	10,8	
Terbuthylazine	230,7	175,1	100	13	9,84	X
Terbuthylazine	230,7	68,1	100	49	9,84	
Terbuthylazine d5	235,7	179,1	110	13	9,82	X
Terbuthylazine d5	235,7	68,9	110	45	9,82	
Terbuthylazine desethyl	202,6	201,7	90	5	8,15	
Terbuthylazine desethyl	202,6	146,3	90	13	8,15	X
Tétraconazole	372	159	160	33	10,17	X
Tétraconazole	372	70,1	160	17	10,17	
Trifloxystrobin	409,4	185,9	100	13	11,72	X
Trifloxystrobin	409,4	145	100	53	11,72	
Trifloxystrobin d6	415,4	185,9	110	13	11,69	X
Trifloxystrobin d6	415,4	145	110	57	11,69	
Zoxamide	336	186,9	130	17	11,3	X
Zoxamide	336	159	130	45	11,3	

Tableau c : *Limite de quantification des différents résidus de pesticides en fonction de la matrice*

Composés	LOQ plasma ($ng.g^{-1}$)	LOQ Eau ($ng.L^{-1}$)	LOQ POCIS ($ng.L^{-1}$)	LOQ Sédiments ($ng.g^{-1}$)	LOQ Ecrevisses ($ng.g^{-1}$)
3,4-Dichloroaniline	4,74	3,06	0,01	0,33	2,50
Ametoctradin	1,70	2,00	0,02	0,19	1,95
Atrazine	1,89	1,48	0,01	0,37	2,50
Bentazone	1,16	0,59	0,27	0,48	2,86
Boscalid	1,54	0,84	0,40	1,47	3,48
Carbendazime	25	1,58	0,04	0,25	11,43
Chlortoluron	1,43	1,29	0,15	0,38	2,86
Cyazofamide	3,85	0,81	0,70	0,78	5,19
Cymoxanil	5,40	1,83	-	6,24	88,89
Cyprodinil	2,25	2,00	0,12	0,10	0,95
DEA	3,46	1,50	0,05	0,60	4,00
DEET	4,5	8,00	0,38	0,12	3,81
DIA	2,07	1,50	0,33	1,45	26,67
Diflufenican	2,00	1,00	0,09	0,12	2,96
Hydroxyatrazine	5,20	3,51	0,02	0,04	4,00
Imidaclopride	1,16	1,95	0,19	1,24	4,21
Imidaclopride Olefin	2,00	4,00	0,12	2,79	50,00
Imidaclopride Urea	1,56	4,00	0,06	1,61	80,00
Irgarol	1,26	1,39	0,40	0,06	0,91
Isoproturon	1,85	1,36	0,70	0,17	2,22
Métazachlore	8,89	3,77	0,38	0,49	6,67
Métolachlore ESA	1,90	3,50	0,15	0,48	1,54
Métolachlore NOA	2,07	5,95	0,05	1,34	100,00
Métolachlore	1,11	2,00	0,06	0,50	1,82
Métolachlore OXA	3,75	2,50	0,64	0,23	3,08
Nicosulfuron	6,60	2,50	0,02	0,15	1,74
Oxadiazon	2,02	5,32	0,01	0,33	1,82
Pendimethaline	1,00	1,05	0,05	0,80	5,97
Penoxsulam	0,79	0,52	0,001	0,26	2,00
Propanil	1,75	0,88	0,05	0,23	2,35
Prosulfuron	1,50	1,50	0,01	0,57	5,33
Simazine	5,80	2,00	0,005	0,28	2,22
Spiroxamine	0,80	2,50	0,05	0,03	0,95
Tébuconazole	0,80	1,20	0,20	0,14	2,67
Tébufénozide	0,75	2,00	0,16	0,19	3,81
Terbuthylazine	5,23	6,76	0,08	0,49	3,81
Terbuthylazine desethyl	3,50	5,50	0,004	0,17	3,33
Tétraconazole	0,98	1,20	0,05	0,33	1,82
Trifloxystrobin	1,50	1,30	0,05	0,07	3,20
Zoxamide	2,10	1,43	0,05	0,21	2,00

VII. Bibliographie

Barraza A. D., Finlayson K. A., Leusch F. D. L., Van De Merwe J. P. (2021). Systematic review of reptile reproductive toxicology to inform future research directions on endangered or threatened species, such as sea turtles. Environmental Pollution, 286(April), 117470.

Bellot P., Brischoux F., Fritsch C., Goutte A., Alliot F., Rocchi S., Angelier F. (2022). Evidence of environmental transfer of tebuconazole to the eggs in the house sparrow (*Passer domesticus*): An experimental study. Chemosphere, 308, 136469.

