MÉMOIRE DE STAGE DE FIN D'ÉTUDES

Pour l'obtention du :

DIPLÔME D'INGÉNIEUR AGROPARISTECH

Dans le cadre de la dominante d'approfondissement METATOX « De l'évaluation à la gestion des risques toxicologiques pour la santé des écosystèmes et de l'Homme »

Intitulé du projet de stage :

Etude de l'impact des contaminants et de caractéristiques individuelles sur différents biomarqueurs physiologiques chez la Cistude d'Europe (Emys orbicularis)

Présenté par : **Sidonie GIRARD**

Soutenu le : **07/09/2023**

Dirigé par **Olivier LOURDAIS**

Maître de stage au sein de l'organisme d'accueil

Centre d'Etudes Biologiques de Chizé (UMR 7372)
405 Route de Prissé-la-Charrière, 79360 Villiers-en-Bois

En collaboration avec **Jérôme MOREAU** et **Coraline BICHET**

Stage effectué du : 01/03/2023 au 01/09/2023

Enseignante référente : **Juliette FABURE**

Sommaire

Remerciements ... 3
Liste des abréviations ... 4
Liste des acronymes des sites étudiés ... 4
Liste des figures ... 5
Liste des tableaux ... 5
Présentation du laboratoire et du contexte du projet ... 6
1. Introduction ... 7
2. Matériel et méthode ... 12
2.1. Sites d'échantillonnage et captures ... 12
2.2. Récolte de données sur le terrain ... 16
2.2.1. Prélèvements et frottis sanguins ... 16
2.2.2. Échantillonnage environnemental : eau, sédiments, POCIS, écrevisses de Louisiane ... 16
2.2.3. Autres paramètres mesurés (morphométrie, tests comportementaux de retournement, photographies, microbiote) ... 16
2.3. Dosage des contaminants dans le sang des individus ... 17
2.4. Mise au point de l'analyse de la formulation sanguine chez la Cistude d'Europe ... 18
2.4.1. Coloration des frottis sanguins ... 19
2.4.2. Identification des types cellulaires ... 19
2.4.3. Protocole d'analyse de la formulation sanguine par comptage cellulaire ... 20
2.5. Analyses statistiques ... 20
2.6. Déclaration d'éthique ... 22
3. Résultats ... 22
3.1. Analyses exploratoires sur les comptages des types cellulaires ... 22
3.2. Analyses des effets des variables explicatives sur la formulation sanguine ... 23
3.2.1. Effet du sexe, de la population et de la masse sur la formulation sanguine ... 23
3.2.2. Liens avec les données de détection et de quantification des résidus de pesticides dans le plasma des individus des 5 populations de Camargue ... 26
4. Discussion ... 27
Références ... 31
Résumé ... 36
Summary ... 36
Annexes ... 37

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier mon maître de stage, Olivier Lourdais, pour m'avoir permis de réaliser ce stage. Son encadrement et son accompagnement m'ont permis d'apprendre et de me former sur de multiples sujets.

Je souhaite ensuite remercier mon enseignante référente de stage, Juliette Faburé, pour sa supervision et son accompagnement au long du stage, ainsi que pour son aide attentive dans la prospection et les candidatures de thèse. Je souhaite également remercier l'ensemble de l'équipe éducative de METATOX, Valérie Camel, Pierre Calvel et François Mariotti pour leur accompagnement tout au long de l'année et sur cette période de stage.

Je remercie également Coraline Bichet et Jérôme Moreau, qui m'ont accompagnée et m'ont fait part de leur expertise quant à l'analyse de frottis sanguins. Leur aide a été précieuse dans le développement et la réalisation de mon protocole, ainsi que dans l'analyse de mes données et la rédaction de mon mémoire. Un grand merci à Sylvain Larrat pour son expertise en termes d'analyse de frottis sanguin, à Anthony Olivier pour le partage de ses connaissances relatives au projet et son aide dans la rédaction du rapport.

Je remercie également Leslie-Anne Merleau, avec qui j'ai réalisé ma période de terrain, pour son accompagnement dans la réalisation de mon stage ainsi que pour nos multiples échanges concernant le monde de la recherche. Un grand merci à toute l'équipe de Cistude Nature qui nous a permis de réaliser nos relevés sur le terrain, mais aussi pour tous les moments informels que nous avons partagés. Je remercie également l'équipe de la réserve ornithologique du Teich pour leur accueil chaleureux.

Un grand merci à Charline Parenteau et Emmanuelle Pouydebat pour leur aide lors de mes passages au laboratoire de biochimie, ainsi qu'à Michaël Guillon pour la réalisation des cartes.

Enfin, un grand merci à mes camarades stagiaires au CEBC, sans qui ce stage n'aurait pas été le même. Anne, Apolline, Benjamin, Carla, Clément, Fanny, Louis, Louison, Margot, Quentin, Roxane, Sarah, Solène, Thalia, Théodore, Tim, merci pour nos échanges, nos repas, nos sorties et tous les moments du quotidien. Un grand merci à mes parents pour leur soutien et à ma sœur, qui a été présente, comme à son habitude, dans les moments de motivation comme de doute.

Liste des abréviations

AB : Agriculture Biologique

APPB : Arrêté Préfectoral de Protection de Biotope

CEBC : Centre d'Etudes Biologiques de Chizé

CMR : Capture Marquage Recapture

GPMM : Grand Port Maritime de Marseille

H/L : Hétérophiles/Lymphocytes

GC : Glucocorticoïdes

PFAS : Substances per et polyfluoroalkylées

PGEN : Plan de Gestion des Espaces Naturels

PNR : Parc Naturel Régional

POCIS : Polar Organic Chemical Integrative Samplers

POPs : Polluants Organiques Persistants

RNN : Réserve Naturelle Nationale

RNR : Réserve Naturelle Régionale

UMR METIS : Unité Mixte de Recherche Milieux Environnementaux, Transfert et Interactions dans les hydrosystèmes et les Sols

ZIP : Zone Industrielle et Portuaire

Liste des acronymes des sites étudiés

BEL : La Bélugue

DRA : Draille marseillaise

ESQ : Esquineau

FAI : Faïsses

HRO : Hautes Rondières

GBA : Grand Badon

PLE : Le Plessis

SMU : (non divulgué)

TON : Tonkin

Liste des figures

Figure 1. Cistude d'Europe. © 2023 par Sidonie Girard 10

Figure 2. Répartition des observations de Cistude d'Europe en France hexagonale et localisation des populations échantillonnées dans le cadre de l'étude. © 2023 par Michaël Guillon 13

Figure 3. Six populations échantillonnées dans le département des Bouches-du-Rhône, représentées par type d'exposition aux contaminants. © 2023 par Michaël Guillon 14

Figure 4. Dimorphisme sexuel chez la Cistude d'Europe. © 2023 par Sidonie Girard 17

Figure 5. Graphiques de corrélation entre les trois marqueurs d'intérêt 23

Figure 6. Représentation du compte total de leucocytes (A), du ratio H/L (B) et du compte d'éosinophiles (C) après transformation logarithmique en fonction de la population. 24

Figure 7. Influence du sexe sur le nombre total de leucocytes après transformation logarithmique, toutes populations confondues 25

Figure 8. Influence de la masse (en grammes) sur le nombre total de leucocytes (A), sur le ratio H/L (B) et sur le nombre d'éosinophiles (C) après transformation logarithmique 25

Figure 9. Nombre total de leucocytes (transformation logarithmique) en fonction du nombre de pesticides détectés, avec les 5 populations confondues. 27

Liste des tableaux

Tableau 1. Populations étudiées, nombre d'individus capturés (N) et contextes des sites 12

Tableau 2. Résultats de l'ANOVA des modèles linéaires finaux (N=175) permettant de tester l'effet de la population, du sexe et de la masse sur les marqueurs sanguins d'intérêt (nombre total de leucocytes, ratio H/L, nombre d'éosinophiles) 23

Tableau 3. Résultats de l'ANOVA des modèles linéaires permettant de tester l'effet du nombre de pesticides sur le nombre total de leucocytes (N = 99) 27

Présentation du laboratoire et du contexte du projet

Le Centre d'Etudes biologiques de Chizé (CEBC) est un centre de recherche en écologie dont l'objectif est d'identifier les mécanismes et les processus qui régulent la dynamique de la biodiversité, dans un contexte de changement global. Il se compose de 3 équipes aux sujets de recherche variés et complémentaires : l'équipe Résilience, qui s'intéresse aux relations entre agriculture et biodiversité, l'équipe Prédateurs marins, qui étudie les effets des changements globaux sur les écosystèmes et organismes marins, et l'équipe ECOPHY, dont j'ai pu faire partie, qui étudie les effets des changements globaux et des stresseurs environnementaux sur les processus physiologiques des organismes.

Ce stage de fin d'études s'inscrit dans le cadre du projet "CISTOX". L'objectif de ce projet est d'évaluer l'exposition d'une tortue aquatique menacée, la Cistude d'Europe (*Emys orbicularis*), aux pesticides dans plusieurs zones humides du territoire métropolitain en fonction du contexte agricole et environnemental. Ce projet est financé par le plan Ecophyto II+, dans le cadre de son « Axe 3 - Action 12 » - « Connaître, surveiller et réduire les effets non intentionnels liés à l'utilisation des produits phytopharmaceutiques sur l'environnement (biodiversité, sol, pollinisateurs) ». Les effets potentiels sont évalués à plusieurs niveaux biologiques via des biomarqueurs (stress oxydant, taille des télomères, perturbation endocrinienne), des indicateurs (microbiote, mobilité, condition corporelle) et des suivis démographiques (survie, démographie). Ce projet engage plusieurs partenaires : le Centre d'Etudes Biologiques de Chizé (UMR 7372), l'Unité Mixte de Recherche Milieux Environnementaux, Transfert et Interactions dans les hydrosystèmes et les Sols (UMR 7619 METIS) à Sorbonne Université à Paris, la Fondation Tour du Valat en Camargue, le Muséum National d'Histoire Naturelle, l'association Cistude Nature en Gironde et l'association Epiméthée en Brenne.

1. Introduction

Les activités humaines sont responsables de la contamination de l'ensemble des compartiments de l'environnement par des polluants de nature variée (Leenhardt et al., 2022). Les polluants sont définis dans la Directive Cadre sur l'Eau (Directive 2000/60/CE) comme "toute substance introduite directement ou indirectement par la suite d'une activité humaine dans l'eau, le sol ou l'air susceptible de porter atteinte à la santé humaine ou à la qualité des écosystèmes aquatiques ou [...] terrestres [...]". Plusieurs classifications sont proposées, selon l'origine ou le devenir des polluants. Parmi celles-ci, les polluants d'origine agricole sont au cœur des préoccupations, en raison de leur ubiquité et de leur toxicité sur les organismes vivants (Boivin & Poulsen, 2017; Malaj et al., 2014). En 2019, les ventes de produits phytosanitaires s'élèvent à 55 000 tonnes de substances actives en France. Environ 97 % sont destinées à un usage agricole, faisant du pays le deuxième utilisateur de phytosanitaires en Europe (*Bilan environnemental de la France - Édition 2021*, n.d.). Cette contamination est identifiée comme l'une des causes majeures de l'érosion de la biodiversité. Ses impacts se combinent à de nombreuses autres perturbations comme la destruction des habitats liée à l'intensification agricole et à l'urbanisation, les changements climatiques et l'introduction d'espèces envahissantes (Topping et al., 2020). Ces pressions sont interconnectées, rendant complexe l'évaluation de la part de l'impact des polluants sur le déclin de la biodiversité.

Parmi les compartiments de l'environnement particulièrement affectés par cette pollution se trouvent les zones humides, espaces naturels sensibles protégés par la convention de Ramsar. Cette convention a pour objectif la "conservation et l'utilisation rationnelle de ces zones par des actions locales et nationales et par la coopération internationale, en tant que contribution à la réalisation du développement durable dans le monde entier". Elle définit largement les zones humides dans son quatrième plan stratégique comme des "étendues de marais, de fagnes, de tourbières ou d'eaux naturelles ou artificielles, permanentes ou temporaires, où l'eau est stagnante ou courante, douce, saumâtre ou salée, y compris des étendues d'eau marine dont la profondeur à marée basse n'excède pas six mètres" (*Le Quatrième Plan Stratégique de Ramsar 2016-2024 | The Convention on Wetlands, La Convention Sur Les Zones Humides*, n.d.). Ces zones présentent un fort enjeu de conservation étant donné qu'elles fournissent un large éventail de services écosystémiques (approvisionnement et épuration de l'eau, régulation du climat, maîtrise des crues, protection des littoraux, inspiration culturelle et spirituelle et tourisme) et abritent une grande biodiversité : 125 000 espèces dont 14% de vertébrés (Balian et al., 2008). Elles font partie des

écosystèmes les plus dégradés et menacés au monde en raison des multiples pressions qui s'y exercent (Dudgeon et al., 2006). Le déclin des espèces d'eau douce (83 % entre 1970 et 2014) dépasse toujours le déclin des espèces des écosystèmes marins et terrestres (Reid et al., 2019). La pollution des eaux de surface y serait le facteur prépondérant du déclin des espèces aquatiques (Dudgeon et al., 2006; Reid et al., 2019).

Des liens entre l'utilisation des pesticides et le déclin des populations de différents vertébrés ont été montrés (Brühl & Zaller, 2019) notamment chez les oiseaux (Mineau & Whiteside, 2013), mammifères, amphibiens et poissons (Garcês et al., 2020). Une récente étude met en évidence le rôle prépondérant de l'intensification de l'agriculture et la forte utilisation d'intrants et d'engrais sur le déclin des populations d'oiseaux en Europe (Rigal et al., 2023). Les effets des contaminants sur la santé des individus et l'état des populations sont de plus en plus étudiés en écotoxicologie. Ces effets sont généralement distingués par leur type (direct, indirect, létal, sublétal). Ils s'inscrivent à différentes échelles et à différents niveaux d'organisation biologique (individus, populations, communautés, écosystèmes). Les polluants peuvent entraîner des perturbations physiologiques importantes. Des pesticides comme les organophosphorés, les carbamates ou les pyréthrines induisent un stress oxydatif par inhibition de l'activité de l'acétylcholinestérase, enzyme impliquée dans le transfert de l'influx nerveux (Abdollahi et al., 2004). Plusieurs études mettent en évidence l'influence des pesticides sur le vieillissement cellulaire prématuré par raccourcissement des télomères (séquences d'ADN à l'extrémité des chromosomes associées à la protection des séquences codantes) (Blévin et al., 2016; Zhang et al., 2013). La longueur des télomères étant un bon prédicteur de la longévité des individus, l'exposition aux polluants pourrait dans certains cas expliquer le taux de survie plus faible chez certaines populations exposées (Blévin et al., 2016). Plusieurs molécules peuvent perturber le système endocrinien (Guillette, 2000) ou altérer le comportement des individus par leur propriétés neurotoxiques (Walker, 2003).

A l'heure actuelle, l'étude des effets des polluants sur la faune sauvage montre des lacunes notamment dans le manque de prise en compte des effets chroniques, indirects, sublétaux et de mélange (effets d'interaction entre plusieurs polluants) et le manque de représentativité des outils d'évaluation actuels. Le développement de la biosurveillance et l'utilisation de biomarqueurs permettent de répondre en partie à ce problème en augmentant la pertinence écologique de l'évaluation. Les biomarqueurs sont des changements observables ou mesurables qui révèlent l'exposition (biomarqueur d'exposition) ou l'effet (biomarqueur d'effet) d'une substance sur un individu. Dans ce contexte, le sang est une matrice pertinente dans l'évaluation de l'état

physiologique d'un individu à un instant *t*, par son rôle de véhicule de transport et de distribution de polluants et étant donné qu'il contient de nombreux composants pouvant servir de biomarqueurs. Jusqu'ici, l'état de stress physiologique d'un individu était évalué par mesure des niveaux d'hormones glucocorticoïdes (GC) circulants. Les vertébrés répondent au stress par activation de réponses physiologiques conduisant entre autres à la libération d'hormones GC dans le sang, ce qui en fait un bon marqueur de stress (Wingfield & Romero, 2011). Cependant, les niveaux de GC augmentent rapidement et sensiblement chez les individus suite au stress généré par la capture (Davis et al., 2008). Ces hormones GC provoquent des changements caractéristiques dans la composition sanguine des vertébrés. Ainsi, l'utilisation de marqueurs sanguins (cellules sanguines), directement liés aux niveaux d'hormones GC, permet de s'affranchir de ce problème car contrairement à la réponse hormonale à un stress de capture, la réponse dans la composition sanguine débute après plusieurs heures (Davis et al., 2008). Le sang est composé d'érythrocytes, de leucocytes et de thrombocytes. Par conséquent, la liste des variables sanguines potentiellement utilisables comme marqueurs sanguins est presque aussi longue que le nombre de composants sanguins (Maceda-Veiga et al., 2015). Ces derniers doivent être choisis minutieusement car ils fournissent des informations très variables. Dans une récente étude sur les effets d'une exposition chronique de perdrix grises à des pesticides (Moreau et al., 2021), le nombre de leucocytes pour 10 000 érythrocytes et le ratio hétérophiles/lymphocytes (H/L) se sont avérés significativement plus élevés chez les individus exposés chroniquement que chez les individus non exposés.

