Modalités de contamination par les polluants organiques persistants des réseaux trophiques lagunaires. Application de la méthode des isotopes stables

Ana Persic

▶ **To cite this version:**

Ana Persic. Modalités de contamination par les polluants organiques persistants des réseaux trophiques lagunaires. Application de la méthode des isotopes stables. Interactions entre organismes. Université Paris Sud - Paris XI, 2004. Français. NNT : . tel-00008851

HAL Id: tel-00008851

https://theses.hal.science/tel-00008851

Submitted on 23 Mar 2005

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

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

N° d'ordre :

UNIVERSITE PARIS XI
UFR SCIENTIFIQUE D'ORSAY

THESE

Présentée pour obtenir

Le Grade de Docteur en Sciences de l'Université Paris XI Orsay

Spécialité : Science de la Vie

Par

Ana Peršić

Sujet : Modalités de contamination par les polluants organiques persistants des réseaux trophiques lagunaires. Application de la méthode des isotopes stables

Soutenance : le 26 Novembre 2004 devant la Commission d'examen :

M. BOGE Gérard, Maître de conférence, Université de Toulon et du Var

M. GIRONDOT Marc, Professeur, Université Paris XI

M. PONT Didier, Directeur de recherche CNRS, Université Claude Bernard

M. RAMADE François, Professeur émérite, Université Paris XI

Mme. ROCHE Hélène, Ingénieur de recherche CNRS, Université Paris XI

Remerciements

Je tiens à remercier les personnes qui, de près ou de loin, ont contribué à la concrétisation de ce travail de thèse de doctorat.

Mes premiers remerciements, et sans doute les plus vifs, sont adressés à ma directrice de thèse, madame Hélène ROCHE, sans qui ces travaux n'auraient pas vu le jour ni ne seraient arrivés à leur terme. Je lui suis reconnaissante pour les qualités scientifiques et pédagogiques de son encadrement et pour sa disponibilité plus que quotidienne dont elle a fait preuve durant les huit mois de mon stage de laurea et ces trois années de thèse. Avec souplesse et ouverture d'esprit, elle a su orienter mes recherches aux bons moments, tout en me laissant une grande liberté de manoeuvre quant au déroulement et à l'organisation de ma propre démarche scientifique. Je salue sa patience, sa gentillesse et ses talents littéraires confirmés dans notre voyage à la «Découverte de la Biologie»! Qu'elle soit assurée de ma plus profonde gratitude.

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance à monsieur François RAMADE, Professeur émérite à l'Université Paris-Sud, dont les compétences scientifiques, les commentaires et les conseils ont contribué à améliorer ce document. Je le remercie également pour m'avoir toujours bien accueilli et pour avoir répondu avec soin à mes nombreuses demandes. Merci d'avoir accepté de faire partie de ce jury.

J'exprime toute ma gratitude à monsieur Didier PONT, directeur de recherche à l'Université Claude Bernard de Lyon, ainsi qu'à monsieur Gérard BOGE, Maître de conférence à l'Université de Toulon et du Var, pour avoir accepté de juger cette thèse et d'en rédiger les rapports.

Je suis très reconnaissante à monsieur Marc GIRONDOT, Professeur à l'Université Paris-Sud d'avoir consenti à examiner ce travail et à participer à ce jury.

Je remercie cordialement monsieur Eric COULET, directeur de la Réserve Nationale de Camargue, pour son accueil chaleureux, ses précieux conseils scientifiques, théoriques et pratiques, de terrain et pour les efforts qu'il a réalisé afin que les campagnes de prélèvement se déroulent dans les meilleures conditions possibles.

Merci également au personnel de la Réserve Nationale de Camargue, en particulier François LESCUYER pour son aide et sa disponibilité à chacune des nos visites en Camargue.

J'exprime toute ma gratitude à Caroline LELARGE, ingénieur d'étude à l'institut de Biotechnologie des Plantes, pour les analyses isotopiques toujours réalisées dans les meilleurs délais.

J'adresse également de sincères remerciements à l'ensemble du personnel du département d'«Ecologie des Populations et Communautés».

Je remercie particulièrement le Professeur Pierre-Henri Gouyon, directeur de l'unité «Ecologie, Systématique et Evolution», ainsi que le Professeur Paul Leadley, directeur du département d' « Ecologie des Populations et Communautés » de m'avoir accueilli au sein de leur établissement.

J'exprime aussi tous mes remerciements à Monique, Nathalie, Martine, Michelle, Chantai, Jean-Louis et Max. Un merci très chaleureux à tous les thésards (Astrid, Anne, Yann, Céline...), aux étudiants de DEA (Yann, Anne-Marie) et aux stagiaires qui ont tous contribué à l'avancement de ces travaux et à la bonne humeur générale.

Un grand merci et muito obrigado à mes « colocataires », Ciro, Abiba, Yann et Damien pour nos discussions scientifiques et autres, leur amitié et sympathie.

Je tiens à remercier sincèrement monsieur Michel DRON, directeur de l'Ecole doctorale « Sciences du végétal, du gène à l'écosystème », pour son soutien. Vous avez, dès nos premières rencontres, montré un grand intérêt pour ce travail et avez eu confiance en mes capacités à le mener à bien.

Je remercie cordialement madame Anne Caillers qui m'a aidé à découvrir d'autres aspects de la thèse.

Enfin merci à Thierry, mon seul ami qui a eu le courage de lire ce manuscrit, grazie à Mauro, Ana & Adrian qui m'ont le plus supporté et

Najvece hvala mami Blanki, tati Mladenu, Natasi, Damiru i Lei, mais eux savent pourquoi.

Cette thèse a été réalisée grâce au soutien financière du Ministère Croate, du Ministère Français et du Service des Relations Internationales de l'Université Paris-Sud. A ce titre, je clos ces remerciements en leur exprimant toute ma reconnaissance.

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE…… 1

CHAPITRE I – LA STRUCTURE DES RESEAUX TROPHIQUES AQUATIQUES DE CAMARGUE Détermination quantitative des niveaux trophiques des espèces dominantes par la méthode des isotopes stables du carbone et de l'azote.

I. 1. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE……..... 5

I.1.1 Flux de matière et d'énergie dans les écosystèmes aquatiques…….....…. 5

I.1.2. Structure des réseaux trophiques aquatiques……...……..…. 7

I.1.3 Effet des réseaux trophiques sur le fonctionnement des écosystème……..…….....… 9

I.1.4 Dynamique temporelle et spatiale des réseaux trophiques aquatiques…….....….. 10

I.1.5 Détermination des niveaux trophiques des organismes aquatiques…….…..….. 11

I. 2. MATERIEL ET METHODES……..……... 15

I.2.1 Site d'étude: la Réserve de Biosphère de Camargue…….…….. 15

I.2.2 Sites de prélèvement: l'étang de Vaccarès et les canaux de drainage……..……..... 17

I.2.3 Matériel biologique……...……. 20

I.2.4 Prélèvements……..... 20

I.2.5 Biométrie des organismes prélevés.……..….. 24

I.2.6 Analyses des isotopes stables.……..... 25

I.2.6.1 Préparation des échantillons…….……..……. 25

I.2.6.2 Détermination du taux d'hydratation des tissus…….……..…… 25

I.2.6.3 Délipidation des échantillons……..……..…….. 25

I.2.6.3a Evaluation de la teneur en lipides totaux...…… 27

I.2.6.3b Dosage des phospholipides et évaluation des lipides neutres…… 27

I.2.6.4 Lyophilisation des échantillons…… 29

I.2.6.5 Pulvérisation des échantillons…….. 29

I.2.6.6 Pesée précise des échantillons en poudre……. 29

I.2.7 Mesure des rapports isotopiques…….. 29

I.2.7.1 Unités de mesure……... 30

I.2.7.2 Précision des mesures……... 30

I.2.8 Détermination du niveau trophique par mesure du $\delta^{15}N$……. 30

I.2.9 Analyse statistique……... 31

I. 3. RESULTATS……..…... 33
I.3.1 Variation de la composition isotopique liée au type de tissu analysé……..... 33
I.3.2 Variation de la composition isotopique liée au site de prélèvement……..…..…… 35
I.3.3 Signatures isotopiques des organismes aquatiques collectés dans l'étang de Vaccarès…..... 35
I.3.3.1 Composition isotopique des espèces……. 35
I.3.3.2 Classification par guildes trophique……. 37
I.3.3.3 Enrichissement isotopique et les niveaux trophiques……... 39
I.3.4 Réseau trophique aquatique de l'étang de Vaccarès…… 41
I.3.5 Evolution des signatures isotopiques des organismes……. 43
I.3.5.1 Variations annuelles...…….. 43
I.3.5.2 Variations saisonnières aux niveaux des espèces et des guildes trophiques…… 43
I.3.6 Signatures isotopiques des organismes collectés dans les canaux de drainage……... 49
I.3.7 Signatures isotopiques et les paramètres biotiques……..…… 49
I.3.8 Signatures isotopiques et les facteurs abiotiques……. 53
I. 4. DISCUSSION…….. 55
I.4.1 Signatures isotopiques…….. 56
I.4.2 L'enrichissement isotopique et les niveaux trophiques……... 58
I.4.3 Réseau trophique…….. 60
I.4.4 Variabilité isotopique – implication du preferendum alimentaire ou limites de la méthode?. 61
I.4.4.1 Variations liées au tissu analysé……... 61
I.4.4.2 Variations liées au site de prélèvement…… 62
I.4.4.3 Les variations liées à la saison de prélèvement…… 63
I.4.5. Influence des facteurs biotiques et des paramètres physiques de l'environnement…… 67

CHAPITRE II - CONTAMINATION PAR DES POLLUANTS ORGANIQUES PERSISTANTS D'ESPECES DOMINANTES DES RESEAUX TROPHIQUES AQUATIQUES DE CAMARGUE Etude des relations entre le niveau trophique déterminé par la méthode des isotopes stables et la contamination par les micropolluants organochlorés

II. 1. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE……... 69
II.1.1 Micropolluants organochlorés – polluants organiques persistants……. 69
II.1.1.1 Pesticides organochlorés……. 70
II.1.1.2 PCBs…… 71
II.1.2 Contamination des écosystèmes aquatiques par les micropolluants organochlorés (OCs) … 75
II.1.3 Bioaccumulation des micropolluants OCs dans les tissus des organismes aquatiques…..… 77

II.1.4 Transfert trophique des micropolluants OCs – évaluation par la méthode isotopique…….. 79
II.1.5 Importance de l'étude de bioamplification dans la surveillance de la qualité des milieux naturels…… 80
II. 2. MATERIEL ET METHODES……. ……. 83
II.2.1 Site d'étude et matériel biologique…… 83
II.2.2 Matériel chimique – les POPs analysés……. 83
II.2.3 Extraction des micropolluants OCs dans les fractions lipidiques……. 83
II.2.3.1 Extraction des substances lipidiques et liposolubles…….. 83
II.2.3.2 Séparation des deux principales phases lipidiques : phospholipides et lipides neutres…… 89
II.2.3.3 Purification des PCBs et des pesticides OCs……. 89
II.2.4 Détermination et quantification des micropolluants OCs par la chromatographie en phase gazeuse…… 90
II.2.5 Evaluation de la relation entre le niveau trophique et le niveau de contamination des organismes – analyse statistique……. 92
II. 3. RESULTATS…… 93
II.3.1 Contamination globale en micropolluants OC…….. 93
II.3.1.1 Pesticides…… 93
II.3.1.2 PCBs……... 95
II.3.2 Variations interspécifiques de l'imprégnation par les OCs……... 96
II.3.2.1 Pesticides……..... 96
II.3.2.2 PCBs……... 96
II.3.3 Classes de contamination…….. 99
II.3.3.1 Pesticides…… 99
II.3.3.2 PCBs……... 101
II.3.4 Influence des guildes trophiques dans l'amplitude de la contamination……... 104
II.3.4.1 Pesticides…… 104
II.3.4.2 PCBs……..…….…. 106
II.3.5 Variations temporelles de la contamination…….. 106
II.3.5.1 Pesticides OCs…… 106
II.3.5.2 PCBs……... 112
II.3.6 Relations entre les paramètres biologiques et la contamination…… 117
II.3.6.1 Pesticides…… 117
II.3.6.2 PCBs……... 119
II.3.7 Mode de contamination par les micropolluants OC……. 119

II.3.7.1 Pesticides…….... 119
II.3.7.2 PCBs……... 123
II.3.8 Contamination par les pesticides OCs des organismes collectés dans les canaux camarguais. 125
II. 4. DISCUSSION…….…... 131
II.4.1 Contamination par les pesticides OCs du réseau trophique de l'étang de Vaccarès…..... 131
II.4.1.1 Bioaccumulation des pesticides OCs dans les maillons du réseau trophique du Vaccarès… 132
II.4.1.2 Différences de bioaccumulation liées aux niveaux trophiques des organismes……. 134
II.4.1.3 Profils des variations temporelles de la bioaccumulation des pesticides OC dans le réseau trophique du Vaccarès……. 135
II.4.1.4 Importance de la niche écologique et de la source de contamination dans la bioaccumulation des pesticides OCs……..... 137
II.4.1.5 Influence des facteurs biologiques…….. 138
II.4.1.6 Transfert des contaminants dans l'écosystème de l'étang de Vaccarès – l'importance relative de la bioconcentration et du transfert trophique……..... 139
II.4.2 Comparaison de la contamination par les pesticides OCs des écosystèmes aquatiques camarguais……. 141
II.4.3 Contamination par les PCBs du réseau trophique de l'étang de Vaccarès……... 143
II.4.3.1 Niveaux de contamination par les PCBs des invertébrés et des poissons de l'étang de Vaccarès…….. 143
II.4.3.2 Modalités de contamination par les PCBs dans l'écosystème de Vaccarès……... 146
II.4.4 Comparaison avec d'autres écosystèmes aquatiques……... 148
II.4.5 Prédiction de la dynamique des contaminants OCs et de ses effets sur la communauté animale du Vaccarès……. 150

CHAPITRE III
ANALYSE DES BIOMARQUEURS (PARAMETRES BIOCHIMIQUES ET BIOMETRIQUES) ***IN SITU*** **– EFFET DE L'EMPLACEMENT TROPHIQUE, DE LA SAISON ET DE LA CONTAMINATION**
III. 1. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE…… 151
III.1.1 Biomarqueurs : définition et rôle dans les études de biosurveillance…….. 151
III.1.2 Paramètres biologiques et biochimiques en tant que biomarqueurs……. 153
III.1.2.1 Biomarqueurs biologiques : les paramètres biométriques et la constitution tissulaire…… 156
III.1.2.2 Biomarqueurs biochimiques : enzymes de biotransformation et de défense antioxydative.. 156
III.1.3 Mollusques bivalves et poissons : organismes bioindicateurs dans les écoystèmes aquatiques. 161

III.1.4 Biomarqueurs et niveaux trophiques…… … 161
III.1.5 Limites des biomarqueurs……... 162
III. 2.MATERIEL ET METHODES…… 165
III.2.1 Site de prélèvement et matériel biologique……..... 165
III.2.2 Biométrie et composition tissulaire……... 165
III.2.3 Analyses biochimiques…….. 165
III.2.3.1 Préparation des échantillons…….. 165
III.2.3.1.1 Préparation des fractions post-mitochondriales……... 166
III.2.1.2 Précipitation de l'hémoglobine……... 166
III.2.2 Dosage des protéines…….. 168
III.2.3 Mesure des activités enzymatiques…… 168
III.2.3.1 Gluthation *S*-transférases……. 168
II.2.3.2 Gluthation peroxydases……. 168
III.2.3.3 Catalase……..... 169
III.2.3.4 Superoxyde dismutases cytosoliques 169
III.2.4 Analyses statistiques……... 170
III. 3. RESULTATS……. 171
III.3.1 Paramètres constitutifs des espèces du Vaccarès…… 171
III.3.1.1 Lipides tissulaires……..…. 171
III.3.1.2 Indices de condition……. 173
III.3.1.3 Indices de condition – biomarqueurs de la contamination par les micropolluants OCs?.. 173
III.3.2 Biomarqueurs enzymatiques……... 175
III.3.2.1 Activités enzymatiques chez les espèces de différents niveaux trophiques du réseau du Vaccarès…… 175
III.3.2.2 Influence de facteurs non toxicologiques sur les activités biochimiques……..……. 175
III.3.3 Réponses biologiques à la contamination par les polluants OC…….. 177
III.3.3.1 Variations des activités enzymatiques-réponses aux variations de la contamination par les micropolluants OCs ?..... 177
III. 4. DISCUSSION ……...…… 181

CONCLUSION GENERALE……..….. 187
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES……..... 191
ANNEXES……... 207

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 Flux d'énergie et de matière dans les écosystèmes naturels

Figure 1.2 Réseau trophique d'un écosystème marin

Figure 1.3 Site d'étude: la Réserve Nationale de Camargue

Figure 1.4 Système hydraulique simplifié du Vaccarès en année pluviométrique moyenne

Figure 1.5 Sites de prélèvement

Figure 1.6 Principe et étapes de la technique CF-IRMS utilisée pour la détermination des signatures isotopiques en carbone et en azote

Figure 1.7 Signatures isotopiques des espèces dominantes du réseau trophique de l'étang de Vaccarès

Figure 1.8 Distribution des espèces de Vaccarès dans deux niches écologiques (benthique et pélagique) à la base des signatures $\delta^{13}C$ et dans 3 compartiments trophiques à la base des signatures $\delta^{15}N$

Figure 1.9 Valeurs de $\delta^{15}N$ dans les guildes trophiques de l'étang de Vaccarès

Figure 1.10 Valeurs de $\delta^{13}C$ dans les guildes trophiques de l'étang de Vaccarès

Figure 1.11 Niveaux trophiques des organismes camarguais calculés à la base de signatures $\delta^{15}N$

Figure 1.12 Représentation schématique des relations trophiques entre les espèces de l'étang de Vaccarès

Figure 1.13 Variations annuelles en $\delta^{15}N$ chez les poissons, bivalves et copépodes du Vaccarès

Figure 1.14 Variations annuelles en $\delta^{15}N$ chez les poissons, bivalves et copépodes du Vaccarès

Figure 1.15 Variations saisonnières des signatures en $\delta^{15}N$

Figure 1.16 Variations saisonnières des signatures en $\delta^{13}C$

Figure 1.17 Evolution saisonnière des rapports isotopiques dans les différentes guildes trophiques

Figure 1.18 Variations saisonnières de $\delta^{15}N$ dans les guildes trophiques

Figure 1.19 Variations saisonnières de $\delta^{13}C$ dans les guildes trophiques

Figure 1.20 Valeurs de $\delta^{15}N$ et $\delta^{13}C$ chez les organismes collectés dans les canaux de drainage en printemps 2003

Figure 1.21 Variations saisonnières des paramètres abiotiques et des signatures isotopiques des organismes de différentes guildes trophiques

Figure 2.1a Mouvement des pesticides dans la Biosphère

Figure 2.1b Mouvement des PCBs dans l'environnement

Figure 2.2 Bioamplification des xénobiotiques chez les organismes aquatiques

Figure 2.3 Processus d'absorption et de l'élimination des xénobiotiques chez les animaux aquatiques

Figure 2.4 Imprégnation globale par les pesticides OCs interdits et strictement limitées

Figure 2.5 Imprégnation globale par les PCBs

Figure 2.6 Imprégnation tissulaire par les PCBs chez les espèces dominantes de l'étang de Vaccarès

Figure 2.7a Répartition des pesticides chez 4 espèces appartenant à différents niveaux trophiques

Figure 2.7b Répartition par classes de contamination par les pesticides « type »

Figure 2.8 Répartition par classes de contamination par les PCBs

Figure 2.9 Profil de contamination par les pesticides dans les guildes trophiques

Figure 2.10 Profil de contamination par les PCBs dans les guildes trophiques

Figure 2.11 Evolution saisonnière de l'imprégnation par les pesticides et leurs métabolites chez *A. boyeri*

Figure 2.12 Evolution saisonnière de la répartition des pesticides types

Figure 2.13 Variations annuelles de l'imprégnation par la somme des PCBs

Figure 2.14 Evolution saisonnière de la répartition des différentes familles de PCBs chez le cardium et l'athérine

Figure 2.15 Imprégnation tissulaire par les pesticides OCs chez le biota collecté dans les canaux de drainage

Figure 3.1 Caractéristiques des approches écotoxicologiques dans l'évaluation du risque environnemental

Figure 3.2 Représentation schématique des étapes principales de la détoxication et de la toxication des xénobiotiques chez les animaux

Figure 3.3 Sources de stress pour les organismes dans un écosystème aquatique

Figure 3.4 – Figure 3.5 Variations saisonnières de l'imprégnation tissulaire et des activités enzymatiques de défense chez le cardium et l'athérine

Figure 3.6 – Figure 3.7 Variations saisonnières de l'imprégnation tissulaire et des activités enzymatiques de défense chez l'épinoche et le gobie

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1 Caractéristiques principales des espèces de poissons analysées

Tableau 1.2 Caractéristiques principales des espèces d'invertébrées analysées

Tableau 1.3 Caractéristiques biométriques [min-max] et effectif des organismes collectés dans l'étang de Vaccarès

Tableau 1.4 Signatures isotopiques des épinoches, des gobies et des syngnathes prélevés à Mornès et à La Capelière

Tableau 1.5 Taux moyen d'enrichissement isotopique par niveau trophiques dans l'écosystème de l'étang de Vaccarès calculé à partir des enrichissements en ^{15}N, compris entre 2,11 et 4,5‰, entre les espèces du réseau trophique

Tableau 1.6 Corrélations de Pearson entre les signatures isotopiques et les paramètres biologiques des poissons analysés

Tableau 1.7 Variations des facteurs abiotiques mesurés à la station météorologique La Capelière au cours du cycle annuel

Tableau 2.1 Caractéristiques principales des pesticides OCs

Tableau. 2.2 Caractéristiques principales des PCBs

Tableau 2.3 Paramètres de chromatographie et programmations pour la détection et quantification des molécules OC

Tableau 2.4a Niveaux de bioaccumulation des pesticides interdits chez le biota du Vaccarès

Tableau 2.4b Niveaux de bioaccumulation des pesticides dont l'utilisation est strictement contrôlée chez le biota du Vaccarès

Tableau 2.5 Variations annuelles de l'imprégnation par les pesticides OCs

Tableau 2.6 Niveaux d'accumulation des pesticides avant, pendant et après les traitements agricoles en 2002

Tableau 2.7 ANOVA de l'effet de la saison de prélèvement sur la contamination par les pesticides

Tableau 2.8 Valeur médiane et [min-max] de l'imprégnation par les PCBs au cours d'un cycle annuel (2002)

Tableau 2.9 Corrélations de Pearson ($p<0,05$) entre le taux d'imprégnation par les pesticides et les paramètres biologiques

Tableau 2.10 Corrélations de Pearson ($p<0,05$) entre le taux d'imprégnation par les PCBs et les paramètres biologiques

Tableau 2.11 Corrélations de Pearson utilisées pour déterminer une éventuelle bioamplification des pesticides OCs dans le réseau trophique de l'étang de Vaccarès

Tableau 2.12 Corrélations de Pearson utilisées pour déterminer une éventuelle bioamplification des PCBs dans le réseau trophique de l'étang de Vaccarès

Tableau 2.12 – 2.13 Variations remarquables entre les crevettes roses et les superprédateurs des canaux et du Vaccarès

Tableau 2. 14 Imprégnation tissulaire moyenne d'espèces aquatiques lagunaires. Comparaison des données bibliographiques avec celles de l'étang de Vaccarès.

Tableau 3.1 Biomarqueurs utilisés dans les études écotoxicologiques

Tableau 3.2 Caractéristiques et nombre d'analyses biochimiques effectués sur les organismes collectés dans l'étang de Vaccarès

Tableau 3.3 Paramètres biologiques des espèces du Vaccarès au cours de l'année 2002

Tableau 3.4 Corrélations de Pearson entre les indices de condition calculé sur l'ensemble de la population (K) et sur la classe « très contaminée »

Tableau 3.5 Variations saisonnières des activités enzymatiques chez les organismes du Vaccarès au cours de l'année 2002

LISTE DES SCHEMAS

Schéma 1.1 Etapes de la préparation des échantillons pour l'analyse isotopique

Schéma 2.1 Etapes de la préparation des échantillons pour la détermination des taux d'imprégnation par les substances OCs

Schéma 3.1 Schématisation de la préparation des fractions post-mitocondriales du foie et des glandes digestives pour l'analyse des activités enzymatiques

LISTE DES PHOTOS

Photo 1.1 Biodiversité exceptionnelle de la Réserve Nationale de Camargue

Photo 1.2 Etang de Vaccarès

Photo 1.3 Canal de Fumemorte

INTRODUCTION GENERALE

La conservation de la Biosphère exige la mise en œuvre de mesures juridiques, fondées sur des bases scientifiques bien établies. Au cours de ces dernières décennies a émergé une discipline, qui, basée sur la détection précoce ou tardive des risques liés aux activités anthropiques, devrait, à terme, permettre d'orienter les gestionnaires vers la protection des écosystèmes menacés. Il s'agit de l'Ecotoxicologie. Cette discipline a été conçue à la suite d'une prise de conscience des effets que pourraient entraîner l'introduction et la dispersion de polluants chimiques dans l'environnement. Sa finalité est d'évaluer l'impact des substances chimiques produites et exploitées par l'homme sur la structure et le fonctionnement des écosystèmes naturels, afin d'en évaluer l'incidence à tous les niveaux d'organisation biologique.

Une partie significative de l'écotoxicologie contemporaine est consacrée à l'évaluation des effets des contaminants dans les écosystèmes aquatiques - marins, dulçaquicoles et lagunaires - et à la prévention de ces effets. Les recherches actuelles en écotoxicologie aquatique tendent à intégrer des approches « traditionnelles » - mesure des paramètres physico-chimiques; analyse des contaminants dans l'eau, les sédiments et les organismes aquatiques; essais de toxicité en environnements artificiels, en microcosmes et en mésoéconomies, sur des organismes représentatifs; cytotoxicité des molécules lors d'essais *in vitro* - avec de nouvelles approches pluriparamétriques *in situ*, lors d'études réalisées sur le terrain, dans des conditions et dans des milieux naturels. Ainsi, depuis plusieurs années, des actions thématiques de recherche sont initiées, elle s'intéressent à l'évaluation de la contamination des organismes aquatiques dans des sites particuliers et ont souvent été développées dans un objectif de surveillance de la qualité d'environnement. Le concept de biosurveillance, qui repose sur l'étude de la réponse biologique des organismes aux polluants, est aujourd'hui en plein essor. Les effets biologiques des polluants peuvent, en effet, être assimilés à des indicateurs biologiques (biomarqueurs) de pollution dans le règne animal et végétal. La caractérisation de ces marqueurs peut permettre la mise en évidence précoce de pollutions avant l'altération de la structure des organismes, et surtout avant que les populations et les communautés, voire l'écosystème, ne soient perturbés.

C'est dans ce contexte général que s'intègre notre étude. Associée à une enquête de

biosurveillance qui a pour ambition d'évaluer les menaces pesant sur des écosystèmes, elle a comme objectifs la détermination du degré de contamination des réseaux trophiques aquatiques de la Réserve Naturelle Nationale de Camargue (RNNC) par des polluants organiques persistants (POPs) d'origine agricole (pesticides organochlorés) et industrielle (polychlorobiphényles) et d'en apprécier la dynamique au sein de ces réseaux. Dans ce milieu protégé, les POPs sont introduits de manière chronique par les activités humaines qui s'exercent à sa périphérie. Ces xénobiotiques présentent généralement une grande persistance et une importante rémanence. À ces objectifs principaux s'ajoutent la validation *in situ* de biomarqueurs, en relation avec l'emplacement trophique et la structure du réseau, et la détection d'organismes « sentinelles » ou bioindicateurs propres aux écosystèmes aquatiques camarguais.

Il s'agit, donc, d'une démarche pluridisciplinaire rassemblant des problématiques environnementales, chimiques, biologiques, écologiques et écotoxicologiques, focalisées sur la caractérisation de l'état sanitaire des écosystèmes aquatiques de la RNNC. Cette zone humide méditerranéenne à caractère patrimonial se révèle être, à l'heure actuelle, un site-modèle pour le monitoring de la dynamique des polluants dans l'environnement et un site-atelier pour l'étude des effets à long terme de contaminations de faible intensité, mais chroniques induites par les activités multiples et incessantes d'une société en évolution perpétuelle.

En raison de l'ampleur et de la complexité des thématiques abordées, ce manuscrit est divisé en trois parties correspondant aux trois axes fondamentaux de cette recherche.
La première partie est consacrée à l'étude de la structure des réseaux trophiques aquatiques de l'étang de Vaccarès et des canaux de drainage et d'irrigation camarguais. En orientant le flux énergétique entre les divers organismes d'un écosystème, le réseau trophique joue un rôle fondamental dans de nombreux processus écologiques. Pour comprendre l'organisation trophique du Vaccarès, 16 taxa dominants, dont 6 espèces d'invertébrés et 10 espèces de poissons, y ont été collectés au cours de 2 années expérimentales. Aux niveaux des canaux, trois espèces aquatiques ont été collectées au printemps 2003. Afin de définir leur régime alimentaire, d'identifier leur l'emplacement trophique et d'apprécier l'évolution saisonnière des relations alimentaires, des méthodes traditionnelles (l'analyse du contenu stomacal, données bibliographiques) ont été associées à une méthode récente, celle des isotopes stables du carbone et de l'azote. Cette technique consiste en la mesure du rapport des quantités d'isotopes stables du carbone ($^{13}C/^{12}C$) et de l'azote ($^{15}N/^{14}N$) dans les tissus des organismes.

Son intérêt est basé sur le fait que la composition isotopique d'un animal est sensiblement enrichie en isotopes lourds du carbone (1 à 3‰) et surtout de l'azote (3 à 5‰) par rapport à celle de ses aliments. Ainsi, les mesures d'enrichissement isotopique ($\delta^{15}N$) sont utilisées comme indicateurs de niveau trophique et les variations du rapport $^{13}C/^{12}C$ comme témoins des différentes sources de carbone primaire. (De Niro et Epstein, 1978; Minagawa et Wada, 1984; France, 1995).

La deuxième partie s'attache à l'évaluation des niveaux d'imprégnation tissulaire et des modes de contamination par une vaste gamme de composés organochlorés d'origine anthropique, pour les espèces chez lesquelles le niveau trophique est déterminé par la méthode isotopique. Les travaux précédents réalisés au laboratoire ont mis en évidence la présence chez 3 espèces de poissons de la RNNC, de charges fluctuantes en pesticides organochlorés (lindane, dieldrine, HCB, *pp*'DDE) et en PCBs (Roche *et al*., 2000, 2003a). Si l'on estime que l'intensité de l'imprégnation tissulaire en polluants lipophiles, comme les composés halogénés, dépend de leur structure chimique, mais également de l'habitat, du régime alimentaire et des capacités métaboliques des organismes-cibles et non-cibles, elle est donc étroitement liée à leur niveau trophique. Au cours de cette étude, les concentrations en de nombreux micropolluants organochlorés ont été mesurées dans différents maillons des réseaux trophiques aquatiques camarguais. Les molécules retenues sont les PCBs et une vaste gamme de pesticides organochlorés, le lindane et ses isomères, la dieldrine, l'hexachlorobenzène (HCB), le *pp*'DDE, l'endrine, l'aldrine, le fipronil, le diuron ainsi que l'heptachlor et l'endosulfan et plusieurs de leurs isomères ou métabolites. Ces substances actives sont transférées dans l'étang de Vaccarès par voie atmosphérique et surtout *via* les canaux de drainages des rizières riveraines. Leur concentration a été évaluée par chromatographie en phase gazeuse dans la matrice lipidique tissulaire (lipides totaux, lipides neutres et phospholipides) en s'attachant plus particulièrement à rechercher une éventuelle dépendance entre le niveau de bioaccumulation et l'emplacement trophique de l'espèce analysée au moment de sa capture.

La troisième partie s'intéresse à l'impact de l'ensemble des xénobiotiques organochlorés sur certains paramètres physiologiques des organismes analysés en insistant plus particulièrement sur la réponse des activités biologiques pressenties comme biomarqueurs - activités enzymatiques de biotransformation et activités enzymatique impliquée dans la défense antioxydative. En fonction de leur habitat et de leur position

trophique, les espèces bioindicatrices ont été analysées afin de fournir des indications supplémentaires sur la dynamique des polluants étudiés dans certains compartiments des écosystèmes aquatiques camarguais, en termes de bioaccumulation, de métabolisation, de biotransformation ou, dans le milieu, eu égard au facteur de bioconcentration de rémanence, de dilution des molécules.

Cette étude revêt un aspect novateur du fait qu'elle rassemble pour la première fois un grand nombre de données écologiques et écotoxicologiques concernant un écosystème naturel d'importance - internationale par son statut de Réserve de Biosphère, - nationale par son aspect patrimonial, et - régionale du fait de son inclusion dans un Observatoire Régional en Environnement (ORE). Outre son aspect écotoxicologique, elle tente d'intégrer des données écologiques, botaniques, zoologiques, limnologiques et hydrologiques et fait état d'un ensemble d'approches empiriques, expérimentales et analytiques *in situ* qui devrait permettre de définir les divers états que ces systèmes peuvent présenter en relation avec leur complexité spatiale et les fluctuations environnementales d'origine naturelle et anthropique.
Enfin, son ambition finale est de participer aux essais de modélisation, actuellement dans leur phase initiale, de l'écodynamique des polluants dans un écosystème aquatique et d'intégrer les notions acquises dans l'orientation générale de la gestion d'une Réserve naturelle, en l'occurrence la Réserve Nationale de Camargue, dont le rôle primordial est *la conservation de l'expression optimale des potentialités de biocénoses naturelles sur l'ensemble de son territoire*.

CHAPITRE I - LA STRUCTURE DES RESEAUX TROPHIQUES AQUATIQUES DE CAMARGUE

Détermination quantitative des niveaux trophiques des espèces dominantes par la méthode des isotopes stables du carbone et de l'azote.

I.1. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

Les écologistes ont consacré beaucoup d'efforts à l'étude des cheminements de la matière organique et de l'énergie au sein des écosystèmes naturels en vue de dégager des lois générales de leur fonctionnement. Puisque la circulation de l'énergie et celle de la matière vivante s'effectuent principalement à travers les chaînes trophiques réunies et interconnectées sous forme de réseaux, les recherches centrées sur les réseaux trophiques ouvrent les voies à la compréhension des nombreux processus écologiques d'importance cruciale. Parmi les perspectives qui se dessinent dans divers domaines de l'écologie contemporaine, les études des structures des réseaux trophiques en milieu naturel et des paramètres biotiques et abiotiques influençant leur dynamique temporelle et spatiale jouent un rôle fondamental. L'application *in situ* des nouvelles méthodologies, telles que la méthode des isotopes stables qui permet la quantification du niveau trophique des organismes au moment de leur capture, contribue à l'éclaircissement des différents facteurs susceptibles de contrôler l'évolution des réseaux trophiques et en conséquence la circulation de l'énergie dans la nature.

I.1.1 Flux de matière et d'énergie dans les écosystèmes aquatiques

Les transferts d'énergie et de matière dans les écosystèmes s'effectuent *via* les chaînes alimentaires d'une façon univoque dans le sens des producteurs primaires, organismes autotrophes, vers les consommateurs et vers les décomposeurs. Ces trois catégories d'organismes constituent, au plan écologique, les trois règnes fonctionnels des écosystèmes naturels (Ramade, 1984). À chaque niveau trophique, une partie importante de l'énergie est dissipée sous forme de chaleur (Figure 1.1). Cette dissipation permanente de l'énergie constitue le moteur de synthèse des substances organiques dans tous les écosystèmes de l'écosphère (Lévêque, 2001).

Dans les écosystèmes aquatiques, le flux d'énergie entrant est constitué principalement

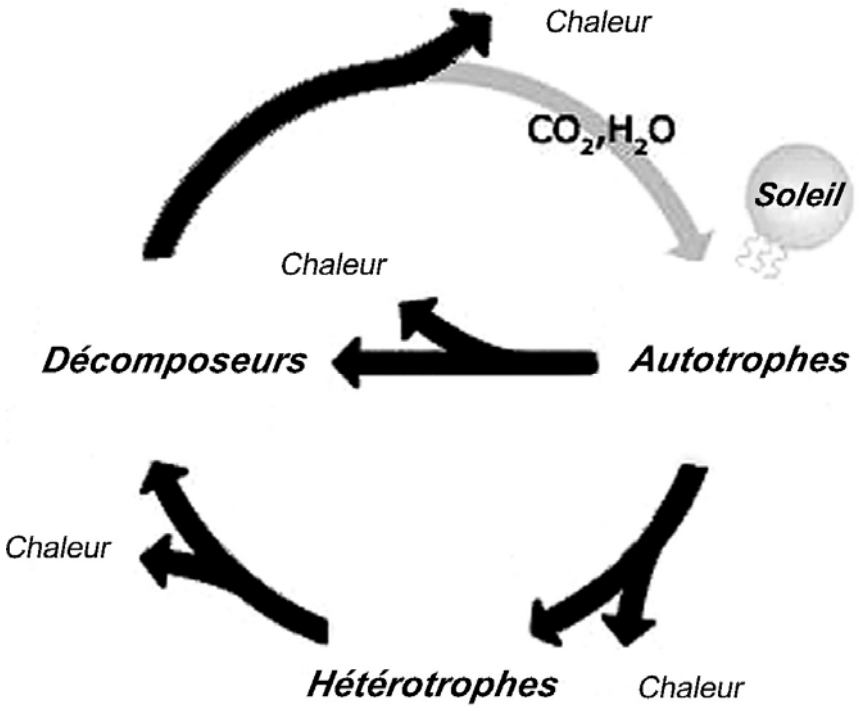


Figure 1.1 Flux d'énergie et de matière dans les écosystèmes naturels

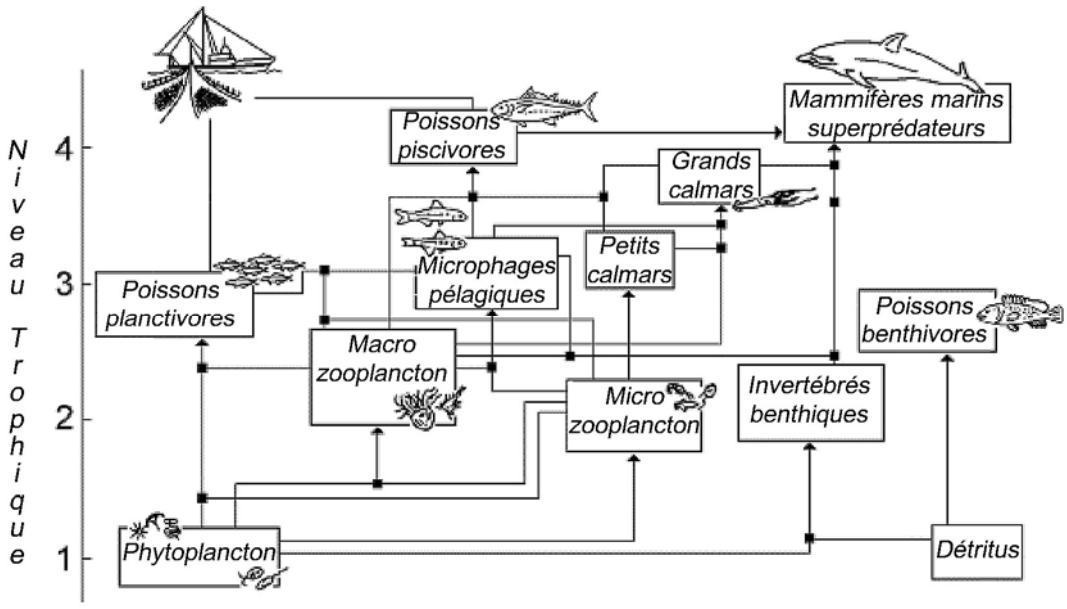


Figure 1.2 Réseau trophique d'un écosystème marin (d'après http://www.cordis.lu/inco2/src/acprep9.htm)

par le rayonnement solaire qui permet aux producteurs primaires (phytoplancton et macrophytes aquatiques) de convertir les minéraux dissous dans l'eau en matière organique et, donc, en énergie biochimique (Ramade, 1998). Cette énergie est ensuite incorporée dans les chaînes alimentaires constituées de *guildes trophiques* rassemblant des organismes aquatiques à la base de la nature des proies consommées (phytoplanctivores, zooplanctivores, zoophages, insectivores, piscivores) et/ou du mode de consommation (filtreurs, broyeurs, collecteurs) (Lévêque, 2001). Enfin, les microorganismes (bactéries et champignons) présents dans les eaux et les sédiments décomposent et minéralisent la matière organique après la mort des organismes.