Boivin A., Cherrier R., et Schiavon M. (2005). A comparison of five pesticides adsorption and desorption processes in thirteen contrasting field soils. Chemosphere, 61, 668-676.

Burkart L., Olivier A., Lourdais O., Vittecoq M., Blouin-Demers G., Alliot F., Le Gac C., Martin N., Goutte A. (2021). Déterminants of Legacy POPs Levels in the European Pond Turtle (*Emys orbicularis*) in the Camargue Wetland, France. Environmental Toxicology and Chemistry.

Cadi A., Nemoz M., Thienpont S., Joly P. (2004). Home range, movements, and habitat us of the European pond turtle (*Emys orbicularis*) in the Rhône-Alpes region, France. Biologia – Section Zoology, 14: 89-94.

Cardone A. (2014). Imidacloprid induces morphological and molecular damages on testis of lizard (*Podarcis sicula*). Ecotoxicology, 24(1): 94-105.

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.

Cheylan M. (1998). Evolution of the distribution of the European pond turtle in the French Mediterranean area since the post-glacial. Mertensiella, 10: 47-65.

Clark D. R., Bickham J. W., Baker D. L., Cowman D. F. (2000). Environmental contaminants in texas, usa, wetland reptiles: evaluation using blood samples. Environmental Toxicology and Chemistry, 19(9), 2259–2265.

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, 124-132.

Crayton S. M., Wood P. B., Brown D. J., Millikin A. R., McManus T. J., Simpson T. J., Ku K., Park Y. (2020). Bioaccumulation of the pesticide imidacloprid in stream organisms and sublethal effects on salamanders. Global Ecology and Conservation, 24, e01292.

de Solla S. R. (2015). Exposure, Bioaccumulation, Metabolism and Monitoring of Persistent Organic Pollutants in Terrestrial Wildlife. In: Alaee M. (eds) Dioxin and Related Compounds. The Handbook of Environmental Chemistry, vol 49. Springer, Cham.

Dong X., Shi Z., Liang S., Sun H. (2014). Rapid simultaneous determination of herbicides in human serum by UPLC-ESI-MS. Analytical Methods, 6, 6939-6947.

Ducotterd C., Crovadore J., Lefort F., Guisan A., Ursenbacher S., Rubin J. F. (2020). The feeding behaviour of the European pond turtle (*Emys orbicularis*, L. 1758) is not a threat for other endangered species. Global Ecology and Conservation, 23, e01133.

Dudgeon D., Arthington A. H., Gessner M. O., Kawabata Z., Naiman R. J., Knowler D. J., Lévêque C., Prieur-Richard A., Soto D., Stiassny M. L. J., Sullivan C. A. (2015). Freshwater biodiversity: importance, threats, status and conservation challenges. Biological Reviews, 2006, 163–182.

Duguy R., Baron J. P. (1998). La Cistude d'Europe, *Emys orbicularis* dans le Marais de Brouage (Char.-Mar.) : cycle d'activité, thermorégulation, déplacements, reproduction et croissance. Annales de la Société des sciences naturelles de la Charente-Maritime, 8 (7): 781-803.

European Food Safety Authority (2015). Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance bentazone. EFSA Journal, 13(4): 4077.

Espel D., Diepens N., Boutron O., Buffan-Dubau E., Chérain Y., Coulet E., Grillas P., Probst A., Silvestre J., Elger A. (2019). Dynamics of the seagrass *Zostera noltei* in a shallow Mediterranean lagoon exposed to chemical contamination and other stressors. Estuarine, Coastal and Shelf Science, 222, 1-12.

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

Ghestem J. P. (2009). BRGM/RP-58049-FR, Conséquences de la directive européenne 2009/90/CE sur l'estimation des limites de quantification des méthodes d'analyse chimique ; 93 pages, 5 annexes.

Gibbons J.W., Scott D.E., Travis R., Kurt A., Mills T., Leiden Y., Poppy S., Winne C. T. (2000). The global decline of reptiles, Déjà Vu amphibians. Bioscience, 50, 653–666.

Golet W. J., Haines T. A. (2001). Snapping turtles (*Chelydra serpentina*) as monitors for mercury contamination of aquatic environments. *Environmental Monitoring and Assessment,* 71: 211-220.

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

Höhener P., Comoretto L., Housari, F. Al., Chauvelon P., Pichaud M., Chérain Y., Chiron S. (2010). Modeling anthropogenic substances in coastal wetlands: Application to herbicides in the Camargue (France). Environmental Modelling & Software, 25, 1837-1844.