L'étude des effets des polluants sur la biodiversité reste encore incomplète, notamment chez les vertébrés ectothermes comme les reptiles. Ceux-ci demeurent rarement étudiés en écotoxicologie (Campbell & Campbell, 2002), bien qu'ils soient exposés et sensibles à la pollution environnementale (Hoang et al., 2021). La plupart des études sur les réponses hématologiques sont réalisées chez les mammifères, les oiseaux et les amphibiens. Quelques rares études montrent des phénomènes similaires chez les reptiles (Case et al., 2005; Chen et al., 2007; Lance & Elsey, 1999). Bien que ces études suggèrent que ces marqueurs puissent être utilisés dans l'étude du stress chez les reptiles, il existe moins de travaux sur ce groupe taxonomique que sur d'autres (Davis et al., 2008). Quelques études récentes s'intéressent aux liens entre hématologie des tortues et exposition aux contaminants, notamment chez les tortues marines (Perrault et al., 2017; Tauer et al., 2017), mais très peu d'études ne s'intéressent à ces liens chez les tortues d'eau douce sauvages.

Notre objectif est donc de mieux comprendre les liens entre exposition aux contaminants et physiologie chez un vertébré ectotherme aquatique, la Cistude d'Europe (Figure 1). Cette tortue

d'eau douce, habitante des zones humides de l'Ouest de l'Europe présente une faible dispersion, un régime alimentaire omnivore et une importante longévité (Olivier, 2002). Cette combinaison de trait en fait une espèce potentiellement indicatrice de la contamination de ces milieux. Elle est classée comme quasi menacée par l'Union Internationale de Conservation de la Nature (Baillie et al., 2004) et est classée à l'annexe 2 de la directive Habitats. L'espèce est intégralement protégée en France métropolitaine depuis 1979 et fait l'objet d'un Plan National d'Action depuis 2011. Une étude récente (Merleau et al., soumis) montre l'exposition avérée de cistudes en Camargue à 29 pesticides et métabolites de pesticides, mais les effets sur la physiologie des individus n'ont pas encore été établis. Le but de cette étude sera d'étudier des biomarqueurs de santé des individus, notamment la formulation sanguine, et de chercher à savoir si ces marqueurs peuvent être mis en relation avec les niveaux de contamination mesurés chez les mêmes individus et/ou avec d'autres paramètres individuels (sexe, population d'origine, masse). Nous utiliserons une approche multi-sites dans laquelle 9 populations provenant de sites à contextes agricoles (riziculture, maraîchage, viticulture, grandes cultures) et industriels variés seront étudiées. Ces populations sont issues des départements des Bouches-du-Rhône (6 populations), Gironde (une population) et Indre (deux populations). Au total, 175 individus seront étudiés.



Figure 1. Cistude d'Europe. © 2023 par Sidonie Girard

Notre étude reposera sur deux étapes complémentaires :

1) Une première étape sera le développement de la méthode permettant l'analyse standardisée des frottis sanguins sur l'espèce. L'identification des types cellulaires est une des principales

sources de variabilité en hématologie des chéloniens. La plupart des articles illustrent les cellules sanguines les plus faciles à identifier, en ignorant les plus difficiles (Perpiñán, 2017). Il en ressort un défaut de connaissance sur le sujet. Un travail de mise au point et d'exploration de la bibliographie en profondeur a donc été nécessaire avant de se lancer dans l'analyse des frottis sanguins. Les dénombrements des marqueurs sanguins ont ensuite été faits selon des méthodes standards en hématologie de la faune sauvage. Seront notamment étudiés le ratio H/L, le compte total de leucocytes pour 4000 érythrocytes, ainsi que le compte d'éosinophiles.

2) Dans une seconde étape, des déterminants des variations des marqueurs sanguins choisis seront analysés. Dans ce cadre, deux hypothèses seront étudiées :

- Hypothèse 1 : La formulation sanguine des individus varie selon leur population d'origine, leur sexe et leur masse. Il a été mis en évidence que de nombreux paramètres comme le sexe, la taille, l'âge, l'habitat, la saison et le régime alimentaire peuvent affecter les paramètres hématologiques chez les tortues (Hernandez et al., 2017; Wood & Ebanks, 1984; Yang et al., 2014). Cette hypothèse sera testée sur les données des 9 populations étudiées.

- Hypothèse 2 : La formulation sanguine varie selon la contamination en pesticides. Cette hypothèse sera testée sur les données de 5 des 9 populations échantillonnées, populations pour lesquelles les données des détection et quantification des résidus de pesticides plasmatiques sont disponibles (Charriot et al., 2023). Selon la bibliographie, nous nous attendons à une altération du nombre de leucocytes, du ratio H/L et du compte d'éosinophiles lorsque l'exposition augmente (Soltanian, 2016).

Cette étude permettra, dans le cadre du projet CISTOX, de participer à l'amélioration des connaissances qui serviront d'appui aux politiques publiques dans le cadre de l'évaluation de l'exposition et de l'impact des contaminants, notamment des pesticides, chez les vertébrés ectothermes. Ces informations pourront être prises en compte dans les définitions de Normes de Qualité Environnementale dans l'eau. Elle participera aussi à l'amélioration des connaissances scientifiques sur les reptiles, autant en écotoxicologie (impact des contaminants) qu'en hématologie (marqueurs sanguins comme témoins d'un stress physiologique) des reptiles.

2. Matériel et méthode

2.1. Sites d'échantillonnage et captures

Les captures de cistudes d'Europe ont été réalisées dans 9 sites en 2022 et 2023 (Tableau 1). Six sites étaient situés en Camargue dans le département des Bouches-du-Rhône (dont 5 dans le Parc Naturel Régional (PNR) de Camargue et deux au sein de la Réserve Naturelle Régionale (RNR) de la Tour du Valat), deux dans le PNR de Brenne (dont une dans la Réserve Naturelle Nationale (RNN) de Chérine) et une en Gironde (Figure 2). Les captures se sont déroulées entre avril et juillet lors des deux années, généralement sur une période de 2 semaines par site. Cette période correspond à la fois à une période d'épandage autorisé des pesticides (Calendrier de traitement multi-cultures, Chambre d'agriculture de Gironde) ainsi qu'à la principale période d'activité des Cistudes (Olivier, 2002).

Tableau 1. Populations étudiées, nombre d'individus capturés (N) et contextes des sites. Type d'exposition : caractérise chaque site par son niveau d'exposition prédite aux contaminants d'origine anthropique. Critère défini arbitrairement sur la base du contexte agricole et industriel environnant, il permet de caractériser généralement l'exposition en amont de l'analyse de la contamination mais ne constitue pas un critère objectif de l'exposition environnementale des sites. Type 1 : peu exposé ; type 2 : exposition agricole moyenne ; type 3 : forte exposition agricole (intensive) ; type 4 : forte exposition, agricole, industrielle, urbaine.

Population	N	Données pesticides plasmatiques	Date échantillonnage	Département	Contexte	Exposition
La Bélugue (BEL)	21	Oui	Juillet 2022	Bouches-du-Rhône	PNR de Camargue - Site du Conservatoire du Littoral	Type 2
Esquineau (ESQ)	21	Oui	Mai 2022	Bouches-du-Rhône	PNR de Camargue - RNR Tour du Valat	Type 2
Draille marseillaise (DRA)	21	Oui	Mai 2022	Bouches-du-Rhône	PNR de Camargue - RNR Tour du Valat	Type 2
Faïsses (FAI)	20	Oui	Juin 2022	Bouches-du-Rhône	PNR de Camargue - Domaine de la Tour du Valat hors RNR	Type 3
Grand Badon (GBA)	16	Oui	Juin 2022	Bouches-du-Rhône	PNR de Camargue - Propriété privée - Mas du Grand Badon - AB	Type 2
Le Tonkin (TON)	20	Non	Avril 2023	Bouches-du-Rhône	Grand Port Maritime de Marseille - APPB	Type 4
SMU	19	Non	Mai 2023	Gironde	Confidentiel	Type 4
Hautes Rondières (HRO)	20	Non	Juin 2023	Indre	PNR de Brenne hors RNN de Chérine	Type 1
Le Plessis (PLE)	17	Non	Juin 2023	Indre	PNR de Brenne, RNN de Chérine	Type 1

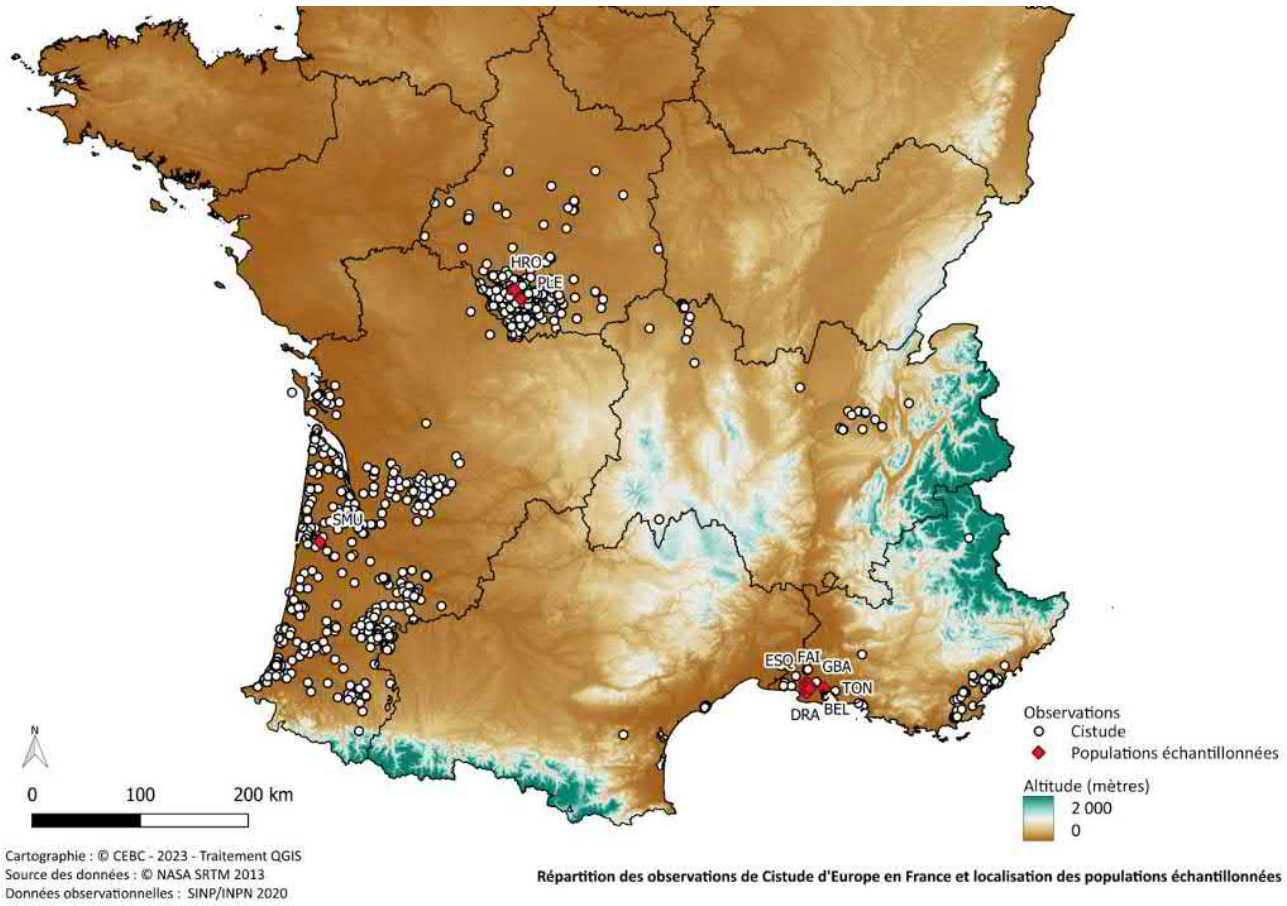


Figure 2. Répartition des observations de Cistude d'Europe en France hexagonale et localisation des populations échantillonnées dans le cadre de l'étude. Les populations sont désignées par leur acronyme explicité dans le tableau 1. **© 2023 par Michaël Guillon**

Les captures sont réalisées à l'aide de pièges d'interception (verveux, nasses) disposés dans les milieux aquatiques utilisés par les Cistudes (marais, étangs, canaux…). Les pièges sont généralement posés le lundi, puis relevés chaque jour et retirés le vendredi. Dans le cas des nasses, des appâts à base de sardines ont été utilisés. Lors de chaque relevé, les individus capturés sont gardés dans des bacs pour être traités (marquage, prise de mesures biométriques, prises de sang…) puis relâchés le jour même à l'endroit de leur capture. Un objectif de 20 prises de sang a été fixé par site. Sur certains sites, cet objectif n'a pas pu être atteint à cause d'un taux de capture trop faible (Tableau 1). Sur d'autres sites, le taux de capture a pu être dépassé et les tortues supplémentaires ont quand même été traitées afin de maximiser le recueil de données.

Sur la majorité des sites étudiés, les populations de Cistude font l'objet de suivis Capture-Marquage-Recapture (CMR) depuis plusieurs années par différents organismes (Tour du Valat, PNR de Camargue, RNN de Chérine, Cistude Nature), permettant l'identification individuelle des cistudes. La marquage est fait par une incision légère des écailles marginales (réalisation d'une petite encoche en forme de demie-lune sur la partie kératinisée de l'écaille).

Description des sites

Bouches-du-Rhône

Le site du Tonkin (TON, Figure 3) est une zone humide située à Fos-sur- Mer, dans l'emprise du Grand Port Maritime de Marseille (GPMM). Elle fait partie de la couronne agro-environnementale définie par le GPMM dans son plan de gestion de ses espaces naturels terrestres (PGEN) situés dans la Zone industrielle et Portuaire (ZIP). L'espace est classé en Arrêté Préfectoral de Protection de Biotope (APPB). Il s'agit du seul site de notre échantillonnage dans les Bouches-du-Rhône qui est en dehors des limites du PNR de Camargue. L'exposition de ce site est jugée comme très forte du fait de son exposition industrielle (type 4). Les captures y ont été réalisées en avril 2023.

Cinq sites ont été échantillonnés en 2022 au sein du PNR de Camargue : l'Esquineau (ESQ), la Draille Marseillaise (DRA), les Faïsses (FAI), le Grand Badon (GBA) et la Bélugue (BEL) (Figure 3). Les captures ont été réalisées durant une campagne d'échantillonnage qui s'est déroulée entre mai et juillet 2022. Le suivi CMR est assuré par la Tour du Valat pour l'ensemble de ces sites à l'exception de la Bélugue où les suivis sont réalisés par le PNR de Camargue.