Il existe d'autres sources de matière organique dans les écosystèmes aquatiques. Il s'agit de l'apport représenté par le recyclage bactérien des tissus provenant d'organismes morts, mais également des apports « terrigènes » des flux de matière en provenance du bassin versant. La contribution, cependant, de ces sources auxiliaires au flux de l'énergie et de la matière dans le cas d'étang de Vaccarès est très modeste. Ceci est dû au rapport surface bassin versant/surface étang (Ad/Ao) réduit (4,8) si l'on considère le bassin versant limité à la Camargue (Banas *et al*., 2004).

I.1. 2. Structure des réseaux trophiques aquatiques

Les réseaux trophiques peuvent être définis comme la résultante de la totalité des chaînes alimentaires unissant les diverses catégories écologiques (producteurs, consommateurs et décomposeurs) composant une biocœnose (Figure 1.2).

Bien que le principe du transfert et de la dissipation de l'énergie et des biomasses à travers les niveaux trophiques successifs concerne tous les écosystèmes naturels, les variations des paramètres physiques, chimiques et biologiques entre les écosystèmes pourraient être à l'origine de variations dans l'organisation des réseaux tropiques respectifs. Même si l'existence de différences fondamentales dans la structure des réseaux trophiques aquatiques et terrestres demeure incertaine, plusieurs hypothèses ont été formulées afin d'expliquer les mécanismes de ces divergences potentielles (Chase, 2000). Polis et Strong (1996) ont suggéré que les écosystèmes terrestres étaient plus complexes que les écosystèmes aquatiques à cause de leur productivité et de leur diversité supérieures. Ces caractères dérivent d'une plus grande capacité défensive des plantes terrestres et de l'adaptation des organismes de petite taille à une atténuation rapide de la lumière, par opposition aux espèces aquatiques dont la défense est uniquement chimique ou structurelle. À cette hypothèse sont reliées les suggestions

d'Hairston et Hairston (1997) sur l'omnivorisme et une prédation intra-guilde plus actives dans les écosystèmes terrestres. Ceci conduit à une réduction des principaux niveaux trophiques dans ces milieux par rapport aux milieux aquatiques.

Cependant, Chase (2000) a rappelé que les mécanismes de défense des proies existaient également dans les écosystèmes aquatiques et que l'apparente « hyper-diversité » des écosystèmes terrestres résultait simplement d'une classification plus précise des organismes terrestres par rapport aux organismes aquatiques. En effet, la majorité d'entre eux n'est ni nommée, ni classifiée explicitement. De plus, Post *et al*. (2000) ont démontré que la taille des écosystèmes, et non la productivité, était le facteur déterminant de la longueur des chaînes alimentaires. Les preuves croissantes de l'existence de superprédateurs, généralement omnivores, dans les réseaux trophiques aquatiques (Vander Zanden, 1999a), confortent les théories selon lesquelles le nombre de niveaux trophiques terrestres dépasse le nombre de niveaux trophiques aquatiques.

L'effet du cycle des nutriments, les caractères démographiques et comportementaux des organismes, la tolérance et la résistance des proies figurent parmi les autres idées proposées afin d'élucider les différences et les similarités dans l'organisation des réseaux trophiques aquatiques et terrestres (Chase, 2000).

Enfin, les réseaux trophiques peuvent être comparés sur des échelles plus étroites, c'est-à-dire au niveau des différents habitats qui composent les écosystèmes aquatiques et terrestres. Par exemple, les biotopes lentiques impliquent d'autres contraintes que les biotopes lotiques, il en est de même pour les biotopes continentaux par rapport aux biotopes océaniques (Ramade, 1998).

Ainsi, dans les écosystèmes aquatiques continentaux, on distingue deux grands systèmes trophiques. Leur différence majeure repose sur la source principale d'énergie utilisée dans les chaînes alimentaires respectives. Dans le premier type, l'énergie est fournie par les producteurs primaires (phytoplancton, algues, végétaux aquatiques), consommés par les herbivores, lesquels sont consommés à leur tour par les prédateurs dont le nombre de niveaux trophiques dépassent rarement 4 échelons. D'une manière générale, les chaînes et les réseaux trophiques fondés sur les producteurs primaires correspondent aux eaux libres de la zone limnétique des lacs, des lagunes et des grands étangs (les réseaux ou chaînes alimentaires *pélagiques*).

Pour le second système trophique, propre principalement aux cours d'eaux et à la zone riparienne des écosystèmes limniques, la source fondamentale d'énergie est le matériel en décomposition provenant d'apports en détritus allochtones. Ce matériel « détritique » grossier

est dégradé en matière organique particulaire fine (MOPF) par des microorganismes et des invertébrés détritivores. Ensuite la MOPF est consommée par un grand nombre d'organismes détritivores de faible taille situés aux niveaux trophiques inférieurs, eux-mêmes consommés par de nombreux carnivores primaires voire secondaires (micro-invertébrés et macro-invertébrés), qui vont servir de proies aux poissons prédateurs dont le niveau trophique s'élève souvent jusqu'à 6 ou 7 (Ramade, 1998).

Les systèmes trophiques basés sur la matière organique en voie de décomposition comme source d'énergie principale correspondent à la zone benthique des écosystèmes aquatiques (les réseaux ou chaînes alimentaires *benthiques*). Dans le milieu naturel, cependant, les deux types de chaînes trophiques ne s'excluent pas, mais coexistent et interagissent d'une manière variable selon la nature de l'écosystème.

L'analyse comparative des réseaux trophiques et des interactions trophiques entre les organismes présente un intérêt certain pour les écologistes, en général, et les écotoxicologistes en particulier, car plusieurs attributs structurels ou fonctionnels des réseaux trophiques (type d'interactions, longueur des réseaux, présence des espèces clés, productivité) jouent un rôle essentiel dans le transfert de l'énergie et du carbone, la bioaccumulation et la bioamplification des contaminants (Lévêque, 2001).

I.1.3 Effet des réseaux trophiques sur le fonctionnement des écosystèmes

Les considérations sur les modalités de la structuration des interactions alimentaires entre les organismes portent, en effet, sur les mécanismes de contrôle du fonctionnement des écosystèmes, à travers la régulation des populations par les réseaux trophiques.

D'une manière générale, les populations peuvent être régulées à la base et au sommet des chaînes alimentaires. Autrement dit, les chaînes alimentaires sont contrôlées par la disponibilité des ressources, régulées par les caractéristiques physico-chimiques du milieu, depuis les producteurs jusqu'aux prédateurs (contrôle « bottom-up ») mais également dans le sens contraire, par la prédation exercée par les niveaux supérieurs sur les niveaux trophiques inférieurs (contrôle « top-down ») (Lévêque, 2001). Dans un écosystème, ces deux types de contrôle par les réseaux trophiques coexistent et se complémentent, mais dépendent de l'échelle spatiale considérée et des paramètres de forçage tels que les changements climatiques (Shultz, 1995). Des recherches, encore peu nombreuses, conduites dans des milieux naturels ont mis en évidence des possibles modalités d'interaction entre le contrôle bottom-up et top-down dans différents écosystèmes (Tanaka et Rassoulzadegan, 2004). Ces

recherches, couplées à des études récentes de modèles trophiques (Herendeen, 2004) amènent à la même conclusion générale: le fonctionnement de chaque écosystème est unique dans la façon dont ces deux types de contrôle interagissent sous l'effet de conditions environnementales spécifiques à chaque milieu naturel. C'est la raison pour laquelle les études des interactions alimentaires entre les organismes, de la structure et de la dynamique des réseaux trophiques *in situ* dans différents biotopes naturels revêtent une importance capitale dans la compréhension du fonctionnement des écosystèmes globaux.

I.1.4 Dynamique temporelle et spatiale des réseaux trophiques aquatiques

L'extrême complexité des interactions entre les organismes et leurs milieux et entre les organismes eux-mêmes font que les réseaux trophiques aquatiques sont des systèmes particulièrement dynamiques tant à l'échelle spatiale que temporelle. Les promoteurs de cette hétérogénéité spatio-temporelle sont des facteurs d'origine naturelle, mais également des facteurs d'origine anthropique.

Par exemple, les réseaux trophiques des écosystèmes aquatiques camarguais sont en effet, constamment soumis à des variations spatiales et temporelles du gradient de salinité et du régime des eaux, modifiés par des événements climatiques et/ou par des activités humaines (Pampoulie *et al*., 2001). Ces systèmes trophiques sont également exposés à des changements saisonniers naturels dans la quantité et la qualité des ressources alimentaires en réponse aux cycles vitaux et aux comportements migratoires de leurs divers composants (Bardin et Pont, 2002; Poizat *et al*., 2002; Gelin *et al*., 2000) .

Il semble, néanmoins, que les zones soumises à de plus fréquentes perturbations naturelles, comme les écosystèmes lagunaires, ont des contraintes environnementales plus importantes (variations de température, de salinité, de l'abondance en eau) qui imposent une certaine constance des interactions trophiques par opposition aux milieux plus stables où des interactions plus faibles peuvent être tolérées grâce à des bases environnementales plus solides (Briand, 1983).

La détérioration des milieux naturels, la modification de la composition des peuplements et la contamination par des xénobiotiques persistants sont, à l'heure actuelle, les répercussions les plus préoccupantes parmi les nombreuses activités humaines ayant un effet sur la structure et la dynamique des réseaux trophiques. Puisque les espèces diffèrent dans leurs modes d'utilisation des ressources, dans leurs effets sur l'environnement et dans leurs interactions avec les autres espèces, les changements de la composition spécifique, lorsqu'ils

sont d'origine humaine, ont un impact beaucoup plus prononcé que s'ils étaient naturels. Ils sont responsables de modifications dans la nature et l'intensité des nombreux processus écologiques (Lévêque, 2001). En fait, nombreux sont les exemples de l'effet de l'introduction d'espèces ou de l'élimination d'espèces autochtones sur la structure et la dynamique des réseaux trophiques aquatiques (Gurevitch et Padilla, 2004).

Dans le cas des écosystèmes aquatiques de la RNNC, treize espèces introduites de poissons dulçaquicoles y sont actuellement recensées. Rosecchi *et al*. (1997) ont étudié les impacts potentiels de ces espèces sur les espèces autochtones dans le canal de Fumemorte, un des canaux de drainage qui se déverse directement dans l'étang de Vaccarès. Ces auteurs ont montré une augmentation des populations d'espèces exotiques sans cependant constater une diminution des espèces indigènes au niveau du canal. Par contre ils suggèrent qu'à long terme, les impacts potentiels des espèces introduites en Camarque pourraient affecter la compétition trophique et spatiale, la prédation sur les espèces de poissons autochtones et sur d'autres groupes animaux et végétaux, ainsi que l'hybridation ou encore la dégradation de l'habitat.

D'autre part, la présence ubiquiste dans la biosphère de substances chimiques introduites et dispersées par l'homme, représente certainement une des principales causes de la modification générale des écosystèmes aquatiques et l'un des aspects les plus inquiétants de la crise globale qui affecte notre environnement. Les conséquences de la pollution des eaux se manifestent à tous les niveaux de l'organisation biologique, la contamination affecte les individus, les espèces et les populations des espèces polluosensibles et dans les cas extrêmes elle affectera la totalité de la biocœnose propre à l'écosystème contaminé. Parmi les contaminants, les POP lipophiles s'avèrent particulièrement dangereux. Ils peuvent persister dans l'environnement durant plusieurs décennies en imprégnant de manière variable les tissus de tous les organismes aquatiques à tous les niveaux trophiques. Cette thématique est abordée dans la deuxième partie de ce mémoire, elle a pour objet l'évaluation de l'impact d'une vaste gamme de POPs (les taux et les modes d'imprégnation) à différents niveaux des réseaux trophiques aquatiques camarguais.

I.1.5 Détermination des niveaux trophiques des organismes aquatiques

Puisque les relations trophiques jouent un rôle important dans la définition de la structure et du fonctionnement des écosystèmes aquatiques, la détermination du niveau trophique précis d'un organisme révèle de nombreux aspects non seulement de son propre

métabolisme mais également des processus et des règles écologiques. Cependant, l'identification des niveaux trophiques est contrariée par l'extrême complexité des réseaux trophiques et par un grand nombre de variations temporelles et spatiales à différentes échelles. Les approches traditionnelles de la description des réseaux trophiques incluent les analyses du contenu stomacal couplées à des observations sur le terrain et au laboratoire (Richter *et al*., 1999; Beaudoin *et al*., 2002). Ces études peuvent déterminer avec un haut niveau de précision taxonomique, la nature des proies consommées par les organismes examinés. Néanmoins, elles impliquent souvent des études difficilement réalisables, sujettes à des erreurs fréquentes et la distinction de ce qui a été réellement digéré par les consommateurs reste habituellement de nature spéculative.

La méthode des isotopes stables, basée sur une partition métabolique sélective (*fractionnement isotopique*) qui consiste en une perte préférentielle des isotopes légers au cours des processus naturels, telles que la respiration et l'excrétion, (De Niro et Epstein, 1978; Rau *et al*., 1983) semble surmonter certaines de ces difficultés. Cette méthode consiste en la mesure des rapports des isotopes lourds et légers de l'azote ($^{15}N/^{14}N$, $\delta^{15}N$) et du carbone ($^{13}C/^{12}C$, $\delta^{13}C$) dans les organismes. En effet, il a été montré que les isotopes stables de l'azote et du carbone présentaient un enrichissement naturel entre les tissus des prédateurs et ceux de leurs proies, ce qui se traduit par un enrichissement isotopique constant (3-5‰ pour l'azote et 1-3‰ pour le carbone) entre deux niveaux trophiques successifs (Minagawa et Wada, 1984; Vander Zanden *et al*., 1997). De cette manière, la méthode isotopique fournit un outil de distinction entre les aliments assimilés et les aliments ingérés en reflétant toute la complexité des réseaux tropiques dans des périodes plus longues (Guiger *et al*., 2002; Heisslein *et al*., 1993). Les variables continues de $\delta^{15}N$ sont de plus en plus utilisées en écologie des réseaux trophiques en tant qu'indicateurs et quantificateurs du positionnement trophique des organismes aquatiques (Vander Zanden et Rasmussen, 1999; Hobson *et al*., 2002; Vizzini et Mazzola, 2002). Les taux d'enrichissement trophique du carbone ($\delta^{13}C$) trouvent, quant à eux, leur application principale dans la détermination des différentes sources de carbone primaire dans les écosystèmes aquatiques et dans l'évaluation des voies du flux de carbone des producteurs primaires jusqu'aux consommateurs tertiaires (Gu *et al*., 1996; Vizzini *et al*., 2002). En effet, dès 1995, France avait démontré que les valeurs attribuées aux $\delta^{13}C$ étaient particulièrement efficaces pour distinguer les deux sources majeures d'énergie dans les lacs : la production littorale provenant des algues benthiques et la production pélagique réalisée par le phytoplancton et les algues pélagiques. Puisque les algues benthiques

ont généralement un taux de fractionnement en ^{13}C réduit pendant la fixation du carbone, elles présentent un enrichissement en $\delta^{13}C$ par rapport au phytoplancton et aux algues pélagiques. D'autre part le microphytobenthos présente des valeurs de $\delta^{13}C$ plus élevées par rapport à une autre source d'énergie dans les écosystèmes aquatiques continentaux, la MOPF (Sauriau et Kang, 2000). Les variations du $\delta^{13}C$ à la base des chaînes alimentaires peuvent se refléter dans le $\delta^{13}C$ de leurs consommateurs, et offrent ainsi un outil de distinction entre les chaînes pélagiques et les chaînes benthiques (Hecky et Hesslein, 1995; Bode *et al*., 2003).

D'autres isotopes stables peuvent fournir une information supplémentaire sur le flux d'énergie et des nutriments dans les écosystèmes aquatiques; il s'agit des isotopes stables de l'oxygène ($\delta^{18}O$) et du soufre ($\delta^{34}S$). L'utilisation des isotopes de l'oxygène en tant qu'indicateur du niveau trophique est très limitée car les variations de ses signatures isotopiques chez les organismes aquatiques varient en fonction des conditions environnementales (température, salinité) (Khim *et al*., 2000). En revanche, les valeurs de $\delta^{34}S$ permettant de distinguer les sources principales de soufre, le sulfate (en milieu oxygéné) et le sulfite (dans les sédiments anoxiques) peuvent être très utiles dans les études des réseaux trophiques à condition que la signature isotopique des producteurs soit unique et relativement constante (Peterson, 1999). Les études récentes ont cependant montré de fortes variabilités temporelles et spatiales du $\delta^{34}S$ chez des producteurs primaires dans un écosystème lagunaire australien (Connoly *et al*., 2004).

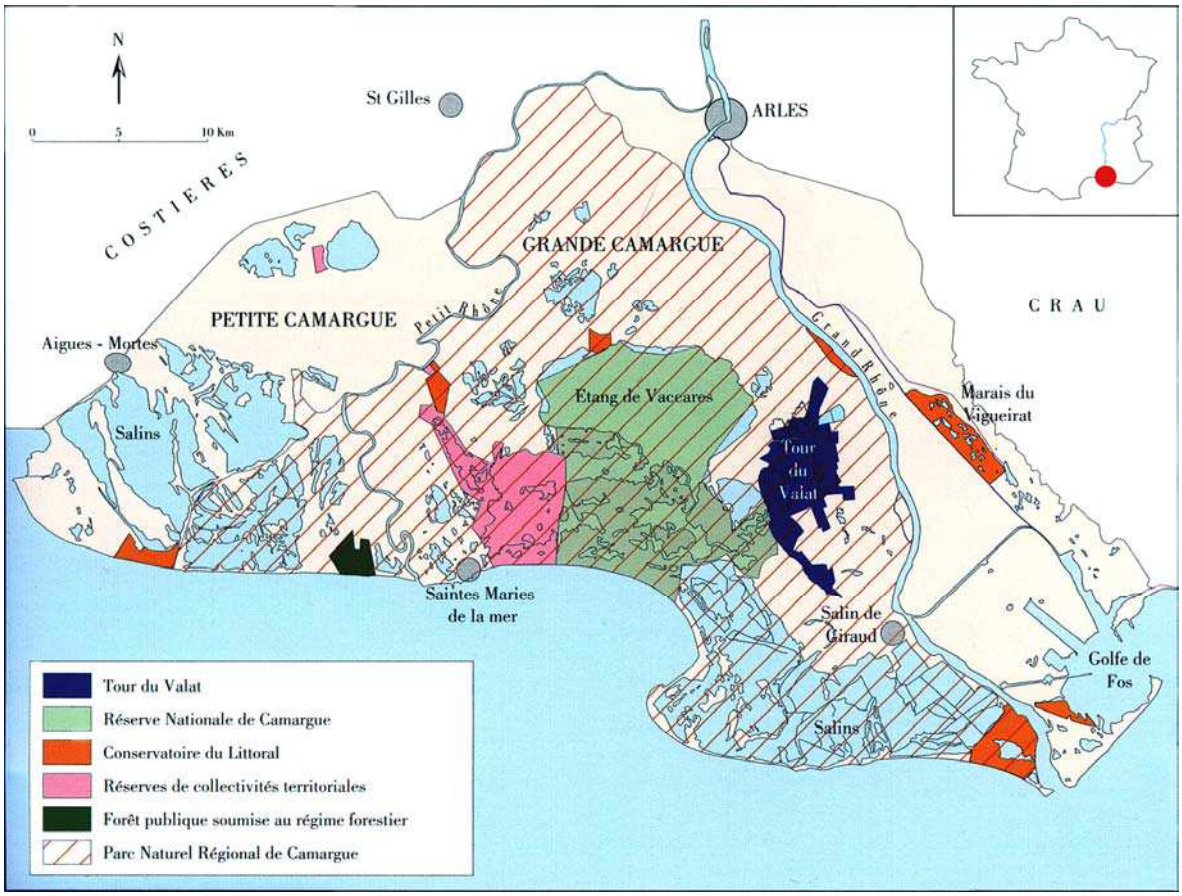


Figure 1.3 Site d'étude: la Réserve Nationale de Camargue

Photo 1.1 Biodiversité exceptionnelle de la Réserve Nationale de Camargue

I.2. MATERIEL ET METHODES

I.2.1 Site d'étude: la Réserve de Biosphère de Camargue

La vaste zone humide de la Grande Camargue s'étend à l'intérieur d'un delta dont deux des côtés sont constitués par les deux bras du Rhône (Le Petit Rhône et le Grand Rhône) et le troisième par une partie de la côte méditerranéenne française (Figure 1.3).

Recouvrant plus de 13 000 ha, au cœur de la Camargue, la Réserve Nationale de Camargue fait partie des plus grandes réserves en zones humides d'Europe et son territoire bénéficie d'une protection intégrale. Sa valeur biologique exceptionnelle lui vaut d'être reconnue au titre de la Convention Internationale sur la Protection des Zones Humides (Ramsar, 1971), de la Directive européenne sur la conservation des oiseaux (1979) et dans le cadre du programme « L'Homme et la Biosphère » (MAB) de l'UNESCO (1972) comme Réserve de Biosphère.

L'originalité et l'intérêt patrimonial international de la Camargue résident dans la diversité de ses habitats naturels (milieux humides permanents - les étangs et les marais, ou temporaires - les lagunes et les sansouïres, saumâtres, salés ou d'eau douce, les dunes côtières et les plages), des espèces qui les occupent (346 espèces d'oiseaux, 34 de mammifères, 15 d'amphibiens, 14 de reptiles, 45 de poissons et de nombreux invertébrés) ainsi que dans son fonctionnement écologique (photo 1.1).

Sous son statut de Réserve de Biosphère, la Réserve de Camargue est censée assurer la conservation de cette remarquable biodiversité et une surveillance continue de l'environnement en s'appuyant sur la recherche scientifique, tout en permettant aux populations avoisinantes un développement durable fondé sur les activités traditionnelles. En effet, ce sont les activités traditionnelles, notamment l'agriculture, qui ont façonné et orienté la biodiversité camarguaise actuelle. Les activités agricoles dominantes ont participé, du fait des apports en eau douce ou en eau salée, à la création de la diversité du biotope dont l'équilibre reste entre les mains de l'Homme (Charte du parc naturel régional du Camargue, 1998, www. parc-camargue.fr).

Cependant l'impact des activités humaines, comme la construction de deux digues sur le Rhône et de la digue à la mer au XIXe siècle, destinée à protéger les terres cultivées des inondations et des apports en eau marine, le développement des salins au début du XXe siècle et de la riziculture après la deuxième guerre mondiale, sont plus préoccupants que celles qui, au cours des siècles ont constamment modifié l'aspect du delta. Aujourd'hui l'Ile Camargue

Photo 1.2 Etang de Vaccarès

Photo 1.3 Canal de Fumemorte

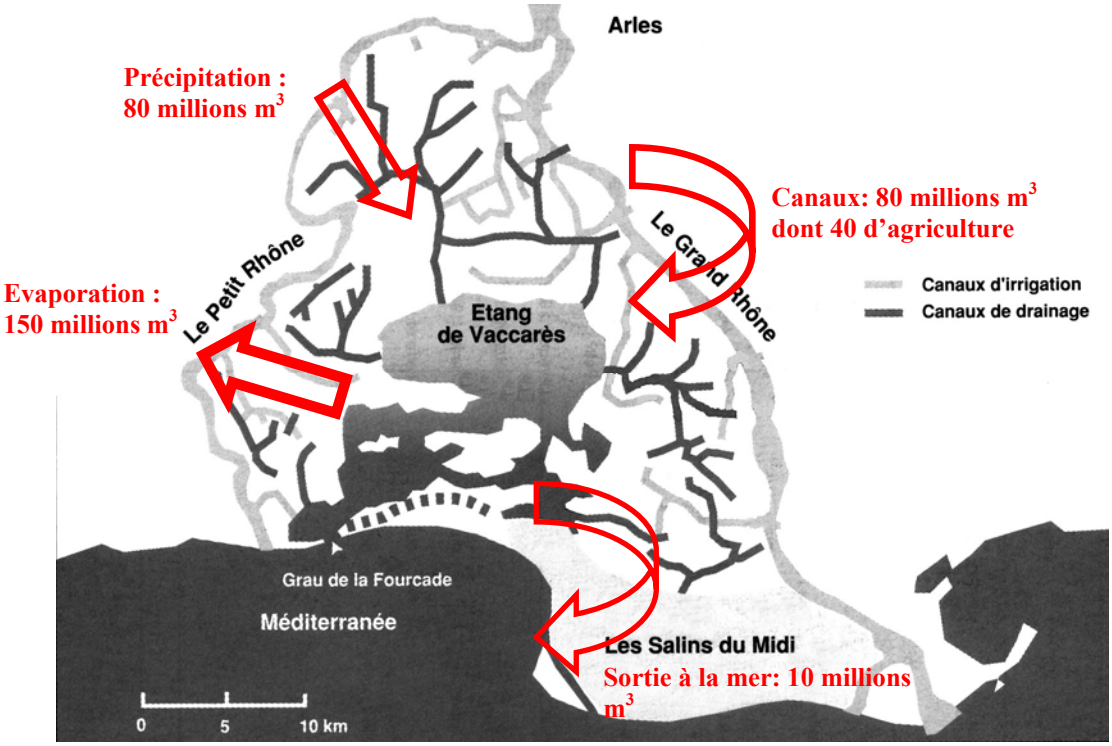


Figure 1.4 Système hydraulique simplifié du Vaccarès en année pluviométrique moyenne (SNPN)

est un milieu largement artificialisé, fragile et menacé. La moitié des habitats naturels a été transformée au cours des 50 dernières années. Bien que ces modifications concernent surtout les zones à l'extérieur des aires protégées, celles-ci en subissent aussi les conséquences.

Avec une arrivée massive d'eau d'origine agricole en été et l'absence de crues du Rhône en automne (grâce aux digues), le cycle naturel, sécheresse estivale et submersion hivernale du vaste complexe de plus de 8 500ha des étangs saumâtres de la Réserve Camargue, n'est plus respecté. De plus, les digues qui ceinturent la Camargue isolent les étangs de la mer et du fleuve, principales sources de renouvellement en invertébrés et en poissons ce qui diminue leur diversité biologique. Les canaux de drainage qui se déversent dans les étangs de la Réserve en apportant continuellement des micro-polluants chimiques (engrais et pesticides) utilisés intensivement dans les traitements agricoles, constituent une source de pollution chronique des eaux et des organismes protégés (Roche *et al*.,2000). Enfin, un transfert non négligeable d'aéropolluants *via* les précipitations résulte de la présence au Sud-Est de la Réserve d'un grand pôle industriel européen (Marseille-Fos), et en particulier d'un vaste complexe pétrochimique entraînant une forte pollution atmosphérique (Buet, 2002).

I.2.2 Sites de prélèvement: l'étang de Vaccarès et les canaux de drainage

Dans cette étude, nous avons concentré notre attention sur les écosystèmes aquatiques de la Réserve de Camargue, particulièrement sur l'étang de Vaccarès et les canaux de drainage, notamment le canal de Fumemorte (Photo.1.2, 1.3).

L'étang de Vaccarès

En tant que pièce maîtresse du système hydraulique du delta, l'étang de Vaccarès (6500 ha) joue un rôle principal dans le biotope aquatique de ce milieu protégé. Il est caractérisé, avant tout, par sa faible profondeur (la profondeur moyenne 1,5m) et sa salinité variable dans le temps et dans l'espace. La température, les précipitations et l'apport par le canal de Fumemorte de l'eau de drainage des rizières (environ 50 millions de m^3 par an) constituent les éléments variables de ce système et conditionnent son niveau par rapport à la mer mais aussi sa salinité (Figure 1.4). La salinité de l'étang de Vaccarès a subit une diminution progressive de 35 à 14 entre 1984 et 1993. En 1993, la rupture des digues du Petit Rhône suivie par le déversement de grandes quantités d'eau douce dans le Vaccarès (110 millions de m^3) a entraîné une augmentation du niveau moyen des eaux et un fort abaissement

de la salinité jusqu'à 5 g par litre (Bethemont et Riviere-Honegger, 1998). À l'heure actuelle, grâce aux campagnes de « re-salure », le niveau moyen de la salinité semble être rétabli à des concentrations équivalentes à celles précédant cette catastrophe écologique (14). Cependant, une telle modification des conditions environnementales pourrait avoir des nombreuses conséquences à long terme sur la quantité et la qualité des biomes aquatiques (Pampoulie *et al*., 2001).

Puisque la salinité est un des facteurs abiotiques déterminant la composition des peuplements de poissons et d'invertébrés dans l'étang de Vaccarès, l'alternance de salure et déssalure affectent la richesse spécifique de cet écosystème (SNPN, 2002). Seules les espèces euryhalines s'y retrouvent en permanence (anguille, épinoche, gobie, athérine, syngnathe). Néanmoins, depuis 1999 on assiste à un effondrement des stocks en athérines et en anguilles dans l'étang, espèces qui ont longtemps représenté les principales ressources halieutiques de Camargue. En effet, ces deux espèces dominent le réseau trophique du Vaccarès et représentent, donc, l'essentiel des revenus des pêcheurs professionnels autorisés des étangs (SNPN, 2002).

Les canaux

Le principal canal de drainage en Camargue est le canal du Fumemorte (14,6 km de long) qui draine les eaux d'irrigation pompées du Rhône et coule par gravité vers l'étang de Vaccarès. Sa profondeur moyenne est comprise entre 0,5 et 1,5m et la largeur entre 10 et 15m (Poizat et Crivelli, 1997). La salinité du Fumemorte durant la période de 1988-1995 (avant et après les inondations) est restée inférieure à 4 avec une moyenne de 0,94 (Rosecchi *et al*., 1997).

Le canal de Fumemorte est connecté aux marais environnants, par exemple le marais de Rolongues par voie de saignées pourvues d'écluses. Ces connexions permettent la communication entre les principaux corps hydriques et les marais camarguais et par conséquent la colonisation de ces derniers par les espèces aquatiques, notamment les poissons et les micro et macro - invertébrés (Poizat et Crivelli, 1997).

I.2.3 Matériel biologique

Notre programme de recherche a concerné une gamme étendue de consommateurs aquatiques, des poissons et des invertébrés placés à tous les niveaux du réseau trophique de l'étang de Vaccarès. Il s'agit de 10 espèces de poissons, 5 espèces de crustacés y compris du zooplancton constitué principalement de Copépodes et une espèce de mollusques bivalves. Leurs caractéristiques, systématique, biologie, habitat et régime alimentaire, sont résumées dans les Tableaux 1.1 et 1.2. En outre, un nombre plus restreint, de crevettes roses, d'écrevisses et de poissons-chats a été prélevé dans les canaux de drainage des rizières qui communiquent avec l'étang de Vaccarès principalement par le canal de Fumemorte.

I.2.4 Prélèvements

Les prélèvements du matériel biologique ont été effectués dans l'étang de Vaccarès aux mois de mars-avril (printemps), de mai-juin (été), et de septembre (automne) 2001 et 2002 au niveau de deux sites (Figure 1.5). Il s'agit du site Fumemorte - La Capelère situé à l'Est de l'étang, proche de l'endroit où débouche le plus important canal de drainage pour la riziculture, le canal de Fumemorte, qui se déverse encore dans le Vaccarès et de la presqu'île de Mornès située au Centre-Ouest de la pièce d'eau et éloignée des apports d'eau douce.

Ce plan expérimental fait abstraction des prélèvements hivernaux, qui ne peuvent pas être comparés avec les autres saisons (nombre d'espèces, effectifs etc…) en raison, entre autres, des conditions climatiques.

Au printemps 2003 des échantillons ont été collectés dans les canaux de drainage au niveau de 4 sites: Pont des Garcines, Egout de Badon, Rolongues et Fumemorte (Grand Canal) (Figure 1.5).

Le zooplancton a été collecté au moyen d'un filet à plancton de 63µm de vide de maille. Les invertébrés benthiques ont été recueillis au fond de l'étang et des canaux au moyen d'un tamis métallique de 500µm de vide de maille, puis triés à la main. Les poissons de grande taille (anguilles, sandres, brèmes, poissons-chats, soles) ont été capturés par des pêcheurs professionnels habilités dans des pêcheries, au moyen de filets statiques disposés en labyrinthe qui piègent les poissons. Les autres poissons et les mysis ont été péchés avec un petit chalut.

Dès leur capture, les organismes ont été congelés dans de l'azote liquide puis transportés au laboratoire où ils ont été maintenus à -30°C ou -80°C dans l'attente des analyses.

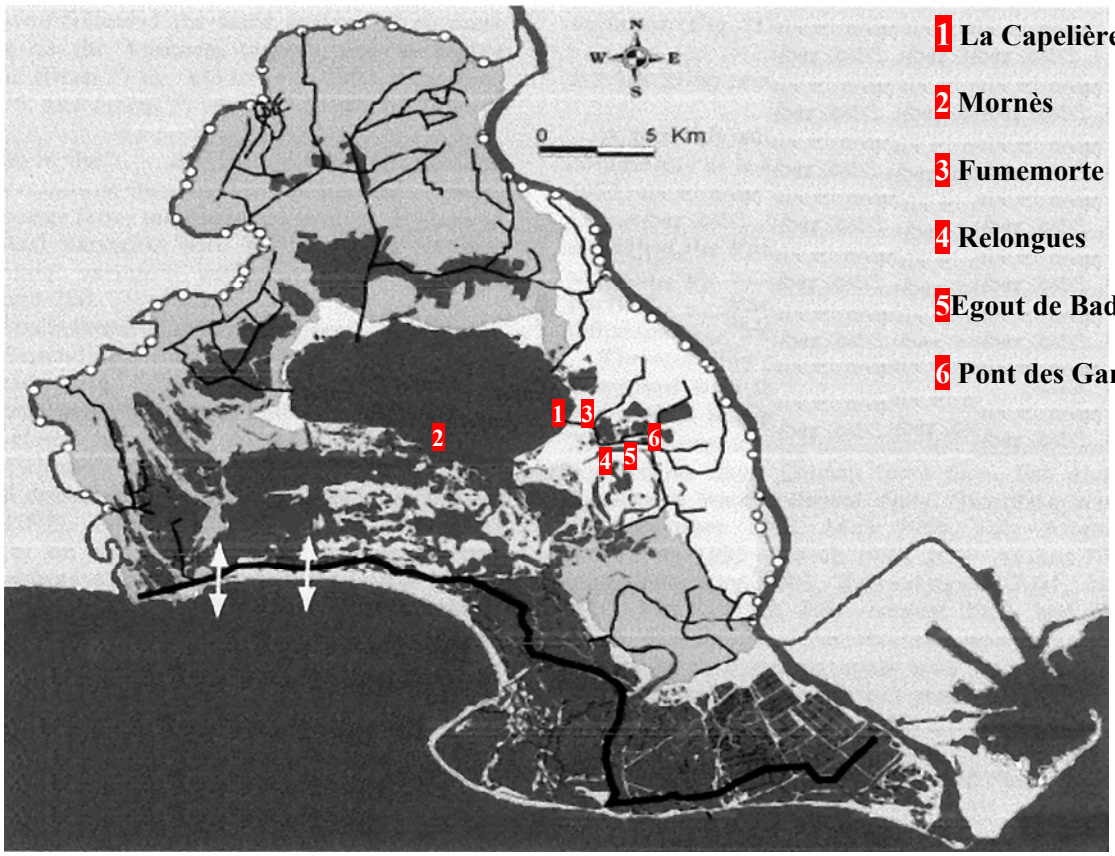


Figure 1.5 Sites de prélèvement

	Taille (cm)	Poids (g)	n							
			Mars 01	Mai /Juin 01	Sept 01	Mars 02	Avril 02	Mai 02	Sept 02	**Total**
anguille jaune	33-57,6	99,6-387	3	5	2	4		2	4	20
anguille juvénile	20-39	10,4-83,5	3	7	4	2		5	7	26
athérine	4-10,5	0,60-8,01	6	12	5	6	6	6	6	47
brème	9,5-51	10,0-52,5			1				6	7
crevette grise	5-7,5	1,03-3,45				6	7	6	8	27
crevette rose	3,38-5	0,32-1,96				6	6	6	4	22
épinoche	2,4-5,3	0,13-1,76				5	13	6	3	27
gobie	3,1-6,3	0,38-2,46				6	10	6	5	27
gobie niger	6-6,3	1,77-1,88				4				4
muge juvénile	3,6-4,1	0,36-0,51					6			6
perche soleil	10,5-12,4	29,6-44,7					3			3
sandre	27-27,9	152-170			2			2		4
sole	18-21	28,5-55,0							4	4
syngnathe	8,5-11,3	0,34-0,70					6	2		8

Tableau 1.3 Caractéristiques biométriques [min-max] et effectif des organismes collectés dans l'étang de Vaccarès

Tableau 1.1$_1$ Caractéristiques principales des espèces de poissons analysées

Espèce	Biologie - Habitat -Alimentation
Atherina boyeri (Risso, 1810) (**Athérine**) Famille :Atherinidae	Poisson très euryhalin rencontré fréquemment dans les eaux saumâtres (étangs, lagunes), parfois dans des eaux douces. Distribué dans toute la colonne d'eau, à une profondeur maximale de 1m. Carnivore, se nourrit de petits crustacés, de vers, de mollusques et de larves de poissons. Juvéniles ils consomment du zooplancton.
Anguilla anguilla (L.) (**Anguille européene**) Famille :Anguillidae	Espèce migratrice amphialine et catadrome, les adultes migrent vers la mer de Sargasse pour se reproduire. Les leptocéphales puis les civelles rejoignent les biotopes paraliques côtiers (étangs, estuaires, lagunes pour devenir les anguilles jaunes immatures pour y séjourner 8-15ans. Après le processus d'argenture, les adultes matures retournent vers la mer. Démersaux, ils vivent prés du fond sableux et vaseux. Prédateurs carnivores, ils se nourrissent de vers, de crustacés, de petits mollusques et de poissons.
Gasterosteus aculleatus (L.) (**Épinoche**) Famille :Gasteroidae	Espèce bentho-pélagique, vivant dans des milieux dulçaquicoles, marins et saumâtres, dans les aires couverte de végétation. Espèce carnivore, prédatrice, se nourrit de vers, de crustacés, de larves et d'insectes aquatiques adultes, de petits poissons.
Mugil sp. (L.) (**Muge**) Famille :Mugilidae Ordre : Perciformes	Espèces bentho-pélagiques, catadromes, côtières mais entrent dans les lagunes et estuaires, se reproduit en mer. Habitats sableux, vaseux et couverts d'une végétation dense. Leur alimentation se compose de zooplancton, d'algues mais aussi de microzoobenthos et de détritus.
Abramis sp. (**Brème**) Famille : Cyprinidae	Espèces bentho-pélagiques vivant dans des cours d'eau calmes et dans des biotopes lentiques dulçaquicoles ou saumâtres. Se nourrissent d'insectes, de chironomes, de petits crustacés de mollusques et de plantes aquatiques. Les individus de grande taille consomment des petits poissons, les juvéniles se nourrissent de zooplancton.
Solea vulgaris (Quensel, 1806) (**Sole**) Famille : Soleidae	Espèce océanodrome, habitant des eaux saumâtres et marines. Habituellement elle est enfoncée dans les fonds sableux ou vaseux. Souvent pélagique pendant sa migration reproductive. Consomme des vers, des mollusques et de petits crustacés pendant la nuit.
Gobius niger (L.) (**Gobie noir**) Famille : Gobiidae	Poisson démersal, vivant dans les estuaires, les étangs, et lagunes et les zones côtières sous le sable ou la végétation. Espèce carnivore qui se nourrit de tous les types de crustacés (amphipodes, isopodes, gammares, mysis, petits crabes), de bivalves, de gastropodes, de polychètes, de larves de chironomes, parfois de petits poissons.
Pomatoschistus sp. (**Gobie**) Famille : Gobiidae	Espèces amphidromes, démersales, fréquentant préférentiellement les eaux saumâtres. Pour éviter leurs prédateurs et se protéger contre les faibles hauteurs en eau s'enfonce dans le sable. Leur alimentation est constituée de petits crustacés, de vers, de larves de chironomes d'acarides et de pollen à la surface de l'eau.