Köhler H., Triebskorn R. (2013). Wildlife Ecotoxicology of Pesticides: Can We Track Effects to the population level and beyond? Science 341, 759.

Hopkins W. A. (2000). Reptile toxicology: challenges and opportunities on the last frontier in vertebrate ecotoxicology. Environmental Toxicology and Chemistry, 19(10): 2391-2393.

Kadokami K., Takeishi M., Kuramoto M., Ono Y. (2004). Maternal transfer of organochlorine pesticides, polychlorinated dibenzo-p-dioxins, dibenzofurans, and coplanar polychlorinated biphenyls in frogs to their eggs. Chemosphere, 57, 382-389.

Labadie P., Alliot F., Bourges C., Desportes A., Chevreuil M. (2010). Determination of polybrominated diphenyl ethers in fish tissues by matrix solid-phase dispersion and gas chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry: Case study on European eel (*Anguilla Anguilla*) from Mediterranean coastal lagoons. Analytica Chimica Acta, 675, 97-105.

Malaj E., von der Ohe P. C., Grote M., Kühne R., Mondy C. P., Usseglio-Polatera P., Brack W., Schäfer R. B. (2014). Organic chemicals jeopardize the health of freshwater ecosystems on the continental scale. PNAS, 111(26), 9549-9554.

Merleau L. A., Lourdais O., Olivier A., Vittecoq M., Blouin-Demers G., Alliot F., Burkart L., Foucault Y., Leray C., Migne E., Goutte A. (in prep). Pesticide concentrations in a threatened freshwater turtle (*Emys orbicularis*): seasonal and annual variation in the Camargue wetland, France. Environmental Science and Technology.

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

Newbold, T., Hudson, L. N., Hill, S. L. L., Contu, S., Lysenko, I., Senior, R. A., Börger, L., Bennett, D. J., Choimes, A., Collen, B., Day, J., De Palma, A., Díaz, S., Echeverria-Londoño, S., Edgar, M. J., Feldman, A., Garon, M., Harrison, M. L. K., Alhusseini, T., … Purvis, A. (2015). Global effects of land use on local terrestrial biodiversity. *Nature*, 520(7545), 45–50.

Olivier A. (2002). Ecologie, traits d'histoire de vie et conservation d'une population de cistude d'Europe *Emys orbicularis* en Camargue. Diplôme de l'Ecole Pratique des Hautes Etudes, 173p.

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: 562-565.

Parc naturel régional de Camargue (2008). Le riz en Camargue. Date de consultation : 22.05.23, www.parc-camargue.fr

Parc naturel régional de Camargue (2017). Etude de l'occupation du sol en Camargue 2016 et évolution 2001-2016. Date de consultation: 15.05.23, www.parc-camargue.fr

Persson L., Carney Almroth B. M., Collins C. D., Cornell S., de Wit C. A., Diamond M. L., Fantke P., Hassellöv M., MacLeod M., Ryberg M. W., Søgraad Jørgensen P., Villarrubia-Gómez P., Wang Z., Zwicky Hauschild M. (2022). Outside the safe operating space of the planetary boundary for novel entities. Environmental Science and Technology, 56, 1510-1521.

Priol P. (2009). Guide technique de conservation de la Cistude d'Europe en Aquitaine. Cistude Nature, Le Haillan, France, 166p.

Rigal S., Dakos V., Alonse H., Auninn A., Benko Z., Brotons L., Chodkiewicz T., Chylareck P., de Carli E., del Moral J. C., Domsa C., Escandell V., Fontaine B., Foppen R., Gregory R., Harris S., Herrando S., Husby M., Leronymidou C., Jiguet F., Kennedy J., Klvanova A., Kmecl P., Kuczynski L., Kurlavicius P., Atle Kalas J., Lehikoinen A., Lindström A., Lorrillière R., Moshøj C., Nellis R., Noble D., Palm Eskildsen D., Paquet J. Y., Pélissie M., Pladevall C., Potolou D., Reif J., Schmid H., Seaman B., Szabo Z. D., Szèp T., Tellini Florenzano G., Teufelbauer N., Trautmann S., van Turnhout C., Vermouzek Z., Vikstrøm T., Vorisek P., Weiserbs A., Devictor V. (2023). Farmland practices are driving bird population decline across Europe. PNAS, 120 (21), e2216573120.

Thienpont S. (2020). Plan national d'action 2020-2029 en faveur de la Cistude d'Europe (*Emys orbicularis*). Société Herpétologique de France. Ministère de la Transition Ecologique.