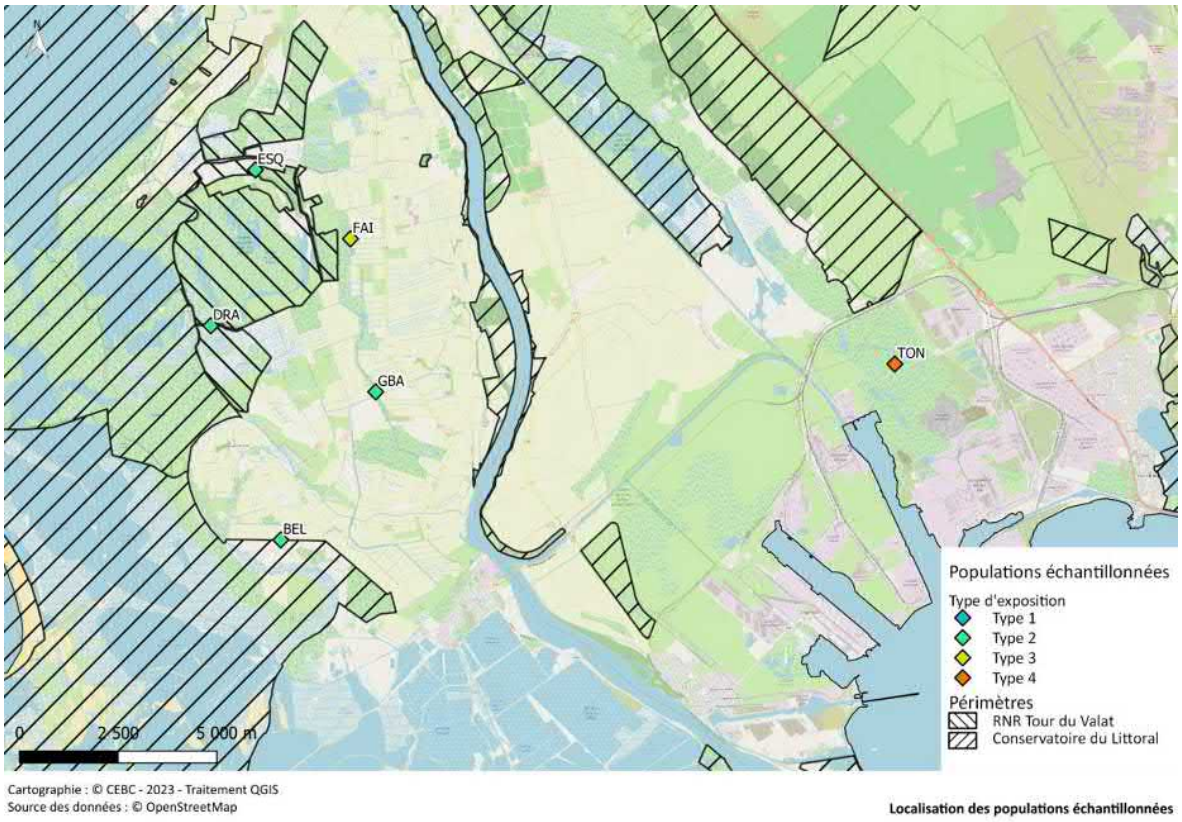


Figure 3. Six populations échantillonnées dans le département des Bouches-du-Rhône, représentées par type d'exposition aux contaminants. Type 1 : peu exposé ; type 2 : exposition agricole moyenne ; type 3 : forte exposition agricole (intensive) ; type 4 : forte exposition, agricole, industrielle, urbaine. **© 2023 par Michaël Guillon**

Les sites de l'Esquineau et de la Draille Marseillaise sont situés au sein de la RNR de la Tour du Valat. L'Esquineau est un marais alimenté par un canal d'irrigation (Burkart et al., 2021; Olivier, 2002). Les cistudes vivent dans ce marais et dans les canaux environnants (Olivier et al., 2010). Son exposition est prédite comme moyenne (type 2) du fait de l'origine de l'eau et du niveau de protection élevé du site. La Draille marseillaise est un site constitué d'un canal de drainage des parcelles agricoles (le Fumemorte) et d'un canal d'irrigation (le canal du Japon). Les premières zones agricoles se situant à 1.5 kilomètre du site, son exposition est prédite comme moyenne (type 2). Le site des Faïsses fait partie du domaine de la Tour du Valat mais n'est pas intégré au périmètre de la RNR. Les Cistudes utilisent des marais et canaux irrigués par le canal du Fumemorte (Olivier, 2002; Olivier et al., 2010). Son exposition est jugée comme forte (type 3) car les parcelles agricoles sont situées à proximité immédiate des sites de capture. Le site du Grand Badon se trouve dans une propriété privée. Son exposition est jugée comme moyenne (type 2) car le site est en agriculture biologique (AB), mais à proximité immédiate du canal du Fumemorte. Le site de La Bélugue est propriété du Conservatoire du Littoral. Son exposition est jugée comme moyenne (type 2) car les cistudes ont principalement été capturées dans des marais et canaux mis en eau par du drainage agricole. Ces sites ayant été échantillonnés en 2022, ce sont les seuls sites de notre étude pour lesquels les données de détection et quantification des résidus de pesticides dans le plasma des tortues sont pour l'instant disponibles. Ce sont ces données qui permettront d'étudier les liens entre marqueurs sanguins et contamination en pesticides (analyse de l'hypothèse 2).

Gironde

Le site SMU est un site industriel à proximité de Biganos. Dans un souci de confidentialité du nom de l'entreprise, le site sera mentionné uniquement par son acronyme (SMU). Les captures y ont été faites entre le 22 mai et le 2 juin 2023. Son exposition est jugée comme forte par son exposition industrielle et la présence de cultures de pin alentour (type 4). Le suivi CMR est assuré par l'association Cistude Nature.

Brenne

Les sites de Hautes Rondières (HRO) et du Plessis (PLE) se trouvent dans le PNR de la Brenne. Les Cistudes vivent dans des chaînes d'étangs en pisciculture extensive. Ces sites sont en contexte de prairie, de friche et de boisement. Leur exposition est donc jugée comme faible (type 1). Le suivi CMR est assuré par l'association Epiméthée et par l'équipe de la RNN de Chérine.

2.2. Récolte de données sur le terrain

2.2.1. Prélèvements et frottis sanguins

Une prise de sang de 1.5mL est réalisée sur chaque individu dont la masse est supérieure à 300 grammes, afin de ne pas dépasser la limite de prélèvement correspondant à 10% de la masse de l'individu. Le prélèvement est réalisé au niveau de la veine coccygienne dorsale à l'aide d'une aiguille 25G et d'une seringue préalablement imbibées d'héparine pour éviter la coagulation du sang. A la suite de cette prise de sang, un frottis sanguin est réalisé. L'échantillon sanguin est ensuite centrifugé pendant 3 minutes à 3000 rotations par minute afin de séparer les cellules sanguines du plasma. Le tout est stocké à -18°C jusqu'à analyse.

2.2.2. Échantillonnage environnemental : eau, sédiments, POCIS, écrevisses de Louisiane

La contamination de l'environnement aquatique sur chacun des sites a été caractérisée via des prélèvements ponctuels d'eau et de sédiments (deux prélèvements à deux semaines d'intervalle, à partir du début de la période de capture), ainsi que le déploiement sur chaque site d'échantillonneurs passifs (Polar Organic Chemical Integrative Samplers ou POCIS). Ces derniers permettent d'intégrer la contamination par les pesticides hydrophiles et leurs résidus présents dans l'eau sur la période de déploiement (deux semaines). Des mesures physico-chimiques (pH, conductivité, température, salinité) sont effectuées le jour de la pose et de la récupération des POCIS. Afin d'évaluer la contribution de l'alimentation comme voie d'exposition, des proies principales des cistudes (écrevisses de Louisiane, *Procambarus clarkii*) sont échantillonnées : les individus présents dans les pièges sur chaque site sont récupérés en fin de semaine, congelés à -18°C puis lyophilisés pendant 48h (Lyophilisateur Alpha 1-4) pour dosage des pesticides. J'ai participé à la réalisation de ces prélèvements mais ils ne seront pas utilisés pour cette étude.

2.2.3. Autres paramètres mesurés (morphométrie, tests comportementaux de retournement, photographies, microbiote)

Chaque individu est mesuré, pesé et identifié selon le code défini lors des suivis CMR spécifiques à chaque site. Les mesures prises sont la longueur droite de la dossière, la longueur du plastron, la hauteur et la largeur de la dossière. Le statut de gravidité (présence des œufs) est déterminé par palpation inguinale. Le sexe est déterminé sur la base du dimorphisme sexuel (Figure 4). Toute anomalie (griffe manquante, dossière abîmée, écaille surnuméraire…) est relevée. Le stade de croissance est déterminé selon l'usure des stries d'accroissement des écailles du plastron. Il varie

entre 1 et 4 et renseigne sur la classe d'âge de l'individu (Olivier, 2002). Ce stade ne sera pas utilisé dans la suite de nos analyses car sa méthodologie de détermination empêche les comparaisons entre sites, étant donné que l'usure des écailles se déroule différemment selon les substrats (Olivier, 2002). Les informations prises en compte dans notre étude sont la masse et le sexe.



Figure 4. Dimorphisme sexuel chez la Cistude d'Europe. La femelle (A) est plus grosse que le mâle (B), ses yeux sont jaunes et noirs contre rouge orangé chez le mâle. Le plastron des mâles est concave tandis que celui des femelles est plat. La queue des mâles est épaisse à la base et le cloaque plus éloigné de la carapace. **© 2023 par Sidonie Girard**

D'autres données sont récupérées sur le terrain dans le cadre du projet global, mais ne seront pas utilisées dans notre étude (tests comportementaux de retournement, photographies, prélèvement de microbiote cloacal).

2.3. Dosage des contaminants dans le sang des individus

Les pesticides sont détectés et quantifiés suivant les protocoles validés au sein de l'UMR 7619 METIS (Sorbonne Université). Les analyses ont été effectuées sur les échantillons provenant des 5 populations camarguaises (Charriot et al., 2023), soit 102 individus. Les données ne sont pas encore disponibles pour les autres populations. Les échantillons de plasma sont analysés par chromatographie liquide ou gazeuse et spectrométrie de masse en tandem (GC ou LC-MS/MS) après extraction et purification. Quarante molécules et leur résidus sont ciblés (Charriot et al., 2023). Le choix des molécules recherchées s'est appuyé sur les résultats des analyses de contaminants effectués dans le canal du Fumemorte par la Société Nationale de Protection de la Nature depuis 2011, ainsi que sur les données d'achats de pesticides par les agriculteurs des communes à proximité des sites étudiés (Banque Nationale des Ventes Distributeurs). Les données sur les marqueurs sanguins n'étant pas disponibles pour trois des 102 individus (deux frottis non disponibles et un frottis non lisible), les 99 autres individus seront considérés.

2.4. Mise au point de l'analyse de la formulation sanguine chez la Cistude d'Europe

Un des principaux objectifs de cette étude a été de mettre en place un protocole d'analyse des frottis sanguins réalisés pendant la campagne d'échantillonnage. Cela a nécessité une phase d'approfondissement de la bibliographie afin d'identifier les marqueurs sanguins les plus pertinents dans l'évaluation de l'état physiologique des individus. Les marqueurs les plus régulièrement étudiés dans l'évaluation de la santé de la faune sauvage en écotoxicologie, notamment chez les vertébrés (Maceda-Veiga et al., 2015) sont :

- Le compte différentiel de leucocytes (ou profil leucocytaire) : il permet de calculer entre autres le ratio hétérophiles/lymphocytes (H/L), témoin d'un stress ou d'une activation de la réponse immunitaire innée (Davis et al., 2008). Les hétérophiles (neutrophiles chez les mammifères) sont des phagocytes et prolifèrent dans la circulation en réponse aux infections, à l'inflammation et au stress. Les lymphocytes sont impliqués dans diverses fonctions telles que la production d'immunoglobulines et la modulation des défenses immunitaires (Davis et al., 2008). Les hormones GC entraînent une augmentation des hétérophiles circulants dans le sang, et une diminution des lymphocytes par migration du sang vers d'autres compartiments (Dhabhar, 2002). Ainsi, une augmentation des GC plasmatiques provoquée par le stress entraîne une augmentation du ratio H/L (Davis et al., 2008). Un autre marqueur accessible par le profil leucocytaire est le nombre d'éosinophiles : ils jouent un rôle dans l'inflammation et la défense contre les parasites (Bichet et al., 2022). Bien qu'elles ne soient pas souvent citées dans les travaux contemporains, les recherches historiques sur les humains et les mammifères ont démontré que le stress induit par les GC entraîne une réduction du nombre d'éosinophiles (Davis et al., 2008).

- Le nombre total de leucocytes : il reflète un investissement dans des processus immunitaires (Polo-Cavia et al., 2013). Le dénombrement est fait pour un nombre constant d'érythrocytes. Il peut être altéré par l'exposition aux contaminants (Soltanian, 2016).

- Des dommages sur l'intégrité de l'ADN peuvent être évalués par quantification des anomalies nucléaires des érythrocytes. Les cellules éclatées peuvent indiquer un état pathologique, tandis que le taux d'érythrocytes immatures est le témoin d'une réponse aiguë au stress (Maceda-Veiga et al., 2015).

Pour être lus, les frottis sont tout d'abord fixés puis colorés, selon un protocole standardisé que nous avons dû mettre au point.

2.4.1. Coloration des frottis sanguins

Nous avons retenu le protocole Giemsa (Moreau et al., 2021), du nom du produit utilisé pour la coloration : Giemsa stain, modified (Accustain, Sigma diagnostics). Les lames sont plongées pendant 5 minutes dans un bain de méthanol pour fixation puis laissées sous hotte pendant une nuit pour séchage. Les lames sont ensuite plongées pendant 40 minutes dans un bain de solution en Giesma dilué au 1/20 par une solution tampon (pH = 7). Les lames sont ensuite rincées dans la solution tampon puis laissées sous hotte pour séchage pendant 24h. Les 175 lames ont été fixées puis colorées à l'aide du protocole Giemsa.

2.4.2. Identification des types cellulaires

L'identification des types cellulaires chez la Cistude d'Europe a été permise grâce à une revue systématique de la littérature sur l'hématologie des tortues et des reptiles, ainsi que par consultation d'expert.es : Coraline Bichet (Maître de Conférences, La Rochelle Université), Sylvain Larrat (Vétérinaire Nouveaux animaux de compagnie, exotiques, faune sauvage et aquatique), Jérôme Moreau (Professeur, Université de Bourgogne) et Sébastien Ravon (Vétérinaire référent du CEBC). Cela a permis de mettre en évidence les types cellulaires retrouvés chez les tortues et attendus dans nos observations et de réaliser un guide d'identification à partir des illustrations de la bibliographie (Annexe 1). Ce guide a permis de se familiariser avec les types cellulaires présents sur nos lames.

La revue de la littérature a permis d'identifier des variations dans la nomenclature en hématologie des reptiles d'un auteur à l'autre. Les ouvrages utilisés pour la réalisation de ce protocole sont les suivants : Çiçek et al., 2015; Claver & Quaglia, 2009; Maceda-Veiga et al., 2015; Metin et al., 2006; Oliveira-Júnior et al., 2009; Perpiñán, 2017; Perpiñán & Sánchez, 2009. Plusieurs types cellulaires présents chez la Cistude d'Europe ou chez d'autres espèces de tortues d'eau douce ont été référencés (érythrocytes (globules rouges), lymphocytes, hétérophiles, monocytes, basophiles, éosinophiles, thrombocytes). Les monocytes sont des cellules phagocytaires impliquées dans des mécanismes de défense contre les infections et les bactéries. Chez les reptiles, les leucocytes sont séparés en deux grandes categories (Campbell et al., 2022): les granulocytes et les leucocytes mononucléaires (lymphocytes et monocytes). Les granulocytes sont ensuite divisés en acidophiles et basophiles. Certains auteurs subdivisent les acidophiles en trois catégories : éosinophiles, neutrophiles et azurophiles. D'autres ne rapportent pas l'existence des azurophiles et distinguent seulement les éosinophiles des hétérophiles. C'est cette subdivision qui est la plus admise et est celle que nous utilisons.

Le guide d'identification à partir de la bibliographie (Annexe 1) a été adapté avec des images des cellules de nos lames (Annexe 2). Les observations sont réalisées à l'aide d'un microscope équipée d'une caméra Axiocam 105 color (adaptateur P95-C ½" 0.5x) reliée à un ordinateur. Les cellules identifiées sont présentées dans les protocoles avec des images prises à l'aide de la caméra reliée au microscope et du logiciel ZEISS ZEN core v3.1.

2.4.3. Protocole d'analyse de la formulation sanguine par comptage cellulaire

Enfin, un protocole standardisé d'analyse de la formulation sanguine a été mis en place afin de recueillir des données exploitables sur nos frottis sanguins et de comparer les formulations sanguines entre individus. Ce protocole a pu être mis en place et réalisé après validation des protocoles de coloration et d'identification. La technique de comptage des cellules sanguines a été définie en s'appuyant sur les techniques classiques d'analyse de la formulation sanguine à partir de frottis (Ots et al., 1998; Polo-Cavia et al., 2013). La lame est d'abord observée au grossissement x10 afin d'identifier les zones où l'observation peut être réalisée (bonne densité de cellules). L'observation est ensuite réalisée avec l'objectif à immersion (grossissement x100) afin de faciliter l'identification des cellules. En application, il est parfois difficile de distinguer les types cellulaires lorsqu'ils sont petits (difficulté à discerner le cytoplasme du noyau foncé). Les cellules apparaissent alors comme de petites cellules rondes et violet foncé à noir. Elles pourraient appartenir à plusieurs catégories : petits lymphocyte, thrombocyte, basophile, éosinophile. Pour pallier ce problème dans l'identification, ces cellules sont comptabilisées dans la catégorie "Cellules non identifiées".

Plusieurs données sont récoltées :

- Le nombre total de leucocytes, de thrombocytes et de cellules non-identifiées pour 4000 érythrocytes : ces types cellulaires sont dénombrés sur 60 champs de microscope de densité en érythrocytes constante (66 érythrocytes par champ environ).

- Formule leucocytaire : en parallèle, les types cellulaires des 100 premiers leucocytes observés sont identifiés afin d'obtenir un pourcentage relatif de chaque type de leucocytes (lymphocytes, hétérophiles, monocytes, basophiles et éosinophiles).

Les lames sont analysées de manière aléatoire entre populations pour éviter un biais.

2.5. Analyses statistiques

Les données sont traitées grâce au logiciel R (R Core Team, 2022) sur interface RStudio (v2023.6.0.421). Les graphiques et tableaux ont été réalisés grâce aux logiciels R Studio, à l'aide de la fonction ggplot du package ggplot2 (Hadley Wickham, 2016) et Excel. Afin d'explorer les relations

entre les différentes paires de variables et d'identifier les corrélations, la fonction ggpairs du package GGally (Schloerke et al., 2021) a été utilisée.