Tableau 1.1$_2$ Caractéristiques principales des espèces de poissons analysées (www.fishbase.com)

Espèce	Biologie - Habitat –Alimentation
Syngnathus acus (L.) **Syngnathe** Famille : Syngnathidae	Espèce souvent localisée au milieu d'algues et dans les herbiers de zostères. Peuple les eaux saumâtres où elle s'alimente de zoobenthos (amphipodes, isopodes, copépodes et insectes).
Lepomis gibbosus (L.) **Perche soleil** Ordre : Perciformes	Espèce considérée comme indésirable dans certaines régions car elle fait partie des « ravageurs » potentiels. Dulçaquicole, vivant dans les eaux calmes des lacs calmes et des étangs. Elle s'alimente principalement de vers, de crustacés et d'insectes, mais peut se comporter comme un prédateur en consommant des petits poissons et d'autres petits organismes vertébrés et invertébrés.
Stizosteidon lucioiperca (L.) **Sandre** Famille : Percidae	Poisson pélagique, dulçaquicole et des eaux saumâtres. Ses habitats semblent varier en fonction de la saison, sa reproduction a lieu dans les cours d'eau. Carnivore et prédateur, se nourrit principalement de poissons. ravageurs potentiels.
Ictalurus nebulosus (Lesueur, 1819) **Poisson - chat** Ordre : Siluriformes:	Espèce introduite d'origine nord-américaine, se trouve au niveau des sédiments dans lesquels elle peut s'enfoncer quand les conditions environnementales sont mauvaises. Poisson omnivore extrêmement vorace et destructeur qui se nourrit d'invertébrés benthiques, de détritus, d'insectes, de mollusques, de poissons. Représente un véritable danger dans les habitats naturels puisqu'il chasse les autres poissons de leur habitat en détruisant leurs œufs et leurs alevins.

Tableau 1.2 Caractéristiques principales des espèces d'invertébrées analysées (Brusca et Brusca, 1996 ; Hayward et Ryland, 1995 ; www. marlin.ac.uk/democergla.htm)

Espèce	Biologie - Habitat – Alimentation
Copépodes *sp.* **Copépodes** Ordre : Calanoidae	Les copépodes sont de petits crustacés qui se développent dans tous les milieux aquatiques et représentent l'une des principales composantes du zooplancton benthique et/ou pélagique. Leur alimentation varie en fonction de l'espèce, de la classe d'âge, du type de milieu et de la saison. Les herbivores sont des filtreurs se nourrissant d'algues unicellulaires de petite taille, les carnivores sont des prédateurs microphages et le régime alimentaire des espèces omnivores peut inclure des détritus organiques. Ils jouent un rôle fondamental dans l'équilibre écologique de la plupart des écosystèmes en occupant une position clé dans les chaînes alimentaires.
Cerastoderma glaucum (Poiret, 1789) **Cardium** Classe : Bivalve	Espèce de mollusques fouisseurs, présente en grand nombre dans les lagunes et les estuaires où ils s'adaptent très bien aux variations de la salinité et de la température. Les juvéniles sont attachés aux algues filamenteuses, les adultes se rencontrent sur toutes sortes de fonds meubles mais marquent une préférence pour les fonds sablo-vaseux. Le régime alimentaire est de type filtreur, suspensivore.
Mysis *sp*. Famille : Mysidiacea	Espèces pélagiques peuplant les eaux côtières et les écosystèmes paraliques. Elles sont tolérantes aux grandes variations de salinité. Essentiellement zooplanctonophages, les mysidiacées se nourrissent aussi de matière organique en suspension. En représentant la proie préférentielle des macro-invertébrés et poissons carnivores de petite taille, ces animaux jouent un rôle important dans le transfert de l'énergie dans les milieux aquatiques littoraux.
Gammarus sp. **Gammare** Famille : Gammaridea	Hôtes des eaux saumâtres et des étangs peu profonds. Invertébrés benthiques vivant sur le fond des étangs qui se nourrissent essentiellement en fouillant le sol en y récupérant la matière organique en décomposition (détritivores à tendance herbivore).
Palaemonetes varians (Leach, 1814) **Crevette rose** Ordre :Decapoda	Crevettes du genre Palaemon vivent près du littoral, dans les étangs et les lagunes saumâtres. Elles nagent occasionnellement en pleine eau mais toujours à proximité des algues ou des rochers jusqu'à un maximum de 40 m de profondeur. Leur nourriture est principalement constituée de petits invertébrés (crustacés, polychètes,...), d'algues mais aussi de déchets animaux (détritivores nécrophages).
Crangon crangon (L.) **Crevette grise** Ordre : Decapoda	Crustacés euryhalins effectuant des migrations horizontales saisonnières entre la mer et les étangs côtiers. Le cycle migratoire est différent en Atlantique et en Mer du Nord par rapport à la Méditerranée. Espèce omnivore avec des contenus stomacaux très variés (petits crustacés, larves, mollusques, vers annélides, algues etc.) en raison d'un opportunisme certain. Activité de nutrition essentiellement nocturne. Reste enfouie dans le sédiment pendant la période diurne.
Procambarus clarkii (Girard, 1852) **Ecrevisse de Louisiane** Famille : Cambariidae	Espèce exotique nocturne, très agressive, résistante et territoriale qui pourrait avoir colonisé naturellement la Camargue. Espèce omnivore se nourrissant de petits invertébrés, larves d'insectes et détritus organique avec une préférence pour l'alimentation à base de végétaux.

I.2.5 Biométrie des organismes prélevés

Le poids et la taille de chaque organisme aquatique capturé en Camargue ont été déterminés soit sur place à la Réserve Nationale de Camargue, soit au laboratoire d'écotoxicologie de l'Université d'Orsay. Le Tableau 1.3 résume les principales caractéristiques biométriques de chacune des espèces analysées.

L'évaluation de la relation taille-poids peut aider à déceler un éventuel déséquilibre pondéral par rapport à une population de référence dont sont issus les individus étudiés. En l'absence de population témoin, un référentiel est élaboré en continu sur un large échantillonnage de poissons et d'invertébrés prélevés dans le Vaccarès et dont les données morphométriques sont collectées lors des campagnes d'inventaire, réalisées par le personnel de la Réserve dans le cadre du suivi scientifique.

La relation taille-poids suit chez les poissons une équation de type: Poids théorique=b X taille^{a}.

La linéarisation de cette relation permet de calculer un poids théorique pour chaque individu en fonction de sa taille réelle.

Dans la population de crevettes grises analysées, la relation taille poids suit l'équation de type Poids théorique=0,90 X taille -3,51

Chez les crevettes roses :Poids théorique=0,46 X taille -1,24

L'indice relatif de condition (K) est défini par le rapport du poids réel d'un individu sur son poids théorique calculé à partir de la population de référence. :

K=Poids réel/ Poids théorique

En ce qui concerne les bivalves, nous avons retenu la relation entre le poids frais des individus (sans eau palléale) et le poids total des organismes (individu+eau palléale+poids coquille) pour établir les coefficients de condition:

Poids total théorique = 5,84 Poids frais +0,02

L'indice K est donc défini de manière suivante:

K=Poids frais réel/ Poids total théorique

Lorsque le coefficient K est proche de 1, les paramètres biologiques de la population restent conformes à ceux de la population de référence. Dans le cas contraire, on peut estimer une altération de la relation taille-poids due à une variation prolongée de l'état nutritionnel, sanitaire et/ou physiologique de l'individu concerné, potentiellement consécutive à une perturbation naturelle ou anthropique.

I.2.6 Analyses des isotopes stables

Après l'évaluation de leurs poids et de la taille, les échantillons ont été préparés pour la détermination de leurs signatures isotopiques.

I.2.6.1 Préparation des échantillons

Les analyses des isotopes stables de l'azote et du carbone ont été effectuées sur la totalité de la masse corporelle des invertébrés et des poissons de petite taille (athérines, épinoches, gobies, syngnathes) et sur 1 gramme (environ) de muscle dorsal des autres poissons. Jusqu'à présent et dans l'état actuel des connaissances, les valeurs d'enrichissement des muscles chez ces animaux, sont considérées comme étant représentatives de l'individu entier (Peterson et Fry, 1987).

Une série d'analyses complémentaires a été réalisée sur du tissu hépatique et du muscle d'anguille (environ 1 g) et sur du muscle et la glande digestive des cardiums afin de comparer les différences éventuelles de signatures isotopiques dans différents tissus ou organes animaux.

Pour les poissons et les crevettes, chaque échantillon représentait les tissus d'un seul individu, alors que pour les organismes de plus petite taille il a été nécessaire de les regrouper pour obtenir une quantité suffisante de matière sèche.

I.2.6.2 Détermination du taux d'hydratation des tissus

Le pourcentage en eau des tissus a été évalué grâce au rapport du poids d'un échantillon avant et après son passage à l'étuve à 105°C pendant 24h. Si l'on désigne par TF le tissu frais et TS le tissu sec, le taux d'hydratation (H) est donné par la formule :

$$H = 100 \times [1\text{-poids (TS)/poids (TF)}]$$

Les étapes principales de la préparation des échantillons pour l'analyse des isotopes stables sont représentées sur le schéma 1.1.

I.2.6.3 Délipidation des échantillons

La concentration et la composition des lipides tissulaires présentent des variations naturelles susceptibles d'influencer les signatures isotopiques des organismes aquatiques (DeNiro et Epstein, 1978), ainsi les mesures isotopiques ont été effectuées sur les échantillons de tissus secs préalablement délipidés par une méthode adaptée de celle de Folch (Folch *et al*., 1957).

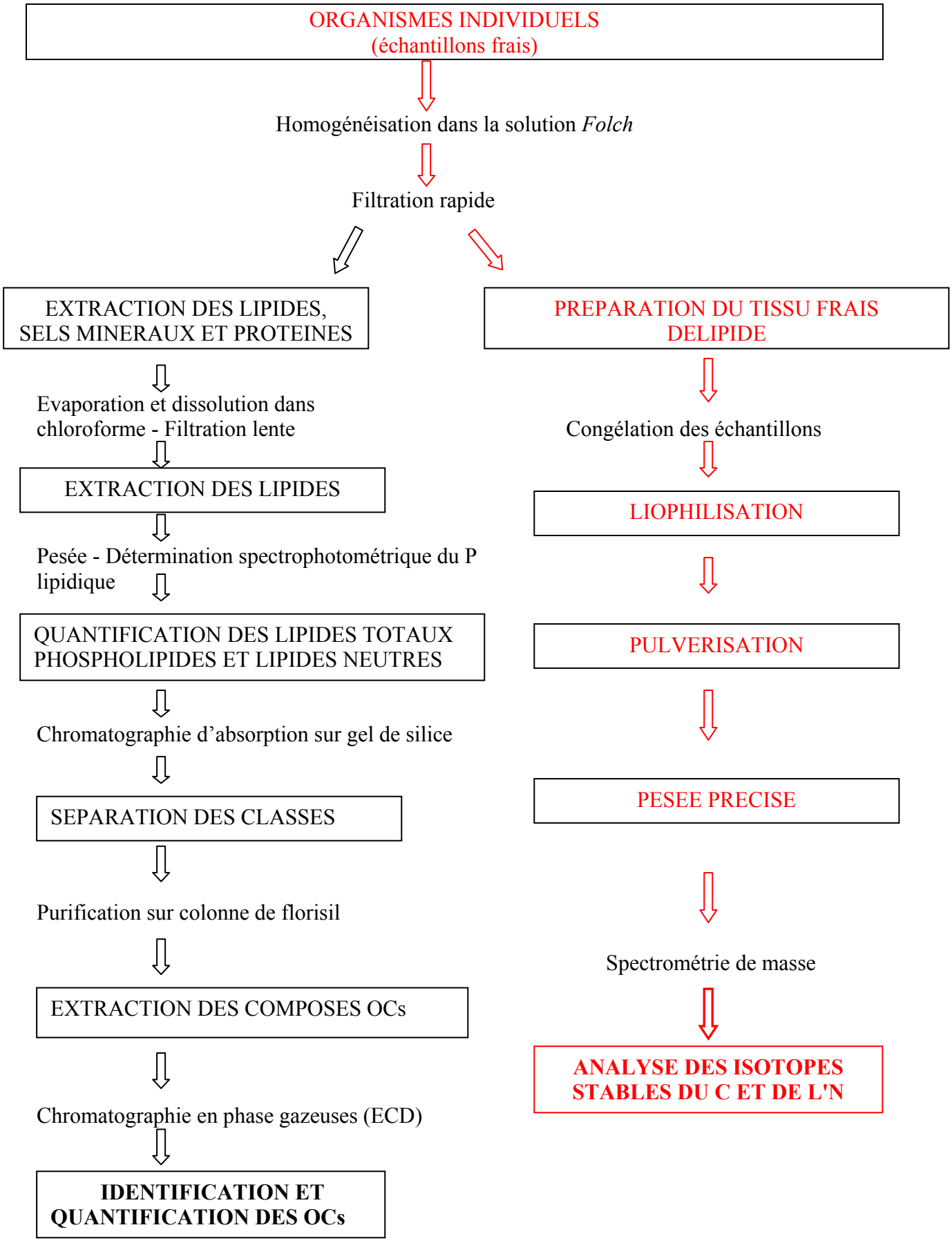


Schéma 1.1 Etapes de la préparation des échantillons pour l'analyse isotopique

Cette opération repose sur la solubilisation des graisses dans un mélange de solvants plus ou moins polaires et leur élimination par filtration.

Les tissus sont homogénéisés à l'aide d'un homogénéisateur (Polytron PT - MR 2100) dans une solution de dichlorométhane 2/méthanol 1 (v/v)) à raison de 20mL par g de tissu. Après deux heures d'extraction à température ambiante, l'homogénat est filtré sur un filtre rapide sans cendre, dégraissé et à texture lâche (∅ des particules retenues 7-12µm). Le tissu délipidé ainsi obtenu est séché pendant une nuit à 60°C et puis placé au moins 24h à -80°C dans les flacons en verre avant leur lyophilisation.

I.2.6.3a Evaluation de la teneur en lipides totaux

Le filtrat lipidique est évaporé sous vide (évaporateur rotatif R Buchi) et repris dans 10 mL de chloroforme par deux lavages successifs. Son lavage avec une solution de KCl et des solutions de méthanol de la technique originale a été remplacé par une simple filtration afin de préserver certaines substances moins hydrophobes, comme certains contaminants organiques, qui font l'objet des analyses ultérieures. Il est donc filtré sur un filtre lent sans cendre, dégraissé, à texture serrée (∅ des particules retenues 2µm) pour éliminer certaines substances hydrosolubles résiduelles (sels minéraux, acides aminés, etc). Après évaporation sous vide du solvant, la teneur en lipides totaux est évaluée par pesée et la concentration est exprimée par rapport au poids de matière sèche. Les lipides sont ensuite repris dans un solvant adéquat (chloroforme ou hexane).

I.2.6.3b Dosage des phospholipides et évaluation des lipides neutres

La quantité de phosphore lipidique dans les lipides précédemment extraits a été dosée selon une méthode standardisée basée sur celle de Fiske et Subarow (1925). Un aliquote (50µl) de la solution de lipides est séché à température ambiante puis minéralisé à chaud (2h à 120°C, 15 min à 200°C puis 1h30 à 320°C) sous l'action d'un mélange d'acide sulfurique H_2SO_4 20N et d'acide perchlorique $HCl0_4$ 11,6N.

Après minéralisation, l'ajout de 5ml d'une solution d'acide amino-naphto-sulphonique (ANSA, $C_{16}H_{13}NO_3S$) et de molybdate d'ammonium ($(NH_4)6Mo_7O_{24}$) puis une ébullition de 8 minutes révèle une coloration bleue, dont l'intensité à λ= 830 nm (spectrophotomètre UVIKON 932, Bio-tek Kontron) est proportionnelle à la teneur en phosphore. Celle-ci est multipliée par un coefficient de 27, pour les organismes aquatiques, pour obtenir la teneur en phospholipides (Zwingelstein, 1981), laquelle s'exprime en $mg.g^{-'}TS$.

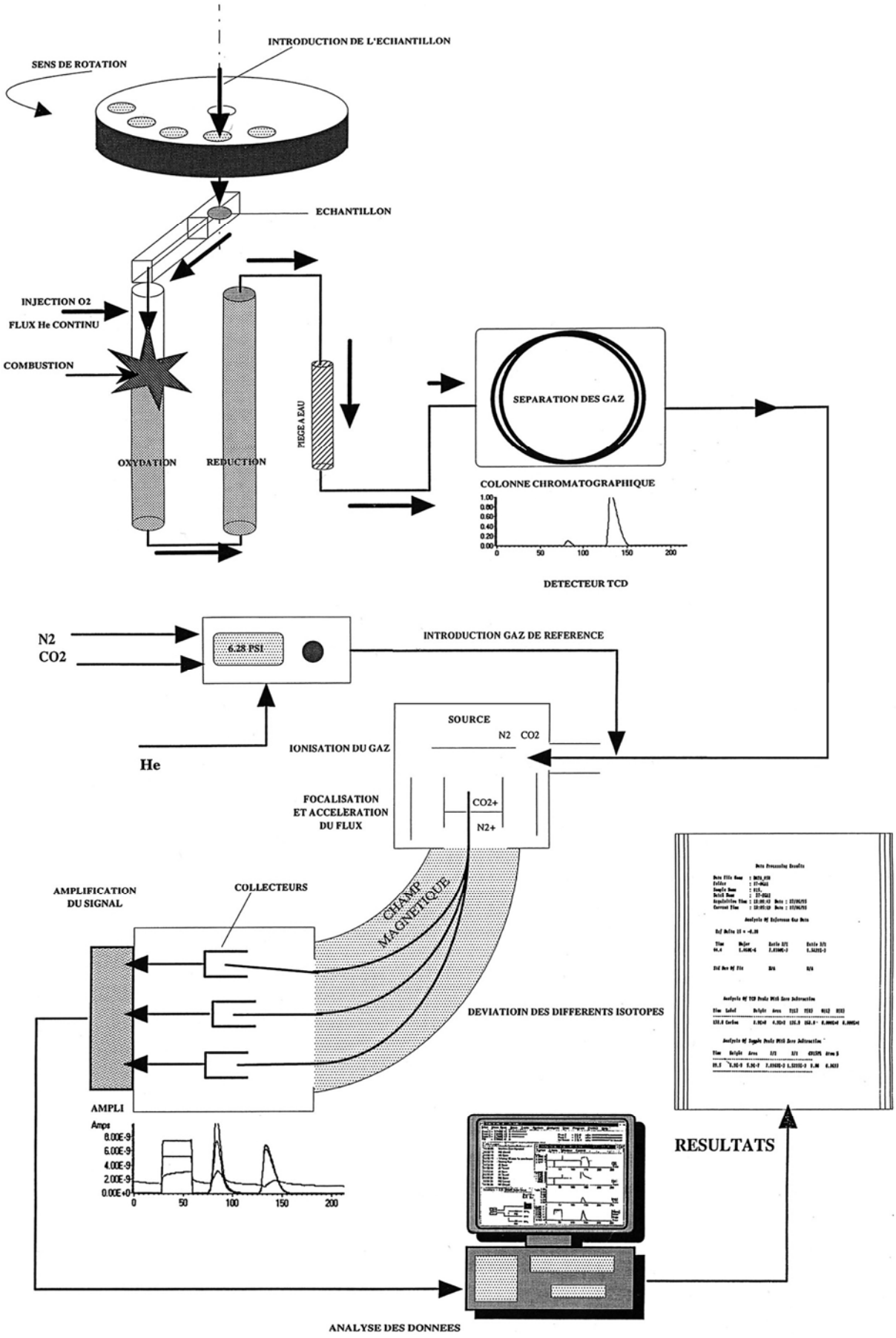


Figure 1.6 Principe et étapes de la technique CF-IRMS utilisée pour la détermination des signatures isotopiques en carbone et en azote

La quantité de lipides neutres dans les échantillons tissulaires est évaluée par différence entre la concentration en lipides totaux et celle en phospholipides.

I.2.6.4 Lyophilisation des échantillons

Les échantillons de tissu sec délipidé congelés subissent une lyophilisation de 24h à l'aide d'un lyophilisateur CHRIST. Le but de cette procédure est d'éliminer complètement l'eau par sublimation.

I.2.6.5 Pulvérisation des échantillons

Les échantillons lyophilisés sont réduits en une fine poudre à l'aide un broyeur à billes (Retch vibro-oscillant) à raison de 30 oscillations/sec pendant 2 min puis placés dans des tubes Eppendorf à l'étuve à 100°C une nuit avant d'en effectuer une pesée précise.

I.2.6.6 Pesée précise des échantillons en poudre

La dernière étape de la préparation des échantillons pour l'analyse isotopique consiste en la pesée de 1mg de chacun d'entre eux grâce à une balance dédiée à cette opération (METTLER) dont la précision est de 10^{-2} mg. Cette masse a été choisie en se basant sur le fait que 1 mg de tissu sec pulvérisé contient une quantité relativement constante d'azote puisque les animaux renferment environ 10-15% d'azote.
Les échantillons sont ensuite placés dans une capsule étanche en étain (3.3 x 5 mm) pour l'analyse isotopique par spectrométrie de masse.

I.2.7 Mesure des rapports isotopiques

Les mesures des rapport isotopiques sont réalisées par *Continuous Flow Isotope Ratio Mass Sectrometry* (CF-IRMS) dans le laboratoire de l'Institut de Biotechnologie des Plantes à Orsay, au moyen d'un spectromètre de masse (VG OPTIMA, Model NA-1500, Carlo Erba).
Le principe de la CF-IRMS est de séparer par spectrométrie de masse les isotopes de carbone ou de l'azote à l'état gazeux. La description détaillée de cette technique très performante est présentée dans la Figure 1.6.
Deux mesures d'isotopes lourds d'azote et de carbone sont effectuées dans deux sous-échantillons.

I.2.7.1 Unités de mesure

Les mesures de la composition isotopique d'un échantillon ne donnent pas la quantité exacte de chacun des isotopes dans l'échantillon, mais leur rapport. Cette valeur permet ensuite de calculer une différence relative entre le rapport isotopique de l'échantillon et le rapport isotopique d'un échantillon standard utilisé comme référence :

$$\delta^{13}C \text{ ou } \delta^{15}N \text{ (‰)} = [(R_{échantillon}/R_{standard})-1] \times 1000$$

où R est le rapport $^{13}C/^{12}C$ ou $^{15}N/^{14}N$.

Par convention internationale, les valeurs du δ sont, donc, exprimées par rapport à un standard dont le δ est arbitrairement fixé à zéro.

Pour le carbone, le standard est le Pee Dee Belemite, carbonate de calcium d'un fossile calcaire de la formation crétacée de Pee Dee en Caroline du Sud. Ce fossile est très riche en ^{13}C et en conséquence le $\delta^{13}C$ des autres échantillons naturels sont négatifs.

Pour l'azote, le standard utilisé est l'azote atmosphérique (N_2).

I.2.7.2 Précision des mesures

Des réplicats de «références», l'acide glutamique pour le carbone et l'atropine pour l'azote permettent d'évaluer les marges d'erreur qui sont de 0,2‰ pour le carbone et 0,3‰ pour l'azote.

I.2.8 Détermination du niveau trophique par mesure du $\delta^{15}N$

La détermination du niveau trophique (NT) des animaux par la mesure du $\delta^{15}N$ est basée sur les mécanismes de fractionnement isotopique et ses conséquences sur les rapports isotopiques entre les aliments et leurs consommateurs (Minagawa et Wada, 1984). En se basant sur un taux d'enrichissement moyen en $\delta^{15}N$ entre les proies et leurs prédateurs, le niveau trophique d'un organisme peut être calculé par la formule suivante (Hobson et Welch, 1992):

$$NT = \lambda + (\delta^{15}N_{\text{ organisme analysé}} - \delta^{15}N_{\text{ organisme à la base du réseau trophique}})/X$$

où λ est le niveau trophique des organismes à la base du réseau trophique et X représente le taux moyen d'enrichissement par niveau trophique dans le réseau trophique considéré.

I.2.9 Analyse statistique

L'interprétation des résultats a été basée sur l'analyse statistique rigoureuse des données biologiques. Dans le cas où les données suivent une distribution normale de leurs fréquences selon une courbe de Gauss (la répartition des mesures biologiques telles que la biométrie, la constitution biochimique tissulaire ou les activités enzymatiques), les résultats sont exprimés par la moyenne ± erreur standard à la moyenne ou par la moyenne géométrique. En revanche, les teneurs tissulaires en micropolluants OCs suivent fréquemment une distribution log-normale et les résultats sont exprimés par les moyennes géométriques ou les médianes et représentés dans des box-plots en accord avec les études précédentes (Buet, 2002).

Grâce au nombre important d'individus échantillonnés, la démonstration statistique des effets recherchés sur ces individus a été réalisée le plus souvent à l'aide de tests paramétriques. Ainsi, les comparaisons entre les séries de données ont été effectuées à l'aide du test t de Student (pour séries non appariées) après vérification de l'indépendance des variances par une ANOVA. Les variations ont été considérées comme significatives lorsque la valeur de *p* était inférieure à 0,05 (le test présentait une probabilité supérieure à 95%).
Les analyses de corrélations (analyses bivariées) entre les variables étudiées (paramètres biologiques et contamination) ont été réalisées grâce au test de Pearson et seules les analyses assurant une probabilité supérieure à 95% ont été prises en compte.

Dans le cas où l'effectif d'échantillons était réduit, les tests non paramétriques ont été utilisés. Il s'agit du test U de Mann-Whitney qui a été appliqué pour comparer 2 groupes composés d'individus différents et du test de Wilcoxon pour des données appariées chez un même individu. Le test de Spearman a été utilisé pour mettre en évidence d'éventuelles relations entre deux variables.

L'analyse statistique des résultats a été réalisée grâce au logiciel de statistique Statview 5 équipant un micro-ordinateur MacIntosh.

I.3. RESULTATS

Les analyses des isotopes stables du C et de l'N ont été effectuées sur 294 échantillons représentant 16 espèces aquatiques (poissons, invertébrés et zooplancton) collectés dans l'étang de Vaccarès au cours des années 2001 et 2002 et 65 échantillons de 3 espèces aquatiques prélevées dans les canaux de drainage en avril 2003. Afin de mieux représenter la communauté animale de ces écosystèmes aquatiques, le choix des espèces a été originalement basé sur les Rapports de Biodiversité issus des Suivis Scientifiques de la Réserve Nationale de Camargue de 2001 et 2002. Cependant l'échantillonnage des espèces analysées a dû également prendre en compte le succès de capture des pêcheurs et du personnel autorisés, et concerne donc les espèces les plus stables et les plus courantes dans cette aire protégée.
La régularité des échantillonages présente nécessairement une variabilité liée aux aléas des sites de collecte dépendants eux-mêmes des conditions climatiques. Ainsi nous avons été confrontés, selon l'espèce et la saison de capture, à un certain déséquilibre dans l'effectif de quelques lots pouvant aller d'un nombre réduit d'échantillons jusqu'à l'absence de certaines séries (par exemple l'absence des prélèvements hivernaux).

I.3.1 Variation de la composition isotopique liée au type de tissu analysé

Le fractionnement isotopique du carbone et de l'azote dépend d'une sélectivité métabolique impliquée dans quasiment toutes les réactions biochimiques. Les signatures isotopiques des organismes ($\delta^{15}N$ et $\delta^{13}C$) qui en résultent sont donc liées à l'activité métabolique qui varie significativement entre les tissus.

Afin d'évaluer la variation potentielle de la composition isotopique liée au type de tissu analysé, nous avons comparé les rapport isotopiques, $\delta^{15}N$ et $\delta^{13}C$, du muscle et du foie chez les anguilles et du manteau musculaire et des glandes digestives chez les cardiums.
Sur un nombre réduit d'individus (6 anguilles et 6 cardiums) une variation significative du $\delta^{15}N$ est observée entre les différents tissus (test de Wilcoxon: p= 0,04 pour les anguilles et p= 0,07 pour les cardiums). Ainsi, chez les anguilles, les valeurs sont significativement plus élevées dans le tissu musculaire que dans le tissu hépatique. Il en est de même chez les cardiums.
A l'opposé, aucune variation significative du $\delta^{13}C$ n'est observée ni chez les anguilles ni chez

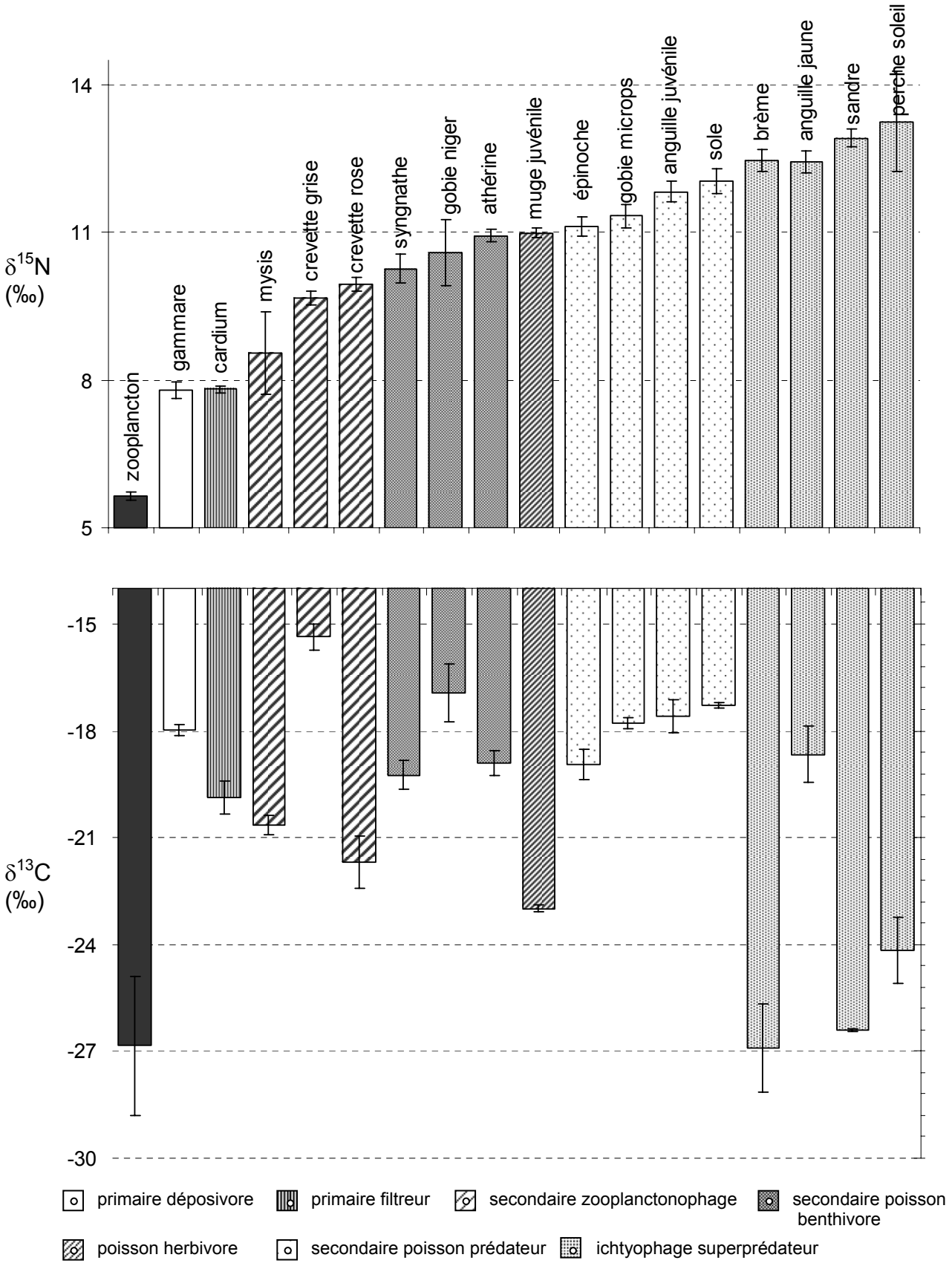


Figure 1.7 Signatures isotopiques des espèces dominantes du réseau trophique de l'étang de Vaccarès

les cardiums dont les niveaux sont homogènes.

I.3.2 Variation de la composition isotopique liée au site de prélèvement

Lors de la campagne de prélèvement d'avril 2002 dans l'étang de Vaccarès, des gobies, des épinoches et des syngnathes ont été collectés parallèlement dans les deux sites La Capelière et Mornès. Les valeurs de $\delta^{15}N$ et $\delta^{13}C$ des organismes ont été mesurés et comparés (Tableau 1.4). Alors que les épinoches et les syngnathes ne montrent pas de variation inter-site, le $\delta^{15}N$ des gobies prélevés à Mornès est significativement différent (test U de Mann Withney) de celui des gobies de La Capelière et le $\delta^{13}C$ a suivi un schéma identique.
En se basant sur les différences inter-sites ainsi caractérisées, la suite de notre étude a concerné exclusivement les organismes capturés à La Capelière afin d'éliminer un facteur de variabilité supplémentaire.

	$\delta^{15}N$ (‰)		$\delta^{13}C$ (‰)	
	La Capelière	Mornès	La Capelière	Mornès
G. aculeautus (5,5)	11,7 [9,9-13,9]	10,7 [10,3-12,1]	-18,7 [-22,5 - -17,4]	-18,3 [-19,8 - -15,9]
Pomatoshistus sp. (5,5)	11,9 [11,5-12,3]	9,8 [8,9-11,9]	-18,4 [-19,0 - -18,0]	-17,6 [-17,9- -15,3]
S. acus (1,5*)*	11,8	9,8 [8,8-10,3]	-21,5	-18,1 [-21,22 - -17,7]

Tableau 1.4 Signatures isotopiques des épinoches, des gobies et des syngnathes prélevés à Mornès et à La Capelière

I.3.3 Signatures isotopiques des organismes aquatiques collectés dans l'étang de Vaccarès

I.3.3.1 Composition isotopique des espèces

Les rapports isotopiques de l'azote ($\delta^{15}N$) et du carbone ($\delta^{13}C$) calculés pour chaque espèce sont présentés sur la Figure 1.7, qui fait état des variations intra- et inter-spécifiques. Pour cette représentation graphique, les espèces ont été classées dans un ordre présomptif basé sur une conception classique des emplacements trophiques. La méthodologie isotopique mise en œuvre devrait confirmer ou infirmer ce classement.
Les mesures de $\delta^{15}N$ sont comprises entre 5,7±0,1‰ pour le zooplancton et 13,4±1,0‰ pour la perche soleil et révèlent un accroissement régulier avec le niveau trophique présumé. Les mysis, les gobies niger et les perches-soleil montrent une plus grande variabilité intraspécifique que les autres organismes, mais, d'une manière générale, celle-ci est

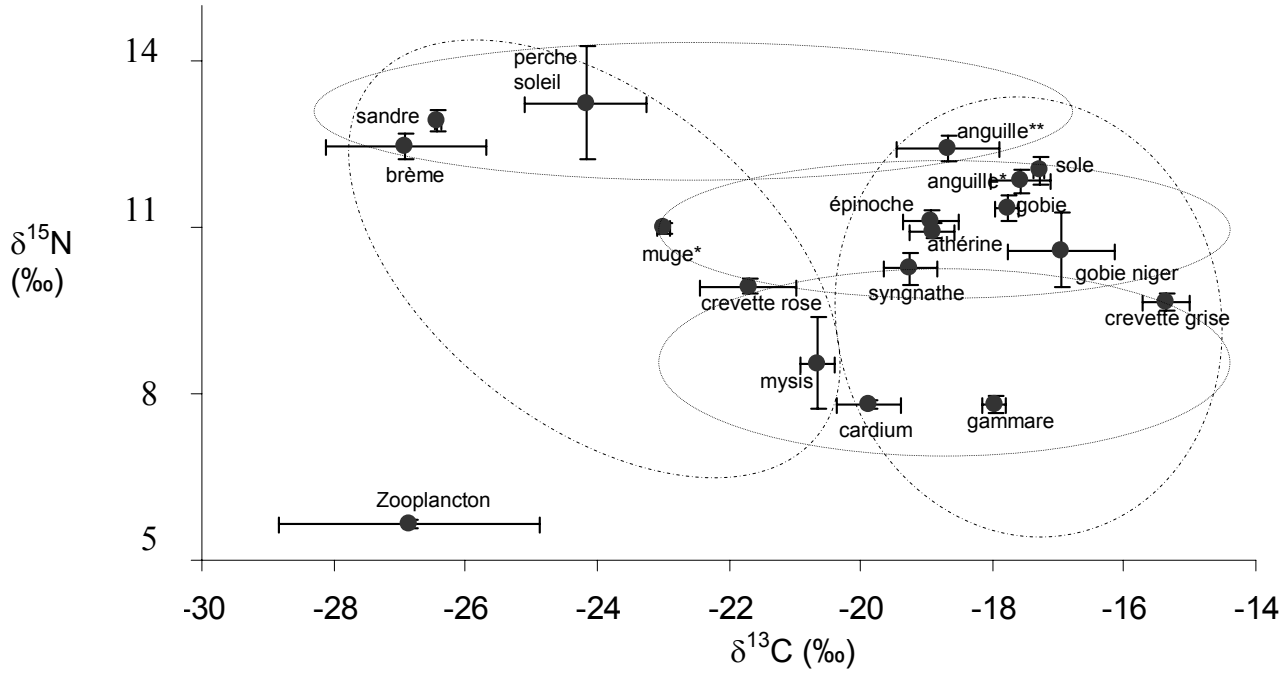


Figure 1.8 Distribution des espèces de Vaccarès dans deux niches écologiques (benthique et pélagique) à la base des signatures $\delta^{13}C$ et dans 3 compartiments trophiques à la base des signatures $\delta^{15}N$ (*juvénile, **jaune)

relativement réduite comme l'indique la faiblesse des écarts à la moyenne (entre 0,1 et 1,0‰) et la rareté des valeurs extrêmes.