Todd, B., Willson, J., Gibbons, J., 2010. The global status of reptiles and causes of their decline. Ecotoxicology of Amphibians and Reptiles, 47–67.

Walker C. H., Sibly R. M., Hopkin S. P., Peakall D. B. 2012. Principles of Ecotoxycology. Fourth Edition, CRC Press, Boca Raton, US, 352p.

Contamination du milieu et niveau plasmatique de pesticides chez la Cistude d'Europe, Emys orbicularis : une étude comparative entre cinq populations en Camargue

Les écosystèmes aquatiques sont exposés à de nombreux polluants, et notamment aux pesticides, fortement utilisés en agriculture. Les risques pour les espèces non-cibles, et particulièrement sur les reptiles, restent très peu évalués. La Cistude d'Europe, *Emys orbicularis*, est une espèce de tortue aquatique, sédentaire vivant dans les rivières et marais, longévive, omnivore, se nourrissant d'Ecrevisse de Louisiane. Le projet CISTOX vise à évaluer l'exposition aux pesticides chez cette espèce en fonction du contexte environnemental, agricole et hydraulique de sites d'échantillonnage ainsi que les effets à différents niveaux physiologiques et écologiques. La première année du projet (2022) s'est focalisée sur la Camargue, une région particulièrement concernée par l'agriculture et les rejets d'importantes quantités de pesticides dans l'environnement. Cette étude vise à (i) explorer les différences de contaminations et d'occurrence aux résidus de pesticides entre les sites d'étude, (ii) étudier la contamination de l'environnement (eau, sédiments) et la mettre en lien avec celle des cistudes, (iii) expliquer les variations interindividuelles des niveaux de pesticides circulant dans le sang en fonction du sexe, des stades d'usure du plastron (âge) et de la condition corporelle des individus. Les résultats de cette étude montrent que les cistudes vivant dans les canaux de drainage sont plus contaminées que les cistudes capturées dans les canaux d'irrigation. Cette contamination est principalement due à un herbicide, la bentazone, fortement utilisé en riziculture. Aucun effet du stade d'usure du plastron (proxy de l'âge), de la condition corporelle ou du sexe des individus n'a été observé sur la contamination des cistudes. Une corrélation nette entre la contamination de l'eau et celle des cistudes a été observée : plus l'eau est contaminée plus le nombre de cistudes contaminées est grand. Cette étude met ainsi en avant la voie principale d'exposition au pesticide : l'eau. L'alimentation ne semble pas être une voie de contamination car aucune Ecrevisse de Louisiane n'est contaminée par la bentazone. Le projet se poursuit actuellement avec la recherche des effets potentiels à différentes échelles biologiques, ainsi que le prélèvement d'échantillons dans d'autres régions pour affiner les comparaisons entre les sites.

Environmental contamination and plasmatic level of pesticides on the European pond turtle, Emys orbicularis: a comparative study between five populations in Camargue

Freshwater ecosystems are exposed to several pollutants, and especially pesticides, which are widely used in agriculture. Risk to non-target species, and especially reptiles are poorly assessed. The European pond turtle, *Emys orbicularis* is sedentary, living in rivers and swamps, long lived, and omnivorous species, feeding on the red swamp crayfish. The CISTOX project aims to evaluate pesticides' exposure of this species depending on the environmental, agricultural, and hydrological context of sampling sites, as well as the effects at different physiological and ecological levels. During the first year (2022), the project was conducted in the Camargue wetlands, which are characterized by agricultural activities and the environmental release of several pesticides. This study aims to (i) explore the differences in contamination and occurrence of pesticides residues among the five sites, (ii) study the environmental contamination (water, sediments) and their relations with pesticides load of European pond turtle, (iii) test the effect of the sex, stage of wear of the plastron and the body condition of the individuals to explain inter-individual variations in plasmatic levels of pesticides. The study results show that turtles caught in sites close to drainage channels are more contaminated than turtles caught in irrigation channels. This contamination is mainly due to an herbicide, the bentazone, widely used in rice farms. No effect of the stage of wear of the plastron (proxy of age), nor the body condition, nor the sex of individuals was observed. A clear correlation between water contamination and European pond turtle contamination was observed: turtle living in the most contaminated water, had the highest probability to be contaminated by bentazone. This study highlights the main pesticides exposure routes: water. Food seems to not be an exposure route because no red swamp crayfish was contaminated by bentazone. The next step of this project is the investigation of biological effects, as well as new sampling in other areas to improve inter-site comparison.