Les données de dénombrement des marqueurs ont été traitées grâce à des modèles linéaires. Les marqueurs choisis pour les analyses sont le nombre total de leucocytes, le ratio H/L et le nombre d'éosinophiles car ce sont les marqueurs les plus intéressants dans le cas de l'analyse du stress physiologique d'après la bibliographie faite dans la partie 2.4. Bien que les données soient sous forme de comptage, leur distribution est normale, d'où le choix du modèle linéaire. L'ajustement de la distribution normale aux données a été vérifié en utilisant le package fitdistrplus (Delignette-Muller & Dutang, 2015) et la fonction fitdist. Une transformation logarithmique de chaque variable a permis de mieux ajuster les données.

Deux analyses ont été réalisées :

1) La première correspond au test de l'hypothèse 1 ("la formulation sanguine des individus varie selon leur population, leur sexe et leur poids"). Elle est réalisée sur les données de l'ensemble des 9 populations et permet de tester les effets de la population (variable factorielle à 9 niveaux), du sexe (deux niveaux) et de la masse (variable quantitative continue) et des interactions entre ces variables sur les variations des marqueurs sanguins (variables quantitatives continues). Nous avons examiné les interactions entre le sexe et la population car le dimorphisme peut dépendre du contexte environnemental. Nous avons examiné l'interaction entre masse et population afin de tester des variations de relations allométriques entre les populations. Trois modèles ont été testés pour cette hypothèse. Pour chaque marqueur sanguin d'intérêt, le modèle linéaire défini est le suivant :

$$log(marqueur) \sim Population + Sexe + Masse + Population{:}Sexe + Population{:}Masse$$

Pour chaque modèle, les variables non significatives (qui n'expliquent pas la variance dans les données) sont retirées progressivement du modèle global jusqu'à ce qu'il ne reste que des variables significatives (choix de modèle par sélection de variables). Les modèles sont testés à l'aide de la fonction Anova du package car (John Fox and Sanfor Weisberg, 2019). Afin de visualiser les différences entre les niveaux de chaque variable explicative, la fonction glht du package multcomp (Hothorn et al., 2008) est utilisée (tests de comparaison entre les niveaux de facteur) puis la fonction summary.

2) La deuxième correspond au test de l'hypothèse 2 ("la formulation sanguine varie selon la contamination en pesticides"). Elle est réalisée sur les données des 5 populations de Camargue pour lesquelles les données de détection et de quantification des résidus de pesticides

plasmatiques sont disponibles (99 individus des populations BEL, ESQ, DRA, FAI, GBA, Tableau 1). Elle permet d'examiner les liens entre niveaux de contamination aux pesticides et variation des marqueurs sanguins. L'exposition aux pesticides est caractérisée par la somme des concentrations en résidus de pesticides plasmatiques (variable quantitative continue), par l'occurrence des pesticides (variable factorielle de 0 lorsqu'aucun pesticide n'est détecté et de 1 lorsqu'au moins un pesticide est détecté) et par le nombre de pesticides détectés (variable factorielle). La population, le sexe ainsi que la masse des individus sont gardés en covariables. L'étude des différences de contamination des individus en fonction des populations et du sexe a été faite dans le cadre d'un stage de Master 2 au sein de l'UMR METIS et sous la supervision de Aurélie Goutte (Maître de conférence, Sorbonne Université) (Charriot et al,. 2023). Ces résultats seront repris pour nos interprétations. Pour chaque marqueur d'intérêt, les trois modèles suivants ont été définis avec les trois variables explicatives caractérisant l'exposition aux pesticides :

$$\log(marqueur) \sim Population + Sexe + Masse + Somme\ des\ concentrations\ en\ résidus\ de\ pesticides$$

$$log(marqueur) \sim Population + Sexe + Masse + Occurence\ en\ pesticides$$

$$log(marqueur) \sim Population + Sexe + Masse + Nombre\ de\ pesticides\ détectés$$

2.6. Déclaration d'éthique

Le projet a fait l'objet d'une autorisation ministérielle permettant d'utiliser des animaux à des fins scientifiques (expérimentation animale) accordée par la Direction générale de la recherche et de l'innovation et après avis favorable d'un comité d'éthique (référence projet : APAFIS#36720-2022041516082432 v6). Les captures ont été possibles grâce à des dérogations préfectorales permettant la capture d'une espèce protégée dans les Bouches du Rhônes, en Nouvelle Aquitaine et en Brenne.

3. Résultats

3.1. Analyses exploratoires sur les comptages des types cellulaires

La représentation des relations entre nos variables (Figure 5) suggère une relation exponentielle négative du nombre total de leucocytes avec le ratio H/L et une relation linéaire négative avec le nombre d'éosinophiles. La ratio H/L est corrélé positivement au nombre d'éosinophiles.

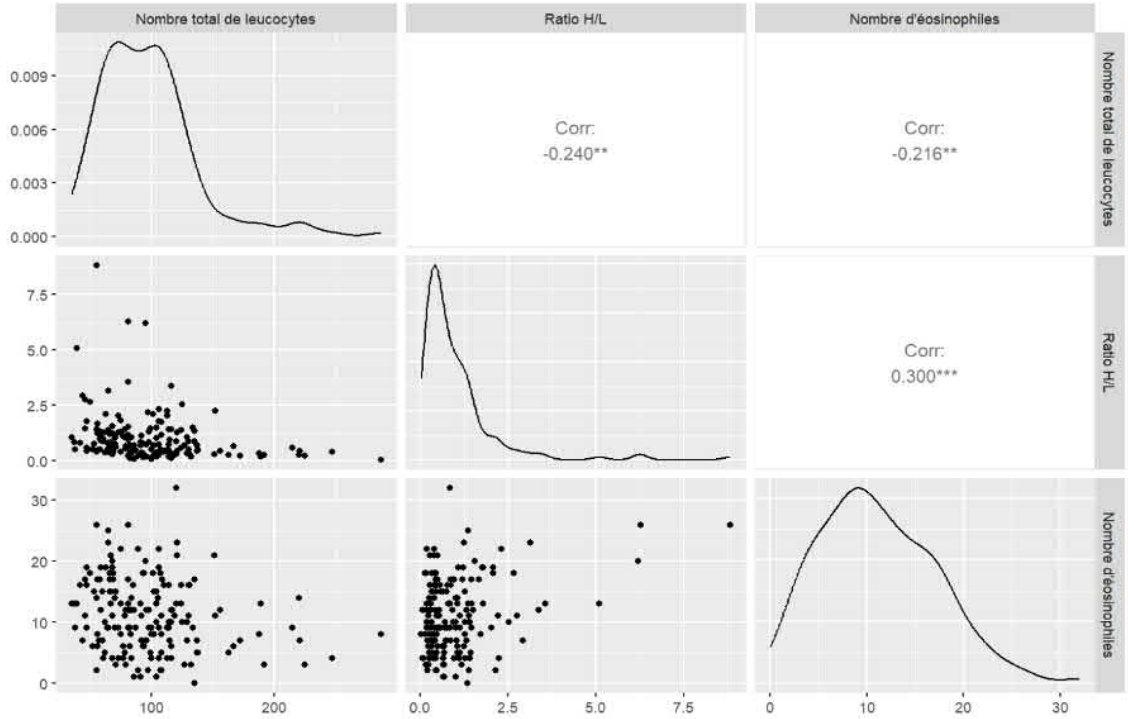


Figure 5. Graphiques de corrélation entre les trois marqueurs d'intérêt. Les individus sont représentés par des points. Le coefficient "Corr" correspond au coefficient de corrélation entre les variables. Une valeur proche de 1 suggère une corrélation linéaire positive entre les deux variables. Une valeur proche de -1 suggère une corrélation linéaire négative. Une valeur proche de 0 indique une faible corrélation ou l'absence de corrélation linéaire.

3.2. Analyses des effets des variables explicatives sur la formulation sanguine

3.2.1. Effet du sexe, de la population et de la masse sur la formulation sanguine

Le choix de modèle par sélection de variables a permis de simplifier les modèles décrits précédemment. Les facteurs d'interaction entre la population et le sexe et entre la population et la masse ne sont pas conservés. Les variables explicatives conservées par choix de modèle sont présentées dans le tableau 2 pour chaque marqueur sanguin, ainsi que la valeur F, le degré de liberté et la valeur P associés.

Tableau 2. Résultats de l'ANOVA des modèles linéaires finaux (N=175) permettant de tester l'effet de la population, du sexe et de la masse sur les marqueurs sanguins d'intérêt (nombre total de leucocytes, ratio H/L, nombre d'éosinophiles). "df" est le degré de liberté.

	Nombre total de leucocytes			**Ratio H/L**			**Nombre d'éosinophiles**		
	F-stat	df	p	F-stat	df	p	F-stat	df	p
Population	7.087	8	**<0.001**	9.087	8	**<0.001**	5.834	8	**<0.001**
Sexe	18.005	1	**<0.001**	-	-	-	-	-	-
Masse	17.144	1	**<0.001**	8.838	1	**0.003**	9.899	1	**0.002**

Le nombre total de leucocytes, le ratio H/L et le nombre d'éosinophiles varient fortement entre les 9 populations suivies ($p < 0.001$ pour les trois modèles) (Tableau 2, Figure 6). Le sexe a également une influence sur le nombre total de leucocytes (les femelles ont en moyenne plus de leucocytes que les mâles, $p < 0.001$) (Figure 7) mais pas sur les deux autres variables (Tableau 2). Le nombre total de leucocytes, le ratio H/L et le nombre d'éosinophiles sont corrélés avec la masse de façon positive pour le ratio H/L ($p = 0.003$, pente de 0.001) et le compte d'éosinophiles ($p = 0.002$, pente de 0.001) et de façon négative pour le nombre total de leucocytes ($p < 0.001$, pente de -0.001) (Figure 8).

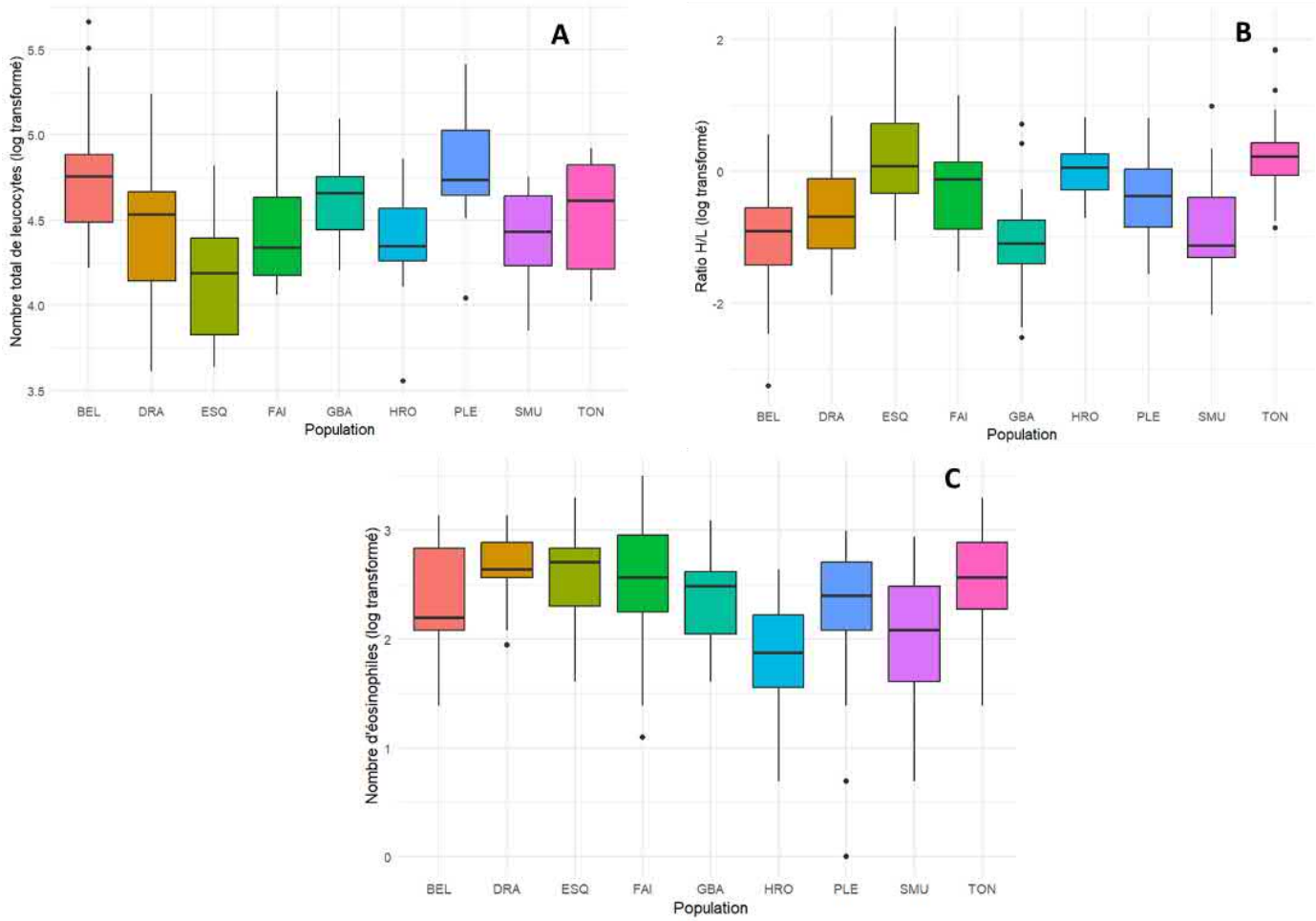


Figure 6. Représentation du compte total de leucocytes (A), du ratio H/L (B) et du compte d'éosinophiles (C) après transformation logarithmique en fonction de la population. Les lignes horizontales représentent les médianes. Les bordures inférieures et supérieures des boîtes délimitent le premier et le troisième quartiles. Les points représentent les valeurs extrêmes.

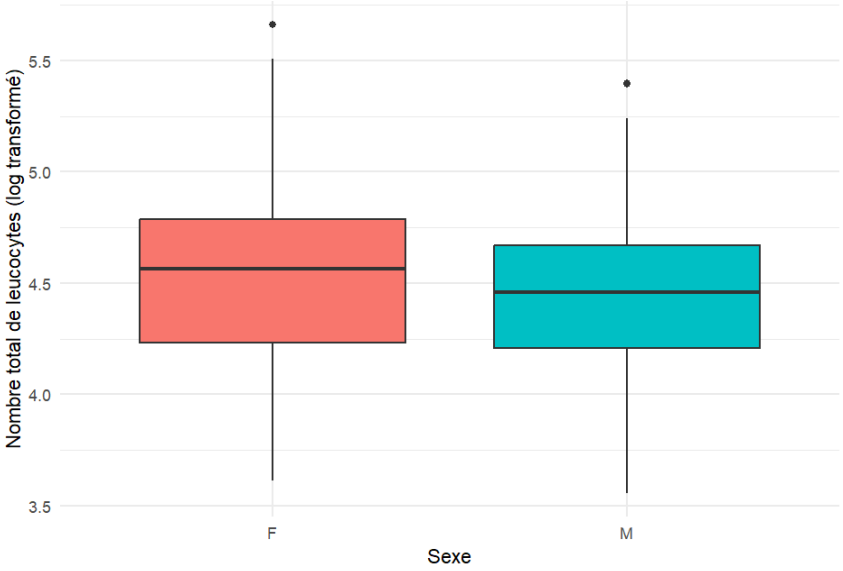


Figure 7. Influence du sexe sur le nombre total de leucocytes après transformation logarithmique, toutes populations confondues. M : mâles ; F : femelles.