Le $\delta^{13}C$ est compris entre -15,4±0,4‰ pour la crevette grise et -26,9±1,2‰ pour la brème. Contrairement au $\delta^{15}N$, son évolution le long de la chaîne trophique supposée est irrégulière. La variabilité entre les individus d'une même espèce est plus prononcée et les valeurs extrêmes sont plus nombreuses. Cependant, les erreurs standards restent dans un interval limité de 0,04‰ pour la sole à 0,9‰ pour la perche soleil. Le $\delta^{13}C$ du zooplancton (-26,9±1,9‰) peut être considéré comme un « artéfact » car, en raison de la faible quantité de matériel biologique, il n'a pas été possible de lui faire subir le traitement de délipidation préalable à l'analyse des isotopes du carbone.

Sur l'ensemble des données, il n'existe aucune corrélation significative entre le $\delta^{15}N$ et le $\delta^{13}C$ (r^2=-0,054, *p*=0,36 n=283) ce qui signifie que ce réseau trophique est « non linéaire ». Cependant, il n'est pas inhabituel que des espèces de positionnement trophique similaire se nourrissent de proies différentes, car ils appartiennent à des écotopes différents (pélagique/benthique) au sein du même réseau trophique. En effet, le facteur $\delta^{13}C$ peut être utilisé comme indicateur de la source de carbone primaire et permet de distinguer deux groupes - les espèces pélagiques ($\delta^{13}C$ <-20) et les espèces benthiques ($\delta^{13}C$ >-20) - dans le réseau trophique du Vaccarès.

La Figure 1.8 montre simultanément la distribution des espèces du Vaccarès à la fois dans deux écotopes distincts et dans trois compartiments trophiques.

I.3.3.2 Classification par guildes trophique

Les signatures isotopiques permettent de regrouper les organismes examinés dans 7 guildes trophiques différentes dont la définition est basée sur la nature des proies consommées et sur le comportement alimentaire. Ces catégories trophiques se définissent ainsi: -les phytoplanctonophages (le zooplancton) les déposivores (les gammares) et les filtreurs (les cardiums) primaires, -les zooplanctonophages secondaires (les crevettes et les mysis), -les poissons « herbivores » (muge juvénile), -les poissons benthivores (les gobies niger, les athérines, les syngnathes) et -les poissons prédateurs secondaires (les épinoches, les autres gobies, les anguilles juvéniles, les soles) et enfin les poissons ichtyophages superprédateurs (les brèmes, les anguilles jaunes, les sandres et les perches).

Malgré une variabilité interne, les valeurs moyennes de $\delta^{15}N$ augmentent significativement ($p<0.0001$) d'une guilde à l'autre (Figure 1.9). Les seules exceptions sont les filtreurs et les

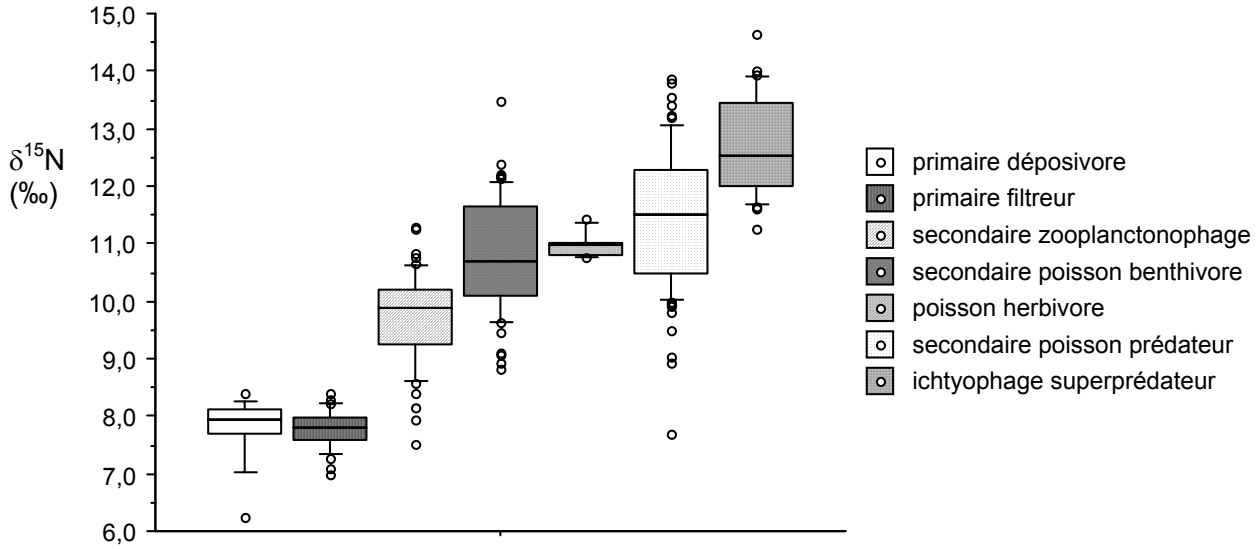


Figure 1.9 Valeurs de $\delta^{15}N$ dans les guildes trophiques de l'étang de Vaccarès

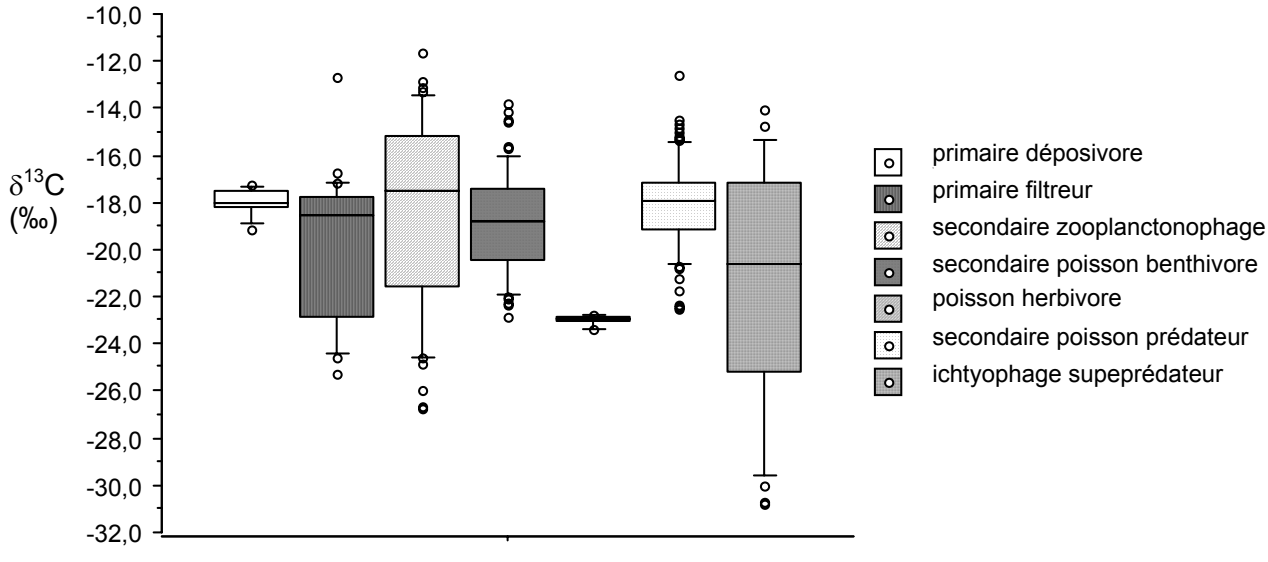


Figure 1.10 Valeurs de $\delta^{13}C$ dans les guildes trophiques de l'étang de Vaccarès

déposivores, dont les signatures isotopiques coïncident (7,8±0,1‰) suggérant qu'ils ont un emplacement trophique identique ou très proche, et les poissons « herbivores » qui présentent des valeurs intermédiaires entre les poissons benthivores et les prédateurs. Cependant cette guilde est représentée par une seule espèce, le muge, qui occupe une situation particulière au sein de l'écosystème du Vaccarès. Cette espèce est préférentiellement herbivore (consommateur primaire), mais au stade juvénile, sous lequel on le rencontre dans cet étang, il se nourrit également de microinvertébrés et de larves d'insectes. En conséquence, en terme de signature en $\delta^{15}N$ (10,9±0,1‰) il ne diffère pas significativement des consommateurs secondaires.

Le profil d'évolution des valeurs moyennes en $\delta^{13}C$ le long des différentes guildes trophiques ne correspond pas à la progression manifestée par les valeurs spécifiques en $\delta^{15}N$ (Figure 1.10). Une forte variabilité intra-guilde, notamment chez les zooplanctonophages primaires et les ichtyophages superprédateurs, confirme, encore une fois, un classement de certaines espèces dans le même emplacement trophique et dans des écotopes différents, afin de mieux utiliser la totalité du biotope à disposition et éventuellement de diminuer la compétition pour les sources disponibles.

I.3.3.3 Enrichissement isotopique et les niveaux trophiques

Dans un premier temps, la totalité des enrichissements en ^{15}N entre deux espèces capturées dans des conditions identiques (saison, site) a été évaluée sans tenir compte des connaissances élémentaires sur les relations proies-consommateurs. Il est admis que dans des écosystèmes aquatiques la déviation du rapport isotopique ^{15}N /^{14}N entre 2 espèces de niveau trophique successif est compris entre 3 et 4‰. La moyenne des taux d'enrichissement isotopique (inclus dans l'intervalle entre 2,11 et 4,45) pour l'ensemble des espèces analysées de l'écosystème du Vaccarès est 3,20±0,14‰ (Tableau 1.5). Ces relations trophiques ont ensuite été comparées aux données obtenues par l'analyse des contenus stomacaux, les données bibliographiques et les observations des « utilisateurs locaux ». Ce taux d'enrichissement moyen est le plus souvent conforme aux habitudes alimentaires connues des espèces, mais il a mis en évidence d'autres liens trophiques plausibles et d'autres moins logiques. En effet, parfois le taux d'enrichissement moyen suggère une liaison trophique entre deux espèces qui, en principe, ne connaissent pas de relation alimentaire; due à une présence saisonnière décalée (par exemple le couple *Crangon crangon* et *Lepomis gibbosus*) elles appartiennent potentiellement à deux chaînes trophiques différentes.

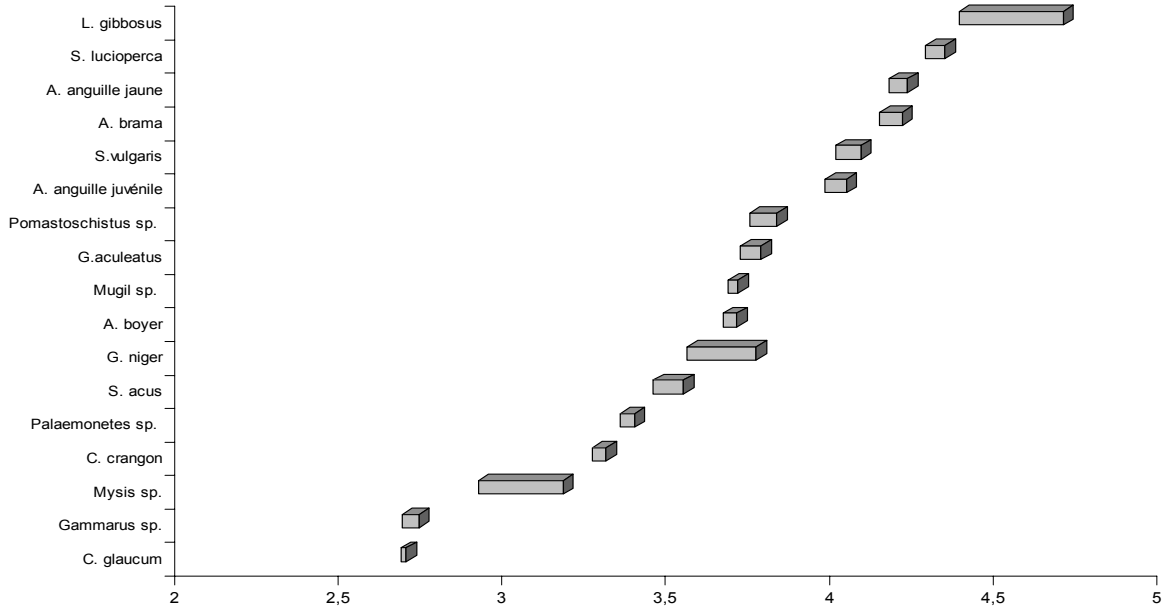


Figure 1.11 Niveaux trophiques des organismes camarguais calculés à la base de signatures $\delta^{15}N$

Couple d'espèces	**Enrichissement en $\delta^{15}N$ (‰)**
brème, crevette rose	2,11
cardium, crevette rose	2,14
athérine, perche soleil	2,25
muge juvénile, perche soleil	2,26
anguille jaune, syngnathe	2,33
brème, crevette grise	2,44
crevette rose, gammare	2,44
perche soleil, syngnathe	2,63
anguille jaune, crevette rose	2,64
cardium, gobie niger	2,68
anguille jaune, crevette grise	2,90
cardium, muge juvénile	2,97
cardium, syngnathe	2,99
athérine, gammare	3,01
athérine, cardium	3,02
cardium, épinoche	3,12
gammare, syngnathe	3,23
crevette rose, perche soleil	3,41
épinoche, gammare	3,48
cardium, gobie	3,73
gammare, muge juvénile	3,77
anguille juvénile, gammare	3,89
gammare, sole	3,92
cardium, sole	3,99
crevette grise, perche soleil	4,06
gammare, gobie	4,26
anguille juvénile, cardium	4,34
brème, gammare	4,40
brème, cardium	4,40
Taux moyen d'enrichissement isotopique par niveau trophique	**3,2±0,14**

Tableau 1.5 Taux moyen d'enrichissement isotopique par niveau trophiques dans l'écosystème de l'étang de Vaccarès calculé à partir des enrichissements en ^{15}N, compris entre 2,11 et 4,5‰, entre les espèces du réseau trophique

L'enrichissement en $\delta^{13}C$ s'est révélé moins éloquent (1,2 ± 0,18‰) en accord avec les réserves mentionnées précédemment qui concernent surtout l'influence des protéines, des lipides et des carbohydrates sur le taux d'enrichissement en ^{13}C (Wada *et al*., 1987). C'est la raison pour laquelle nous avons focalisé notre attention sur l'étude des isotopes stables de l'azote pour estimer les niveaux trophiques des espèces analysées.

Grâce aux signatures $\delta^{15}N$ des organismes et au taux d'enrichissement moyen, nous avons pu calculer le niveau trophique de chaque organisme examiné d'après la formule suivante :

$$\text{Niveau trophique (NT)} = \lambda + (\delta^{15}N_{\text{organisme analysé}} - \delta^{15}N_{\text{organisme à la base du réseau trophique}})/3{,}20$$

avec λ=2, qui correspond à la position trophique du zooplancton considéré comme le $\delta^{15}N$ à la base du réseau trophique; $\delta^{15}N_{\text{organisme analysé}}$ mesuré directement, et 3,20, le taux moyen d'enrichissement isotopique par niveau trophique calculé pour les écosystèmes de l'étang de Vaccarès.

Comme le montre la Figure 1.11, les niveaux trophiques des espèces collectées dans le Vaccarès au cours de cette étude vont de 2 pour le zooplancton à 4,44 pour la perche soleil. D'une manière générale, les niveaux trophiques calculés s'accordent avec les emplacements et les guildes trophiques présumées. Ainsi il est possible d'attribuer aux consommateurs primaires, secondaires et tertiaires des classes de niveau trophique croissant, soit 2 et 3, 3 à 4 et supérieur à 4, respectivement.

I.3.4 Réseau trophique aquatique de l'étang de Vaccarès

D'après les données théoriques intégrées à notre analyse des signatures isotopiques des espèces dominantes, nous avons réalisé un schéma rapportant les relations en accord avec les données sur les habitudes alimentaires et les relations définies uniquement par un taux d'enrichissement proche de 3,2‰ indépendamment des liens alimentaires. La Figure 1.12 présente donc la structure trophique des réseaux aquatiques de l'étang de Vaccarès.

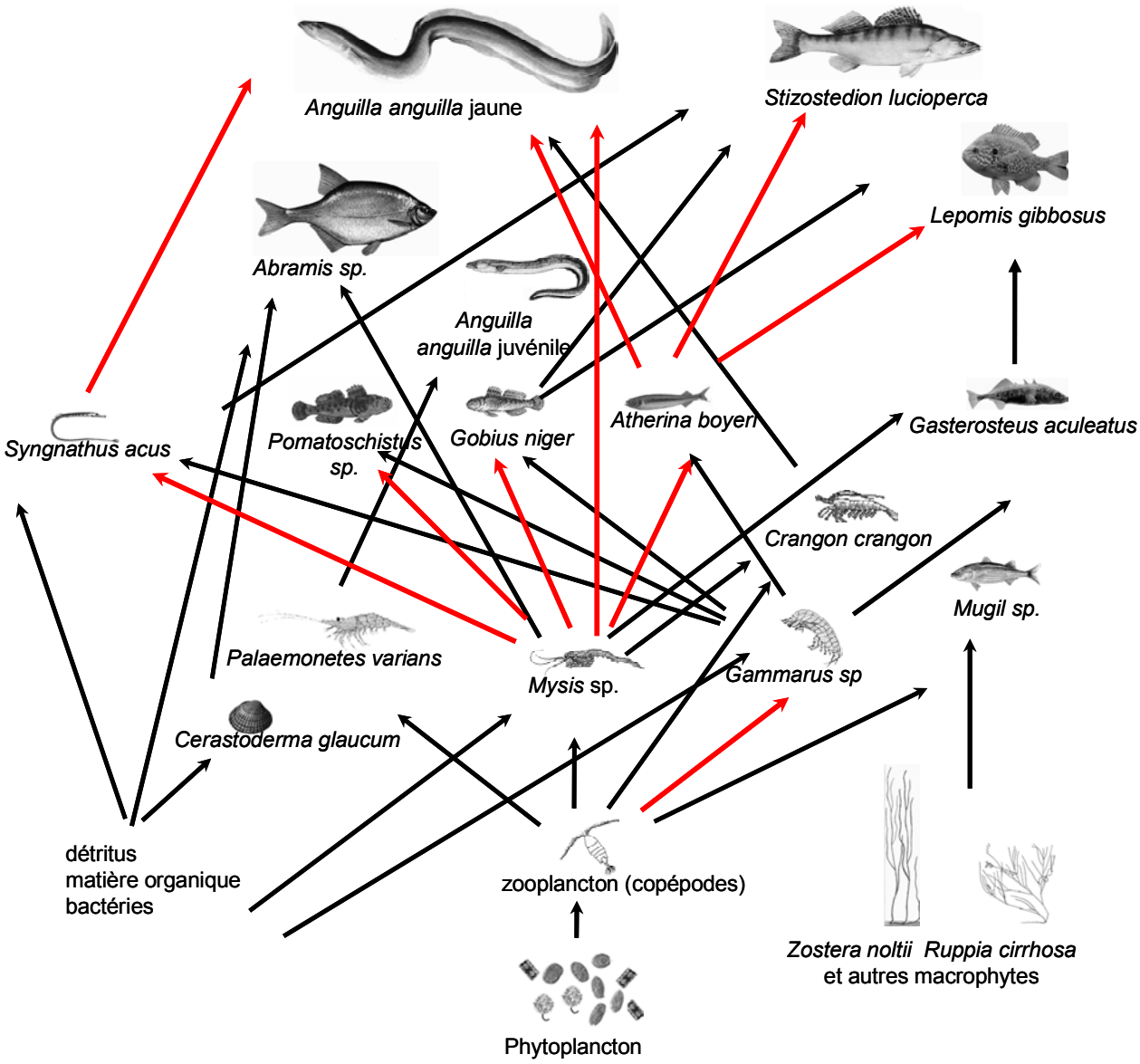


Figure 1.12 Représentation schématique des relations trophiques entre les espèces de l'étang de Vaccarès basée - sur les analyses des contenus stomacaux, les données bibliographiques et les observations professionnelles, confirmées par les analyses de $\delta^{15}N$ ⟶
- sur l'information apportée par le taux moyen d'enrichissement en ^{15}N (3,2‰) ⟶ (modifié de Persic et al., 2004).

I.3.5 Evolution des signatures isotopiques des organismes

I.3.5.1 Variations annuelles

L'évolution annuelle des signatures isotopiques a été étudiée chez 3 espèces parmi les plus fréquentes dans le Vaccarès au cours d'un cycle biannuel. Il s'agit des anguilles (juvéniles et jaunes), des athérines et des cardiums, représentant respectivement les poissons ichtyophages super-prédateurs, les poissons prédateurs secondaires, les poissons benthivores secondaires et les filtreurs primaires.

A l'exception des athérines dont la valeur moyenne annuelle a significativement diminué en 2002 par rapport à 2001 (11,3±0,2 et 10,6±0,2‰, respectivement; p=0,002), il ressort de cette analyse la mise en évidence d'une grande stabilité du $\delta^{15}N$ (Figure 1.13).

Cette stabilité s'observe aussi chez les copépodes en dépit de la difficulté matérielle qu'entraîne leur petite taille pour multiplier les échantillonnages. La comparaison de deux pools de zooplancton pour les deux années expérimentales a montré l'absence de variation annuelle des signatures isotopiques chez les espèces les plus stables de l'étang considéré.

Une absence d'évolution annuelle a été également relevée pour les signatures $\delta^{13}C$ (Figure 1.14) des 3 espèces étudiées, avec cependant quelques réserves, en raison de l'extrême variabilité des données.

I.3.5.2 Variations saisonnières aux niveaux des espèces et des guildes trophiques

D'une manière générale, les variations des processus métaboliques impliqués dans la biologie et la physiologie des organismes aquatiques dépendent fortement des conditions environnementales et donc directement de la saison de prélèvement. C'est la raison pour laquelle nous nous sommes particulièrement intéressés aux variations saisonnières des profils isotopiques.

La Figure 1.15 montre le profil du $\delta^{15}N$ chez 7 espèces aquatiques (l'anguille, le gobie, l'épinoche, l'athérine, la crevette rose, la crevette grise et le cardium) collectées au cours d'un cycle annuel dans l'étang de Vaccarès. Les prélèvements hivernaux n'ont pas été réalisés à cause des mauvaises conditions météorologiques. Les prélèvements ont été effectués aux saisons suivantes : l'automne 2001, le printemps, l'été et l'automne 2002. Malgré quelques difficultés d'échantillonnage, les résultats démontrent l'existence d'une variation saisonnière qui se révèle plus ou moins significative selon les saisons et les espèces considérées. Ainsi les signatures $\delta^{15}N$ des cardiums différent significativement ($p<0,001$) d'une saison à une autre,

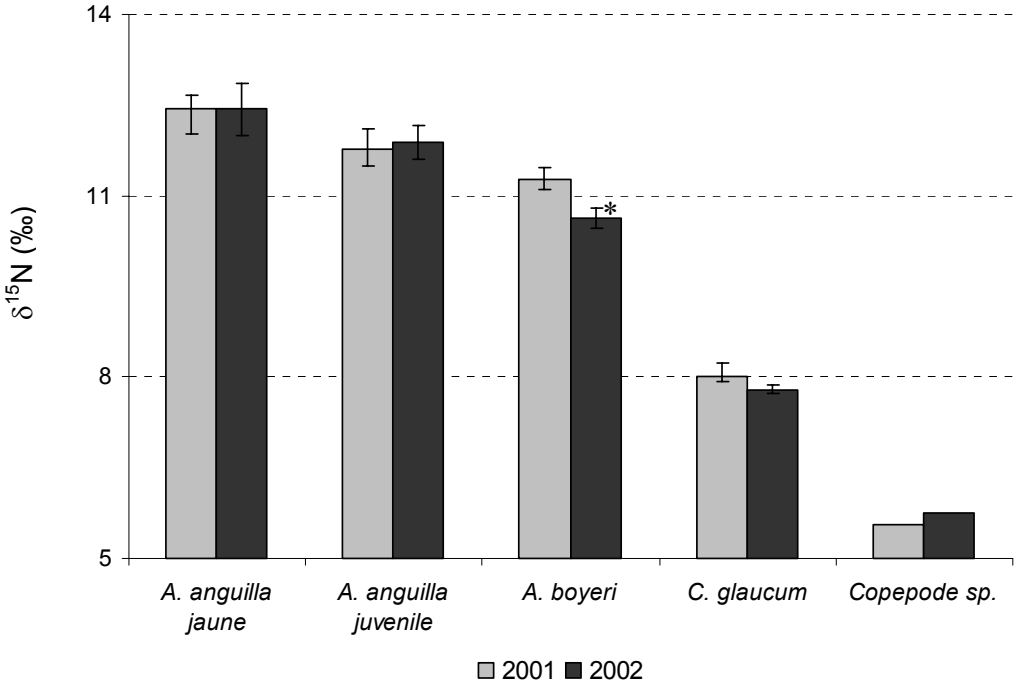


Figure 1.13 Variations annuelles en $\delta^{15}N$ chez les poissons, bivalves et copépodes du Vaccarès (* variation significative ($p \leq 0.05$) entre les niveaux d'imprégnation en 2001 et 2002 ; 2 pools<n<47 individus cf. Tableau 1.3)

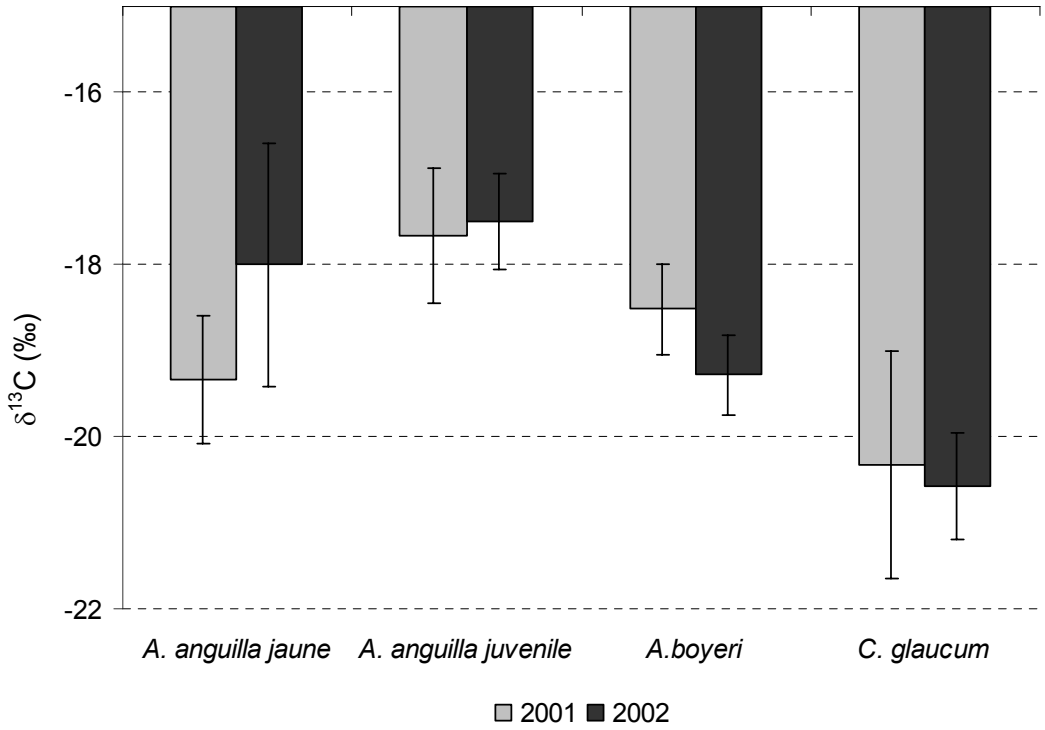


Figure 1.14 Variations annuelles en $\delta^{15}N$ chez les poissons, bivalves et copépodes du Vaccarès (2 pools<n>47 individus cf. Tableau 1.3)

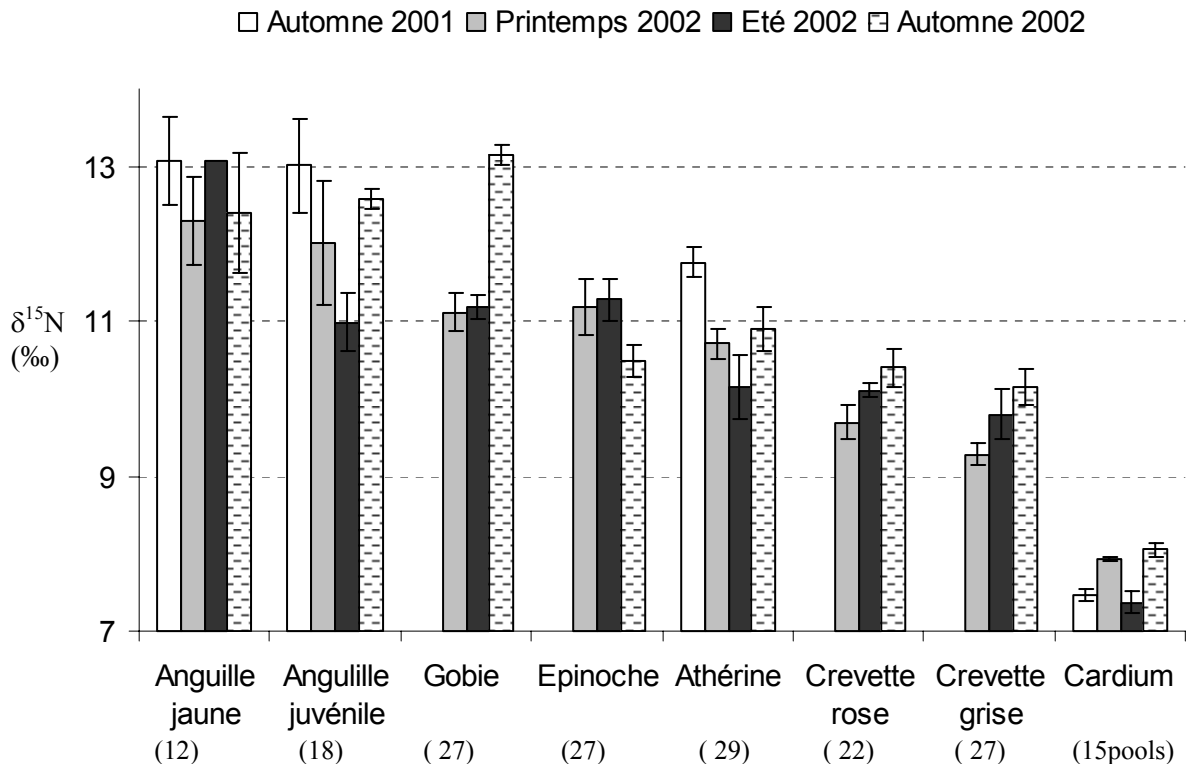


Figure 1.15 Variations saisonnières des signatures en $\delta^{15}N$

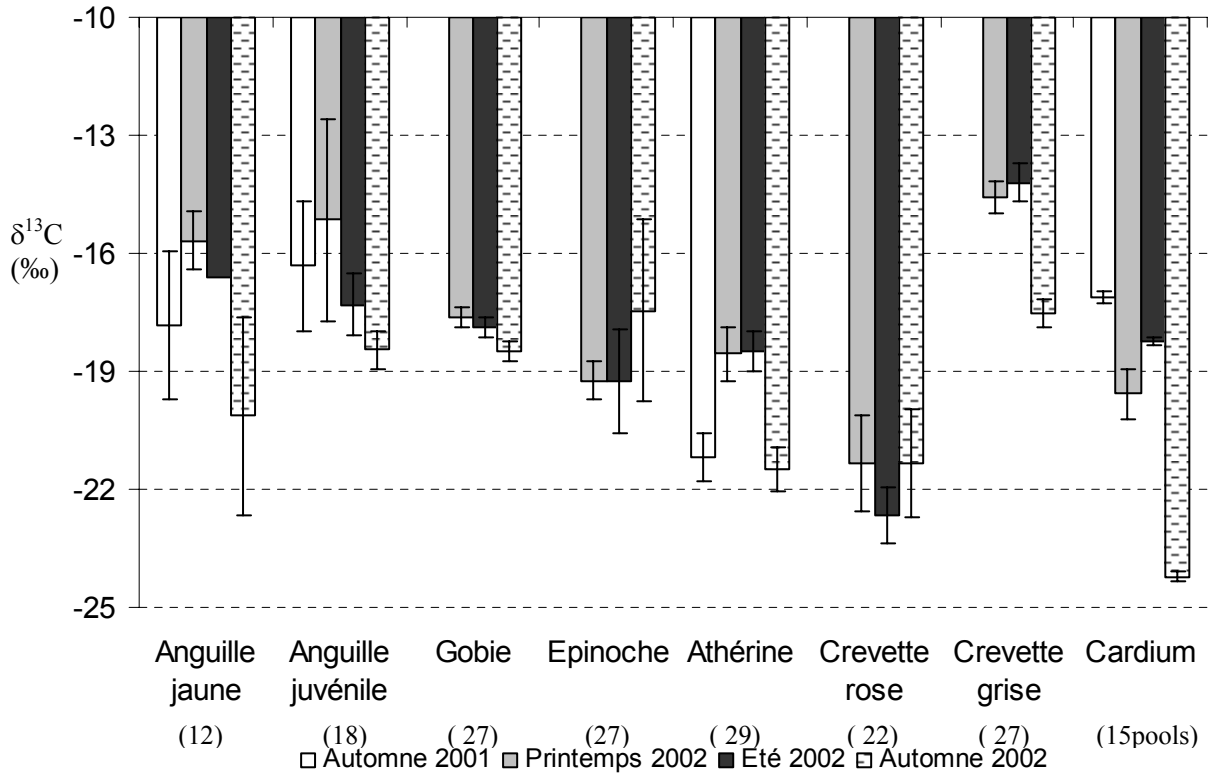


Figure 1.16 Variations saisonnières des signatures en $\delta^{13}C$

en présentant des fluctuations très régulières autour de la valeur moyenne (7,8 ±0,1‰). Une variation moins significative ($p<0,05$) à été observée chez les athérines et les anguilles juvéniles mais à des saisons différentes ; elles se traduisent par une diminution significative du $\delta^{15}N$ entre l'automne 2001 (11,8±0,2‰) et le printemps 2002 (10,7± 0,2‰) chez les athérines, et chez les anguilles juvéniles une augmentation significative entre l'été 2002 (10,9±0,4‰) et l'automne 2002 (12,6±0,1‰). Les gobies ont montré une évolution différente: après une phase extrêmement homogène, pendant le printemps et l'été 2002, la signature en $\delta^{15}N$ a augmenté très significativement ($p<0,0001$) en automne 2002 pour atteindre le niveau des superprédateurs. (13,2 ± 0,3‰).

En ce qui concerne les profils saisonniers du $\delta^{13}C$, une tendance à une diminution en automne 2002 a été observée chez de nombreuses espèces, de manière significative ($p<0,001$) chez les cardiums, les crevettes grises et les athérines. Chez les épinoches et les crevettes roses, les signatures $\delta^{13}C$ n'ont pas varié significativement (Figure 1.16).

Les schémas d'évolution saisonnière des espèces s'accordent aux variations saisonnières des guildes trophiques auxquelles elles appartiennent (Figure 1.17). Si l'on considère le profil saisonnier des signatures $\delta^{15}N$ en regroupant les espèces dans les guildes trophiques correspondantes, on remarque une évolution intra-guilde régulière mais différente selon les guildes (Figure 1.18). Les filtreurs et les superprédateurs présentent des fluctuations régulières autour les valeurs moyennes mais de sens opposé. En revanche, les consommateurs secondaires (les zooplanctonophages, les poissons benthivores et prédateurs) présentent une évolution saisonnière cyclique, avec une diminution des valeurs de l'automne 2001 au printemps 2002, une stabilité entre le printemps et l'été 2002 et une ré-augmentation en automne 2002. Naturellement, puisque les données d'automne 2001 pour les zooplanctonophages ne sont pas disponibles, cette observation reste partiellement hypothétique.

De plus, même si les différences isotopiques diminuent entre les poissons prédateurs et superprédateurs en automne 2001 et 2002, et entre les zooplanctonophages et benthivores au printemps et en été 2002, nos résultats indiquent une relative stabilité dans le temps de la structure trophique aquatique de l'étang de Vaccarès. S'il existe des exceptions, elles sont probablement dues à la physiologie de l'espèce ou de l'individu analysé.

En termes d'évolution saisonnière des signatures $\delta^{13}C$ dans les différentes guildes trophiques, deux types de variation sont mises en évidence: cyclique et fluctuante autour de la valeur moyenne (Figure 1.19). Le premier a été observé chez les superprédateurs, les poissons

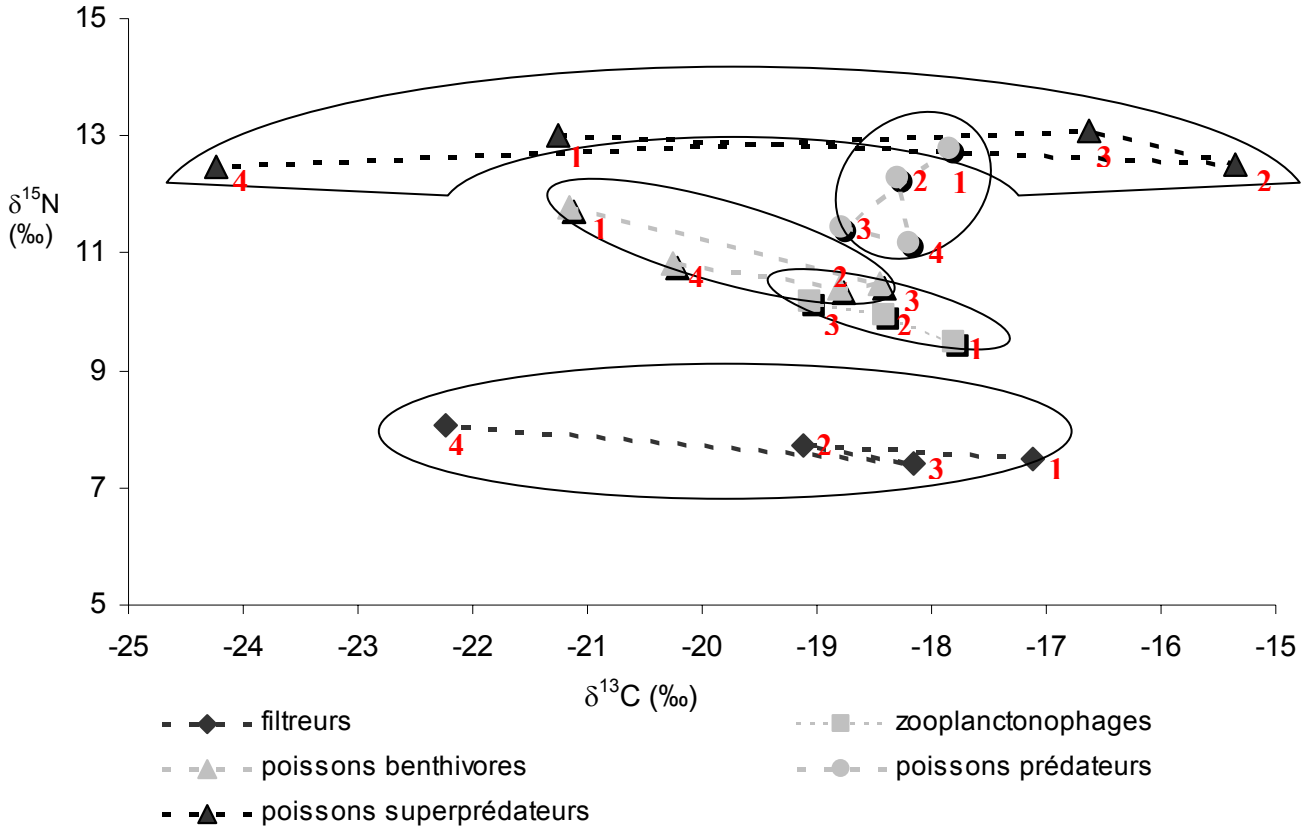


Figure 1.17 Evolution saisonnière des rapports isotopiques dans les différentes guildes trophiques (1 automne 2001; 2 printemps 2002; 3 été 2002; 4 automne 2002)

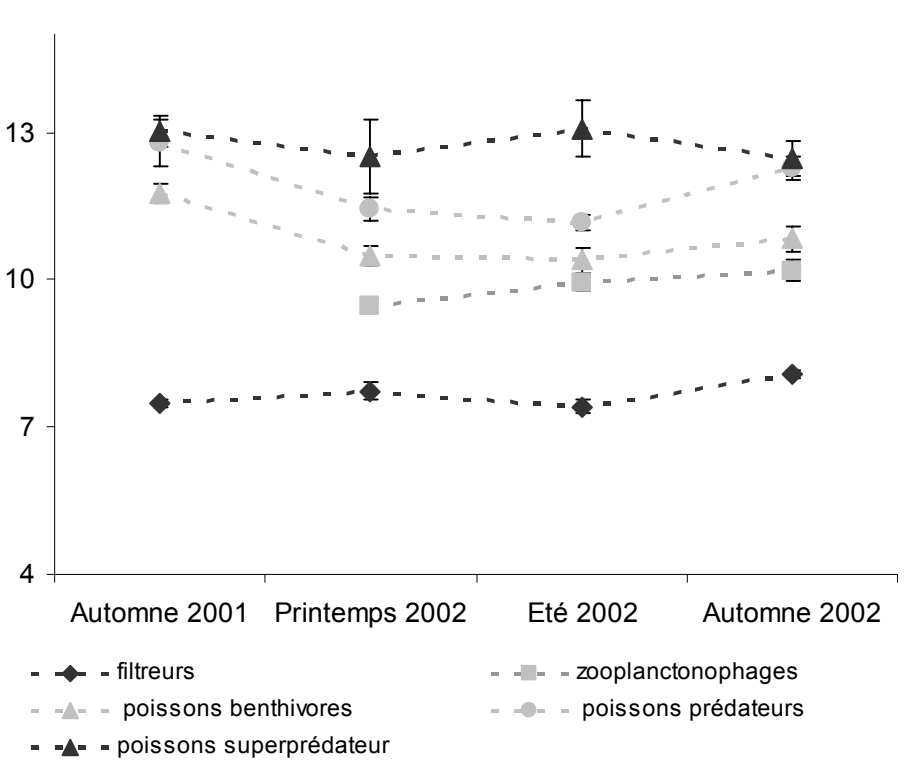


Figure 1.18 Variations saisonnières de $\delta^{15}N$ dans les guildes trophiques

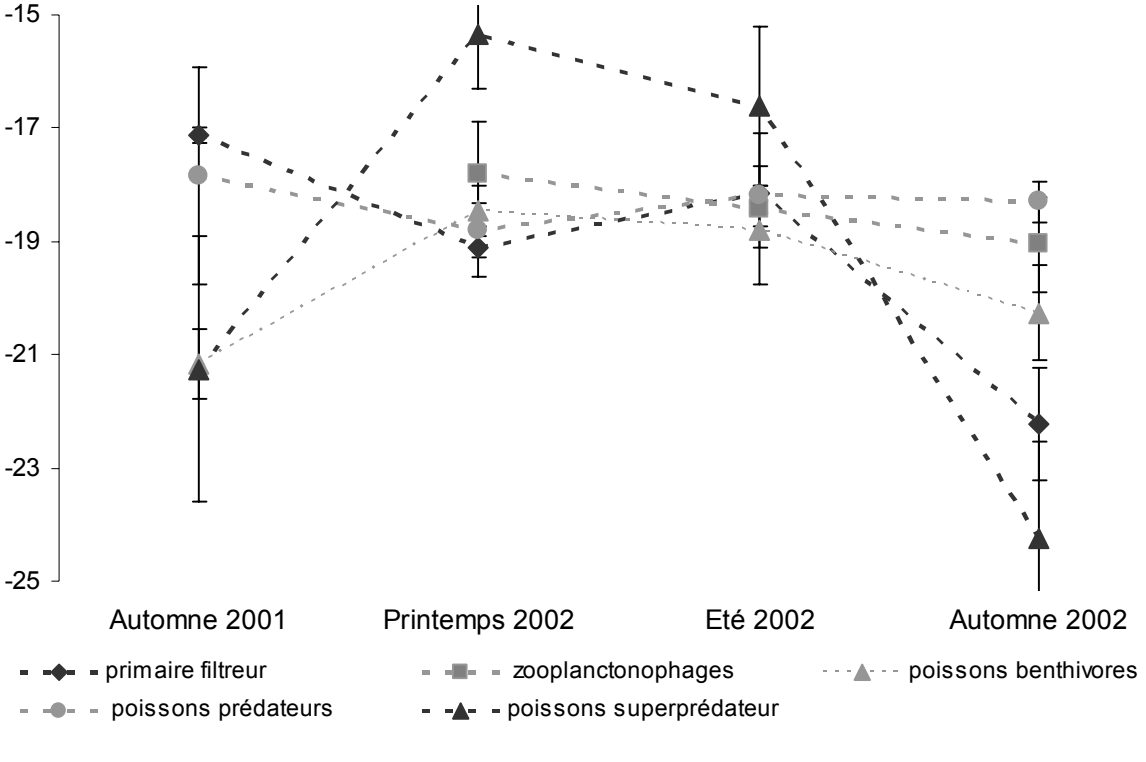


Figure 1.19 Variations saisonnières de $\delta^{13}C$ dans les guildes trophiques

benthivores et éventuellement chez les zooplanctonophages.
Les superprédateurs et les benthivores ont présenté des pics de $\delta^{13}C$ au printemps - été 2002 (-15,3±0,1 et -18,5±0,2‰, respectivement). Chez les filtreurs et les prédateurs, nous avons observé une évolution fluctuante mais synchrone jusqu'en l'automne 2002 puis les valeurs des filtreurs ont significativement diminué (-22,2±0,2‰) et celles des prédateurs ont augmenté (-18,3±0,3‰).

I.3.6 Signatures isotopiques des organismes collectés dans les canaux de drainage

Les signatures isotopiques des organismes collectés dans les canaux de drainage en avril 2002 ne présentent pas d'écart considérable, le $\delta^{15}N$ va de 10,3±0,4‰ pour les écrevisses à 12,7±0,5‰ pour les poissons-chats et le $\delta^{13}C$ de -22,8±0,4‰ pour les crevettes roses 2 à -30±0,3‰ pour les écrevisses (Figure 1.20). Les deux lots de crevettes roses présentent des valeurs de $\delta^{15}N$ distinctes (10,7±0,2‰ et 12,4±0,1‰), indépendamment de la taille, du site de prélèvement ou des signatures $\delta^{13}C$, ce qui suggère leur appartenance à deux niveaux trophiques différents. Toutefois, la distinction entre ces deux groupes se manifeste par une différence de poids corporel.
Aucune différence significative de $\delta^{13}C$ inter -site n'est révélée, il en est de même pour le $\delta^{15}N$ à l'exception des écrevisses prélevées au niveau du site dit « Egout de Badon » qui présentent un enrichissement de ~1,5‰ par rapport à celles collectées à Rolongues.

I.3.7 Signatures isotopiques et les paramètres biotiques

Pour tous les organismes analysés (à l'exception des invertébrés de petite taille: cardiums, copépodes et gammares qui ont été regroupés), les corrélations entre la composition isotopique et certains paramètres biologiques (taille, poids, coefficient de condition (K), teneur en lipides totaux, teneur en phospholipides et teneur en lipides neutres) ont été recherchées. Les résultats du test de Pearson ($p<0,05$) sont donnés dans le Tableau 1.6.
Aucune règle générale n'est ressortie, même si chez la majorité des espèces analysées, excepté les syngnathes, il existe une ou plusieurs corrélations significatives entre les paramètres biologiques, à l'exception des concentrations en lipides neutres, et les signatures $\delta^{13}C$. Ces résultats confortent la notion de complexité extrême du fractionnement isotopique du carbone impliqué dans pratiquement tous les processus métaboliques.

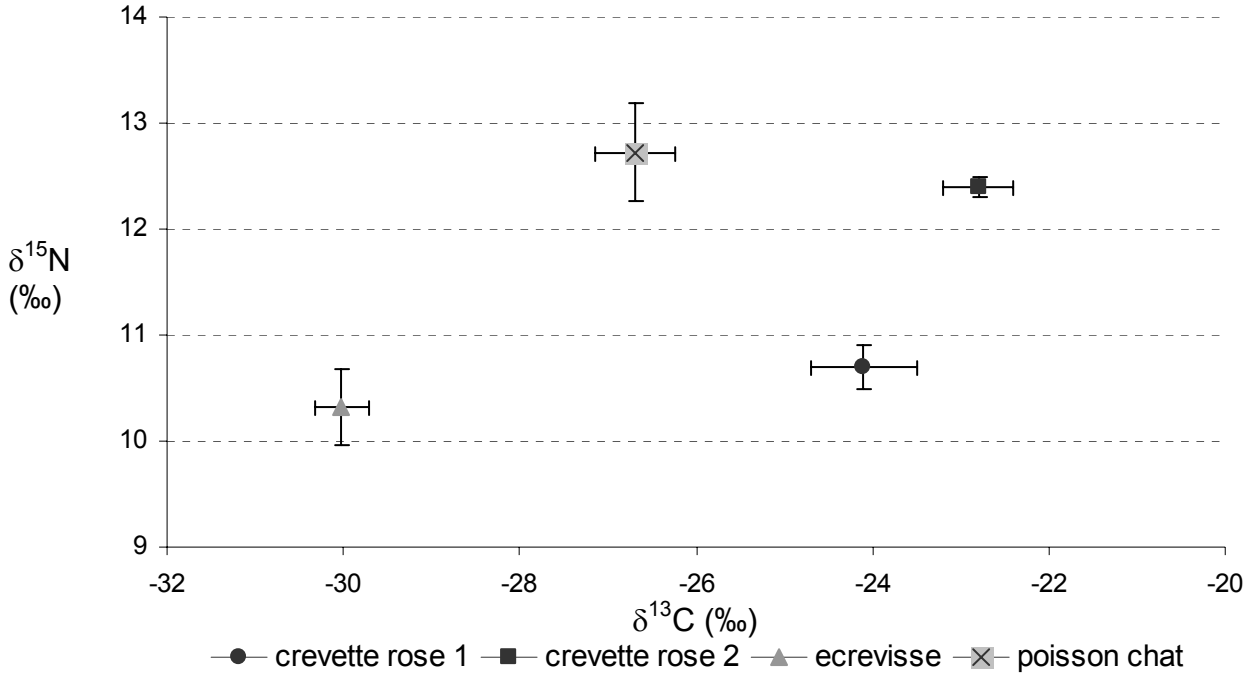


Figure 1.20 Valeurs de $\delta^{15}N$ et $\delta^{13}C$ chez les organismes collectés dans les canaux de drainage en printemps 2003 (n=38, 18, 12 pour crevette rose, écrevisse et poisson-chat, respectivement)

Tableau 1.6 Corrélations de Pearson entre les signatures isotopiques et les paramètres biologiques des poissons analysés

	δ^{15}N *vs*						δ^{13}C *vs*					
	Taille	Poids	K	mgLT/gTs	mg PL/gTS	mgLN/gTS	Taille	Poids	K	mgLT/gTs	mg PL/gTS	mgLN/gTS
Anguille jaune (20)								-0,453 p=0,05	-0,676 p=0,006			
Anguille juvénile (26)											0,433 p=0,049	
Muge juvénile (6)							0,979 p<0,0001	0,876 p=0,019			0,873 p=0,019	
Athérine (47)							0,686 p<0,0001	0,65 p<0,0001		-0,385 p=0,007	-0,489 p=0,001	
Gobie (27)	0,522 p=0,005	0,474 p=0,012		-0,455 p=0,016			-0,423 p=0,027					
Epinoche (27)		-0,415 p=0,034	-0,44 p=0,024				0,551 p=0,003	0,508 p=0,007		-0,49 p=0,0102		
Syngnathe (7)						-0,702 p=0,021						
Crevette rose (22)						0,499 p=0,0073			-0,386 p=0,002		-0,408 p=0,034	
Ecrevisse (18)							0,539 p=0,0243	0,538 p=0,025				

Tableau 1.7 Variations des facteurs abiotiques mesurés à la station météorologique La Capelière au cours du cycle annuel (SNPN, 2001; 2002)

	Sept 2001	Oct 2001	Nov 2001	Déc 2001	Jan 2002	Fév 2002	Mars 2002	Avril 2002	Mai 2002	Juin 2002	Juillet 2002	Août 2002	Sept 2002	Oct 2002	Nov 2002
Température (°C)	18,0	18,1	8,8	4,5	6,4	9,6	12,1	14,7	16,8	21,8	22,9	22,2	18,5	15,9	12,7
Précipitations (mm)	74,8	178,2	29,4	1,2	24,6	59,8	30,8	33,6	66,6	55,2	41,4	51,4	64,4	97,0	116,8
Salinité (Vaccarès)	14,5	13,5	13,8	14,0	15,1	14,5	14,7	15,5	15,2	14,5	15,1	14,6	13,1	12,6	12,4

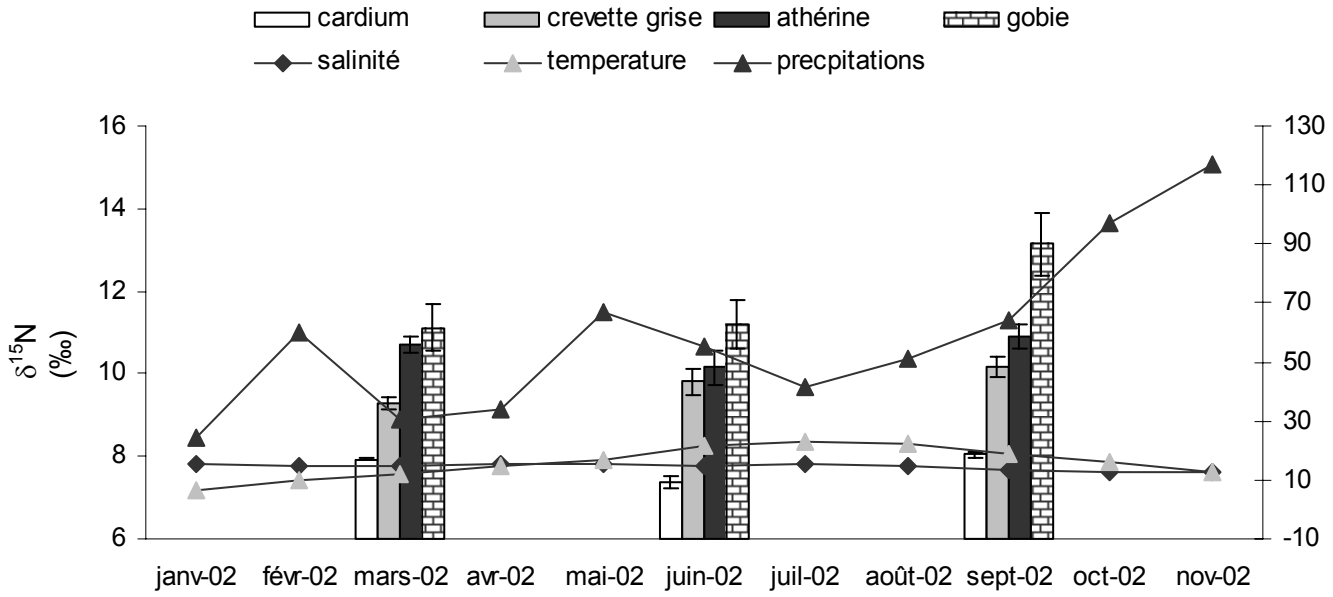


Figure 1.21 Variations saisonnières des paramètres abiotiques et des signatures isotopiques des organismes de différentes guildes trophiques

Les corrélations entre les paramètres biologiques et $\delta^{15}N$ se limitent à certaines espèces. Contrairement au $\delta^{13}C$, une corrélation significative entre les teneurs en lipides neutres et le $\delta^{15}N$ a été relevée chez les syngnathes et les crevettes roses. Chez les gobies, il existe une corrélation significative avec la taille, le poids et la teneur en lipides totaux. Chez les épinoches, les facteurs corrélés au $\delta^{15}N$ sont le coefficient de condition et le poids corporel.

I.3.8 Signatures isotopiques et les facteurs abiotiques

Dans un écosystème lagunaire, l'écologie et la biologie des organismes aquatiques sont fortement influencées par les changements environnementaux liés aux facteurs abiotiques. En conséquence, nous avons confronté les variations de la salinité, du niveau de précipitations et de la température aux variations de la composition isotopique des organismes.

Le Tableau 1.7 rapporte les valeurs des facteurs abiotiques (précipitations, température et salinité) mesurés à la station météorologique de La Capelière et en différents sites répartis dans l'étang (SNPN, 2001, 2002) au cours du cycle annuel. De manière générale, la période considérée a été caractérisée par un automne particulièrement humide (la moyenne des précipitations de l'année 2002 (682,8, soit 100mm supérieure à la moyenne (591,1mm) calculée pour la période 1944-2002) avec des températures correspondant à celles des années précédentes, soit une moyenne en 2002 (15,2°C) supérieure à la moyenne de 1944-2002 (14,4°C) confirmant la tendance vers une élévation de la température de ces dernières années. La salinité a été particulièrement stable autour la valeur moyenne (14,2 ± 0,3) confirmant l'efficacité de la gestion des pertuis qui contrôlent l'apport d'eau douce du Rhône et de l'eau salée de la Mer Méditerranée.

En superposant les variations saisonnières des paramètres abiotiques et des signatures isotopiques des organismes de différentes guildes trophiques, nous avons constaté qu'il n'y avait pas de correspondance (Figure 1.21). Bien que la salinité, la température et l'apport en eau jouent un rôle fondamental dans le fonctionnement de l'écosystème, ils ne semblent pas affecter directement les signatures isotopiques des éléments de son réseau trophique.

I. 4. DISCUSSION

L'organisation des réseaux trophiques aquatiques de la RNNC dépend d'un équilibre entre tolérance et impacts des fluctuations de différents facteurs biotiques et abiotiques (Ramade, 2002). Dans l'étang de Vaccarès, les nombreuses études citées par Bardin et Pont (2002) s'intéressent à l'influence de facteurs environnementaux, comme la turbidité de l'eau, les remous provoqués par le vent et les aléas du régime hydrologique naturel (les crues, les marées, les courants) sur le nombre d'espèces, notamment de poissons juvéniles, qui entrent dans l'étang. D'autre part, nos précédentes études ont mis en évidence les effets des variations des facteurs anthropiques sur quelques espèces de poissons camarguais (Roche *et al*., 2000; Roche *et al*., 2003a, 2003b) qui pourraient se répercuter sur le fonctionnement et la structure du réseau trophique.

Néanmoins, les facteurs d'origine anthropique, les variations de température, les fluctuations de la salinité, la variabilité des cycles d'apport en eau et l'abondance et la qualité des ressources alimentaires sont des contraintes environnementales qui imposent une plus grande rigidité des relations trophiques que dans les écosystèmes moins variables où des interactions de plus faible intensité peuvent être tolérées, puisque elles se situent dans un cadre environnemental plus stable (Briand, 1983).

L'étang de Vaccarès est un milieu paralique - en relation plus ou moins étroite avec la mer - qui, comme tout écosystème de ce type, se caractérise par une zonation particulière des divers compartiments trophiques. Les compartiments « poissons » sont particulièrement intéressants du point de vue de leur zonation biologique car ils ne présentent pas tous la même écologie (Bouchereau *et al*., 2000; Garnerot *et al*., 2004). En effet, les espèces marines sont plutôt pélagiques et leur cycle de vie passe par une écophase trophique dans l'étang, alors que le reste de leur cycle de vie est marin, et les espèces sédentaires, plutôt benthiques, sont susceptibles d'intégrer les variations de l'environnement.

Dans notre étude, nous avons tenté de déterminer les emplacements tropiques des éléments du réseau trophique de l'étang de Vaccarès, par l'utilisation d'indicateurs isotopiques. Nous avions pour objet de définir sa structure et de comprendre le profil et la dynamique des relations existantes entre les organismes dominants dans cette communauté écologique particulière.

I.4.1 Signatures isotopiques

Les signatures isotopiques en $\delta^{15}N$ des espèces analysées sont comprises entre ˜ 5‰ pour les copépodes et 13‰ pour les poissons superprédateurs (*S. lucioperca* et *L. gibbosus*) révélant une augmentation régulière en fonction de l'élévation de l'emplacement trophique présumé. Au contraire, les valeurs de $\delta^{13}C$ allant de -15,4±0,4‰ pour la crevette grise et -26,9±1,2‰ pour la brème ne suivent pas ce même schéma. Le ^{13}C reflète le flux du carbone entre la matière organique et les consommateurs (Gu *et al*., 1996) et par conséquent peut varier considérablement selon les constituants d'un réseau trophique (Hobson *et al*., 2002).

Il est classique de dire que les variations isotopiques entre espèces sont dues à une large dispersion des données individuelles, qui, si elle est montrée, découle des disparités intra- ou inter-populations. D'une manière générale, les différences isotopiques s'expliquent par les comportements trophiques et le type d'habitat (Vander Zanden *et al*., 1999a,b; Bode *et al*., 2003; Gaye-Siessegger *et al*., 2004) mais on doit insister sur la variété de niches écologiques occupées par les espèces de même niveau trophique.

Les signatures en $\delta^{13}C$, en tant qu'indicateurs de source de carbone primaire, et en accord avec Hecky et Hesslein (1995), permettent la distinction de deux groupes au sein du réseau trophique étudié. Il s'agit des espèces « pélagiques » et « benthiques » qui elles-mêmes dépendent d'autotrophes différents en ce qui concerne leurs propres signatures en $\delta^{13}C$. Les mesures isotopiques des producteurs primaires n'ont pas pu être effectuées dans cette étude. Néanmoins, si l'on se base sur les Rapports de Biodiversité réalisés par la SNPN (SNPN, 2000, 2001) et sur les signatures en $\delta^{13}C$ obtenues dans d'autres études effectuées dans les milieux similaires (Vizzini et Mazzola, 2003; Kang *et al*., 1999; Hsieh *et al*., 2002; Wainright *et al*., 2000; Melville et Connoly, 2003), nous pouvons estimer que, dans l'étang de Vaccarès, les principales sources de carbone primaire sont représentées par le microphytobenthos (composé surtout de Diatomées benthiques et de Cyanophycées), par les épiphytes des phanérogames dominants (*Zostera noltii*) et par des macroalgues (Characées, Poysiphonia) dont les valeurs de $\delta^{13}C$ comprises entre -14 et -20‰ s'accordent avec celles observées chez les consommateurs « benthiques » de l'étang de Vaccarès. D'autre part, les consommateurs « pélagiques » dépendent surtout du phytoplancton représenté par des Chlorophycées et, en raison de la colonne d'eau limitée, de la matière organique particulaire (MOP) et de la matière en suspension (MES) et dont les valeurs isotopiques sont compris entre -26 et -20‰, excepté chez la brème qui présente une valeur très inférieure. Cette exception est probablement liée au

fait que la brème est un poisson préférentiellement dulçaquicole occasionnellement présent dans le Vaccarès. Sa signature isotopique reflète d'autres sources de production primaire, telle que la matière organique d'origine terrestre riche en nutriments. En ce qui concerne la valeur en $\delta^{13}C$ du zooplancton (-26,8±1,9‰), elle est faussée en raison d'une différence de traitement préalable à l'analyse isotopique : celui-ci, en raison de sa petite taille, n'a pas pu être délipidé. Néanmoins, cette étape est primordiale pour ce type d'analyse comme l'ont montré, De Niro et Epstein (1978). Ces auteurs estiment, en effet, que la signature en $\delta^{13}C$ des lipides est inférieure à celle des constituants organiques, ainsi plus les espèces sont riches en graisse, plus le $\delta^{13}C$ de leurs tissus diminue.

L'importance de la matière organique provenant des plantes vasculaires terrestres est minime en termes de source de carbone primaire. Puisque le riz est la plante dominante de la zone étudiée, on s'attend à ce que la signature isotopique de la matière organique émanant de cette plante de type C_3, soit inférieure à -26‰ (Hsieh *et al*., 2002). D'autre part, pour les détritivores et les filtreurs du Vaccarès (les gammares et les cardiums), la production primaire est d'origine microphytobenthique. En effet Sauriau et Kang, (2000) ont démontré que le microphytobenthos constituait la plus grande part des sources de production pour *C.edule* d'un bassin français (Marennes-Oléron sur la Côte Atlantique).

Bien que le $\delta^{13}C$ fournisse un bon outil de discrimination des sources d'origine pélagique et benthique, contrairement aux travaux de Hobson et Welch (1992) et de Vizzini et Mazzola (2002), aucune corrélation n'a été mise en évidence entre le $\delta^{13}C$ et le $\delta^{15}N$, ni au niveau de la communauté entière, ni chez les espèces pélagiques. Dans l'étang de Vaccarès, la variabilité isotopique dépend surtout de la variabilité liée à l'écologie et à la physiologie des espèces dont une partie n'est qu'occasionnellement présente dans cet écosystème dynamique.

Cependant, l'analyse des relations entre les signatures en $\delta^{13}C$ et en $\delta^{15}N$ nous a permis de mettre en évidence l'existence dans cet écosystème de trois compartiments trophiques principaux: consommateurs primaires (des invertébrés), consommateurs secondaires (des poissons de taille moyenne) et des consommateurs tertiaires (les poissons de plus grande taille). Les signatures en azote lourd ont été utilisées pour établir une classification détaillée regroupant les espèces dans 7 principales guildes trophiques: les phytoplanctonophages, les déposivores et les filtreurs primaires, les zooplanctonophages secondaires, les poissons omnivores à tendance « herbivores », les poissons benthivores et les poissons prédateurs secondaires et les poissons ichtyophages superprédateurs.

La grande variabilité intraguilde des signatures en $\delta^{13}C$, surtout aux niveaux des

zooplanctonophages primaires et des ichtyophages superprédateurs, confirme encore une fois les divergences dans la répartition des espèces de même niveau trophique mais vivant dans des écotopes différents. Cette hétérogénéité vient de l'optimisation de l'utilisation du biotope à disposition et de la nécessité de réduire une éventuelle compétition pour les sources disponibles. Cependant, dans un tel écosystème, on ne peut écarter les guildes écologiques des différentes espèces. Elles se répartissent essentiellement en trois classes les espèces migrantes-résidantes comme les anguilles, résidantes comme les athérines, les épinoches et certains gobies et migrantes-trophiques comme les muges et les soles.

I.4.2 L'enrichissement isotopique et les niveaux trophiques

Nous avons précédemment explicité que l'intérêt du $\delta^{13}C$ était limité pour la détermination des positions trophiques, en conséquence, seul l'enrichissement en $\delta^{15}N$ a été utilisé pour évaluer les niveaux trophiques.

Dans une étude destinée à mesurer l'enrichissement en $\delta^{15}N$ entre une proie et son consommateur, Vanderklift et Ponsard (2003) ont montré qu'il existait plusieurs sources de variabilité (l'excrétion, le régime alimentaire, les classes taxonomiques, l'environnement), ils ont mis en évidence l'importance des transferts trophiques entre les différents groupes d'organismes dans chaque écosystème étudié. Dans notre étude, les données sur les habitudes alimentaires et les préférences d'habitat, décrites dans la littérature ou observées sur le terrain, ont été associées avec les valeurs de $\delta^{15}N$ mesurées. Cette analyse a révélé un enrichissement régulier de 3,20 ± 0,14‰ d'un niveau trophique au suivant. Cette valeur est en accord avec l'estimation généralement applicable aux réseaux trophiques aquatiques qui est de 3,4‰ (Post, 2002).

Dans l'évaluation des niveaux trophiques des organismes, nous avons utilisé la signature en ^{15}N du zooplancton (consommateur primaire) qui a été le $\delta^{15}N_{base}$ (Hobson *et al*., 2002). Le $\delta^{15}N$ moyen du zooplancton analysé a une valeur de 5.5‰, ceci indique que nous avons collecté surtout du zooplancton de type herbivore. En conséquence, nous avons empiriquement attribué le niveau trophique (NT) 2 à ce zooplancton. Ainsi il a été possible de calculer le NT de chaque consommateur, considérant la stabilité de l'enrichissement en $\delta^{15}N$ entre les NT successifs au sein d'un réseau trophique aquatique (Hobson *et al*., 2002). Les NT calculés sont compris entre 2 et 3 pour les consommateurs primaires (phytoplanctonophages,

filtreurs, déposivores), entre 3 et 4 pour les consommateurs secondaires (zooplanctonophages, poissons benthivores, poissons prédateurs) et de 4 à 4,5 pour les poissons ichtyophages superprédateurs.

Cependant, lors de ce type de détermination, il est important de tenir compte des grandes discontinuités temporelles et spatiales des valeurs servant de base. Or la variabilité temporelle des signatures isotopiques des consommateurs primaires de petite taille est notoire, ce qui réduit l'utilisation de $\delta^{15}N$ du zooplancton comme $\delta^{15}N_{base}$ (Post, 2002). En revanche, la saisonnalité des signatures $\delta^{15}N$ des consommateurs primaires, tels que les mollusques bivalves, a une moindre importance, ce sont des organismes de plus grande taille qui présentent une longévité supérieure (Vander Zanden et Rasmussen, 1999). Il en découle que, comme les bouleversements isotopiques sont nécessairement plus lents, leurs signatures isotopiques sont représentatives de leur alimentation sur de plus longues périodes (Post, 2002). En outre, les tissus des mollusques absorbent l'azote des producteurs primaires dans leurs tissus et reflètent ainsi la composition isotopique des sources d'azote des zones côtières (McKinney *et al*., 1999; 2001)

Si l'on utilise le $\delta^{15}N$ des cardiums (7,8±0,1‰) comme $\delta^{15}N_{base}$ pour calculer les niveaux trophiques, ils sont inclus dans une gamme s'étalant de 2 pour les cardiums à 3,76 pour la perche soleil. Par ce calcul, l'intervalle dans lequel sont comprises les différentes espèces des chaînes alimentaires étudiées s'en trouve réduit, ce qui en limite sa longueur théorique. La portée de cette réduction ne se révèle que dans le cas d'une analyse comparative d'écosystèmes. En effet, Post *et al*. (2000) ont montré que la longueur d'une chaîne alimentaire dépend de la taille de l'écosystème. Si l'on prend en compte cette observation, le fait que, dans l'étang de Vaccarès, le plus haut niveau trophique ne dépasse pas 4, serait lié aux dimensions réduites de ce « plan d'eau ». Cependant, cette affirmation n'est pas totalement en concordance avec le site étudié car, d'une part, l'étang de Vaccarès par sa superficie supérieure à 6000 Ha et son association avec les étangs dit inférieurs du système Vaccarès, fait partie des plus vastes lagunes méditerranéennes, si l'on excepte certains étangs languedociens. D'autre part, excepté le cas de biotopes artificiels de taille très réduite, la notion de domaine vital et de compétition entre les espèces est probablement à prendre en compte pour estimer l'amplitude d'une chaîne alimentaire.

I.4.3 Réseau trophique

La représentation des liens alimentaires entre les espèces dominantes du réseau trophique de l'étang de Vaccarès met en valeur la position des mysis. L'importance des mysidacées dans le transfert d'énergie pour les maillons supérieurs de ce réseau trophique tient à leur position centrale et à leur stabilité dans les écosystèmes littoraux méditerranéens (Sondergaard *et al*., 2000; Vizzini et Mazzola, 2002). Ils représentent la proie préférentielle des poissons de petite taille, pélagiques ou bentho-pélagiques (athérines, épinoches) et benthiques (différentes espèces de gobiidae, syngnathes) et, avec le plancton et les gammares, construisent la base du réseau trophique dans son ensemble. Les populations des crevettes sont aussi très stables dans l'écosystème étudié (Poizat *et al*., 2004). Néanmoins, elles présentent des fortes variations saisonnières. Ainsi, les juvéniles de *C.crangon* (population annuelle) pénètrent dans l'étang en été et le quittent à l'âge d'un an (Gelin *et al*., 2000). Dans les eaux saumâtres de Vaccarès, ils sont consommés par les poissons omnivores de grande taille, notamment les anguilles. Aux niveaux trophiques inférieurs (compris entre 2 et 3), l'espèce bivalve dominante est le *C. glaucum*. Ce filtreur assimile la matière organique sédimentée, la matière en suspension et le microphytobenthos, et son seul prédateur potentiel est la brème occasionnellement présente dans l'étang de Vaccarès.

Les poissons de petite taille, les athérines et les gobies, dominent l'ichtyofaune camarguaise. Alors que la population des gobies, notamment des *Pomatoschistus microps*, semble augmenter dans les dernières années, celle des athérines se montre très stable (Poizat *et al*., 2004). Toutefois, le personnel de la RNNC déplore un effondrement des stocks en athérines depuis 1999. En tout cas, pour ces poissons, ainsi que pour les syngnathes, les épinoches, les anguilles et les muges juvéniles, les NT calculés sont compris entre 3 et 4 alors que chez les superprédateurs, les anguilles jaunes, les brèmes, les perches et les sandres, le NT dépasse 4. Les anguilles jaunes sont classiquement considérées comme omnivores. Cependant, dans notre étude elles semblent piscivores (NT=4,1) ce qui est probablement du à leur relation trophique avec les athérines. Les grands prédateurs piscivores, *L. gibbossus* et *S. lucioperca*, sont dulçaquicoles et introduits. En étudiant l'impact de ces superprédateurs sur les populations des espèces autochtones dans l'écosystème camarguais, Rosecchi *et al*. (1997) n'ont pas constaté de diminution dans l'effectif de ces derniers, malgré l'augmentation des espèces exotiques. Par contre, Poizat *et al*. (2004) rapportent une augmentation suivie par une diminution des perches et des sandres dulçaquicoles à la suite des fortes variations de salinité qui ont eu lieu de 1993 à nos jours.

I.4.4 Variabilité isotopique - implication du preferendum alimentaire ou limites de la méthode?

Il est certain que la méthode des isotopes stables améliore la compréhension des relations trophiques, de l'importance des ressources alimentaires spécifiques et de l'utilisation de l'habitat. Cependant l'interprétation des signatures isotopiques n'est pas aussi directe et peut conduire à des conclusions erronées (Gannes *et al*, 1997). Les problèmes sont partiellement dus à la complexité des écosystèmes, leur richesse spécifique, la multitude des ressources alimentaires, la migration (ou simplement le déplacement) des espèces (O'Reilly et Hecky, 2002; Melville et Connolly., 2003) et /ou la variabilité du taux de croissance et du turn-over isotopique liés aux processus biochimiques, physiologiques et nutritionnels des organismes analysés (Schmidt *et al*., 2004; Vizzini et Mazzola, 2003).

Dans cette étude, par la mise en évidence de différentes sources de variabilité isotopique, notamment celles liées au type de tissu analysé, au site et à la saison de collecte des organismes, nous avons cherché à en déterminer certaines causes.

I.4.4.1 Variations liées au tissu analysé

La comparaison des signatures isotopiquesde tissus à activité métabolique variée: le muscle et le foie chez les anguilles et le manteau musculaire et les glandes digestives chez les cardiums a révélé une différence significative du rapport isotopique δ^{15}Nentre les tissus analysés. Dans le tissu musculaire des anguilles, le δ^{15}N est significativement plus élevé que dans le tissu hépatique (13,3±0,4‰ et 12,2±0,4‰ respectivement), de même chez les cardiums le manteau est plus riche en azote lourd que la glande digestive (8,1±0,2‰ et 7,8±0,1‰ respectivement).

A l'inverse, aucune différence significative du δ^{13}C n'a été observée entre les tissus ni chez les anguilles, ni chez les cardiums. L'extraction des lipides a certainement réduit la variabilité du δ^{13}C tissulaires.

Ces discriminations tissulaires du δ^{15}Npeuvent être attribuées aux divergences dans la vitesse d'assimilation des aliments, dans les mécanismes d'absorption des nutriments et dans le turn-over des substrats énergétiques et structuraux des tissus. Le taux de fractionnement isotopique des tissus varie également en fonction de leur composition biochimique (Schmidt *et al*., 2004). Puisque les isotopes de l'azote se fractionnent au cours des processus de

déamination et transamination des acides aminés, l'enrichissement en ^{15}N devrait être plus accentué dans les tissus dont le taux de synthèse et le turn-over protéiques sont élevés (le foie) que dans les tissus en croissance (muscles) (Hobson *et al*., 1996). Cependant, chez les anguilles une réduction alimentaire hivernale est classique au cours d'un cycle annuel naturel. Ce comportement peut entraîner l'utilisation de protéines musculaires comme apport énergétique ce qui induit une augmentation du catabolisme des acides aminés et a pour résultat des valeurs de $\delta^{15}N$ plus hautes dans les muscles que dans le foie (Schmidt *et al*., 2004).

I.4.4.2 Variations liées au site de prélèvement

Les gobies, les épinoches et les syngnathes prélevés à La Capelière en avril 2002 présentent des valeurs de $\delta^{15}N$ plus élevées que celles des poissons prélevés à Mornès à la même période. Cet enrichissement en $\delta^{15}N$ est largement significatif pour les gobies. Le $\delta^{13}C$ est plus bas chez les individus de La Capelière par rapport à ceux de Mornès, notamment chez les gobies. Ces différences ne rendent pas compte d'un changement de niveau trophique, mais elles semblent refléter les fluctuations des compositions isotopiques liées aux sources d'azote et de carbone au niveau des deux sites. Mornès est le site le plus central de l'étang de Vaccarès et le point le plus éloigné des apports en eaux douces provenant, entre autres, du canal de Fumemorte, alors que le site de La Capelière se trouve à seulement 300m de l'embouchure du canal. Des études précédentes ont mis en évidence une différence entre ces deux sites en termes de contamination des populations des poissons par les micropolluants organochlorés, démontrant l'importance de l'apport du canal de Fumemorte en tant que source de pollution chronique de l'étang de Vaccarès (Roche *et al*., 2000)

Les différences inter-sites des signatures isotopiques de poissons démontrent l'intervention des apports en azote et carbone *via* le canal de Fumemorte pour le réseau trophique de l'étang de Vaccarès. Ce canal de drainage transfère de la matière organique d'origine terrestre riche en azote et en résidus divers provenant des rizières. Cela expliquerait, en outre, les valeurs inférieures en $\delta^{13}C$ (le matériel terrestre dérivant de plantes en C3, i.e. le riz) et plus élevées en $\delta^{15}N$ (venant potentiellement des fertilisants utilisés dans le traitement des rizières). Il a été déjà montré que les isotopes stables pouvaient servir de signaux d'une eutrophisation et d'autres impacts anthropiques, comme l'élimination des déchets ou bien l'usage de fertilisants dans une zone agricole adjacente (Heikopp *et al*., 2000; Voss *et al*., 2000; Pearson *et al*., 2000; Neumann *et al*., 2002)

La richesse en ^{15}N de la matière organique circulant dans les canaux de drainage pourrait expliquer les variations de signature isotopique mises en évidence entre les crevettes roses prélevées dans l'étang de Vaccarès et celles prélevées dans les canaux de drainage en avril 2002. D'une manière générale, le $\delta^{15}N$ des crevettes des canaux est plus élevé que celui des crevettes du Vaccarès. Ainsi, il apparaît que la diversité des sources d'azote dans ces deux écosystèmes se reflète sur les niveaux trophiques supérieurs. Ces résultats confirment à nouveau la prépondérance du $\delta^{15}N_{base}$ pour l'utilisation des signatures isotopiques dans les études sur les relations trophiques entre des organismes aquatiques.