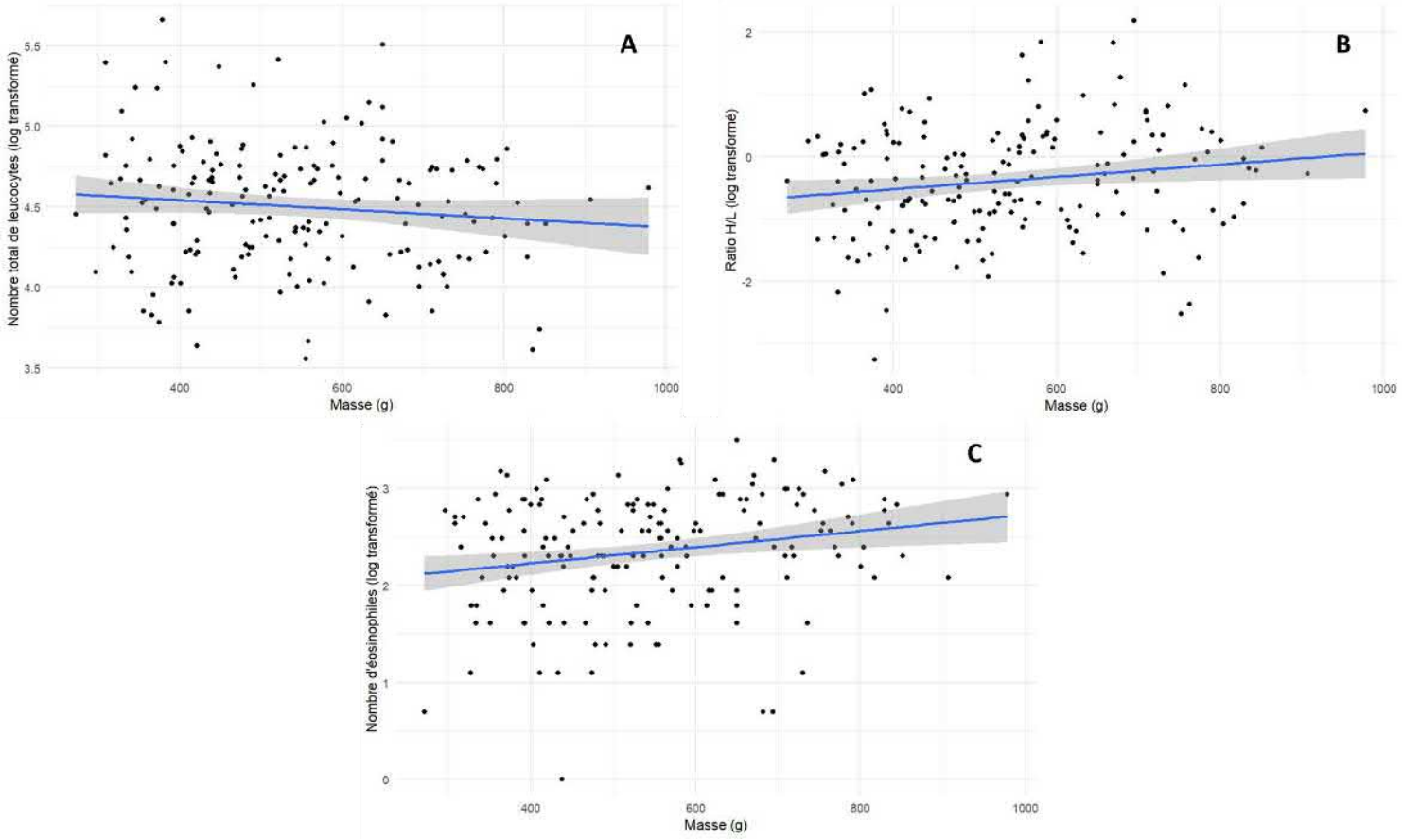


Figure 8. Influence de la masse (en grammes) sur le nombre total de leucocytes (A), sur le ratio H/L (B) et sur le nombre d'éosinophiles (C) après transformation logarithmique. La zone grisée représente l'intervalle de confiance à 95% associé à la droite de régression linéaire.

L'exploration détaillée souligne des différences marquées entre les 9 populations (Figure 6). Les variations observées semblent plutôt liées au site qu'à des différences entre les trois régions. De

fortes variations au sein des populations semblent exister ce qui souligne l'existence de différences entre les individus d'un même site. Le site BEL se démarque des autres sites avec un nombre total de leucocytes plus élevé que les sites DRA, ESQ, FAI, SMU, TON (Figure 6) et un ratio H/L moins élevé que les sites DRA, ESQ, HRO, TON. Ces valeurs élevées sont le témoin d'un stress physiologique. Le site ESQ se démarque aussi avec un nombre total de leucocytes moins élevé que les sites GBA, PLE, FAI et un ratio H/L plus élevé que les sites GBA et SMU. Enfin, le nombre total de leucocytes des individus du site PLE est plus élevé que celui des sites SMU et TON. Le ratio H/L est plus élevé chez les individus de TON que chez les individus des sites SMU et DRA et moins élevé chez GBA que chez HRO et TON. Le nombre d'éosinophiles de HRO est moins élevé que celui de BEL, DRA, ESQ, FAI, TON, GBA, et celui de SMU est moins élevé que chez DRA, ESQ, TON.

3.2.2. Liens avec les données de détection et de quantification des résidus de pesticides dans le plasma des individus des 5 populations de Camargue

Les analyses de détection et quantification des résidus de pesticides dans le plasma des individus réalisées au sein du laboratoire METIS ont montré que sur les 40 pesticides recherchés, 8 ont été détectés et quantifiés chez au moins un individu parmi les 102 examinés (Charriot et al., 2023). Cela concerne la bentazone, herbicide utilisé en riziculture qui montre la fréquence de détection la plus élevée (35,3% des 102 individus de départ), trois autres herbicides (le chlortoluron, le métolachlore et le penoxsulam) ainsi que des fongicides (l'ametoctradin, la carbendazim, la spiroxamine et le tebuconazole). Les 32 composés restants ne sont pas détectés ou en concentrations inférieures aux limites de quantification. Aucun composé n'a été détecté chez 56,9% des individus, tandis que pour 35,3% d'entre eux seul 1 résidu de pesticides est détecté, quel qu'il soit. Le nombre maximal de composés détectés chez un même individu est de 4.

La somme des concentrations en résidus de pesticides plasmatiques varie significativement en fonction des sites (Charriot et al., 2023). Elle est plus élevée chez les individus du site FAI que chez les individus des autres sites. Aucun effet du sexe n'a été observé, à l'exception du site BEL, où les mâles ont une probabilité d'être contaminé plus élévée que les femelles ($p = 0.012$), puisque 10 mâles sur 11 sont contaminés contre 3 femelles sur 10 (Charriot et al., 2023). L'occurrence en pesticides varie elle aussi entre les sites. En considérant la probabilité d'être contaminé par au moins un pesticide, les tortues vivant au niveau de FAI sont plus contaminées (90%) que les cistudes venant de DRA (22,7%), de ESQ (13%) et de GBA (31,3%) (Charriot et al., 2023).

Le nombre total de leucocytes est influencé par le nombre de pesticides détectés ($p = 0.04$) (Tableau 3). Il est moins élevé chez les individus chez qui deux pesticides sont détectés que chez les

individus chez qui aucun pesticide n'est détecté (Figure 9). La somme des concentrations en résidus de pesticides plasmatiques et l'occurrence en pesticides plasmatiques n'expliquent pas la variance dans les marqueurs sanguins d'intérêt ($p > 0.05$).

Tableau 3. Résultats de l'ANOVA des modèles linéaires permettant de tester l'effet du nombre de pesticides sur le nombre total de leucocytes (N = 99). La population, la masse et le sexe sont conservés en covariables.

	F-stat	df	p
Population	7.771	4	**<0.001**
Sexe	16.375	1	**<0.001**
Masse	15.688	1	**<0.001**
Nombre de pesticides	2.888	3	**0.04**

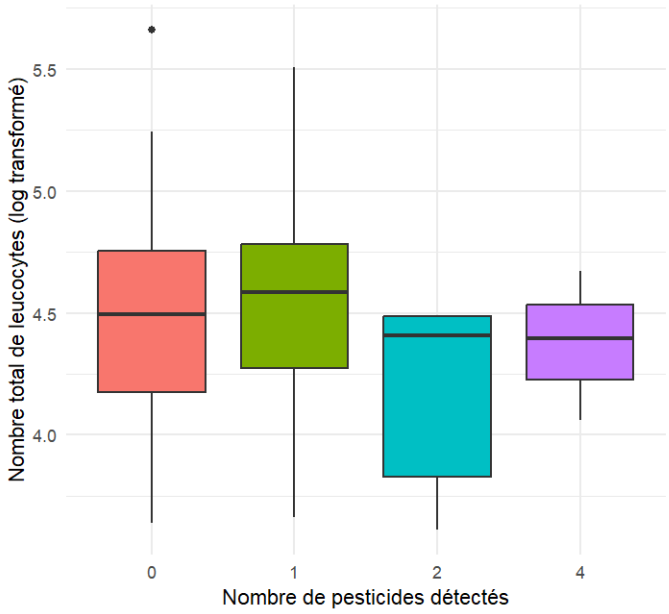


Figure 9. Nombre total de leucocytes (transformation logarithmique) en fonction du nombre de pesticides détectés, avec les 5 populations confondues.

4. Discussion

L'objectif de cette étude était d'étudier les variations de marqueurs sanguins d'intérêt dans l'étude du stress physiologique chez la Cistude d'Europe, une espèce longévive exposée aux contaminants. J'ai tout d'abord mis au point un protocole pour dénombrer le nombre total de leucocytes, le ratio H/L et le compte d'éosinophiles. Dans un second temps j'ai cherché à mettre en relation ces marqueurs avec des paramètres individuels (sexe, population d'origine, masse) et également les niveaux de contamination mesurés chez les individus. Les résultats de cette étude mettent en évidence des variations inter-populationnelles marquées dans la formulation sanguine

des individus et en fonction de certaines caractéristiques individuelles (sexe et masse). Le nombre total de leucocytes augmente avec la masse tandis que le ratio H/L et le compte d'éosinophiles diminuent avec ce paramètre. Pour certains marqueurs comme le nombre total de leucocytes, des variations existent aussi entre les sexes (les femelles ont un nombre de leucocytes plus élevé que les mâles). Dans le cadre de l'hypothèse du handicap de l'immunocompétence, la testostérone des mâles rehausse l'expression des caractères sexuels, mais réduit la fonction immunitaire. De ce fait, seuls les mâles de bonne qualité peuvent exprimer pleinement les caractères sexuels secondaires parce qu'ils sont les seuls à pouvoir tolérer une réduction de l'immunité par la testostérone (Roberts et al., 2009). L'immunité plus faible suggérée chez les mâles par le nombre de leucocytes moins élevé pourrait être attribué à un compromis avec la reproduction et donc des effets inhérents au sexe. Le site de La Bélugue se démarque de plusieurs autres sites avec un nombre total de leucocytes plus élevé et un ratio H/L moins élevé. Ces variations suggèrent un stress physiologique plus important localement ou dans les individus capturés. Le site Esquineau se démarque aussi avec un nombre total de leucocytes moins élevé et par conséquent un ratio H/L plus élevé que certains sites. Ainsi, des paramètres individuels comme le sexe, la population ou la masse influent sur la formulation sanguine des individus.

Il existe des différences de contamination entre les sites étudiés en Camargue, mises en évidence lors des analyses de Mickaël Charriot (Charriot et al., 2023). Le site des Faïsses est associé à un canal de drainage qui collecte les effluents des parcelles avoisinantes. Il est caractérisé par une somme des concentrations en résidus de pesticides et une occurrence en pesticides plus élevées que les sites de La Bélugue, d'Esquineau, du Grand Badon et de la Draille Marseillaise. Les variations des marqueurs sanguins chez les individus des sites de Camargue indiquent que le nombre total de leucocytes est plus faible chez un individu contaminé par au moins deux pesticides que chez un individu non contaminé. Cependant, la somme des concentrations en résidus de pesticides détectés dans le plasma des individus, le nombre de pesticides détectés, ou l'occurrence en pesticides n'expliquent pas les variations dans les autres marqueurs sanguins. Une contamination aux pesticides n'est détectée que chez peu d'individus (35,3% des individus, Charriot et al., 2023). Cette faible fréquence dans un secteur agricole est possiblement liée à la dégradation assez rapide des molécules utilisées. Il serait intéressant d'approfondir l'étude avec une analyse plus complète des contaminants présents dans nos échantillons, en ajoutant par exemple des polluants plus persistants auxquels pourraient être exposés les individus, comme les substances per et polyfluoroalkylées (PFAS), les éléments traces métalliques ou les microplastiques. Par ailleurs, il a été démontré une accumulation différentielle des polluants chez les individus selon le sexe,

notamment pendant la période prénatale (accumulation en plus grande concentration de polluants organiques persistants (POPs) dans le placenta et les tissus foetaux des mâles (Björvang & Mamsen, 2022)). Les mâles et les femelles présentent des différences physiologiques (détoxification possible chez les femelles par transferts fœto-maternels des polluants aux œufs (Beale et al., 2022)) et écologique : on peut supposer une contamination et une bioaccumulation différentes entre mâles et femelles. Des liens ayant été démontrés entre le nombre de leucocytes et le sexe et le nombre de pesticides détectés chez un individu dans notre étude, il serait particulièrement intéressant d'étudier des effets sexe-spécifiques des contaminants.

Comme mentionné précédemment, il a été mis en évidence que plusieurs paramètres comme le sexe, la taille, l'âge, l'habitat, la saison et le régime alimentaire peuvent affecter les paramètres hématologiques chez les tortues (Hernandez et al., 2017; Wood & Ebanks, 1984; Yang et al., 2014). Bien que l'analyse des marqueurs sanguins donne une information précieuse sur l'état de santé des individus, l'interprétation des variations de ces marqueurs reste complexe et il est important de les étudier conjointement à d'autres marqueurs complémentaires afin d'obtenir une image fiable de la réponse immunitaire à un stress environnemental (Maceda-Veiga et al., 2015). Le manque de standardisation (divergences dans la manière dont les données hématologiques sont recueillies et/ou rapportées dans les publications) et de connaissance (notamment sur les données de référence pour de nombreux vertébrés sauvages) constituent des freins à la bonne utilisation de l'hématologie en écotoxicologie (Maceda-Veiga et al., 2015). Des analyses complémentaires comme le dosage des corticostérones permettent d'affiner les interprétations.

Des covariations entre les paramètres hématologiques et d'autres traits comme le phénotype ou le comportement sont possibles (Aigner & Heumann, 2023). Dans l'étude citée précédemment (Moreau et al., 2021), les perdrix exposées chroniquement à des pesticides présentent des concentrations plus faibles en caroténoïdes plasmatiques et donc des ornements à base de caroténoïdes moins développés. Pour plusieurs autres espèces (lézards, oiseaux), il a été mis en évidence que des individus présentant des ornements plus colorés, plus lumineux ou plus saturés ont un meilleur état de santé (meilleure réponse immunitaire, ratio H/L plus faible, meilleur état corporel), mettant en évidence un compromis entre la régulation physiologique du système immunitaire et l'allocation de composés essentiels (comme des caroténoïdes) aux ornements (Polo-Cavia et al., 2013). La prise de photographies sur le terrain permet d'analyser la proportion et l'intensité de la coloration des tortues. Ce travail est en cours au sein de la Tour du Valat, et il sera intéressant d'examiner les liens entre paramètres hématologiques et analyses de la coloration.

Enfin, plusieurs études montrent une infection avérée de cistudes par plusieurs espèces du genre Haemogregarina (hémoprotozoaires, parasites infectant principalement les vertébrés ectothermes). On retrouve notamment l'espèce *Haemogregarina stepanowi* (Attia El Hili et al., 2020; Javanbakht & Sharifi, 2014; Mihalca et al., 2008). Notre analyse a montré que 6 des 17 individus du site Le Plessis et 13 des 20 individus du site des Hautes Rondières étaient infectés par *Haemogregarina stepanowi*. Il existe des liens entre paramètres hématologiques et infection parasitaire ou bactérienne : les éosinophiles jouent un rôle dans les mécanismes de défense contre les parasites, tandis que les monocytes sont impliqués dans les mécanismes de défenses contre les infections et les bactéries (Davis et al., 2008). Examiner les liens entre hématologie des cistudes d'Europe, infection parasitaire et contamination pourrait être une étude complémentaire intéressante, d'autant plus que plusieurs interactions ont été montrées entre l'infection parasitaire et l'exposition à des polluants chimiques chez la faune sauvage (Sures, 2008). L'infection par un parasite est connue pour affecter l'état de santé des hôtes et cet impact est souvent supposé négatif, par consommation des ressources de l'hôte, endommagement de ses tissus ou stimulation des réponses immunitaires. Or, ces nouvelles recherches sur les liens entre parasitologie environnementale et exposition aux polluants chimiques (Sures, 2008) montrent des effets complexes. En affectant la survie des hôtes, les contaminants peuvent affecter indirectement les cycles de vie des parasites et donc leur occurrence et distribution. L'exposition à une contamination peut augmenter le parasitisme chez un hôte si ses mécanismes de défense ou son système immunitaire sont affectés. Dans l'étude citée précédemment sur les perdrix grises (Moreau et al., 2021), la charge parasitaire est plus élevée chez les individus exposés chroniquement à différents pesticides que chez les individus non exposés. Enfin, plusieurs études révèlent une accumulation différentielle des contaminants dans les tissus de l'hôte en fonction de son infection à certains parasites, suggérant un possible rôle de puits de polluants des parasites (Sures & Siddall, 1999). Ainsi, on pourrait s'attendre à un effet de l'exposition aux contaminants sur le parasitisme chez la cistude d'Europe et inversement, mais il est encore difficile d'émettre une hypothèse sur la nature de cet effet (positif, négatif ou complexe).

Références

Abdollahi, M., Ranjbar, A., Shadnia, S., Nikfar, S., & Rezaie, A. (2004). Pesticides and oxidative stress: A review. *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, *10*(6), RA141-147.