Cependant, on peut déplorer que, dans les canaux, la distribution des fréquences du $\delta^{15}N$ laisse supposer 2 « groupes trophiques » de crevettes roses car leurs signatures isotopiques sont distinctes et indépendantes de la taille des individus et du $\delta^{13}C$. Bien que ces deux groupes présentent deux valeurs différentes de niveaux trophiques, le fait qu'ils diffèrent significativement en terme de poids corporel, pourrait souligner la portée de l'embonpoint, contrecoup du taux d'activité alimentaire, sur la composition isotopique. Dans leur étude sur la carpe (*Cyprinus caprio*) Gaye-Siessegger *et al*. (2004) ont démontré que le $\delta^{15}N$ diminuait lorsque le taux d'alimentation augmentait, ils en ont déduit que le turn-over protéique dans les tissus de ce poisson avait une grande influence sur les signatures isotopiques d'azote. L'analyse de ces auteurs suggère que lorsque l'alimentation est abondante, la majorité des acides aminés alimentaires participe directement à la synthèse protéique *de novo*. Ce métabolisme conduit à une certaine homologie entre la composition isotopique du prédateur et celle de sa proie.

D'autre part l'absence de variation significative entre les $\delta^{13}C$ des deux, voire trois, populations de crevettes roses indiquerait que la source de carbone primaire est identique et indépendante du site de capture. Toutefois, le fait de délipider les tissus préalablement à l'analyse pourrait masquer une variabilité isotopique liée à l'importance de la prise alimentaire des organismes analysés.

I.4.4.3 Les variations liées à la saison de prélèvement

Dans un écosystème instable, comme l'étang de Vaccarès, certaines espèces, périodiquement présentes, ont une activité alimentaire souvent opportuniste. En effet, ces organismes adaptent leurs habitudes alimentaires à la variabilité de l'abondance et de la qualité des proies, deux facteurs dépendants de la saison (Vizzini et Mazzola, 2003).

Ce n'est pas le cas d'*A.boyeri*, espèce traditionnelle des étangs camarguais pour laquelle on

assiste depuis 1999 à une diminution dramatique d'effectifs. Cette espèce présente des variations interannuelles en signatures isotopiques reflétant probablement ses capacités adaptatives aux ressources environnementales locales et sa plasticité trophique comme l'ont montré Vizzini et Mazzola (2002).

Alors que les moyennes globales du $\delta^{15}N$ et du $\delta^{13}C$ relevées au cours de 2 cycles annuels chez les anguilles jaunes et juvéniles et chez les cardiums ne présentent pas de variation statistiquement significative, les profils isotopiques annuels de ces espèces camarguaises sont variables d'une saison à une autre (de l'automne 2001 à l'automne 2002) et caractérisent un certain effet saisonnier.

Les variations isotopiques saisonnières dans un écosystème donné sont assez classiques, mais elles sont plus ou moins intenses selon les espèces. Ainsi nous avons observé des variations isotopiques saisonnières plus prononcées chez les athérines, les gobies, les anguilles juvéniles et les cardiums ce qui signifie qu'il existe un effet « saison » sur la composition isotopique de ces organismes aquatiques.

D'une manière générale, nos analyses montrent des évolutions saisonnières différentes selon les guildes trophiques d'appartenance des espèces. Ainsi, les filtreurs et les superprédateurs présentent des fluctuations régulières du $\delta^{15}N$ autour de sa valeur moyenne, mais de sens opposé. En revanche, chez les consommateurs secondaires (les zooplanctonophages, les poissons benthivores et les prédateurs) cette évolution saisonnière est cyclique, avec une diminution des valeurs de l'automne 2001 au printemps 2002, une stabilité entre le printemps et l'été 2002 et une augmentation en automne 2002.

Alors que l'existence et les sources probables de variations saisonnières des signatures isotopiques des producteurs et des consommateurs primaires ont été largement rapportées dans les études citées par Vizzini et Mazzola (2003), peu d'informations existent sur les fluctuations des compositions isotopiques chez les consommateurs secondaires, notamment chez les poissons.

Dans notre étude, l'évolution saisonnière du $\delta^{15}N$ en fonction des guildes trophiques s'accorde avec les variations du $\delta^{15}N$ observées chez les espèces isolées et peut s'expliquer par les différences dans les habitudes alimentaires et par la physiologie des consommateurs qui occupent différents compartiments trophiques dans le réseau du Vaccarès.

D'une manière générale, la variabilité des signatures isotopiques est souvent attribuée à un certain omnivorisme ou « plurivorisme», c'est-à-dire à un régime alimentaire composé

de proies de niveaux trophiques différents. France (1997) a démontré que l'omnivorisme, estimé à partir de la variation moyenne du $\delta^{15}N$ intraspécifique s'accroît quand on s'élève dans une chaîne alimentaire aquatique, ce qui suggère une amplification avec le niveau trophique. Cependant, ces variations isotopiques observées ne peuvent pas, à elles seules, démontrer l'expansion de l'omnivorisme au sein d'une communauté écologique (Ponsard et Arditi, 2001). En réalité, la stabilité du $\delta^{15}N$ chez les consommateurs ichtyophages de plus grande taille (les anguilles jaunes, les perches, les sandres) est probablement liée au fait, qu'indépendamment de la variation isotopique de leurs proies, des changements de leurs propres signatures isotopiques nécessitent plus d'une année pour se manifester (Hesslein *et al*., 1993). Au contraire, les espèces de plus petite taille, comme les poissons benthivores (*A.boyeri*) ou les petits poissons prédateurs (*Pomatoschistus sp.*), qui sont des organismes à croissance rapide et à longévité réduite, présentent un $\delta^{15}N$ dont le taux rapide de variation est une réponse directe aux changements isotopiques de leurs aliments (Vizzini et Mazzola, 2002; 2003; Bardin et Pont, 2002).

Certains auteurs soulèvent d'autres arguments pour expliquer les différences saisonnières de la composition isotopique chez les poissons (Renones *et al*., 2002). Il s'agit d'une hypothèse basée sur un changement alimentaire ontogénique et/ou lié à la croissance des organismes. En effet, les individus juvéniles et adultes qui dominent tour à tour les écosystèmes des deltas et des estuaires à différentes saisons présentent une diversité d'habitudes trophiques qui s'appuient sur des sources alimentaires distinctes (Vizzini et Mazzola, 2003). Cependant, le taux de consommation, qui est un autre facteur du preferendum alimentaire, est susceptible d'influencer les signatures isotopiques en $\delta^{15}N$ et en $\delta^{13}C$. En effet, l'importance de la ration alimentaire présente des variations individuelles chez les organismes aquatiques (Gaye-Siessegger *et al*., 2004). Ainsi la diminution du $\delta^{15}N$ mise en évidence chez les poissons benthivores et ichtyophages prédateurs, au printemps et en été 2002, suivie par une augmentation en automne 2002, pourraient être due à l'évolution saisonnière de ces taux de consommation, qui sont logiquement plus élevés en période estivale et plus faibles en période hivernale conformément à la variabilité naturelle de l'abondance des ressources alimentaires dans le Vaccarès.

Une autre hypothèse peut être émise: les variations saisonnières du $\delta^{15}N$ pourraient être la conséquence de processus adaptatifs des organismes dans un milieu paralique. Le succès de l'osmorégulation chez ces espèces euryhalines dépend des processus impliqués dans la perméabilité ionique mise en oeuvre afin de contrebalancer l'effet des gradients osmotiques

(Hansen *et al*, 1999). Il est probable que de tels mécanismes affectent le fractionnement isotopique et en viennent à modifier les compositions isotopiques d'espèces sédentaires de l'étang de Vaccarès, en augmentant notamment les concentrations en ^{15}N en été et en automne. Ceci est particulièrement vrai pour les gobies et les crevettes grises, qui représentent les rares espèces camarguaises dont la totalité du cycle vital a lieu exclusivement dans l'étang de Vaccarès. De plus, ces deux espèces investissent la majorité de leurs ressources énergétiques dans la reproduction pendant les saisons chaudes et présentent ainsi une plasticité phénotypique de l'activité reproductive en réponse à des changements environnementaux (Pampoulie *et al*., 2001; Gelin *et al*., 2000). Comme le décrit Miller (1975), les gobies cessent leur croissance pendant la période de ponte afin d'investir le maximum de leurs substrats énergétiques dans le développement des gonades. Ces changements d'allocation énergétique dépendent de nombreuses réactions biochimiques qui pourraient favoriser l'isotope lourd d'azote (Schmidt *et al*., 2004) et se traduire par l'augmentation des valeurs estivales en $\delta^{15}N$ chez les gobies analysés dans cette étude.

Des variations saisonnières sont aussi observées pour les signatures en $\delta^{13}C$. Leurs amplitudes et leurs sens semblent dépendre des compartiments trophiques des organismes. Les superprédateurs, les poissons benthivores et les zooplanctonophages présentent ainsi des pics en $\delta^{13}C$ au printemps - été 2002, alors que le carbone lourd des filtreurs et des prédateurs secondaires se maintient à un niveau moyen, en dépit d'une certaine variabilité pendant un cycle annuel, puis en automne 2002 leur profil s'oriente différemment. A cette époque expérimentale, le $\delta^{13}C$ des filtreurs diminue par rapport aux autres données annuelles et celui des prédateurs secondaires augmente. Ces observations indiquent que le $\delta^{13}C$ est étroitement lié à la physiologie et à l'activité métabolique des espèces au moment de la capture (Khim *et al*., 2000). Il est probable que les variations saisonnières décrites dépendent de la disponibilité et de l'abondance des différentes sources alimentaires à la base du réseau trophique étudié. En effet, le printemps et l'été dans l'étang de Vaccarès sont caractérisés par une abondance des espèces phytoplanctoniques (les diatomées au printemps et les chlorophycées et cyanophycées en été) (SNPN, 2002). Nos résultats s'accordent avec ces données puisque le $\delta^{13}C$ est significativement plus élevé au printemps et en été chez les consommateurs dépendant directement (zooplanctonophages) ou indirectement (poissons benthivores, prédateurs ou superprédateurs) des proies s'alimentant avec du phytoplancton (copépodes herbivores, dominant dans le site de prélèvement). En revanche, chez les filtreurs (les cardiums), le $\delta^{13}C$

diminue au printemps et il est particulièrement faible en automne 2002 évoquant une différente source de carbone primaire du microphytobenthos dans la matière organique particulaire et la matière en suspension. En effet, dans l'étang de Vaccarès, la disponibilité de détritus d'origine continentale augmente en automne par rapport à l'été et au printemps et on pourrait lui attribuer la diminution du $\delta^{13}C$ chez les cardiums.
Par ailleurs, les profils saisonniers reflètent probablement des changements de l'allocation métabolique du carbone pendant les processus respiratoires, reproductifs et lors de l'excrétion.

Malgré les diverses variations isotopiques observées, les espèces examinées n'ont pas montré de variation en termes d'emplacement tropique occupé (NT calculés), à l'exception des gobies en septembre 2002 pour les raisons citées précédemment. Nos résultats démontrent, en conséquence, une relative stabilité temporelle de la structure trophique dominante de l'étang de Vaccarès en accord avec l'hypothèse selon laquelle la stabilité des réseaux trophiques est renforcée lorsque les environnements sont variables (Briand, 1983).

I.4.5. Influence des facteurs biotiques et des paramètres physiques de l'environnement

Comme nous l'avons précédemment exposé, la recherche des causes d'une variation isotopique chez les organismes aquatiques collectés dans les écosystèmes aquatiques camarguais repose sur quelques hypothèses fondamentales: l'hypothèse d'une variation isotopique chez les organismes à la base des réseaux trophiques, l'hypothèse de la variation individuelle de la qualité (proies préférentielles) et de l'abondance de la prise alimentaire au cours des cycles vitaux (Vizzini et Mazzola, 2003), l'hypothèse de l'impact ontogénique lié à la taille des organismes (Renones *et al*., 2002), l'hypothèse des différences dans le fractionnement isotopique liées au taux de métabolisme et au taux d'alimentation des organismes (Schmidt *et al*., 2004 ; Vizzini et Mazzola, 2003; Hesslein *et al*., 1993; Gaye-Siessegger *et al*., 2004). Ces hypothèses mettent en évidence l'importance de certains paramètres biologiques, -la taille, -l'embonpoint, -l'état nutritionnel, dans l'interprétation des compositions isotopiques en tant qu'outils pour l'étude des réseaux trophiques aquatiques.

Ainsi nous avons recherché les corrélations éventuelles entre les signatures isotopiques et les paramètres biologiques des organismes analysés, notamment la taille, le poids, le coefficient de condition, la teneur en lipides totaux tissulaires, en lipides de structure et de réserve. Les résultats sont très variables selon l'espèce considérée et s'accordent très partiellement avec les observations précédemment exposées. Chez les gobies, les corrélations

positives entre le $\delta^{15}N$ et la taille ou le poids et les corrélations négatives entre le $\delta^{15}N$ et le taux de lipides tissulaires d'une part, et le $\delta^{13}C$ et la taille d'autre part, confirment l'hypothèse de l'implication du stade ontogénique dans les préférences alimentaires et l'influence de l'état nutritionnel sur la composition isotopique de cette espèce sédentaire dans l'écosystème étudié. En revanche, la corrélation positive entre le $\delta^{13}C$ et la taille ou le poids des athérines et des épinoches chez lesquels aucune corrélation significative n'a été trouvée entre la taille et le $\delta^{15}N$ indique une absence de modification ontogénique. Au contraire chez ces espèces, les adultes s'alimentent dans la zone pélagique, alors que les juvéniles utilisent les ressources benthiques sans cependant changer de niveau trophique (Vizzini et Mazzola, 2003). Chez les crevettes roses, la corrélation négative entre la teneur en lipides neutres et le $\delta^{15}N$ caractérise l'impact de l'état nutritionnel sur la répartition de l'isotope lourd de l'azote chez les invertébrés aquatiques.

Cependant, l'absence d'homogénéité dans l'ensemble des résultats obtenus souligne, en premier lieu la nécessité de mettre en œuvre des recherches additionnelles qui auraient pour objectifs d'établir l'implication de l'état métabolique général des organismes (nutritionnel, physiologique…) sur la répartition isotopique chez les espèces aquatiques. Les mesures des activités enzymatiques digestives, par exemple pourraient fournir un outil supplémentaire dans l'évaluation des habitudes alimentaires chez les espèces collectées dans le milieu naturel, en intégrant en même temps l'impact des variations naturelles et anthropiques (par exemple la présence d'une contamination chronique) sur ces habitudes alimentaires et sur la structure trophique des écosystèmes aquatiques.

D'autre part, il est bien connu que les paramètres environnementaux influencent la structure trophique des écosystèmes aquatiques (Briand, 1983). C'est la raison pour laquelle nous avons essayé de mettre en relation les signatures isotopiques et les paramètres environnementaux, comme la salinité, la pluviométrie et la température, relevés au cours d'un cycle annuel de l'automne 2001, au printemps, à l'été et à l'automne 2002. Malgré les variations observées pour chacun des paramètres examinés, aucune relation entre eux n'est mise en évidence. Il semble donc évident que les variations des signatures isotopiques, bien qu'indirectement fortement liées aux paramètres environnementaux, trouvent leurs origines directes dans la biologie et dans l'écologie de la communauté aquatique considéré.

CHAPITRE II - CONTAMINATION PAR DES POLLUANTS ORGANIQUES PERSISTANTS D'ESPECES DOMINANTES DES RESEAUX TROPHIQUES AQUATIQUES DE CAMARGUE

Etude des relations entre le niveau trophique déterminé par la méthode des isotopes stables et la contamination par les micropolluants organochlorés

II.1. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

Il est largement reconnu de nos jours que la production, le commerce, l'utilisation et le rejet de nombreuses substances chimiques de synthèse constituent une menace globale non seulement pour la santé humaine, mais aussi pour l'équilibre écologique de la biosphère prise dans son ensemble. Parmi ces xénobiotiques, les polluants organiques persistants (POPs) revêtent une dimension et une importance tout-à-fait particulières. La gravité de la dissémination des POPs dans l'environnement réside dans les propriétés spécifiques: faible biodégradabilité (persistance), omniprésence due au transport *via* les courants aquatiques ou atmosphériques, effets toxiques à faible dose, aptitude à s'accumuler dans les organismes (bioaccumulation) et le long des chaînes alimentaires (bioamplification). Sachant que la contamination des POPs est diffusée principalement par l'alimentation et par l'eau, il semble inéluctable que les biotopes aquatiques et les populations qu'ils englobent soient particulièrement menacés, notamment en raison d'une plus grande réceptivité à l'accumulation et à la bioamplification. C'est la raison pour laquelle les études centrées sur l'évaluation des modalités et de l'intensité du transfert trophique des POPs dans les écosystèmes aquatiques naturels aident à la compréhension de l'impact réel et général d'une contamination chronique. Comme il s'agit d'atteintes qualitatives des réserves hydriques dues à l'anthropisation elle est considérée comme faisant partie des changements globaux qui affectent notre planète.

II.1.1 Micropolluants organochlorés - polluants organiques persistants

Parmi les POPs existant, cette étude s'intéresse aux molécules organiques chlorées et en particulier aux pesticides organochlorés (OCs) et polychlorobiphényles (PCBs), substances qui continuent à être dispersées dans l'environnement depuis le début du XXe siècle et dont

l'élimination de l'environnement présente un enjeu à l'échelle mondiale.

Même si la plupart des pays développés ont réduit ou interdit la production de certains POPs dès les années 70, la Convention de Stockholm sur les POPs (2001) constitue le premier pas décisif dans la lutte contre la production massive et l'utilisation incontrôlée des POPs à l'échelle mondiale. Une des décisions issues de cette Convention est le bannissement de l'usage de 12 familles de polluants organiques persistants, comptant parmi les produits chimiques les plus toxiques pour la santé humaine et environnementale. Il s'agit justement des composés organochlorés : des PCB, des dioxines, des furanes et de 9 substances pesticides actives: l'aldrine, la dieldrine, le DDT, l'endrine, le chlordane, l'hexachlorobenzène, le mirex, le toxaphène et l'heptachlore.

II.1.1.1 Pesticides organochlorés

La définition des pesticides, en tant que substances chimiques de synthèse utilisées à vaste échelle contre les ravageurs des cultures, les animaux nuisibles et les agents vecteurs d'affections parasitaires ou microbiennes de l'homme et des animaux domestiques (Ramade, 2000), donne une idée des nombreux bénéfices qu'ils ont apporté à la société humaine. En effet, l'utilisation des pesticides a permis une augmentation de la production des aliments et des fibres, la prévention de la détérioration des récoltes après moisson et lors du stockage et la sauvegarde de millions de vies humaines grâce à la prévention contre certaines maladies (Freedman, 1995). C'est la raison pour laquelle la production mondiale en pesticides (insecticides, herbicides, fongicides, acaricides, nématicides, hélicides, rodenticides, termicides) a connu une croissance considérable depuis la fin de la Deuxième Guerre mondiale, après la découverte des propriétés biocides du DDT en 1948.

Cependant, dès les années 60, le monde scientifique a commencé à accumuler les preuves des effets toxiques secondaires non désirables du DDT (Carson, 1962) et des pesticides analogues sur les organismes non-cibles (Ehrich *et al*., 1977). Malgré leur nom faisant entrevoir une certaine spécificité, les pesticides se révèlent, donc, dotés d'un spectre d'action assez vaste et d'une toxicité qui dépasse souvent les groupes d'organismes contre lesquels ils sont utilisés.

D'une manière générale, la toxicité d'une substance est définie comme sa capacité à provoquer des effets nocifs sur un système biologique (Hoffman *et al*., 1995). De nombreux facteurs influencent la toxicité des composés de synthèse, ils comprennent la structure chimique, la forme moléculaire et la présence de groupes fonctionnels, et déterminent les

modes d'action et les voies métaboliques utilisées par la molécule. La sensibilité des organismes exposés s'avère également un des facteurs déterminant du risque induit par les substances toxiques au même titre que l'intensité et la durée d'exposition.

En ce qui concerne les pesticides organochlorés comme le DDT, la dieldrine, l'heptachlor, l'HCB, l'aldrine, le chlordane, le lindane et les autres, ce sont des dérivés chlorés d'hydrocarbures aliphatiques, aromatiques ou hétérocycliques. Les principales caractéristiques physico-chimiques de ces molécules sont d'abord une grande stabilité face aux agents et facteurs de dégradation physico-chimiques et biologiques. Cette stabilité leur confère une certaine persistance dans les milieux naturels où ils sont absolument omniprésents puisque propagés par l'air, l'eau et les espèces migratrices par delà les frontières internationales. Ils peuvent être déposés loin de leur site d'origine et s'accumulent dans les écosystèmes, notamment dans les écosystèmes aquatiques. Enfin, leur statut de substances liposolubles leur confèrent une aptitude à la bioaccumulation dans les organismes vivants et à être transférés par voie alimentaire dans les chaînes trophiques. La conséquence la plus préoccupante d'un tel transfert trophique est la bioamplification, qui se matérialise par un accroissement des concentrations dans les organismes en substances lipophiles au fur et à mesure qu'elles circulent vers les maillons supérieurs d'un réseau trophique.

II.1.1.2 PCBs

Les polychlorobiphényles (PCBs) sont une famille de composés chlorés aromatiques ayant une très vaste gamme d'applications. Ce sont des produits techniques dont la synthèse et la fabrication à l'échelle industrielle a débuté en 1929, et, pendant plus de 50 ans, ils ont été exportés et abondamment exploités pour des applications commercialisées dans quasiment tous les pays du monde (Nobbs et Chipman, 2003). Il s'agit d'un mélange de biphényles à divers degrés de chloration (de 1 à 10 chlores par molécule). Théoriquement il existe un nombre total de 209 congénères, mais seulement environ 130 d'entre eux apparaissent généralement dans les produits commerciaux et une cinquantaine fait partie des PCBs commercialisés (PNUE, 1999).

Grâce à leurs propriétés physico-chimiques (grande résistance thermique, faible conductivité électrique, haute stabilité chimique) les PCBs ont été couramment utilisés comme fluides diélectriques dans les transformateurs et les condensateurs (sous le nom de pyralènes), dans les systèmes de transfert de chaleur (fluides caloporteurs) et les systèmes hydrauliques, et comme solvants pour les encres dans les papiers autocopiants sans carbone. Les autres

utilisations des PCBs sont leur présence dans les formulations d'huiles lubrifiantes pour les pompes et les turbines et d'huiles de coupe, comme agents plastifiants dans les peintures, les adhésifs, les mastics, comme produits d'ignifugation et dans les plastiques (PNUE, 1999). Ils ont aussi été utilisés comme couche protectrice des semences (communication interne).

Les hauts degrés de stabilité chimique et thermique, qui rendaient les PCBs tellement utiles dans le monde industriel, se sont révélés être, cependant, la cause de divers impacts négatifs sur l'environnement et sur la santé humaine. Ces effets sont principalement attribuables à une partie des congénères de PCBs, notamment aux congénères chlorobiphényles co-planaires (non-ortho substitués) à caractères apparentés à ceux des dioxines, c'est-à-dire stables et résistants à la biodégradation et à la métabolisation. De plus, les PCB sont semi-volatiles ce qui les rend d'autant plus susceptibles d'être transportés par voie atmosphérique ce qui permet une large diffusion *via* les dépôts secs et/ou humides. Si la toxicité aiguë des PCB est faible pour l'Homme, les effets chroniques se traduisent par diverses altérations allant jusqu'à des effets cancérogènes. Ainsi, de nombreuses études comme celles citées par Woo Lee *et al*. (2003) et Hsu *et al*. (2004) ont montré des perturbations du système reproductif, immunitaire et nerveux liées à l'accumulation des PCBs dans les tissus de diverses espèces de poissons, oiseaux et mammifères, y compris l'homme. Cependant, c'est aux produits de dégradation thermique des PCBs que l'on attribue les effets toxiques majeurs, puisqu'à partir de quelques centaines de degrés (en incinérateur par exemple) et en présence d'oxygène se dégagent des composés à forte toxicité, les dioxines (polychlorodibenzodioxines) et les furanes (polychlorodibenzofuranes) qui sont des composés cancérigènes très stables.

A l'image des pesticides OCs, le danger représenté par les PCBs pour l'ensemble de la biosphère repose sur -leur grande stabilité et leur persistance dans l'environnement (dans des conditions particulières, certains PCBs peuvent résister dans certains milieux plus d'un siècle (Ramade, 2000), -sur leur présence dans toutes les matrices environnementales, -sur leur forte tendance à s'accumuler dans la biomasse et -sur leur potentiel de bioamplification.

L'interdiction ou la forte restriction d'utilisation de ces composées dès les années 70 dans la majorité des pays développés a largement contribué à une diminution de leurs quantités dans la nature, toutefois la quantité estimée des PCBs déjà introduits dans l'environnement (1.5 millions de tonnes, selon PNUE, 1999) a et aura un impact important sur tous les composants des divers écosystèmes aquatiques et terrestres.

II.1.2 Contamination des écosystèmes aquatiques par les micropolluants organochlorés (OCs)

Les pesticides organochlorés et les PCB sont donc, reconnus comme étant des molécules persistantes et ubiquistes, qui, en conséquence, sont répandues de manière globale dans l'ensemble de la biosphère (Figure 2.1a,b).

Comme ils représentent les trois quarts de la surface du globe, les milieux aquatiques font figure de « réservoirs » pour ces composés, car ils y sont tous potentiellement transférés. Dans les écosystèmes aquatiques, les micropolluants OCs subissent des répartitions continuelles entre les interfaces air-eau, eau-eau, eau-sédiment, eau-biota, sédiment-biota, biota-biota et c'est cette répartition entre l'eau et les matrices biotiques et abiotiques qui détermine finalement leur dynamique et leur impact écotoxicologique.

Différentes études ont montré que, exceptée une introduction directe, la déposition atmosphérique à travers l'interface air-eau constitue la voie principale de transfert des POPs des sources anthropiques (agriculture, industrie) dans les écosystèmes aquatiques marins et continentaux (Wania *et al*., 1998; Waren *et al*., 2003). De plus, une exposition aux POPs dans l'environnement vient souvent de la redistribution des POPs déjà relâchés dans un cycle (dit de redistribution). Elle comprend l'évaporation dans l'atmosphère à partir de l'eau, suivi du transport dans l'air puis redéposition dans l'atmosphère par les voies humides et sèches; ceci est particulièrement vrai pour les PCBs fixés sur des particules subissant une re-volatilisation ultérieure. C'est la raison pour laquelle la concentration de ces composés dans les différents écosystèmes aquatiques, subit des variations annuelles et saisonnières, liées aux conditions climatiques plutôt qu'à leur déversement direct dans l'environnement (Agrell *et al*., 2002). Ces contaminants se déposent, s'évaporent et se fractionnent continuellement selon leur volatilité. Il en résulte que les POPs de volatilité intermédiaire, comme l'HCB, sont transportés relativement rapidement et que les composés moins volatiles, comme le DDT, migrent plus lentement.

D'une manière générale, les océans semblent être les sites majeurs de stockage des micropolluants OCs, notamment pour les pesticides de type HCH (Wania *et al*., 1998) ainsi que les plus volatiles. Cependant, la pollution par les POPs, et précisément par les pesticides OC, des écosystèmes marins plus fermés et des eaux côtières et continentales est aussi importante - d'une part, car elle dépend directement de la source et du transfert primaire de contamination (comme les rivières, les canaux de drainage ou d'irrigation des champs cultivés, les eaux de lessivage des axes routiers etc…), d'autre part, car elle est souvent une première étape de la diffusion de la contamination et devient alors une source pour les étapes

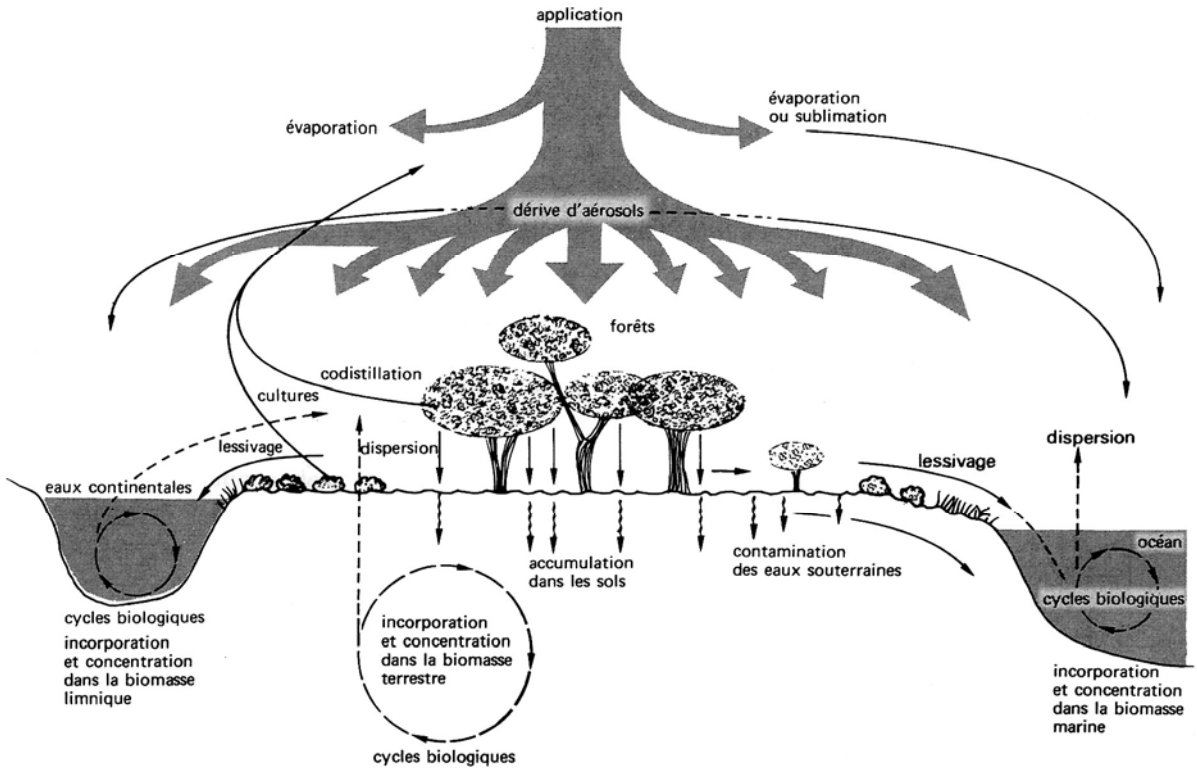


Figure 2.1a Mouvement des pesticides dans la Biosphère (d'après Ramade, 1998)

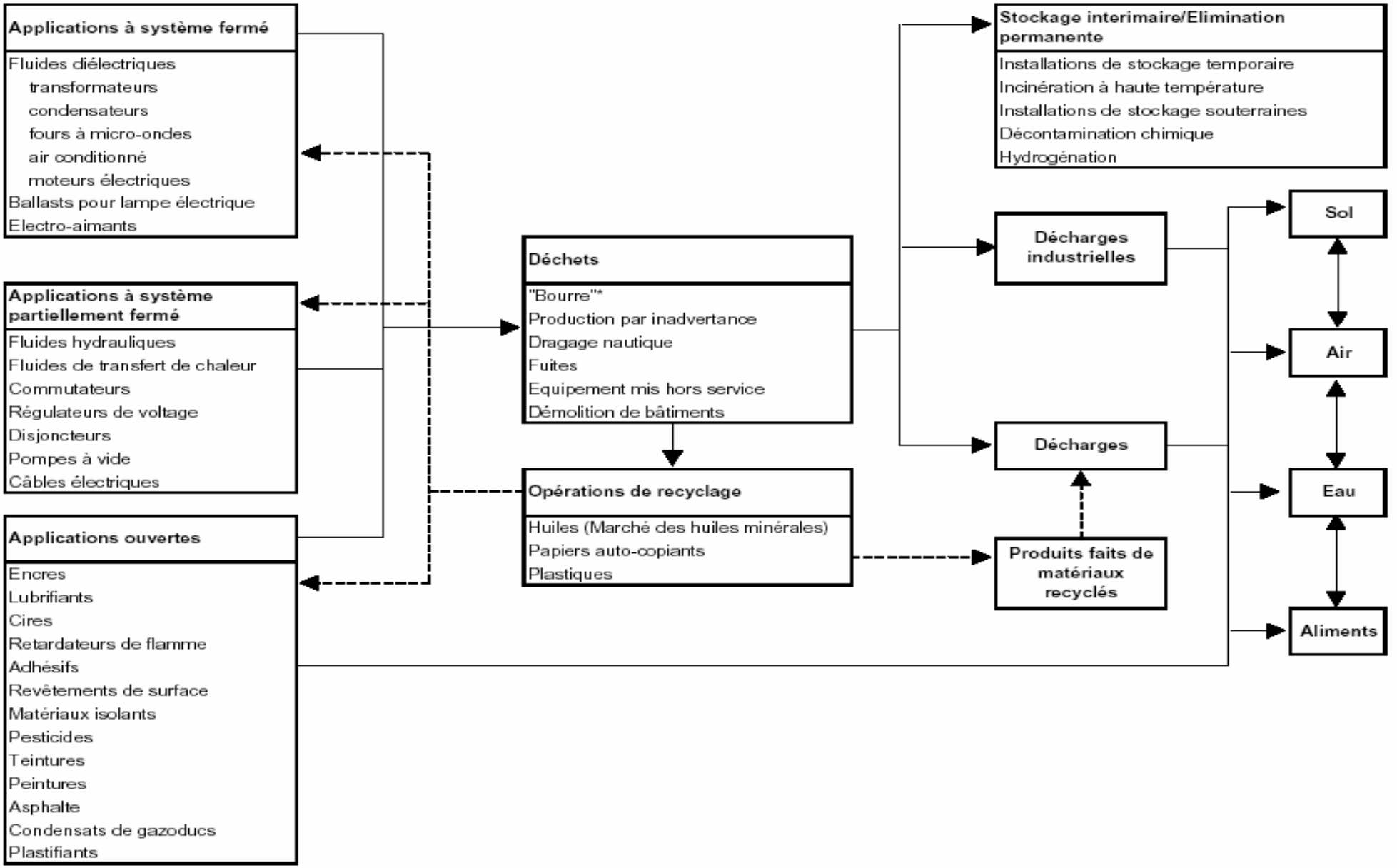


Figure 2.1b Mouvement des PCBs dans l'environnement (d'après PNUE, 1999)

suivantes (Waren *et al*., 2003).

Dans l'évaluation de la contamination par les OCs des écosystèmes d'eaux continentales, il est particulièrement important de considérer les sédiments. À cause de leur nature extrêmement hydrophobe, les PCBs et les pesticides OCs y sont fortement adsorbés. Dans une étude centrée sur les écosystèmes arctiques, il a été démontré que les concentrations des divers contaminants dans les sédiments des eaux continentales étaient significativement plus élevées par rapport à celles détectées aux niveau des sédiments marins (Dietz *et al*., 2000).

Toutefois, des concentrations très élevées des composés OCs sont peu fréquentes dans les milieux naturels, mais leur rétention dans les sédiments donne lieu à une contamination à long terme des milieux aquatiques ayant des conséquences directes et indirectes sur tous les composants des écosystèmes aquatiques y compris les communautés animales et végétales qui y vivent (Brown *et al*., 2000 ; Fleeger *et al*., 2003). Les effets indirects d'une telle contamination englobent des changements comportementaux, physiologiques, des interactions compétitives et/ou des relations prédateur-proie qui entraînent des bouleversements dans la composition des populations et des communautés, ce qui peuvent intensifier, masquer ou révéler des effets toxiques directs (Fleeger *et al*., 2003). Les effets directs sur les communautés ou les effets toxiques varient avec l'intensité de l'imprégnation tissulaire par divers polluants, celle-ci étant elle-même déterminée par les propriétés de la molécule et les caractéristiques de l'organisme exposé. Dans ce contexte, les espèces sentinelles jouent un rôle très important. Ce sont des espèces présentant une pollusensibilité particulière à un groupe de polluants donné qui, en théorie, réagissent à des concentrations de ce dernier dans le biotope bien inférieures à celles susceptibles d'affecter l'ensemble des composants de la biocénose (Ramade, 2000).

Les PCBs et les pesticides OCs, substances hautement lipophiles, tendent à s'accumuler dans les tissus adipeux des organismes où leur concentration dépasse souvent les concentrations des milieux externes par le phénomène de bioconcentration. Par la suite, ils peuvent être transportés par voie trophique le long les chaînes alimentaires et atteindre des niveaux considérables (voire toxiques) dans les tissus des prédateurs situés aux échelons supérieurs des réseaux trophiques (y compris l'homme) au cours d'un phénomène connu sous le nom de bioamplification (Figure 2.2)

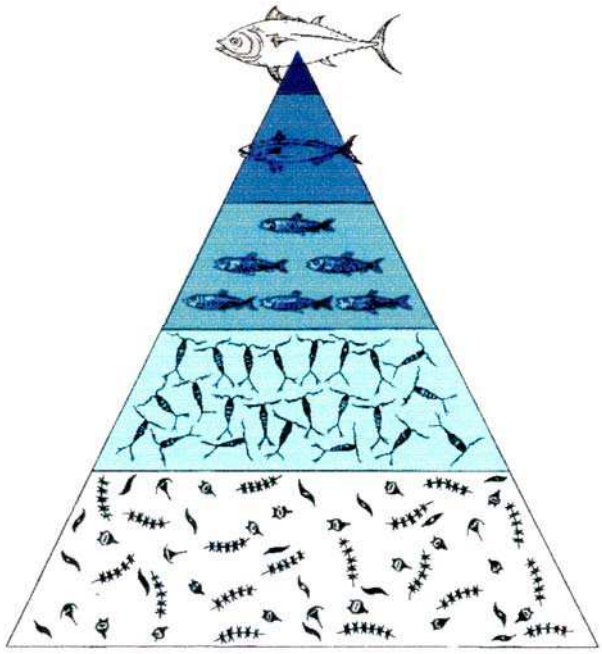


Figure 2.2 Bioamplification des xénobiotiques chez les organismes aquatiques (d'après Cognetti et al., 1999)

II.1.3 Bioaccumulation des micropolluants OCs dans les tissus des organismes aquatiques

Les micropolluants OCs, comme tous les autres composés persistants et hydrophobes, peuvent être bioaccumulés dans les organismes aquatiques directement à partir de l'eau et des sédiments à travers les branchies et les téguments (bioconcentration), par l'ingestion des particules suspendues et par la consommation d'aliments contaminés (bioamplification).
La bioconcentration à partir de l'eau est principalement liée aux processus de respiration et suit les mécanismes de diffusion passive analogues à ceux de l'oxygène. L'accumulation à partir des sédiments et par l'ingestion des particules suspendues dépend de la capacité d'adsorption des contaminants par ses phases environnementales et des processus de compétition entre eux et la biomasse pour les substances organiques et hydrophobiques (Van der Oost *et al*., 2003).

La bioamplification est un cas particulier de bioaccumulation due à un transfert par le biais de la chaîne alimentaire, elle a pour résultat que la concentration du contaminant dans un organisme est supérieure à celle de ses aliments (Gobbas et Morrison, 2000). Si les sédiments contaminés rejettent par diffusion lente un polluant dans un écosystème aquatique, il est très probable que la contamination des organismes situés aux niveaux trophiques supérieurs ou

des espèces pélagiques passe par les organismes benthiques et par des transports trophiques successifs (Van der Oost, 2003). De même il a été démontré que les organismes planctoniques absorbaient des quantités importantes de PCBs et certains pesticides OC au moment de leur diffusion dans les milieux aquatiques (Quental *et al*., 2003). Ce sont alors les organismes planctoniques qui deviennent une source de contamination qui se propagera ensuite surtout par un processus de bioamplification. Il a été également suggéré que le taux d'accumulation dans la biomasse de certaines molécules lipophiles était lié à la teneur des tissus en lipides structuraux et donc à la capacité d'incorporation des POPs dans les membranes biologiques leur conférait une certaine prédisposition à la bioamplification (Roche *et al.*, 2002). En effet, la constitution lipidique tissulaire (phospholipides, lipides neutres) des organismes est déterminante d'un point de vue écotoxicologique car elle est susceptible d'affecter le niveau des POPs dans les réseaux trophiques aquatiques (Larson *et al*., 2000).

Toutefois, les niveaux de contamination du biota aquatique sont déterminés non seulement par les processus d'accumulation, mais aussi par la cinétique de ces processus et par les mécanismes d'élimination des polluants (Figure 2.3). Ces facteurs sont spécifiques de chaque polluant et de chaque organisme (Gobas *et al*., 1999). Les organismes aquatiques disposent de deux voies principales d'élimination des polluants OCs: l'excrétion sous leur forme chimique originale et la biotransformation qui transforme la molécule en métabolites plus hydrosolubles et donc plus facilement éliminés. La biotransformation est un processus essentiel qui est déterminant pour l'intensité de l'activité toxique, mais qui dépend de la durée et du temps d'exposition directe de l'organisme. Néanmoins, il est connu que les métabolites et en particulier les formes radicalaires produites au cours de mécanismes de détoxication présentent souvent des activités cytotoxiques supérieures à celle du produit parent. En définitive, l'intensité de l'imprégnation tissulaire et les capacités d'excrétion des métabolites dépendent du type d'organisme, du type de tissu et des conditions qui contrôlent l'activité des enzymes impliquées dans la biotransformation (cycle vital, état nutritionnel, saison..)

Puisque l'existence et l'amplitude d'une contamination persistante dépend de l'habitat, du régime alimentaire et des capacités métaboliques des organismes elle est donc étroitement liée à leur niveau trophique (Baumard *et al.,* 1998). Comme il n'existe aucune relation entre le niveau trophique et la teneur globale en lipides ce sont les interactions trophiques qui jouent un des rôles fondamentaux dans la distribution des composés lipophiles au sein des réseaux trophiques aquatiques (Russel *et al.,* 1999).

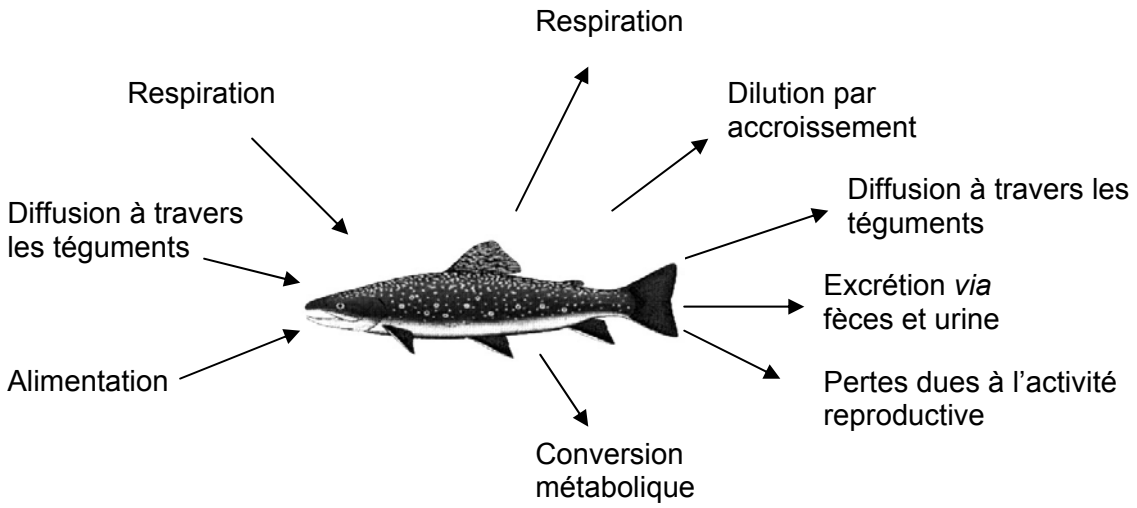


Figure 2.3 Processus d'absorption et de l'élimination des xénobiotiques chez les animaux aquatiques (modifié de Mackay et Fraser, 2000)

II.1.4 Transfert trophique des micropolluants OCs - évaluation par la méthode isotopique

Le rôle du processus de bioamplification dans les chaînes alimentaires aquatiques est à ce jour largement controversé. Certaines études suggèrent que la bioamplification représente une voie importante du transfert des contaminants dans l'ensemble des réseaux trophiques, d'autres rapportent son effet négligeable en ce qui concerne les espèces occupant les niveaux trophiques inférieurs (Binelli et Provini, 2003). Mais ce qui est définitivement admis est que la bioamplification dépend principalement de la nature des contaminants, du niveau trophique et de l'habitat des organismes contaminés. Une méthode récente qui permet de mettre en relation les niveaux trophiques avec l'amplitude de contamination est basée sur la détermination chiffrée des emplacements trophiques par méthodologie isotopique (Chapitre I). Ainsi les rapports des isotopes lourds et légers de l'N ($\delta^{15}N$) est du C ($\delta^{13}C$), à l'origine utilisés comme des variables continues indiquant respectivement les niveaux trophiques et les différentes sources du carbone primaire des organismes, sont couplés aux mesures de contamination. Cette analyse permet de définir les modalités de contamination dans une communauté, c'est-à-dire s'il s'agit d'une intoxication directe due à une exposition récente ou un transfert trophique de micropolluants par le biais de la chaîne alimentaire, une bioamplification (Kidd *et al*., 1998; Das *et al*., 2000; Fisk *et al*., 2001). La puissance des méthodologies isotopiques en écotoxicologie permettra, à terme, de révéler non seulement le

mode d'accumulation des toxiques dans les tissus animaux mais également l'ancienneté et la chronicité d'une pollution organique et donc facilitera l'évaluation des risques. Malgré la nouveauté de cette technologie et la nécessité de pallier les aléas de la modulation des données isotopiques, un certain nombre de travaux ont donné des résultats significatifs. Par exemple, l'analyse du $\delta^{15}N$ parallèlement aux analyses de biocontaminants a mis en évidence dans le lac Malawi (Afrique de l'Est) une relation statistique entre l'imprégnation par les OCs (comme le DDT) et le $\delta^{15}N$ des organismes du réseau trophique, celle-ci se révélant plus significative au niveau pélagique qu'au niveau benthique (Kidd *et al*., 2001). Hoekstra *et al*. (2003) en utilisant la même approche ont mis en relation l'intensité de la bioamplification avec la stratégie alimentaire des organismes et les propriétés physico-chimiques et de biotransformation pour différents micropolluants OCs.

D'autres travaux comme ceux de Brown *et al*. (2000), réalisés dans les estuaires situés au nord du Golfe du Mexique, ont montré que l'analyse de la longueur de la chaîne trophique benthique d'un écosystème aquatique était un outil pertinent pour évaluer des réponses des communautés à une exposition chronique. Ils estiment également que cette mesure est aussi utile pour apprécier les réponses toxicologiques des organismes situés aux divers niveaux trophiques. En outre, cette méthode peut être très utile pour définir la structure des réseaux trophiques à travers l'évaluation de la distribution des contaminants dans les différents maillons trophiques (Russel *et al*., 1999).

II.1.5 Importance de l'étude de bioamplification dans la surveillance de la qualité des milieux naturels

L'émergence du concept actuel de la préservation de l'écosphère a été associée à l'évolution récente de la notion d'environnement considéré en tant qu'ensemble de ressources de matières primaires - alimentaires, renouvelables ou non - génétiques, médicamenteuses, esthétiques ou récréatives (Lagadic *et al*., 1998). Dans ce contexte, des critères qualitatifs et/ou quantitatifs ont été proposés afin d'évaluer avec une précision toujours plus poussée la qualité des écosystèmes. De nombreuses méthodes mises en place afin de permettre la surveillance de la qualité des milieux naturels ont aussi évolué, notamment au cours de ces dernières années. L'approche traditionnelle « chimique », basée sur la mesure de variables chimiques et physiques du milieu, y compris la détection et la quantification des polluants dans les milieux physiques, a été renforcée par une approche « biologique » intégrant des variables biotiques et l'effet de la pollution à différents niveaux d'organisation biologique

(moléculaire, cellulaire, individuel, populationnel, communautaire et biocénotique). Le recours à des méthodes basées sur des observations quantitatives ou qualitatives *in natura* (biosurveillance) se révèle un moyen prometteur pour pallier les insuffisances des méthodes chimiques. Alors que les mesures d'un contaminant dans l'environnement, par exemple dans l'eau ou dans les sédiments, ne fournissent que des informations sur les concentrations physiques, une analyse des substances chimiques et de ses métabolites dans l'organisme, imprégnation tissulaire ou lipidique par exemple, permet de quantifier la fraction de polluant biodisponible et, en conséquence, susceptible de causer un effet sur l'organisme contaminé (Lam et Gray, 2003). En outre, elle donne des informations sur la métabolisation de la substance et donc souvent son potentiel toxique. De plus les contaminants introduits dans une chaîne ou un réseau alimentaire peuvent affecter de manière différente les espèces des niveaux trophiques supérieurs (Lam et Wu, 2003) et par voie de conséquence influencer la dynamique d'une population et/ou d'une communauté en changeant finalement la qualité d'un écosystème (Van der Oost, 2003).

Dans ce contexte, l'étude du transfert trophique des polluants peut être qualifiée de «bioindicateur» intermédiaire entre les indicateurs biologiques individuels (espèces bioaccumulatrices ou espèces sentinelles) et les indicateurs écologiques (basés sur la structure de la communauté ou simplement sur la présence ou l'absence d'espèces). En offrant un outil de liaison entre la concentration des divers contaminants coexistants dans les milieux naturels, leur biodisponibilité individuelle et réelle à différents niveaux d'un système biologique (du tissu à la communauté) et leur toxicité potentielle intrinsèque, la bioamplification se confirme actuellement en tant qu'indicateur de la qualité des écosystèmes aquatiques incontournable dans les études de biosurveillance. De plus, en portant le sujet d'étude du niveau individuel à celui d'une communauté complexe, la portée écologique et toxicologique de l'impact d'une contamination aussi bien que l'échelle temporelle augmentent substantiellement.

Cependant, bien que l'analyse d'une bioamplification fournit des informations sur la biodisponibilité, la bioaccumulation et même la biotransformation des polluants dans les systèmes biologiques, son utilisation unique ne permet pas d'apprécier l'impact de cette contamination chimique sur l'état sanitaire de l'écosystème, ni d'obtenir une détection précoce des modifications de sa qualité. C'est la raison pour laquelle l'utilisation de biomarqueurs, pris comme signaux d'alerte des effets d'une contamination chimique, a été préconisée dans le cadre des études écotoxicologiques de pollution chronique ou dans des programmes de surveillance du milieu. L'étude de certains biomarqueurs traditionnels à différents niveaux du réseau trophique sera l'objet du troisième Chapitre de ce mémoire.

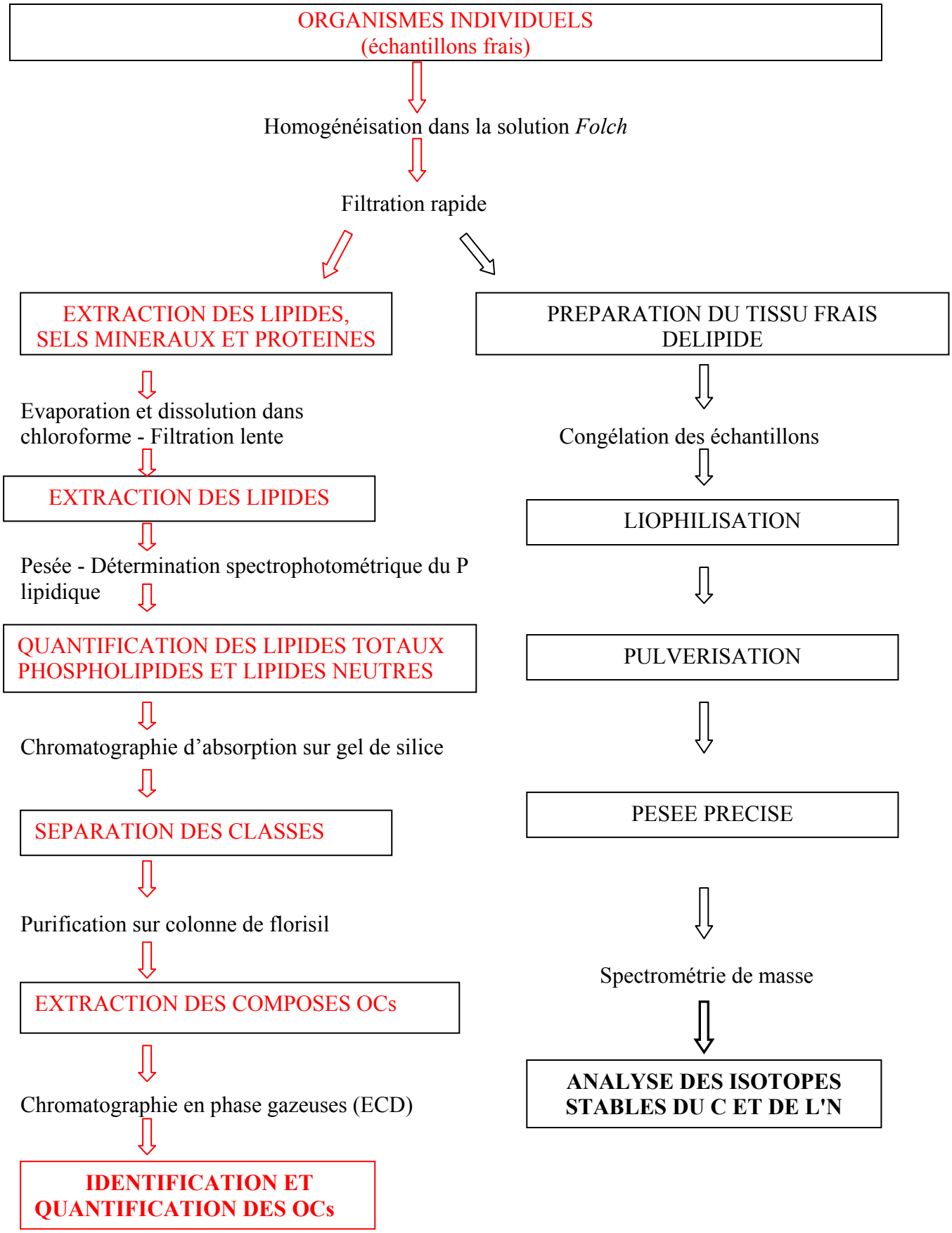


Schéma 2.1 Etapes de la préparation des échantillons pour la détermination des taux d'imprégnation par les substances OCs

II.2. MATERIEL ET METHODES

II.2.1 Site d'étude et matériel biologique

Le site d'étude (étang de Vaccarès, canaux de drainage) et le matériel biologique (invertébrés aquatiques et poissons) sont décrits dans le premier Chapitre (§I.2.1, §I.2.2). La détermination des rapports isotopiques et la contamination par les POPs ont été effectuées sur les mêmes individus collectés dans les écosystèmes aquatiques camarguais au cours de l'année 2002 (aux mois de mars, avril, mai, juin et septembre). Les campagnes de prélèvement ont été programmées en fonction des périodes de traitement des zones rizicoles riveraines (avant, pendant et après).

II.2.2 Matériel chimique - les POPs analysés

Les principales caractéristiques de tous les POPs recherchés sont présentées dans les Tableaux 2.1 et 2.2.

II.2.3 Extraction des micropolluants OCs dans les fractions lipidiques

Les différentes étapes de préparation des échantillons pour la détermination des taux d'imprégnation par les substances OCs chez les organismes camarguais sont schématisées sur le Schéma 2.1.

II.2.3.1 Extraction des substances lipidiques et liposolubles

L'extraction des lipides* à partir des tissus des animaux collectés dans les sites d'étude au cours de campagnes de prélèvement en 2002 est basée sur leur solubilité dans les solvants (solution de Folch modifiée, dichlorométhane 1/méthanol 2 (v/v) (Folch *et al*., 1975), et de chloroforme). La description détaillée de cette extraction est détaillée dans le paragraphe Matériel et méthodes de la première partie de ce mémoire (§I.2.6.3).

* Pour faciliter la lecture, les substances extraites par cette opération seront indiquées globalement par le terme de lipides

Tableau 2.1$_1$ Caractéristiques principales des pesticides OCs (www.epa.gov; www.inra.fr/agritox; www.chem.unep.ch/pops/indxhtms/asses6.html; www.atsdr.cdc.gov/toxpro2.html ; www. cdc.gov/niosh/ipcs/french.html ; Index phytosanitaire, 2004)

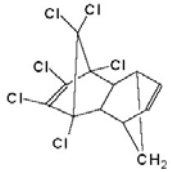
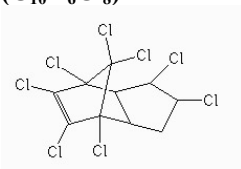
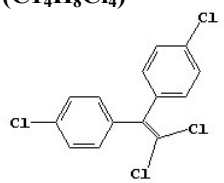
Produit technique Substance active	Utilisation	Propriétés physiques et chimiques					Toxicité
Aldrine ($C_{12}H_8Cl_6$)  1,2,3,4,10,10-hexachloro-1,4,4a,5,8,8a-hexahydro-1,4-endo,exo-5,8-diméthano-naphthalène	Insecticide du sol très efficace, il a été employé pour contrôler les termites, les vers s'attaquant aux racines de maïs, les coléoptères et les larves colonisant les grains de maïs, les charançons dans le riz, les sauterelles et les coléoptères japonais. Interdit en France pour son usage phytosanitaire depuis 1972 Mais il est employé, sous forme de concentré émulsifiable ou de poudre mouillable, pour protéger les structures en bois contre les termites avant et après la construction des charpentes. Il est aussi utilisé pour enduire et protéger les semences, notamment, celles de riz. et pour le traitement de sol pour des cultures non alimentaires.	Point de fusion (°C)	Densité relative à l'eau (g/cm^3)	Tension de vapeur 20°C (Pa)	Coeff de partition (Log)	Demi-vie DT_{50}	La substance peut être absorbée par l'organisme à travers la peau, par ingestion. Et inhalation, La toxicité clinique est réellement due à son métabolisme rapide sous forme de dieldrine dans le corps. Les symptômes reflètent une toxicité due à l'inhibition de la neurotransmission GABA: maux de tête, tremblements, vertiges, hyperexcitabilité, évanouissement et coma. La plupart des décès est due à des expositions intentionnelles ou accidentelles à des fortes concentrations. Très toxique pour les poissons et les crustacés (CL_{50}allant de 2,2 à 53 µg/1). DJA est fixée à 0,0001mg/kg/jour.
		104-105.5	1.6	$7.5x10^{-5}$	Kow 6.5 Koc 7.67	20-100 jours (sols)	
		Son aspect varie de l'incolore au brun foncé, sous forme liquide ou solide. il est résistant aux bases organiques et minérales, ainsi qu'à l'action des chlorures métalliques hydratés et des acides doux. Stable jusqu'à 200°C ; son pH est compris entre 4 et 8.					
Chlordane ($C_{10}H_6Cl_8$)  1,2,4,5,6,7,8,8-octachloro-3a,4,7,7a-tétrahydro-4,7-endo-méthanoindane	Le chlordane a été utilisé comme insecticide pour lutter contre les termites et comme insecticide domestique pour éliminer les fourmis et les blattes. Ses usages agricoles sont limités, mais il est encore couramment utilisé dans certaines régions africaines. En France, son utilisation en agriculture a été interdite en 1972.	104-107	1.59-1.63	$3,9x10^{-6}$ $2.2x10^{-5}$	Kow 5.54 Koc 3.49-4.64	2-4 ans (sol)	Les intoxications peuvent avoir lieu par voie orale, inhalation ou résorption cutanée (rapide). Il provoque des irritations de la peau et de l'appareil respiratoire. Il s'accumule dans les tissus adipeux, le foie et les reins. Une intoxication chronique entraîne des lésions graves de ces organes. Réputé pour avoir des effets cancérogènes, il est extrêmement toxique pour les poissons, chez lesquels il s'accumule jusqu'à 10^5 fois; par cette voie, il pénètre dans la chaîne alimentaire.
		Liquide brun, visqueux et inodore (produit technique). Le produit technique contient 60-75% d'isomères de chlordane (*cis* et *trans*) et 25-40% de substances dérivées, principalement deux isomères heptachloro(10-20%). Compte tenu de sa très faible solubilité dans l'eau et de sa stabilité, le chlordane doit être considéré comme une substance très persistante dans l'environnement.					
***pp*' DDE ($C1_4H_8Cl_4$)**  1,1-dichloro 2,2-bis(p-chlorophenyl) ethylene	Sans utilisation commerciale directe, le *pp*'DDE est le principal métabolite du DDT, l'insecticide le plus utilisé dans le monde de fait de son large spectre d'action et de sa grande rémanence le rendant efficace plusieurs semaines, mois apès sa dispersion. Actuellement il est interdit pour une utilisation agricole dans la plupart des pays industrialisés, toutefois il revient couramment pour la lutte contre le palludisme.	89		$6.0x10^{-5}$	Kow 6.51 Koc 4.7		Le DDT et ses métabolites sont extrêmement persistants dans l'environnement et se bioaccumulent dans les chaînes trophiques. La voie principale d'intoxication est l'ingestion d'aliments contaminés. La toxicité touche le système nerveux, les processus reproductif et endocrinien. Les poissons et les oiseaux sont particulièrement sensibles. Il est potentiellement cancérogène même pour l'homme.
		La substance pure est sous forme de poudre blanche. Insoluble dans l'eau, il est soluble dans les lipides et dans la plupart des solvants organiques.					

Tableau 2.1$_2$

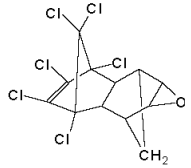
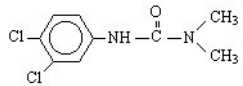
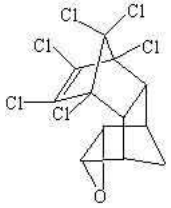
Produit technique Substance active	Utilisation	Propriétés physiques et chimiques					Toxicité
Dieldrine ($C_{12}H_8Cl_6O$)  1,2,3,4,10,10-hexachloro-6,7-époxy-1,4,4a,5,6,7,8,8a-octahydro-1,4,5,8-diméthanonaphthalène	Intervient comme matière active dans la préparation d'insecticides. En France, son emploi étant interdit en agriculture en 1972, elle est utilisée notamment dans la lutte contre les termites et les insectes xylophages (protection des charpentes).	Point de fusion (°C)	Densité relative à l'eau	Tension vapeur 20°C (Pa)	Coeff partition (Log)	Demi-vie DT_{50}	Facilement absorbé par les voies cutanée, digestive et pulmonaire, il s'accumule dans les tissus graisseux de l'organisme d'où peut effectuer une redistribution lente et progressive. Il agit en tant qu'agent neurostimulateur avec des effets néfastes sur le système nerveux central. Impliqué dans des mortalités en milieu naturel, il est potentiellement mutagène et carcinogène. Ses effets hépatocancérogènes sont probablement dus à l'induction d'un stress oxydatif chez les animaux exposés.
		176-177	1.75	$3.1x10^{-6}$	Koc 6.67 Kow 6.2	3 ans (sol)	
		La substance pure est sous forme de cristaux blancs, la substance technique est sous forme d'écailles solides brun clair. Pratiquement insoluble dans l'eau, il est peu soluble dans les alcools, non inflammable et très stable sous l'action de tous les types de dégradation.					
Diuron ($C_9H_{10}Cl_2N_2O$)  3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea	Herbicide de la famille des urées substituées utilisé pour le désherbage des zones non agricoles : jardins, cours, trottoirs, parcs, bordures de voiries et dans la viticulture, le désherbage des exploitations de lentilles, d'ananas ou de bananes… Il pénètre dans le végétal par les racines, agit au niveau foliaire et il a une action anti-germinative. Applicable pendant le repos végétatif à la sortie de l'hiver. Depuis 2002 son utilisation est strictement limitée en France, interdite pour un usage non-agricole, les produits à base de diuron seul sont retirés du marché pour tous les usages à l'exception de désherbage des exploitations de lentilles, de canne à ,sucre, de banane et d'ananas.				Kow 2.77-2.85	56-231 jours (plein champ)	Absorbé par les racines, il inhibe la photosynthèse et agit sur les graines en germination et les très jeunes plantules. Selon la décision de la CEE d 06/08/01 il est dit «nocif pour l'environnement, nocif en cas d'ingestion, avec des effets cancérogènes suspectés. Les preuves sont insuffisantes, mais il présente des risques graves pour la santé en cas d'exposition prolongée par ingestion. Il est très toxique pour les organismes aquatiques, peut entraîner des effets néfastes à long terme pour l'environnement aquatique. Il touche aussi le la reproduction et le développement des organismes (EPA).
		Solide cristallin incolore, il s'hydrolyse à la chaleur et en conditions alcalines et/ou fortement acides.					
Endrine ($C_{12}H_8C_{l6}O$)  3,4,5,6,9,9,-Hexachloro-1a,2,2a,3,6,6a,7,7a-octahydro-2,7:3,6-dimethanonaphth[2,3-b]oxirene.	L'endrine est un insecticide foliaire utilisé principalement sur des cultures de plein champ telles que le coton et pour la protection des graines. Elle a été également employée comme rodenticides et pour contrôler les souris et les campagnols. En raison de ces effets secondaires sur les organismes non-cibles son utilisation est interdite en France.	200°C	1.7	négligeable	Kow 3.21-5.34	12 ans (sols)	L'endrine est très toxique pour les organismes aquatiques. Une attention particulière doit être accordée aux abeilles, aux oiseaux et aux mammifères chez lesquels il affecte le système nerveux. La bioaccumulation a lieu chez les poissons et dans les aliments d'origine marine. Un grand soin devrait cependant être apporté pour éviter tout rejet supplémentaire, par ex. par un déversement peu approprié.
		Substance solide, blanche et sans odeur, ses principaux métabolites sont l'endrine aldéhyde et l'endrine kétone dont les effets et le devenir dans l'environnement sont peu connus					

Tableau 2.1$_3$

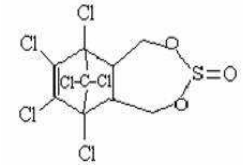
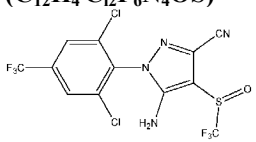
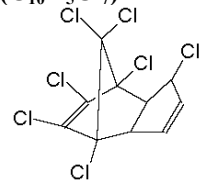
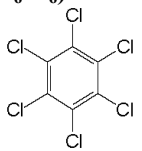
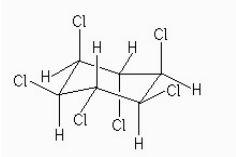
Produit technique Substance active	Utilisation	Propriétés physiques et chimiques					Toxicité
Endosulfan ($C_9H_6C_{l6}O_3S$)  6,7,8,9,10,10-Hexachloro-1,5,5a,6,9,9a-hexahydro-6,9-methano-2,4,3-benzo(e)-dioxathiepin-3-oxide	L'endosulfan existe sous la forme de deux isomères (α et β). Les isomères α et β présentent le rapport de 7 :3 respectivement dans le composé technique. L'endosulfan sulfate est aussi présent dans la substance technique, on le retrouve dans l'environnement comme produit de photolyse et dans les organismes comme substance résultant de l'oxydation au cours du processus de biotransformation. Il est couramment utilisé comme pesticide sur les cultures vivrières et non vivrières dans de nombreux pays. L'utilisation de l'endosulfan a régulièrement diminué ces dernières années dans les pays de l'Union européenne. Il est probable d'envisager son l'interdiction pour un usage phytosanitaire.	Point de fusion (°C)	Densité relative à l'eau	Tension vapeur 20°C (Pa)	Coeff partition (Log)	Demi-vie DT_{50}	L'endosulfan, surtout son isomère α, est très toxique pour les organismes aquatiques, notamment les poissons, et il est également toxique pour les mammifères de façon aiguë et chronique. Son principal produit de transformation (le sulfate d'endosulfan) est aussi toxique que le composé parent. Des études rapportent ses effets neurotoxiques et genotoxiques. CL_{50} (96-h) = 0,37-2,1µg/l (poissons d'eau douce) CL_{50} (96-h) = 0,1-0,32 µg/l (poissons marins)
		106	1.73	$1x10^{-5}$	Kow 3.55 et 3.62 Koc 3.5	≅ 6 mois (sols)	
		Il s'hydrolyse très lentement dans des eaux acides, mais rapidement dans des eaux alcalines. En Europe, la plupart des masses d'eau de surface sont sensibles à un pH faible. Dans les sols, le temps de demi-vie serait supérieur à 6 mois si le sulfate d'endosulfan, métabolite aussi toxique, est présent. Etant utilisé exclusivement comme agent phytosanitaire, la totalité du volume produit est épandue sur les terres agricoles. Une partie se répand dans l'atmosphère par dispersion et par volatilisation, et une autre partie dans les eaux de surface en raison des phénomènes de lessivage et de ruissellement.				
Fipronil ($C_{12}H_4C_{l2}F_6N_4OS$)  5-amino-1-(2,6-dichloro-a,a,a-trifluoro-p-tolyl)-4-trifluoromethylsulfinylpyrazole-3-carbonitrile	Insecticide de la famille des phénylpyrazoles commercialisé depuis 1993. il est utilisé pour le traitement des céréales, maïs, tournesol et riz pour la lutte contre les coléoptères (taupins), les diptères (mouches grises), les chironomes et les fourmis. Il est également applicable pour le traitement des semences. D'après la décision de la Commission Française des Toxiques du 20/10/2003 cet insecticide est défini comme « toxique dangereux pour l'environnement, toxique par inhalation, contact avec la peau et par ingestion avec des risques d'effets graves pour la santé en cas d'exposition prolongée par ingestion et très toxique pour les organismes aquatiques, peut entraîner des effets néfastes à long terme pour l'environnement aquatique ». Cependant son interdiction est toujours en discussion bien qu'il soit soupçonner d'être néfaste pour l'apiculture.	200°C		$3.7x10^{-5}$	Kow 4	18-110 jours(sols)	Il présente un large spectre d'activité et agit après ingestion et inhalation. Son mode d'action original s'exerce au niveau du système nerveux central par un blocage des canaux chlorés normalement régulés par le GABA. Soupçonné de décimer les abeilles (DL_{50} Contact : 0.00593 µg/abeille. DL_{50} Orale : 0.00417 µg/abeille). Les effets sur d'autres invertébrés et sur les vertèbres et sur l'homme sont très controversés à l'heure actuelle.
		On le connaît sous une forme solide blanche à odeur de moisi.					

Tableau 2.1$_4$ Caractéristiques principales des pesticides OCs (www.epa.gov; www.inra.fr/agritox; www.chem.unep.ch/pops/indxhtms/asses6.html; www.atsdr.cdc.gov/toxpro2.html ; www. cdc.gov/niosh/ipcs/french.html ; Index phytosanitaire, 2004)

Produit technique Substance active	Utilisation	Propriétés physiques et chimiques					Toxicité
Heptachlor **($C_{10}H_5Cl_7$)**  1,4, 5,6,7,8,8a-heptachloro-3a,4,7,7a-tetrahydro-4,7-methanoindene	L'heptachlor est un insecticide de contact persistant nonphytotoxique aux concentrations agissant sur les insectes et les termites. Il a été utilisé intensivement pour le traitement de graines et des sols afin de protéger le maïs, les petites céréale, et le sorgho contre des parasites ; pour contrôler les fourmis, les larves, les termites et les charançons. Il a également été employé pour un usage domestique (lutte contre les termites). C'est un des composés principaux du pesticide chlordane et son métabolite. En raison de ses propriétés cancerogènes, l'heptachlor est interdit depuis 1988, en France son utilisation en agriculture est strictement limitée.	Point de fusion (°C)	Densité relative à l'eau	Tension vapeur 20°C (Pa)	Coeff partition (Log)	Demi-vie DT_{50}	L'heptachlor et l'heptachor epoxyde sont des substances très lipophiles qui s'accumulent dans la fraction lipidique des organismes et y sont extrêmement persistants. Après l'ingestion, ses molécules ont des effets nocifs au niveau du système nerveux et l'appareil reproductif et conduit à une augmentation de mortalité chez les populations exposées. Des études ont montré des relations entre l'exposition à l'heptachlor et ses metabolites et le développement de tumeurs chez le rat, mais ces substances ne cont pas classifiées cancérigènes.
		95-96	1.57	$3x10^{-4}$	Kow 5.44 Koc 4.34		
		Substance solide blanche, soluble dans tous les solvants organiques, persistant dans l'environnement, bioaccumulable. Son métabolite principal est l'heptachlor époxyde obtenu par l'oxydation de l'heptachlor.					
Hexachlorobenzene **(C_6Cl_6)** 	L' HCB est un fongicide qui a été utilisé pour le traitement des céréales, particulièrement pour le contrôle de la rouille du blé depuis1945. Il a été aussi utilisé pour enrober les semences afin de prévenir les mycoses. Interdit pour une utilisation en agriculture en France depuis 1972.	231°C	1.21	1.09×10^{-5}	Koc: 2.56-4.54 Kow: 3.03-6.42	3-6 ans (sol)	Cette substance peut être absorbée par inhalation de ses aérosols, à travers la peau et par ingestion. Elle peut avoir des effets sur le foie et le système nerveux, entraînant des troubles fonctionnels et des lésions de la peau. Elle est peut-être cancérogène pour l'homme. Les tests chez l'animal montrent qu'elle peut entraîner des effets toxiques sur la reproduction ou le développement chez l'homme.
		La substance se présente sous forme de cristaux blancs					
Lindane **($C_6H_6Cl_6$)**  γ-1,2,3,4,5,6-Hexachlorocyclahexane	Doté d'un très large spectre d'activite insecticide le lindane a trouvé de nombreuses applications en agriculture, dans la protection des bois, en médecine vétérinaire et en santé publique (anti-poux). Ses principales utilisations sont :le traitement des sols (mais, betterave),des semences (cereales colza), la protection des bois de construction (grumes, charpentes, mobilier), le traitement antiparasitaire du betail et des animaux de cornpagnie (lutte contre les tiques, puces), usages domestiques (lutte contre les mouches, les moustiques). En raison de ses effets nuisibles sur l'environnement il a été interdit en France en 1998.	112.5	1.89	$4.2x10^{-5}$	Kow 3.72 Koc 3.57	400 jours (sols)	Les études de toxicité aiguë réalisées par voie orale et par voie cutanée chez de nombreuses espèces (souris. rats, cobayes. lapins, chiens, poissons) ont montré que sa cible était le système nerveux central dont la stimulations se traduit par une hyperactivité et des convulsions. Des anomalies morphologiques du foie et du rein ont été mis en évidence. Différents facteurs influencent nettement la toxicité du produit : l'état nutntionnel, l'induction enzymatique, l'âge (plus grande sensibilité des jeunes animaux) et, dans le cas d'intoxications par voie cutanée, la nature du tiers solvant utilisé.
		Sous forme de 8 isomères ce pesticide est composé de 99% de γHCH, α, β et le δHCH se trouvent en traces. Le ΓHCH sous forme de cristaux blancs, à basse température et à la température ordinaire, il est deshydrochloré, en cyclohexanes chlorés d'abord, puis en trichlorobenzènes. II peut également être décomposé par des poudres de métaux (zinc, fer, aluminium) pour formé du benzène.					