Aigner, B., & Heumann, C. (2023). Variability of clinical chemical and hematological parameters, immunological parameters, and behavioral tests in data sets of the Mouse Phenome Database. *PLOS ONE*, *18*(7), e0288209. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0288209

Attia El Hili, R., Achouri, M. S., & Verneau, O. (2020). The genetic diversity of blood parasites within the freshwater turtles Mauremys leprosa and Emys orbicularis in Tunisia reveals coinfection with Haemogregarina spp. *Parasitology Research*, *119*(10), 3315–3326. https://doi.org/10.1007/s00436-020-06821-1

Baillie, J., Hilton-Taylor, C., & Stuart, S. N. (2004). *2004 IUCN Red List of threatened species: A global species assessment*. IUCN. https://portals.iucn.org/library/node/9830

Balian, E. V., Segers, H., Lévèque, C., & Martens, K. (2008). The Freshwater Animal Diversity Assessment: An overview of the results. *Hydrobiologia*, *595*(1), 627–637. https://doi.org/10.1007/s10750-007-9246-3

Beale, D. J., Nilsson, S., Bose, U., Bourne, N., Stockwell, S., Broadbent, J. A., Gonzalez-Astudillo, V., Braun, C., Baddiley, B., Limpus, D., Walsh, T., & Vardy, S. (2022). Bioaccumulation and impact of maternal PFAS offloading on egg biochemistry from wild-caught freshwater turtles (Emydura macquarii macquarii). *Science of The Total Environment*, *817*, 153019. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.153019

Bichet, C., Regis, C., Gilot-Fromont, E., & Cohas, A. (2022). Variations in immune parameters with age in a wild rodent population and links with survival. *Ecology and Evolution*, *12*. https://doi.org/10.1002/ece3.9094

Bilan environnemental de la France—Édition 2021. (n.d.). Données et études statistiques pour le changement climatique, l'énergie, l'environnement, le logement, et les transports. Retrieved 2 August 2023, from https://www.statistiques.developpement-durable.gouv.fr/bilan-environnemental-de-la-france-edition-2021

Björvang, R. D., & Mamsen, L. S. (2022). Sexually Dimorphic Accumulation of Persistent Organic Pollutants in Fetuses. *Frontiers in Toxicology*, *4*. https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/ftox.2022.909307

Blévin, P., Angelier, F., Tartu, S., Ruault, S., Bustamante, P., Herzke, D., Moe, B., Bech, C., Gabrielsen, G. W., Bustnes, J. O., & Chastel, O. (2016). Exposure to oxychlordane is associated with shorter telomeres in arctic breeding kittiwakes. *Science of The Total Environment*, *563–564*, 125–130. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.04.096

Boivin, A., & Poulsen, V. (2017). Environmental risk assessment of pesticides: State of the art and prospective improvement from science. *Environmental Science and Pollution Research*, *24*(8), 6889–6894. https://doi.org/10.1007/s11356-016-8289-2

Brühl, C., & Zaller, J. (2019). Biodiversity Decline as a Consequence of an Inappropriate Environmental Risk Assessment of Pesticides. *Frontiers in Environmental Science*, *7*, 177. https://doi.org/10.3389/fenvs.2019.00177

Burkart, L., Olivier, A., Lourdais, O., Vittecoq, M., Blouin-Demers, G., Alliot, F., Le Gac, C., Martin, N., & Goutte, A. (2021). Determinants of Legacy Persistent Organic Pollutant Levels in the European Pond Turtle (Emys orbicularis) in the Camargue Wetland, France. *Environmental Toxicology and Chemistry*, *40*(8), 2261–2268. https://doi.org/10.1002/etc.5077

Campbell, K. R., & Campbell, T. S. (2002). A logical starting point for developing priorities for lizard and snake ecotoxicology: A review of available data. *Environmental Toxicology and Chemistry*, *21*(5), 894–898. https://doi.org/10.1002/etc.5620210502

Case, B. C., Lewbart, G. A., & Doerr, P. D. (2005). The physiological and behavioural impacts of and preference for an enriched environment in the eastern box turtle (Terrapene carolina carolina). *Applied Animal Behaviour Science*, *92*(4), 353–365. https://doi.org/10.1016/j.applanim.2004.11.011

Charriot M., Merleau L. A., Lourdais O., Olivier A., Vittecoq M., Blanchoud H., Alliot F. & Goutte A. (2023). Exposition aux pesticides de cinq populations de Cistude d'Europe, *Emys orbicularis* en Camargue. 51e congrès du Groupe Français de recherche sur les Pesticides. Paris, 31 mai-2 juin 2023.

Chen, X., Niu, C., & Pu, L. (2007). Effects of stocking density on growth and non-specific immune responses in juvenile soft-shelled turtle, Pelodiscus sinensis. *Aquaculture Research*, *38*(13), 1380–1386. https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2007.01813.x

Çiçek, K., Arikan, H., & Ayaz, D. (2015). Blood cells morphology and erythrocytes count of two freshwater turtles, emys orbicularis and mauremys rivulata, from Turkey. *Ecologia Balkanica*, *7*, 21–27.

Claver, J., & Quaglia, A. (2009). Comparative Morphology, Development, and Function of Blood Cells in Nonmammalian Vertebrates. *Journal of Exotic Pet Medicine*, *18*, 87–97. https://doi.org/10.1053/j.jepm.2009.04.006

Davis, A. K., Maney, D. L., & Maerz, J. C. (2008). The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: A review for ecologists. *Functional Ecology*, *22*(5), 760–772. https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2008.01467.x

Delignette-Muller, M. L., & Dutang, C. (2015). fitdistrplus: An R Package for Fitting Distributions. *Journal of Statistical Software*, *64*, 1–34. https://doi.org/10.18637/jss.v064.i04

Dhabhar, F. S. (2002). A hassle a day may keep the doctor away: Stress and the augmentation of immune function. *Integrative and Comparative Biology*, *42*(3), 556–564. https://doi.org/10.1093/icb/42.3.556

Dudgeon, D., Arthington, A. H., Gessner, M. O., Kawabata, Z.-I., Knowler, D. J., Lévêque, C., Naiman, R. J., Prieur-Richard, A.-H., Soto, D., Stiassny, M. L. J., & Sullivan, C. A. (2006). Freshwater biodiversity: Importance, threats, status and conservation challenges. *Biological Reviews*, *81*(2), 163–182. https://doi.org/10.1017/S1464793105006950

Evaluation and Interpretation of the Peripheral Blood and Bone Marrow of Reptiles. (2022). In *Exotic Animal Hematology and Cytology* (pp. 399–432). John Wiley & Sons, Ltd. https://doi.org/10.1002/9781119660293.ch19

Garcês, A., Pires, I., & Rodrigues, P. (2020). Teratological effects of pesticides in vertebrates: A review. *Journal of Environmental Science and Health. Part. B, Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, *55*(1), 75–89. https://doi.org/10.1080/03601234.2019.1660562

Guillette, L. J. (2000). Organochlorine pesticides as endocrine disruptors in wildlife. *Central European Journal of Public Health*, *8 Suppl*, 34–35.

Hadley, W. (2016). ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. Springer-Verlag New York.

Hernandez, J. D., Castro, P., Saavedra, P., Ramirez, P., & Oros, J. (2017). Seasonal variations in haematological parameters in yellow-bellied slider turtles (Trachemys scripta scripta). *Veterinární Medicína*, *62*(7), 394–400. https://doi.org/10.17221/159/2016-VETMED

Hoang, A. Q., Tu, M. B., Takahashi, S., Kunisue, T., & Tanabe, S. (2021). Snakes as bimonitors of environmental pollution: A review on organic contaminants. *Science of The Total Environment*, *770*, 144672. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144672

Hothorn, T., Bretz, F., & Westfall, P. (2008). Simultaneous inference in general parametric models. *Biometrical Journal. Biometrische Zeitschrift*, *50*(3), 346–363. https://doi.org/10.1002/bimj.200810425

Javanbakht, H., & Sharifi, M. (2014). Prevalence and intensity of Haemogregarina stepanowi (Apicomplexa: Haemogregarinidae) in two species of freshwater turtles (Mauremys caspica and Emys orbicularis) in Iran. *Journal of Entomology and Zoology Studies*.

https://www.semanticscholar.org/paper/Prevalence-and-intensity-of-Haemogregarina-in-two-Javanbakht-Sharifi/df05ccae7ec16228f9380872c5fc1e86a60ca96d

John Fox and Sanfor Weisberg. (n.d.). *An {R} Companion to Applied Regression* (Third) [Computer software].

Lance, V. A., & Elsey, R. M. (1999). Plasma catecholamines and plasma corticosterone following restraint stress in juvenile alligators. *Journal of Experimental Zoology*, *283*(6), 559–565. https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-010X(19990501)283:6<559::AID-JEZ7>3.0.CO;2-4

Le quatrième Plan stratégique de Ramsar 2016-2024 | The Convention on Wetlands, La Convention sur les zones humides. (n.d.). Retrieved 2 August 2023, from https://www.ramsar.org/fr/document/le-quatrieme-plan-strategique-de-ramsar-2016-2024

Leenhardt, S., Mamy, L., Pesce, S., Sanchez, W., Achard, A. L., Amichot, M., Artigas, J., Aviron, S., Barthélémy, C., Beaudouin, R., Bedos, C., Bérard, A., Berny, P., Bertrand, C., Bertrand, C., Betoulle, S., Bureau-Point, È., Charles, S., Chaumot, A., … Tournebize, J. (2022). *Impacts des produits phytopharmaceutiques sur la biodiversité et les services écosystémiques. Synthèse de l'expertise scientifique collective* (p. 136 p.) [Report, INRAE ; IFREMER Institut Francais de Recherche pour l'Exploitation de la Mer]. https://doi.org/10.17180/gfkj-e861

Maceda-Veiga, A., Figuerola, J., Martínez-Silvestre, A., Viscor, G., Ferrari, N., & Pacheco, M. (2015). Inside the Redbox: Applications of haematology in wildlife monitoring and ecosystem health assessment. *Science of The Total Environment*, *514*, 322–332. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.02.004

Malaj, E., Ohe, P. C. V. D., 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *111*(26), Article 26. https://doi.org/10.1073/pnas.1321082111

Merleau, L. A., Lourdais, O., Olivier, A., Vittecoq, M., Blouin-Demers, G., Alliot, F., Burkart, L., Foucault, F., Leray, C., Migne, E., & Goutte, A. (2023). Pesticide levels in a threatened freshwater turtle (Emys orbicularis): seasonal and annual variation in the Camargue wetland, France. For consideration in: Environmental Science and Technology.

Metin, K., Türkozan, O., Kargin, F., Koca, Y., Taskavak, E., Koca, S., & Basimoglu, Y. (2006). Blood Cell Morphology and Plasma Biochemistry of the Captive European Pond Turtle Emys orbicularis. *Acta Veterinaria Brno - ACTA VET BRNO*, *75*. https://doi.org/10.2754/avb200675010049

Mihalca, A. D., Racka, K., Gherman, C., & Ionescu, D. T. (2008). Prevalence and intensity of blood apicomplexan infections in reptiles from Romania. *Parasitology Research*, *102*(5), 1081–1083. https://doi.org/10.1007/s00436-008-0912-9

Mineau, P., & Whiteside, M. (2013). Pesticide acute toxicity is a better correlate of U.S. grassland bird declines than agricultural intensification. *PloS One*, *8*(2), e57457. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057457

Moreau, J., Monceau, K., Crépin, M., Tochon, F. D., Mondet, C., Fraikin, M., Teixeira, M., & Bretagnolle, V. (2021). Feeding partridges with organic or conventional grain triggers cascading effects in life-history traits. *Environmental Pollution*, *278*, 116851. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.116851

Oliveira-Júnior, A. A., Tavares-Dias, M., & Marcon, J. L. (2009). Biochemical and hematological reference ranges for Amazon freshwater turtle, Podocnemis expansa (Reptilia: Pelomedusidae), with morphologic assessment of blood cells. *Research in Veterinary Science*, *86*(1), 146–151. https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2008.05.015

Olivier, A. (2002). *Ecologie, traits d'histoire de vie et conservation d'une population de Cistude d'Europe (Emys orbicularis) en Camargue*.

Olivier, A., Rosecchi, E., Germain, C., & Cheylan, M. (2010). Assessing spatial and temporal population dynamics of cryptic species: An example with the European pond turtle. *Ecological Applications : A Publication of the Ecological Society of America*, *20*, 993–1004. https://doi.org/10.1890/09-0801.1

Ots, I., MurumÄgi, A., & HÕrak, P. (1998). Haematological health state indices of reproducing Great Tits: Methodology and sources of natural variation. *Functional Ecology*, *12*(4), 700–707. https://doi.org/10.1046/j.1365-2435.1998.00219.x

Perpiñán, D. (2017). Chelonian haematology 2. Identification of blood cells. *In Practice*, *39*(6), 274–283. https://doi.org/10.1136/inp.j2361

Perpiñán, D., & Sánchez, C. (2009). Morphologic and Cytochemical Characteristics of Blood Cells from the European Pond Turtle (Emys orbicularis) and the Mediterranean Pond Turtle (Mauremys leprosa). *Journal of Herpetological Medicine and Surgery*, *19*, 119–127. https://doi.org/10.5818/1529-9651-19.4.119

Perrault, J. R., Stacy, N. I., Lehner, A. F., Poor, S. K., Buchweitz, J. P., & Walsh, C. J. (2017). Toxic elements and associations with hematology, plasma biochemistry, and protein electrophoresis in nesting loggerhead sea turtles (Caretta caretta) from Casey Key, Florida. *Environmental Pollution*, *231*, 1398–1411. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.09.001

Polo-Cavia, N., López, P., & Martín, J. (2013). Head coloration reflects health state in the red-eared slider Trachemys scripta elegans. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, *67*(1), 153–162. https://doi.org/10.1007/s00265-012-1435-z

R Core Team (2022). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL https://www.R-project.org/.

Reid, A. J., Carlson, A. K., Creed, I. F., Eliason, E. J., Gell, P. A., Johnson, P. T. J., Kidd, K. A., MacCormack, T. J., Olden, J. D., Ormerod, S. J., Smol, J. P., Taylor, W. W., Tockner, K., Vermaire, J. C., Dudgeon, D., & Cooke, S. J. (2019). Emerging threats and persistent conservation challenges for freshwater biodiversity. *Biological Reviews*, *94*(3), 849–873. https://doi.org/10.1111/brv.12480

Rigal, S., Dakos, V., Alonso, H., Auniņš, A., Benkő, Z., Brotons, L., Chodkiewicz, T., Chylarecki, P., de Carli, E., del Moral, J. C., Domşa, C., Escandell, V., Fontaine, B., Foppen, R., Gregory, R., Harris, S., Herrando, S., Husby, M., Ieronymidou, C., … Devictor, V. (2023). Farmland practices are driving bird population decline across Europe. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *120*(21), e2216573120. https://doi.org/10.1073/pnas.2216573120

Roberts, M. L., Buchanan, K. L., Evans, M. R., Marin, R. H., & Satterlee, D. G. (2009). The effects of testosterone on immune function in quail selected for divergent plasma corticosterone response. *The Journal of Experimental Biology*, *212*(19), 3125–3131. https://doi.org/10.1242/jeb.030726

Schloerke, B., Cook, D., Larmarange, J., Briatte, F., Marbach, M., Thoen, E., Elberg, A., Toomet, O., Crowley, J., Hofmann, H., & Wickham, H. (2021). *GGally: Extension to 'ggplot2'* (2.1.2) [Computer software]. https://cran.r-project.org/web/packages/GGally/index.html

Soltanian, S. (2016). Effect of atrazine on immunocompetence of red-eared slider turtle(Trachemys scripta). *Journal of Immunotoxicology*, *13*, 1–6. https://doi.org/10.1080/1547691X.2016.1195463

Sures, B. (2008). Environmental Parasitology. Interactions between parasites and pollutants in the aquatic environment. *Parasite*, *15*(3), Article 3. https://doi.org/10.1051/parasite/2008153434

Sures, B., & Siddall, R. (1999). Pomphorhynchus laevis: The Intestinal Acanthocephalan as a Lead Sink for its Fish Host, Chub (Leuciscus cephalus). *Experimental Parasitology*, *93*(2), 66–72. https://doi.org/10.1006/expr.1999.4437

Tauer, A., Liles, M., Chavarría, S., Valle, M., Amaya, S., Quijada, G., Meléndez, O., Rodríguez, S., Lock, E., Henríquez, A., Gaos, A., & Seminoff, J. (2017). *Hematology, biochemistry, and toxicology of wild hawksbill turtles (Eretmochelys imbricata) nesting in mangrove estuaries in the eastern Pacific Ocean*. https://doi.org/10.1101/238956

Topping, C. J., Aldrich, A., & Berny, P. (2020). Overhaul environmental risk assessment for pesticides. *Science*, *367*(6476), 360–363. https://doi.org/10.1126/science.aay1144

Walker, C. H. (2003). Neurotoxic Pesticides and Behavioural Effects Upon Birds. *Ecotoxicology*, *12*(1), 307–316. https://doi.org/10.1023/A:1022523331343

Wingfield, J. C., & Romero, L. M. (2011). Adrenocortical Responses to Stress and Their Modulation in Free-Living Vertebrates. In *Comprehensive Physiology* (pp. 211–234). John Wiley & Sons, Ltd. https://doi.org/10.1002/cphy.cp070411

Wood, F. E., & Ebanks, G. K. (1984). Blood Cytology and Hematology of the Green Sea Turtle, Chelonia mydas. *Herpetologica*, *40*(3), 331–336.

Yang, P.-Y., Yu, P.-H., Wu, S.-H., & Chie, C.-H. (2014). Seasonal hematology and plasma biochemistry reference range values of the yellow-marginated box turtle (Cuora flavomarginata). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine: Official Publication of the American Association of Zoo Veterinarians*, *45*(2), 278–286. https://doi.org/10.1638/2013-0125R1.1

Zhang, X., Lin, S., Funk, W. E., & Hou, L. (2013). Environmental and occupational exposure to chemicals and telomere length in human studies. *Occupational and Environmental Medicine*, *70*(10), 743–749. https://doi.org/10.1136/oemed-2012-101350

Résumé

Les zones humides, espaces sensibles et réservoirs de biodiversité, sont contaminées par des polluants d'origine variée. Les effets des contaminants sur la biodiversité restent encore peu ou mal connus et notamment les effets sublétaux sur la physiologie. Une meilleure évaluation de ces effets est primordiale et requiert l'utilisation de biomarqueurs pertinents à différentes échelles biologiques. L'objectif de cette étude est d'étudier les liens entre l'exposition aux pesticides et des marqueurs physiologiques sanguins chez 9 populations de Cistude d'Europe (*Emys orbicularis*), des départements des Bouches-du-Rhône, Gironde et Indre. La Cistude d'Europe est une espèce ectotherme longévive d'eau douce potentiellement indicatrice de la contamination des zones humides. Plusieurs marqueurs sont étudiés : le nombre total de leucocytes et la formule leucocytaire (nombre d'éosinophiles et ratio hétérophiles/lymphocytes). Les variations de ces marqueurs ont été examinées entre les 9 populations, entre les sexes et en fonction de la masse. Nous avons pu mettre en évidence un effet significatif de ces différents paramètres, notamment un dimorphisme entre mâles et femelles. Dans un second temps, les liens avec la contamination en pesticides dans le plasma des individus ont été étudiés pour 5 des 9 populations. Les variations des marqueurs ne sont pas expliquées par la contamination des individus, à l'exception du compte total de leucocytes, plus faible chez un individus contaminé par au moins deux pesticides que chez un individu non contaminé.

Summary

While wetlands are sensitive areas and biodiversity reservoirs, they are contaminated by pollutants of various origins. Yet, little is known about the effects of contaminants on biodiversity, particularly the sublethal effects on physiology. A better assessment of these effects is essential and requires the use of relevant biomarkers at different biological scales. The aim of this study is to investigate the links between pesticide exposure and blood physiological markers in 9 populations of the European pond turtle (*Emys orbicularis*) in the Bouches-du-Rhône, Gironde and Indre départements. The European pond turtle is a freshwater long-lived ectotherm and a potential indicator of wetland contamination. Several markers were studied: the total number of leukocytes and the leukocyte formula (number of eosinophils and heterophil/lymphocyte ratio). Variations in these markers were examined between the 9 populations, between the sexes and as a function of mass. We were able to demonstrate a significant effect of these different parameters, in particular a dimorphism between males and females. Secondly, the links with pesticide contamination in the plasma of individuals were studied for 5 of the 9 populations. Variations in markers were not explained by individual contamination, with the exception of the total leucocyte count, which was lower in an individual contaminated by at least two pesticides than in an uncontaminated individual.

Annexes

Annexe 1. Guide d'identification des types cellulaires chez les reptiles et tortues sur base de la littérature publiée. En anglais. 38

Annexe 2. Protocole d'identification des types cellulaires chez *Emys orbicularis* à partir d'images de nos lames. En anglais. 44

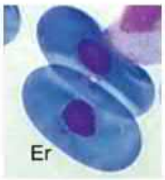
Annexe 1. Guide d'identification des types cellulaires chez les reptiles et tortues sur base de la littérature publiée. En anglais.

Cellular identification of blood smears – Cell types

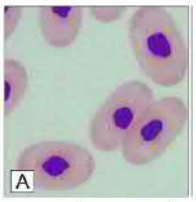
Erythrocytes:



Erythrocyte of turtle (Claver & Quaglia, 2009)



Erythrocyte of *Emys orbicularis* Stained with May-Grunwald-Giemsa (Perpiñán & Sánchez, 2009)



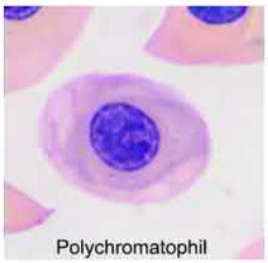
Erythrocyte of *Emys orbicularis* (Çiçek et al., 2015)



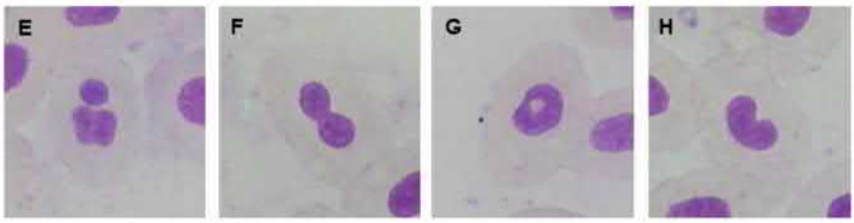
Immature erythrocyte (polychromatophil) (Maceda-Veiga et al., 2015)



Erythrocyte with micronucleus (Maceda-Veiga et al., 2015)



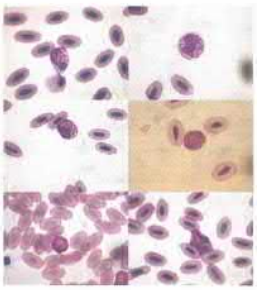
(*Turtle Blood*, n.d.)



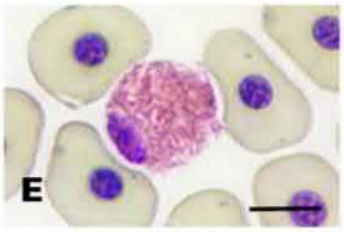
Erythrocyte nuclear abnormalities (lobed (E), segmented (F), vacuolated (G), kidney-shaped nuclei (H)) (Maceda-Veiga et al., 2015)

Leucocytes:

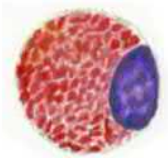
- Heterophils:



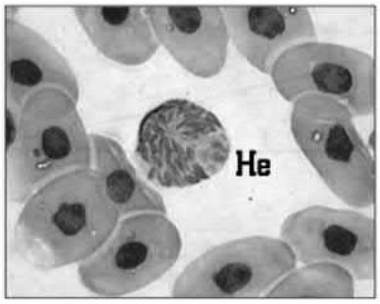
Granulocyte, circular cell, segmented nucleus with 2 lobes, cytoplasm sparsely stained or pale blue with some red or brown granules. The nucleus can be hidden by the granules sometimes. Same size as erythrocytes.



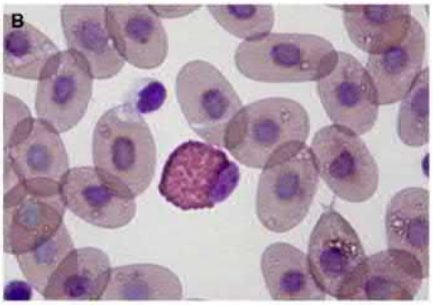
Heterophil of freshwater turtle *Podocnemis expansa*. Stained with May Grünwald–Giemsa–Wrigh (Oliveira-Júnior et al., 2009)



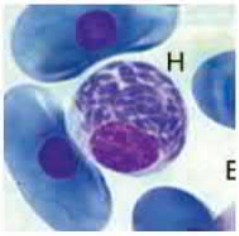
Heterophil of turtle (Claver & Quaglia, 2009)



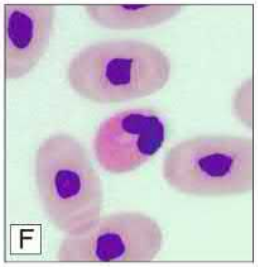
Heterophil of *Emys orbicularis* (Metin et al., 2006)



Heterophil of *Trachemys scripta dorbigny* (Claver & Quaglia, 2009)



Heterophil of *Emys orbicularis.* Stained with May-Grunwald-Giemsa (Perpiñán & Sánchez, 2009)

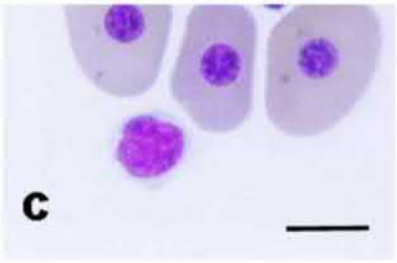


Heterophil of *Emys orbicularis* (Çiçek et al., 2015)

- Lymphocyte:

Round cell, round or oval nucleus occupying the majority of the cell (very important nucleus/cytoplasm ratio), homogeneous pale blue or colorless cytoplasm, dark purple red and dense chromatin. Smaller than erythrocytes.

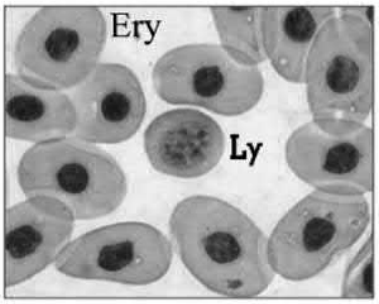




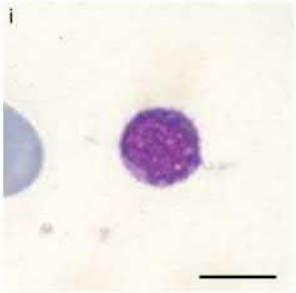
Lymphocyte of freshwater turtle *Podocnemis expansa*. Stained with May Grünwald–Giemsa–Wrigh (Oliveira-Júnior et al., 2009)



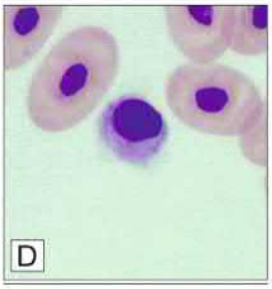
Lymphocyte of reptile (Claver & Quaglia, 2009)



Lymphocyte of the captive European pond turtle *Emys orbicularis* (Metin et al., 2006)



Lymphocyte of *Emys orbicularis.* Stained with May-Grunwald-Giemsa (Perpiñán & Sánchez, 2009)



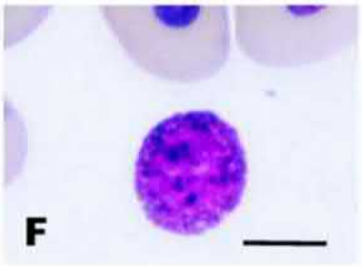
Lymphocyte of *Emys orbicularis* (Çiçek et al., 2015)



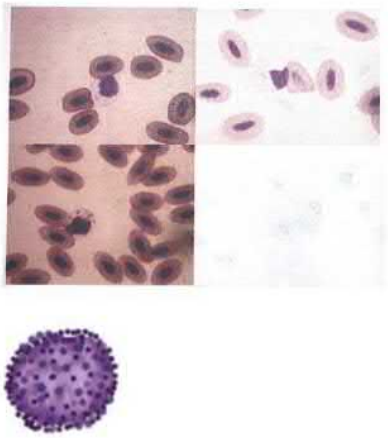
Lymphocyte (*Turtle Blood*, n.d.)

- Basophil:

Round cell, polylobed nucleus poorly visible, covered with voluminous dark purple granulations filling the whole cell. Rare. Smaller than erythrocytes.



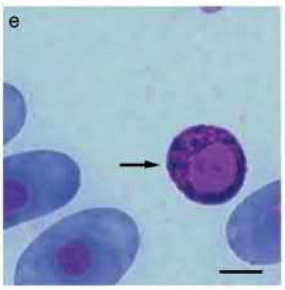
Basophil of freshwater turtle *Podocnemis expansa*. Stained with May Grünwald–Giemsa–Wrigh (Oliveira-Júnior et al., 2009)



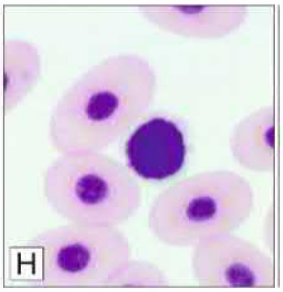
Basophil of reptile (Claver & Quaglia, 2009)



Basophil of the captive European pond turtle *Emys orbicularis* (Metin et al., 2006)



Basophil of *Emys orbicularis*. Stained with May-Grunwald-Giemsa (Perpiñán & Sánchez, 2009)



Basophil of *Mauremys rivulata* (Çiçek et al., 2015)



(*Turtle Blood*, n.d.)

- <u>Eosinophil:</u>



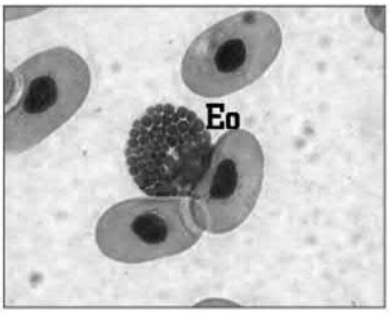
Granulocyte, round cell, pale blue cytoplasm filled with orange granules, polynuclear, visible nucleus often bi-lobed. Smaller than erythrocytes and heterophils.



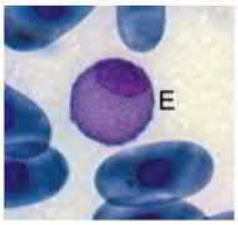
Eosinophil of freshwater turtle *Podocnemis expansa*. Stained with May Grünwald–Giemsa–Wrigh (Oliveira-Júnior et al., 2009)



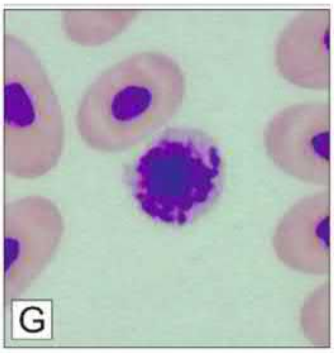
Eosinophil of reptile (Claver & Quaglia, 2009)



Eosinophil of the captive European pond turtle *Emys orbicularis* (Metin et al., 2006)



Eosinophil of *Emys orbicularis*. Stained with May-Grunwald-Giemsa (Perpiñán & Sánchez, 2009)



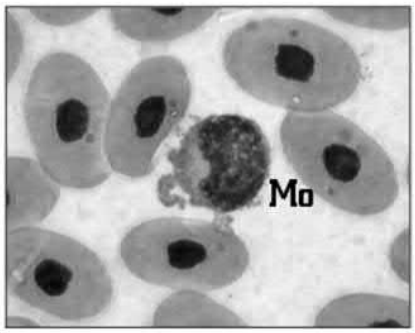
Eosinophil of *Emys orbicularis* (Çiçek et al., 2015)

- Monocyte:

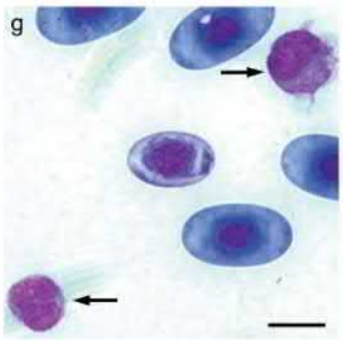
Large cell, nucleus elongated and irregularly contoured but without individualized lobes, bean-shaped. Cytoplasm grey/blue, flaky texture, purplish chromatin. Smaller than erythrocytes unlike bird monocytes.



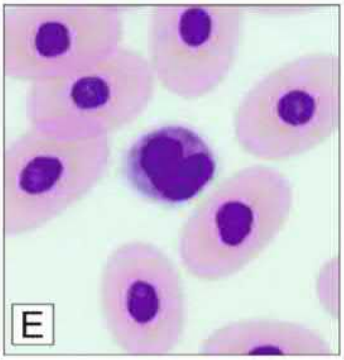
Monocyte of reptile (Claver & Quaglia, 2009)



Monocyte of the captive European pond turtle *Emys orbicularis* (Metin et al., 2006)



Monocytes (arrows) of *Emys orbicularis.* Stained with May-Grunwald-Giemsa (Perpiñán & Sánchez, 2009)

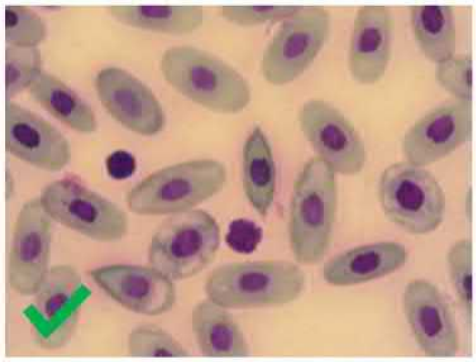


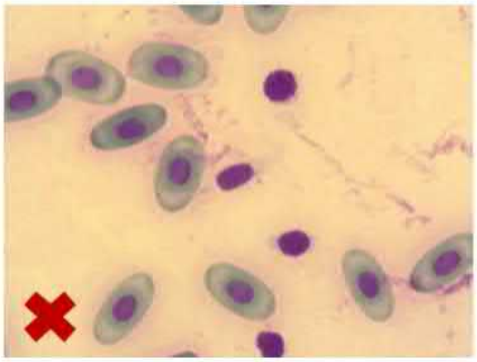
Monocyte in *Mauremys rivulata* (Çiçek et al., 2015)

Annexe 2. Protocole d'identification des types cellulaires chez *Emys orbicularis* à partir d'images de nos lames. En anglais.

Cellular identification of our blood smears – Cell types

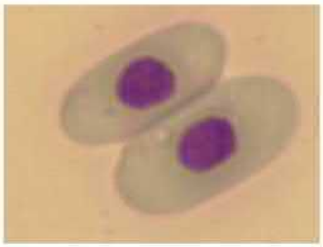
Acceptable erythrocyte density for blood smear analysis:



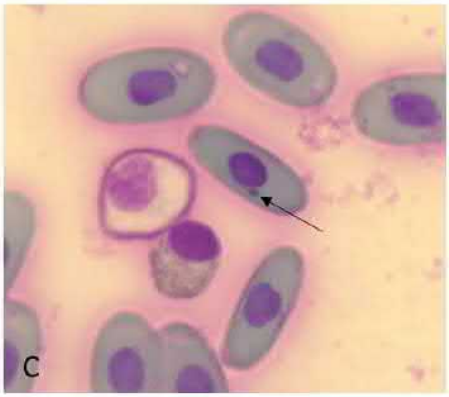


Erythrocytes:

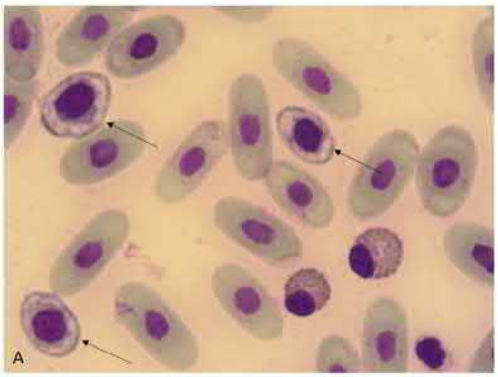
Elliptical cell, centrally-located nucleus, containing heterogeneous chromatin. Most erythrocytes have one or two small intracytoplasmic bodies (degenerated organelles), sometimes replaced with vacuoles. Immature erythrocyte are more round, pale blue cytoplasm



Mature erythrocytes



Intracytoplasmic body



Immature erythrocytes or polychromatophils

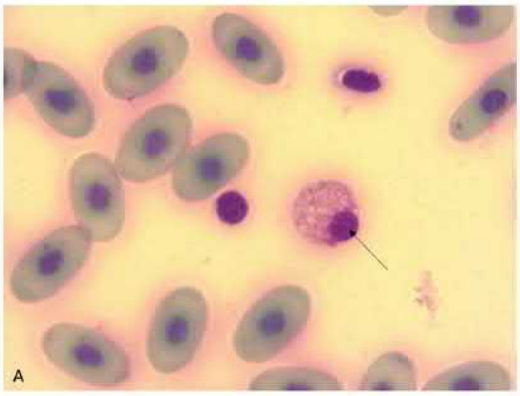
Leucocytes:

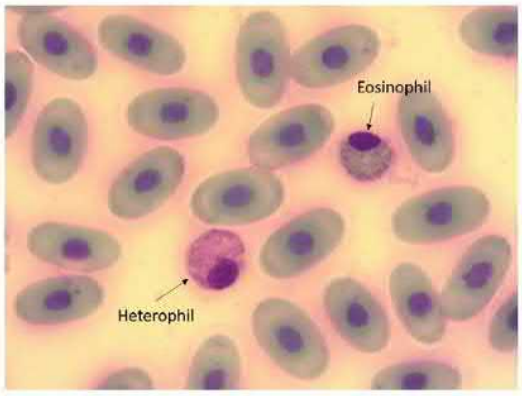
- Heterophils:

Granulocyte, circular cell, visible eccentric nucleus, cytoplasm sparsely stained or pale blue with some red or brown elongated granules. The nucleus can be hidden by the granules sometimes (contrary to eosinophils which have round granules).

Differentiate:

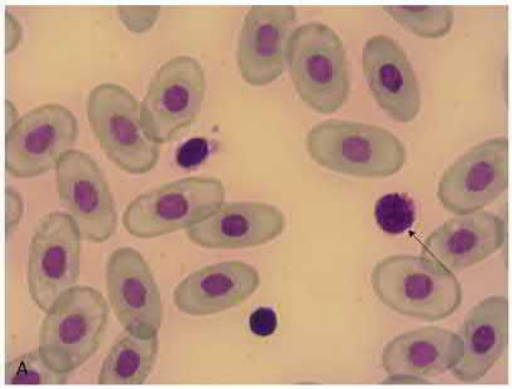
- Young heterophil: non-segmented nucleus
- Old heterophil: lobed nucleus, low in granulations

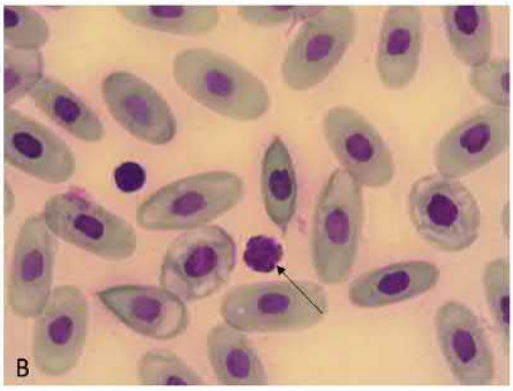




- Basophil:

Round cell, polylobed nucleus poorly visible, covered with voluminous dark purple granulations filling the whole cell and which obscure the membrane of the nucleus. Granulations are cytoplasmic. Smaller than heterophils and eosinophils.





- Lymphocyte:

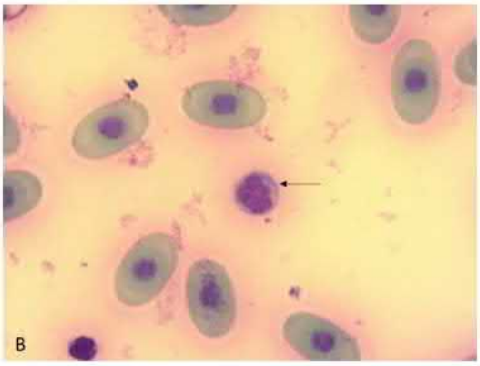
Round cell, round nucleus occupying the majority of the cell (very important nucleus/cytoplasm ratio), homogeneous pale blue cytoplasm, dark purple red and dense chromatin.

Differentiate:

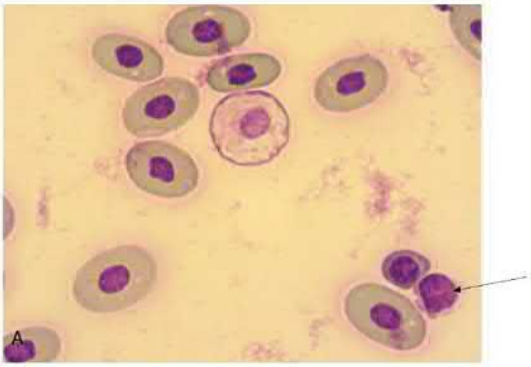
- Large lymphocyte : decondensed nucleus
- Small lymphocyte : condensed nucleus, smaller, less cytoplasm. Can be mistaken for a thrombocyte but the cytoplasm is blue contrary to thrombocytes which have transparent cytoplasm)

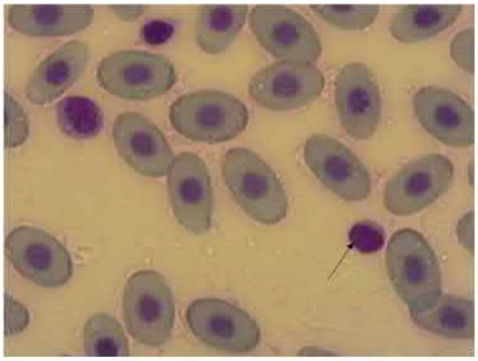
Differentiating lymphocyte and :

- Small monocyte: lymphocyte's cytoplasm darker than monocyte's
- Smudge cell (bare nucleus): check presence of cytoplasm for lymphocytes
- Thrombocyte : lymphocyte nucleus is usually round, thrombocytes nucleus can be irregular. Lymphocyte nucleus usually has clumps of condensed chromatin.





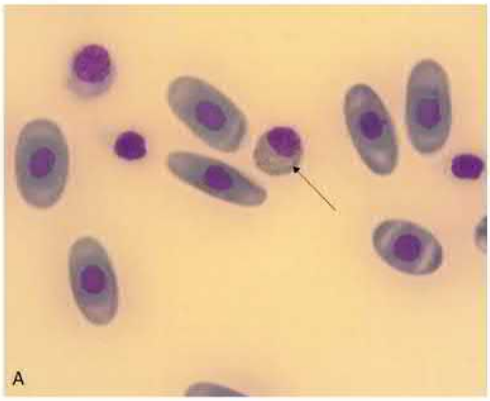


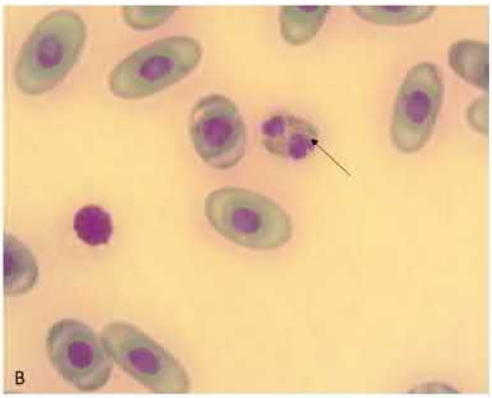


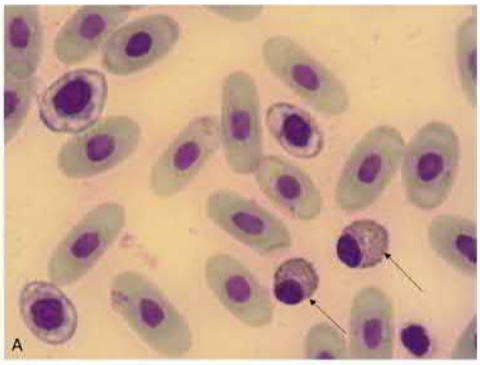
- Eosinophil:

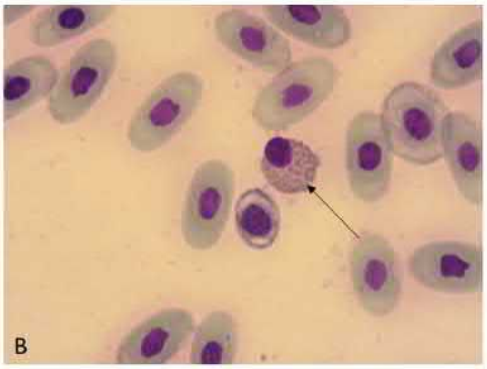
Granulocyte, round cell, pale blue cytoplasm filled with round granulations, visible nucleus often bi-lobed.

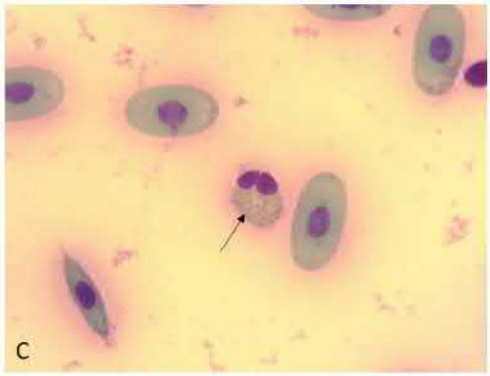
Differentiate young and old (bi-lobed) erythrocytes.







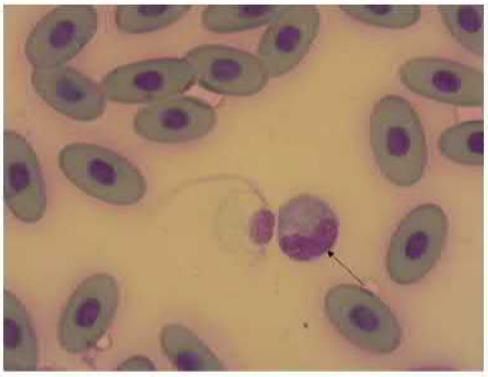




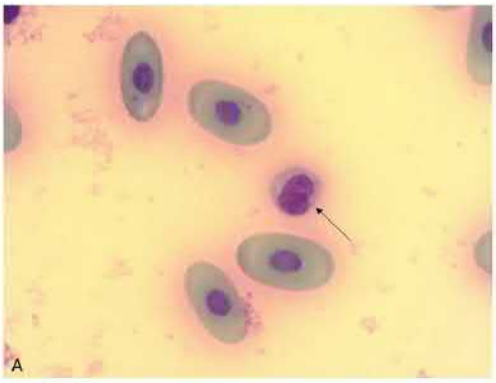
- Monocyte:

Large cell, nucleus elongated and irregularly contoured but without individualised lobes, bean-shaped. Cytoplasm grey/blue, flaky texture, purplish chromatin. Lower nucleus/cytoplasm ratio than lymphocytes.

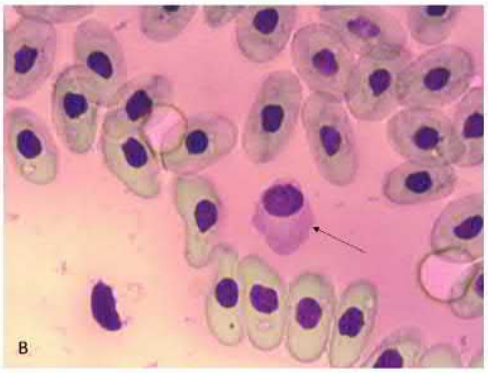
Differentiate large monocytes and small monocytes.

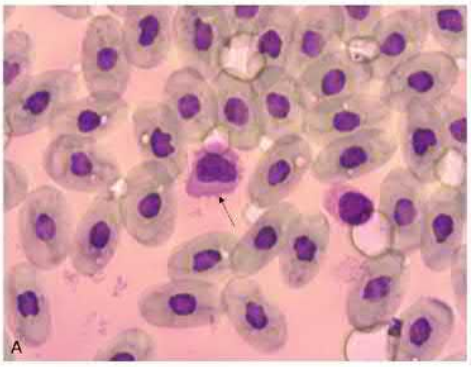


Large monocyte



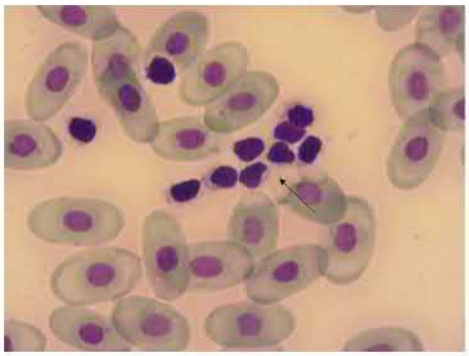
Small monocyte

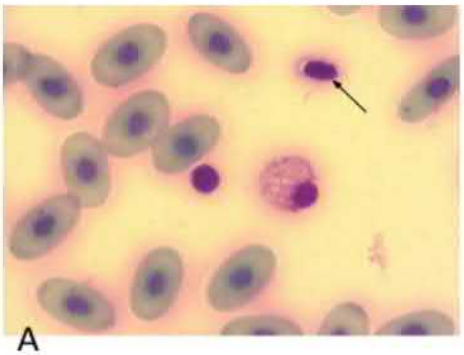




- Thrombocyte:

Small elliptical to round cell, dense and dark, often in clusters. Transparent cytoplasm. Morphology is highly variable both among and within individuals. Small thrombocytes may have lost most of their cytoplasm, making the differentiation between small thrombocytes and small lymphocytes very difficult and subjective. Characteristic indentation of the nucleus. The chromatin tends to be more homogeneous than in lymphocytes. Appreciation of thrombocytic morphology can be obtained by observing them in aggregated clumps.





A