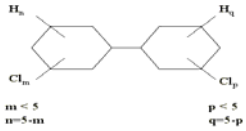
IDENTIFICATION	**PCB** Polychlorobiphényles 		
UTILISATION	De nombreuses utilisations industrielles dans les systèmes réfrigérants et l'industrie électrique (condensateurs, transformateurs); comme matériau d'étanchéité pour les surfaces de bois et de ciment; comme fluides hydrauliques, huiles de coupe.		
APPELLATIONS COMMERCIALES/ SYNONYMES	Arochlor, Chlorextol, biphényles chlorés, diphényles chlorés, Clophen, chlorobiphényles, Dykanol, Fenclor, Inerteen, Kanechlor, Noflamol, Phenoclor, polychlorobiphényles, Pyralène, Pyranol, Santotherm, Sovol, Therminol.		
AROCHLOR	Les 14 formulations (1016, 1210, 1216, 1221, 1231, 1232, 1240, 1242, 1248, 1250, 1252, 1254, 1260, 1262, 1268) se composent de différents congénères de chlorobiphényles dont le nombre (de 1 à 10) et la position des atomes de chlore varie. En effet, les derniers deux chiffres du nom de la formulation rapportent le pourcentage en chlore.		
PROPRIETES CHIMIQUES ET PHYSIQUES	Les chlorobiphényles sont thermiquement stables, résistants à l'oxydation, aux acides, aux bases et à d'autres agents chimiques. Sous leur forme pure, ce sont des cristaux incolores, mais les produits commerciaux sont liquides. Ils sont insolubles dans l'eau, solubles dans les huiles et dans les solvants organiques.		
FORMULATIONS	Sous leur forme pure ce sont des cristaux incolores. Sous leur forme commerciale ils sont liquides (ou mélanges liquides)		
TOXICITE	**Toxicité aiguë:** DL50 par voie orale chez le rat: 4 (Arochlor 1221) - 10 (Arochlor 1268) g/kg de pds c.; DL50 chez le lapin: 1 (Arochlor 1242) - 3 (Arochlor 1268) g/kg de pds c.	**Toxicité à court terme**: Effets sur la reproduction, tératogénicité, altération de l'immunité, lésions hépatiques, augmentation de l'activité enzymatique microsomique, interférence avec le métabolisme des stéroïdes.	**Toxicité à long terme**: Cancérogène pour les animaux, cancérogène probable pour les hommes. CIRC: classe II. DJA = 0,1 /ug/kg de pds c.
ETUDES EPIDEMIOLOGIQUES	Les études menées chez l'homme ont montré que l'exposition aux PCB provoquait des anomalies cutanées (acnéiformes), bien qu'il existe une forte présomption que ces anomalies ne surviennent que par l'action combinée avec les polychlorodibenzofuranes (PCDF). Un empoisonnement accidentel donne à penser que les effets pourraient être un retard et une modification de la croissance foetale, un ralentissement et un changement dans le métabolisme du calcium en relation avec un dysfonctionnement hormonal. D'après des études de mortalité humaine, il existe des indices importants montrant que les PCB provoquent des cancers du foie, des voies biliaires et de la vésicule biliaire.		
COMPORTEMENT DANS L'ENVIRONNEMENT	Les congénères les plus courants des PCBs commercialisés sont spontanément dégradables. La photolyse peut conduire à une cassure des molécules de PCB à haute teneur en chlore. Néanmoins, les PCB qui contiennent cinq atomes de chlore et une petite proportion des PCBs à caractère de dioxine sont résistants à la biodégradation et au métabolisme. Dans le sol, leurs demi-vie est de 5 ans.		
EFFETS	Le facteur de bioconcentration chez les poissons et les crustacés est de 270 000. La DL50 chez les poissons: 3-3000 /µg/litre, chez les crustacés: 10 - 2400 / µg/litre (très sensibles à l'Aroclor 1254). Concentration admissible dans l'eau afin de protéger la vie aquatique: 30µg/litre.		
EXPOSITION	**Alimentaire**: Dans les pays industrialisés, l'ingestion moyenne par l'intermédiaire de la nourriture est de 5-100 µg/jour, la source principale étant le poisson, les PCB subissent une amplification dans la chaîne alimentaire.	**Professionnelle/utilisation:** L'inhalation est la voie principale d'absorption. La limite d'exposition professionnelle: 0,5 mg/m3 (MPT sur 8 h). Dans les tissus adipeux des hommes exposés professionnellement, on a trouvé des concentrations allant jusqu'à 700 mg/kg.	**Environnementale:** On a rapporté des concentrations dans l'air ambiant de 0,1-10 ng/m3, dans l'eau de mer de 0,01-0,5 ng/l et dans les rivières polluées jusqu'à 500 ng/l.
REGLEMENTATION	Les PCBs sont interdits et/ou strictement réglementés dans la majorité des pays industrialisés. Les mesures de réglementation ont été prises pour les raisons suivantes: persistance dans l'environnement, bioaccumulation dans la chaîne alimentaire humaine, extrême toxicité des impuretés, formation de substances extrêmement toxiques pendant la thermolyse, danger pour la santé humaine, toxicité à long terme, contamination de l'environnement.		
LIMITES MAXIMALES DE RESIDUS (mg/kg)	La concentration tolérée maximale dans la nourriture et les produits alimentaires est 0,05 - 2 mg/kg, dans les poissons, dans les mollusques et les crustacés: 2 mg/kg (Suède). Dans les matériaux d'emballage pour les aliments: 10 mg/kg.		

Tableau. 2.2 Caractéristiques principales des PCBs (www.epa.gov)

II.2.3.2 Séparation des deux principales phases lipidiques : phospholipides et lipides neutres

Après l'évaluation de la masse de lipides totaux extraite, ces derniers sont repris dans 2 ml d'hexane afin de les séparer en deux phases lipidiques en fonction de leur polarité, les lipides neutres et les phospholipides.

La séparation des fractions lipidiques a été effectuée par chromatographie d'absorption, sur phase solide (SPE) à l'aide d'une colonne de silice aminopropyle ($Si(CH_2)_3NH_2$) placée sur une enceinte Vac Elut permettant de régler la vitesse d'élution des lipides (Kaluzny *et al*.,1985).

La colonne est activée par 4 ml d'hexane et du sulfate de sodium anhydre est ajouté afin d'absorber toute trace d'eau résiduelle. Ensuite, les lipides en solution dans 2 ml d'hexane sont déposés au sommet de la colonne: ils se fixent sur le gel de silice par des liaisons hydrogène polaires et des liaisons de Van der Waals apolaires.

4 ml de trois solvants de polarité croissante sont utilisées pour éluer 3 phases lipidiques :

A) Les triglycérides (+ di et monoglycérides) par une solution de chlorophorme et 2-propanol (2V/1V) ;

B) les acides gras libres par une solution d'éther éthylique acidifiée par 2% d'acide acétique;

C) les lipides polaires dont les phospholipides par le méthanol.

Les phases A et B sont réunies dans un ballon pré-taré et représentent ainsi les lipides neutres ou lipides de réserve et la phase C: les phospholipides, ou lipides de structure sont récupérés dans un autre ballon. Les solvants sont évaporés et chaque fraction lipidique est remise en solution dans 2 ml d'hexane afin de procéder à la séparation et la purification des composants OCs.

II.2.3.3 Purification des PCBs et des pesticides OCs

Le but de cette étape est d'isoler de chacune des fractions lipidiques les micropolluants OC lipophiles. Elle est réalisée par chromatographie d'absorption sur phase solide (SPE) comme précédemment en utilisant une colonne dont la phase stationnaire est du florisil, ou silicate de magnésium polaire (MgO_3Si) (Durand *et al*., 1989).

La colonne est activée par 4ml d'hexane, puis l'échantillon contenant la fraction lipidique (lipides neutres ou phospholipides) est déposé au sommet de colonne, avant d'être élué par deux solvants de polarité très légèrement différente qui entraînent avec eux les deux phases

d'OCs:

a) Les substances les moins polaires (PCBs, HCB, *pp*'-DDE, diuron) par 2 ml d'hexane ;

b) Les polluants les plus polaires (les autres pesticides OCs) par 4ml d'une solution hexane 95/ether (95V/5V).

Les éluats sont récupérés dans deux ballons différents. Les solvants sont évaporés et les fractions OCs remis en solution dans 1ml d'hexane. Avant la détermination des composés par chromatographie, les échantillons sont concentrés dans 100 à 500µl d'hexane.

Le rendement de l'extraction a été calculé chez des poissons témoins imprégnés d'une quantité connue de composés OC et sur lesquels le processus complet d'extraction/purification a été appliqué. Pour chacun des OC, ce rendement est voisin de 80 %.

II.2.4 Détermination et quantification des micropolluants OCs par la chromatographie en phase gazeuse

Les différents polluants présents dans chacune des fractions lipidiques sont analysés par chromatographie en phase gaseuse sur colonne capillaire à l'aide d'un chromatographe Autosystème XL (Perkin-Elmer) équipé d'un détecteur à capture d'électrons (GC/ECD). Cette technique se révèle être la plus adaptée à la détection de traces de composés organohalogénés (Schenk *et al*., 1996).

La technique de GC/ECD est une chromatographie de partage de solutés sous forme gazeuse entre la phase gazeuse mobile (N_2 ou Ar/CH_4) et la phase stationnaire tapissant l'intérieur d'une colonne capillaire qui peut être solide ou liquide. Les différents solutés sont injectés à l'aide d'une microseringue Hamilton de 1-10µl dans la chambre de vaporisation, dans laquelle la température est telle que la vaporisation des substances injectées est immédiate. Les pics correspondants aux substances recherchées ont des temps de rétention (RT) différents selon leur affinité pour la phase stationnaire ou pour la phase mobile.

À leur sortie de colonne, les solutés sont détectés par un détecteur à capture d'électron (ECD). L'ECD émet alors un signal électrique qui va être capté par un intégrateur qui le traduira sous forme de chromatogramme.

L'ECD est un détecteur de très haute affinité pour les molécules portant des groupements fonctionnels négatifs tels que $-Cl^-$. C'est pourquoi il présente une très bonne sensibilité pour le dosage des pesticides organochlorés, avec une limite de détection de l'ordre

de 0,0l ng de pesticide /g de lipides. Ce détecteur est équipé d'une source radioactive de nickel ^{63}Ni, qui émet en continu des radiations β̃ En l'absence d'espèces organiques, il y a donc un courant constant entre les deux électrodes. Mais lorsqu'un composé portant des groupements fonctionnels négatifs passe devant ce faisceau d'ions, il intercepte une partie de ces ions créant une diminution du courant électrique enregistré entre les deux électrodes. C'est cette diminution de courrant électrique qui est interprété par l'integrateur sous forme de chromatogramme.

Les caractéristiques et les paramètres de la chromatographie ainsi que ses diverses programmations pour la détection et la quantification des OC sont présentés dans le Tableau 2.3.

	PCBs	**Pesticides**
Instrument	PERKIN ELMER® AutoSystem XL GC	
Intégrateur	PE NELSON® 1022	
Colonne	Colonne capillaire PE_5 (5% Phénylméthylpolysiloxane)	
Longueur	30m	
Diamètre interne	0,25mm	
Epaisseur	0,25µm	
Injection	Méthode SPLIT	
Température - injecteur	280°C	
Gaz vecteur	Azote ultra pur Alphagaz N2 2	
Débit de gaz	30ml/min	
Pression	12 psi	
Débit du gaz make up (Azote)	60 ml/min	
Détecteur	Détecteur à capture d'électrons (ECD) ; source ^{63}Ni	
Température - détecteur	350°C	370°C
Programme du four	T_1=180°C t_1=5min augmentation =10°C/min T_2=205°C t_2=54min augmentation =40°C/min T_3=280°C t_3=3min	T_1=200°C t_1=12min augmentation =10°C/min T_2=210°C t_2=30min augmentation =40°C/min T_3=280°C t_3=3min

Tableau 2.3 Paramètres de chromatographie et programmations pour la détection et quantification des molécules OC

L'analyse quantitative de l'imprégnation tissulaire pour chacun des polluants est réalisée à l'aide d'un étalon externe, qui est une solution de référence, de concentration connue et dont l'aire des pics sortant à des temps de rétention (RT) donnés sera comparée à l'aire des pics sortant aux mêmes RT pour les échantillons. Cela est rendu possible en posant l'hypothèse d'une linéarité entre l'aire des pics et la concentration en soluté. Cependant, les programmations utilisées dans cette étude ne permettent pas de séparer certaines molécules OC dont les pics sortent en même temps (β et γHCH, plusieurs congénères des PCBS).

Les références utilisées pour l'analyse chromatographique (Cil Cluzeau Labo, Paris):

- Pesticide-Mix 7(alpha-HCH, beta-HCH, gamma-HCH, delta-HCH 10µg/µl dans le cyclohexane ; L18000700CY)
- Organochlorine Pesticide Mix 1(aldrine, alpha-HCH, beta-HCH, gamma-HCH, delta-HCH, 4'4'-DDD, 4'4'-DDE, 4'4'-DDT, dieldrin, alpha-endosulfan, beta-endosulfan, endosulfan-sulfate, endrine, endrine-aldhéyde, heptachlor, heptachlor-epoxyde 100 µg/µl dans l'éthylacétate ; ref.XA06080100)
- PCB-Mix 7(congénères 8,18,28,31,44,52,70,101,105,138,151,180,194,195 10 ng/µl dans iso-octane ; ref.L200030700010)
- Aroclor-Mix 1242 :1254 :1260 (10ng/µl ; ref.L20258000CY)
- Fipronil (10mg/l dans cyclohexane; ref.13654000)
- Diuron (10mg/ dans cyclohexane; ref.13020000)
- alpha-endosulfan (10mg/l dans cyclohexane; ref.1321000)
- HCB (10mg/l dans cyclohexane; ref.14160000).

II.2.5 Evaluation de la relation entre le niveau trophique et le niveau de contamination des organismes - analyse statistique

Les analyses statistiques des résultats ont été effectuées selon les règles énoncées dans le Chapitre I (§I.2.9). De manière plus particulière, la relation entre les niveaux trophiques des organismes et leurs paramètres biologiques et les niveaux de l'imprégnation a été appréciée grâce à l'analyse des corrélations (analyses bivariées). Ces tests, qui s'intéressent aux valeurs individuelles, ont pour but de déceler celle(s) qui s'éloigne(nt) de l'ensemble de son (leur) groupe. Le test de Pearson a donc été appliqué et seules les analyses assurant une probabilité supérieure á 95% ont été prises en compte ($p<0,05$).

II.3. RESULTATS

L'évaluation de l'imprégnation par une large gamme de micropolluants OC (18 pesticides et de nombreux congénères de PCBs) des espèces dominantes de l'étang de Vaccarès (16 espèces) et des canaux adjacents (3 espèces) est l'un des objectifs de cette étude. En préambule, il est procédé au constat d'un état toxicologique de ces espèces et des facteurs biotiques et abiotiques susceptibles d'agir sur les niveaux d'imprégnation. Puis l'influence de paramètres biologiques descriptifs est appréciée. Enfin une interprétation des modes de contamination des espèces est tentée grâce à la combinaison des acquis écotoxicologiques et isotopiques. La mise en évidence d'une bioamplification ou d'une bioaccumulation directe par les téguments constitue la finalité principale de ces travaux.

Les données toxicologiques sont nombreuses, mais les démarches expérimentales ont dû évoluer au cours de l'avancement des travaux (2001-2003) en raison d'un ajustement permanent et progressif des technologies, de l'analyse des résultats collectés et des aléas des campagnes de prélèvement *in situ* (conditions climatiques, succès de capture). En conséquence, quelques disparités apparaissent dans la présentation de ces résultats, dévoilant des carences du nombre d'individus analysés et l'irrégularité des contaminants détectés. Les premiers résultats exposés font état de la situation écotoxicologique globale dans l'aire protégée étudiée.

II.3.1 Contamination globale en micropolluants OC

L'imprégnation par des micropolluants OC de l'ensemble du biota dominant du réseau trophique aquatique donne une image générale de l'état toxicologique de l'étang de Vaccarès. Sans tenir compte des espèces concernées, il s'agit de déterminer l'amplitude d'une contamination par ces composés chimiques phytosanitaires et industriels qui, de manière indirecte ou directe, atteignent cet écosystème *a priori* protégé. L'étalement des valeurs individuelles étant considérable, la contamination globale ne peut être représentée que par des graphiques en boîtes (box plots) dans lesquels sont inclus 90% des valeurs individuelles et où figure la médiane. Les teneurs sont exprimées en ng de substance par g de tissu sec, l'intensité de la contamination est ici exprimée par la médiane qui divise chaque série de données individuelles en deux sous-ensembles de taille égale. Le choix de l'expression chiffrée de

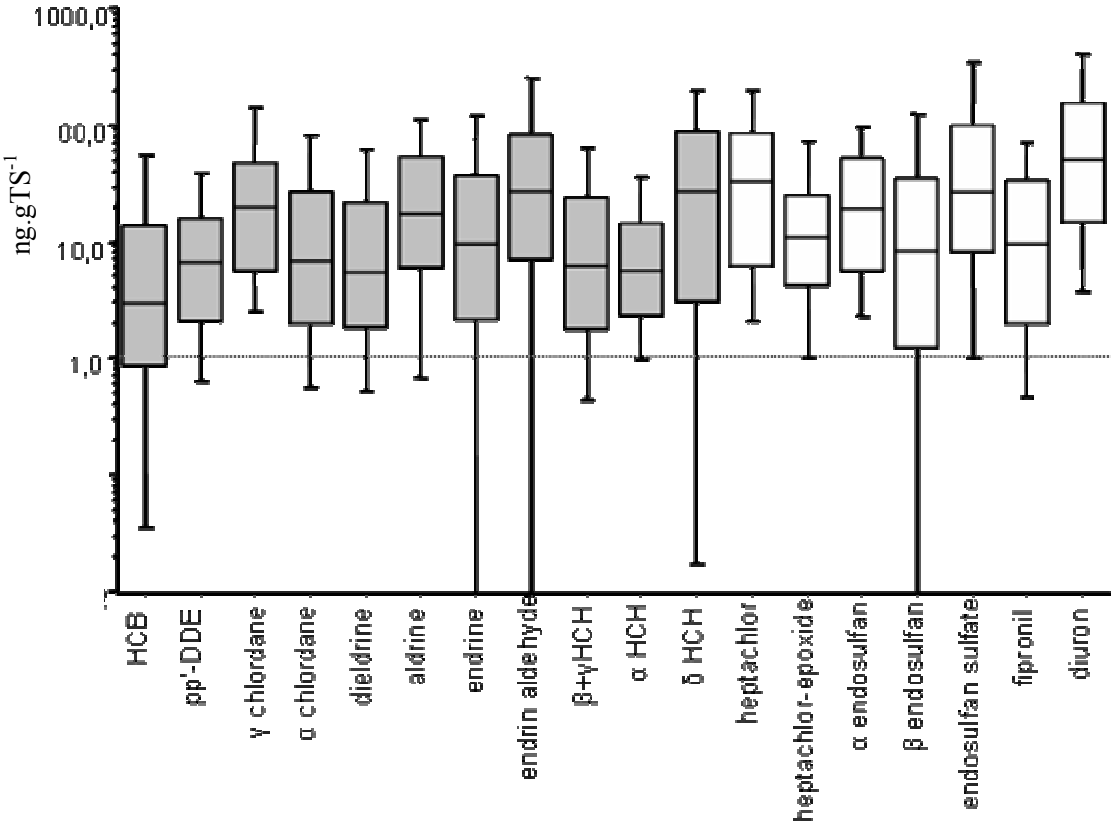


Figure 2.4 Imprégnation globale par les pesticides OCs□ interdits □ strictement limitées (n=225)

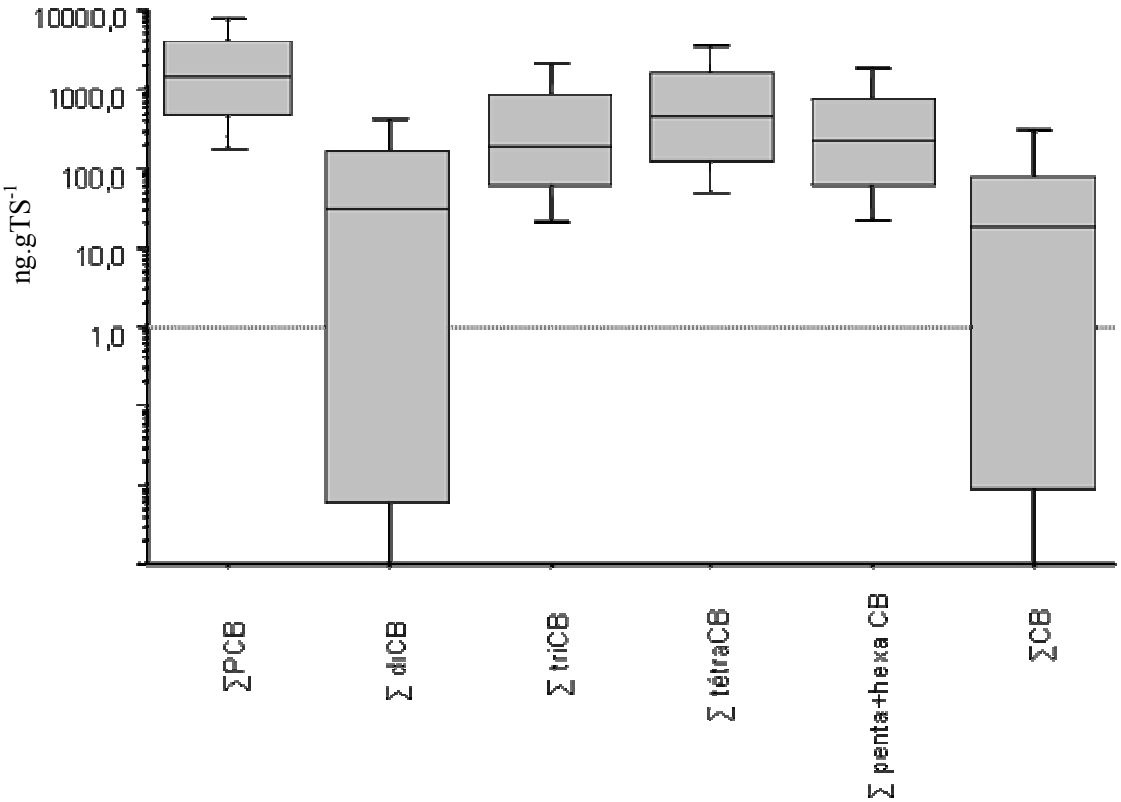


Figure 2.5 Imprégnation globale par les PCBs (n=223)

l'état de contamination n'est pas aisé car le calcul de la moyenne arithmétique est largement influencé par les valeurs les plus élevées et celui de la moyenne géométrique est inadapté si certaines données sont inférieures à la limite de détection. Aucune transformation mathématique n'a donc été réalisée pour faire état de nos résultats. Ainsi, l'étalement des valeurs médianes est réduit et peut présenter un risque pour l'interprétation.

II.3.1.1 Pesticides

Tous les pesticides recherchés ont été détectés dans le biota examiné, les valeurs médianes (en $ng.gTS^{-1}$) allant de 0 (ou indétectable = nd) pour l'α chlordane [nd-307] (n=198) à 32 pour le diuron [nd-1933] (n=219) (Figure 2.4).

Parmi les pesticides dont l'utilisation agricole est strictement limitée, des concentrations élevées ont été constatées pour l'heptachlor (21,4 [nd-1555], n=198] et l'α endosulfan (9,47 [nd-1636], n=198). Leurs métabolites sont également présents mais en moindres concentrations. La teneur globale en fipronil, utilisé en riziculture jusqu'en 2003, et qui semble être la substance la plus rapidement dégradable, est relativement basse (5,33 [nd-575], n=198). Il en est de même pour le lindane (3,32 [nd-1530], n=222), abondamment utilisé en Camargue jusqu'en 1998, date officielle de son interdiction. Bien qu'à des concentrations inférieures, l'ensemble des pesticides interdits depuis 1972 (la dieldrine, l'endrine et ses métabolites, l'HCB, le *pp*'-DDE et le γ chlordane) est présent de manière chronique. Il est, par ailleurs, surprenant d'observer des teneurs souvent très élevées en aldrine (14,9 [nd-1636], n=198) soit des concentrations 3.5 fois supérieures à celles de la dieldrine.

II.3.1.2 PCBs

La contamination globale en PCBs ($\sum$PCBs) (1453 [0-84806] $ng.gTS^{-1}$) est notablement supérieure à celle en pesticides. Les familles de chlorobiphényles (CB) en tri- et en tétra- sont les plus fréquentes avec des valeurs médianes égales à 188 [0-31666] ng gTS^{-1} et 437 [0-14066] ng.g TS^{-1}, respectivement. Les PCBs les plus « lourds », les hepta-CB, ainsi que les plus « légers », les di-CB affichent des concentrations médianes considérablement inférieures, 29,2 [nd-2573] $ng.gTS^{-1}$ et 17,8 [nd-8133] $ng.gTS^{-1}$, respectivement (Figure 2.5).

Les congénères 52 (95,6 [nd-13190]), 18 (14,8 [nd-1827]), 8 (8,13 [nd-1588]), 152+138 (5,92 [nd-3211]) et 177 (0.01 [nd-985]) se révèlent être les plus abondants au sein des familles en tétra-, tri-, di-, penta-, hexa- et heptaCB, respectivement.

II.3.2 Variations interspécifiques de l'imprégnation par les OCs

Dans le réseau trophique du Vaccarès, chaque espèce se caractérise par une sensibilité spécifique en terme de bioaccumulation des divers xénobiotiques OC. Au sein d'une même espèce, des individus répondent différemment à la présence de contaminants dans le milieu en fonction de leurs propres particularités biologiques et physiologiques et des paramètres abiotiques caractérisant le milieu lui-même. Toutes ces différences conduisent à une grande variabilité inter- et intraspécifique qu'il est nécessaire de prendre en compte lorsque l'on étudie le comportement de substances chimiques d'origine anthropique dans des écosystèmes naturels.

II.3.2.1 Pesticides

La grande variabilité inter- et intraspécifique de l'imprégnation par les pesticides OC est présentée dans les Tableaux 2.4a, pour les pesticides interdits, et 2.4b pour les pesticides d'usage limité et encore utilisés. Si l'on considère l'étalement des valeurs médianes détectables, elles vont de 1,77 ng.gTS^{-1} pour l'α chlordane [nd-306] chez l'épinoche à 219 ng.gTS^{-1} pour le diuron [nd-1077] chez ce même poisson. Cependant, d'une manière générale, l'épinoche n'est pas l'espèce la plus chargée en pesticides OC. En effet, les espèces présentant le plus souvent les médianes maximales sont, pour les pesticides interdits, un superprédateur - l'anguille jaune, un poisson préférentiellement herbivore -le muge juvénile- et un bivalve filtreur - le cardium. Pour les pesticides utilisés et/ou strictement limités c'est l'athérine, poisson benthivore, et le gammare, organisme déposivore qui les ont le plus accumulé. Les espèces affichant les valeurs extrêmes le plus fréquemment sont les athérines et les anguilles juvéniles; à l'opposé, les espèces les moins contaminées s'avèrent être les syngnathes et les crevettes roses.

Les concentrations techniquement indétectables sont surtout celles des métabolites principaux des pesticides recherchés, chez la plupart des espèces, à l'exception de ceux de γ et α chlordane. D'autre part, lorsque les pesticides sont encore en cours d'utilisation dans les zones agricoles adjacentes, les concentrations inférieures au seuil de détection sont rares, c'est le cas du fipronil, du diuron et de l'heptachlor chez la grande majorité des espèces.

II.3.2.2 PCBs

Du fait du grand nombre de congénères regroupés, les taux d'imprégnation par les PCB sont très élevés, ils atteignent même la valeur de 85 μg.g TS^{-1} chez un cardium.

Tableau 2.4a Niveaux de bioaccumulation (valeur médiane [min-max] ng.gTS^{-1}) des pesticides interdits chez le biota du Vaccarès

	Cardium (26p)	**Gammare** (7p)	**Crevette grise** (26)	**Crevette rose** (22)	**Syngnathe** (7)	**Athérine** (28)	**Muge juvénile** (6)	**Epinoche** (21)	**Gobie** (27)	**Anguille juvénile** (19)	**Brème** (7)	**Anguille jaune** (12)
pp'DDE	**0,01** [nd-26,6] %(nd)=50	**2,64** [nd-92,1] %(nd)=29	**0,69** [nd-38,9] %(nd)=35	**3,47** [nd-13,8] %(nd)=27	**0** [nd-0,10] %(nd)=86	**7,09** [nd-1139] %(nd)=21	**0,73** [nd-38,4] %(nd)=50	**2,91** [nd-153] %(nd)=43	**0,01** [nd-64,3] %(nd)=46	**8,37** [nd-35,7] %(nd)=31	**7,30** [1,89-50,5] %(nd)=0	**12,8** [1,48-99,5] %(nd)=0
HCB	**2,76** [nd-443] %(nd)=15	**0,08** [nd-20,4] %(nd)=29	**0,75** [nd-37,7] %(nd)=31	**2,39** [nd-12,6] %(nd)=9	**0,05** [nd-41,4] %(nd)=43	**1,40** [nd-453] %(nd)=18	**0,68** [nd-14,2] %(nd)=33	**0,97** [nd-102] %(nd)=33	**0,47** [nd-26,9] %(nd)=42	**1,67** [nd-395] %(nd)=31	**1,76** [0,001-20,1] %(nd)=0	**4,67** [0,01-121] %(nd)=7
γ chlordane	**1,83** [nd-127] %(nd)=45	**0** [nd-7,64] %(nd)=86	**3,89** [nd-917] %(nd)=31	**5,05** [nd-1284] %(nd)=48	**0** [nd-158] %(nd)=71	**3,06** [nd-282] %(nd)=33	**0** [nd-84,1] %(nd)=67	**2,39** [nd-359] %(nd)=43	**0** [nd-28,7] %(nd)=63	**0** [nd-53,5] %(nd)=69	**0** [nd-145] %(nd)=67	**29,1** [nd-76,5] %(nd)=20
α chlordane	**0** [nd-51.2] %(nd)=80	**0** [nd-6.21] %(nd)=85	**0** [nd-56.6] %(nd)=57	**0** [nd-136] %(nd)=	**0** [nd-9.43] %(nd)=52	**0** [nd-86.8] %(nd)=54	**0** |nd-0.56] %(nd)=83	**1.78** [nd-306] %(nd)=42	**0** [nd-31.4] %(nd)=74	**0** [nd-126] %(nd)=60	**0** [nd-88.6] %(nd)=83	**1.23** [nd-78.4] %(nd)=46
dieldrine	**2,77** [nd-631] %(nd)=7	**4,03** [nd-110] %(nd)=43	**6,47** [nd-195] %(nd)=11	**7,97** [0,03-112] %(nd)=0	**3,35** [nd-196] %(nd)=29	**4,87** [nd-118] %(nd)=14	**8,25** [2,5nd-68,1] %(nd)=0	**5,80** [nd-182] %(nd)=5	**5,20** [nd-96,9] %(nd)=42	**0,97** [nd-557] %(nd)=38	**1,29** [nd-9,71] %(nd)=43	**2,27** [0,82-216] %(nd)=13
aldrine	**25,1** [nd-1635] %(nd)=10	**40,5** [nd-197] %(nd)=14	**6,33** [nd-71,9] %(nd)=4	**8,81** [nd-489] %(nd)=10	**0,001** [nd-274] %(nd)=29	**8,86** [nd-94,5] %(nd)=4	**78,7** [5,44-320] %(nd)=0	**19,5** [nd-24,5] %(nd)=5	**12,6** [nd-101] %(nd)=3,7	**35,5** [nd-1199] %(nd)=0	**13,2** [nd-21,9] %(nd)=17	**43,4** [9,6nd-240] %(nd)=10
endrine	**8,79** [nd-89,4] %(nd)=15	**0** [nd-11,8] %(nd)=71	**0,002** [nd-76,3] %(nd)=42	**11,5** [nd-281] %(nd)=5	**0,001** [nd-73,6] %(nd)=29	**0,001** [nd-74,7] %(nd)=50	**9,01** [nd-16,0] %(nd)=33	0,62 [nd-2676] %(nd)=29	1,70 [nd-728] %(nd)=37	**0** [nd-1053] %(nd)=54	0 [nd-119] %(nd)=67	**0** [nd-123] %(nd)=70
endrine aldehyde	**27,0** [nd-360] %(nd)=30	**0** [nd-764] %(nd)=86	**2,18** [nd-145] %(nd)=35	**29,5** [nd-256] %(nd)=10	**0,003** [nd-0,004] %(nd)=43	**30,6** [nd-232] %(nd)=29	%(nd)=100	0 [nd-37,5] %(nd)=57	5,09 [nd-563] %(nd)=37	**0** [nd-1169] %(nd)=62	**0** [nd-25,3] %(nd)=67	**0** [nd-1519] %(nd)=70
α HCH	**2,55** [nd-25,5] %(nd)=30	**1,46** [nd-56,9] %(nd)=43	**1,72** [nd-6,53] %(nd)=12	**5,11** [nd-47,5] %(nd)=10	**0** [nd-8,42] %(nd)=57	**6,31** [nd-34,5] %(nd)=13	**15,2** [2,96-34,7] %(nd)=0	**5,15** [nd-19,1] %(nd)=5	**3,29** [nd-39,3] %(nd)=15	**10,3** [nd-37] %(nd)=31	**5,54** [nd-84,6] %(nd)=33	**15,0** [nd-121] %(nd)=50
β/γ HCH	**3,79** [nd-977] %(nd)=19	**19,6** [nd-68,9] %(nd)=15	**0,40** [nd-35,8] %(nd)=14	**3,36** [nd-306] %(nd)=14	**1,48** [nd-93,0] %(nd)=14	**3,90** [nd-1530] %(nd)=71	**68,9** [23,8-106] %(nd)=75	**6,24** [nd-64,9] %(nd)=14	**1,86** [nd-65,4] %(nd)=0	**2,19** [nd-99,9] %(nd)=14	**0** [nd-5,22] %(nd)=21	**8,51** [nd-211] %(nd)=33
δ HCH	**0,02** [nd-280] %(nd)=45	**89,8** [nd-4765] %(nd)=43	**5,57** [nd-105] %(nd)=15	**16,4** [nd-6459] %(nd)=5	**23,9** [nd-180] %(nd)=0	**0,01** [nd-200] %(nd)=42	**61,3** [13,08-121] %(nd)=0	**58,0** [nd-1333] %(nd)=19	**26,8** [nd-554] %(nd)=11	**0** [nd-5,45] %(nd)=85	**0** [nd-5,75] %(nd)=83	**0,37** [nd-156] %(nd)=60

Tableau 2.4b Niveaux de bioaccumulation (valeur médiane [min-max] ng.gTS^{-1}) des pesticides dont l'utilisation est strictement contrôlée chez le biota du Vaccarès

	Cardium (26)	**Gammare** (7p)	**Crevette grise** (26)	**Crevette rose** (22)	**Syngnathe** (7)	**Athérine** (28)	**Muge juvénile** (6)	**Epinoche** (21)	**Gobie** (27)	**Anguille juvénile** (19)	**Brème** (7)	**Bnguille jaune** (12)
α endosulfan	**6,57** [nd-448] %(nd)=25	**63,3** [nd-100] %(nd)=14	**1,09** [nd-46,6] %(nd)=39	**16,1** [nd-334] %(nd)=19	**14,3** [nd-92,] %(nd)=14	**19,2** [nd-102] %(nd)=21	**25,7** [5,46-97,7] %(nd)=0	**15,5** [nd-197] %(nd)=19	**19,9** [nd-131] %(nd)=11	**8,08** [nd-175] %(nd)=39	**2,29** [nd-19,3] %(nd)=50	**10,3** [2,29-129] %(nd)=10
β endosulfan	**2,78** [nd-199] %(nd)=45	**0** [nd-75,9] %(nd)=86	**0,15** [nd-561] %(nd)=31	**0** [nd-75,9] %(nd)=14	**0,002** [nd-0,003] %(nd)=43	**9,81** [nd-112] %(nd)=29	%(nd)=100	**0** [nd-120] %(nd)=57	**0,01** [nd-135] %(nd)=48	**3,60** [nd-953] %(nd)=54	**8,18** [nd-18,5] %(nd)=17	**0,47** [nd-373] %(nd)=40
endosulfan sulphate	**12,5** [nd-621] %(nd)=40	**0** [nd-1345] %(nd)=57	**9,11** [nd-255] %(nd)=27	**0** [nd-1345] %(nd)=24	**0,003** [nd-2,56] %(nd)=43	**29,5** [nd-334] %(nd)=13	%(nd)=100	**0** [nd-30,0] %(nd)=52	**21,1** [nd-561] %(nd)=30	**0** [nd-1428] %(nd)=62	**17,84** [nd-385] %(nd)=33	**0** [nd-2772] %(nd)=60
heptachlor	**9,56** [nd-649] %(nd)=15	**83,8** [nd-324] %(nd)=14	**4,22** [nd-97,7] %(nd)=4	**7,96** [nd-632] %(nd)=5	**6,40** [0,001-1291] %(nd)=0	**22,7** [nd-245] %(nd)=13	**68,8** [7,67-1555] %(nd)=0	**24,6** [nd-130] %(nd)=19	**10,2** [nd-156] %(nd)=4	**44,8** [nd-217] %(nd)=46	**30,6** [nd-65,2] %(nd)=17	**12,6** [nd-205] %(nd)=40
heptachlor epoxyde	**14,7** [nd-404] %(nd)=5	**15,8** [nd-93,8] %(nd)=43	**3,69** [nd-824] %(nd)=12	**8,76** [nd-261] %(nd)=14	**3,98** [nd-66,2] %(nd)=0	**6,53** [nd-88,8] %(nd)=13	**15,5** [nd-72,1] %(nd)=33	**7,28** [nd-120] %(nd)=19	**9,50** [nd-131] %(nd)=7	**24,6** [nd-150] %(nd)=23	**9,08** [3,7-23,4] %(nd)=0	**12,9** [nd-105] %(nd)=30
fipronil	**33,8** [nd-417] %(nd)=10	**13,6** [nd-57,8] %(nd)=29	**1,11** [nd-290] %(nd)=11	**8,46** [nd-269] %(nd)=5	**0,001** [nd-43,4] %(nd)=29	**4,15** [nd-200] %(nd)=21	**6,43** [nd-19,8] %(nd)=17	**9,64** [nd-228] %(nd)=5	**5,83** [nd-103] %(nd)=15	**5,03** [nd-574] %(nd)=31	**40,0** [nd-105,66] %(nd)=50	**0,96** [nd-228] %(nd)=40
diuron	**56,3** [nd-506] %(nd)=8	**18,9** [nd-1108] %(nd)=29	**14,1** [nd-1030] %(nd)=8	**28,3** [nd-345] %(nd)=5	**14,7** [nd-128] %(nd)=14	**127** [0,19-1932] %(nd)=0	**77,1** [nd-315] %(nd)=33	**219** [nd-1077] %(nd)=10	**57,1** [2,8-397] %(nd)=0	**19,3** [nd-150] %(nd)=38	**16,1** [0,002-224] %(nd)=0	**33,9** [nd-569] %(nd)=0

Parmi ces chlorobiphényles les molécules en tri- et tétra- sont les plus nombreuses puisqu'elles représentent 26 et 35% des PCBs totaux.

Les box plots de la Figure 2.6 illustrent les variations inter- et intraspécifiques de la totalité des PCBs et des familles de chlorobiphényles les plus fréquentes. Les cardiums (2961 [147-84807] ng.gTS^{-1}), les muges (4293 [3468-17929] ng.gTS^{-1} et les athérines (3759 [165-48496] ng.gTS^{-1}) et sont les espèces les plus chargées, alors que les crevettes grises et les brèmes sont les espèces les moins imprégnées, 4145 [82,6-3262] ng.gTS^{-1} et 268 [90,5-2691] ng.gTS^{-1}, respectivement. *A. boyeri* et *Mugil sp.* se sont révélées être les espèces les plus contaminées par toutes les familles de PCBs à l'exception des hepta-CB, qui ont atteint leurs niveaux les plus hauts chez les gammares.

Une des particularités des variations « interspécifiques » de l'imprégnation par les PCBs réside dans les différences entre les anguilles juvéniles et les anguilles jaunes. On observe en effet chez les individus juvéniles une tendance à la bioaccumulation des molécules de PCBs les plus « lourdes » (hepta-, hexa- + penta- et tétra-CB), alors que les anguilles jaunes sont plus particulièrement chargées en molécules dites « légères ». Ce contraste suggère que le métabolisme, probablement de biotransformation, de ces xénobiotiques évolue au cours du cycle vital, notamment chez cette espèce.

II.3.3 Classes de contamination

Il existe également une grande variabilité intraspécifique au sein des populations aquatiques examinées. Dans la poursuite de notre analyse, nous avons procédé à un classement des individus en fonction de leur niveau de contamination. Seuls les échantillonnages dont l'effectif dépasse n=10 ont été pris en compte. Trois classes ont été définies, sur la base de la moyenne géométrique des niveaux de contamination : individus «très » imprégnés (++), individus « moyennement » imprégnés (+) et individus dont l'imprégnation est inférieure au seuil de détection (-).

II.3.3.1 Pesticides

Le fipronil et le diuron étaient activement utilisés dans le traitement des rizières camarguaises, pour le premier, et dans les zones viticoles du couloir rhodanien, pour le second, pendant les années expérimentales. Précédemment, l'usage du lindane était fréquent dans cette région, jusqu'à son interdiction en 1998. Quant à la dieldrine, elle est interdite en traitement agricole depuis 1972, mais elle a été encore récemment utilisée pour l'enrobage des

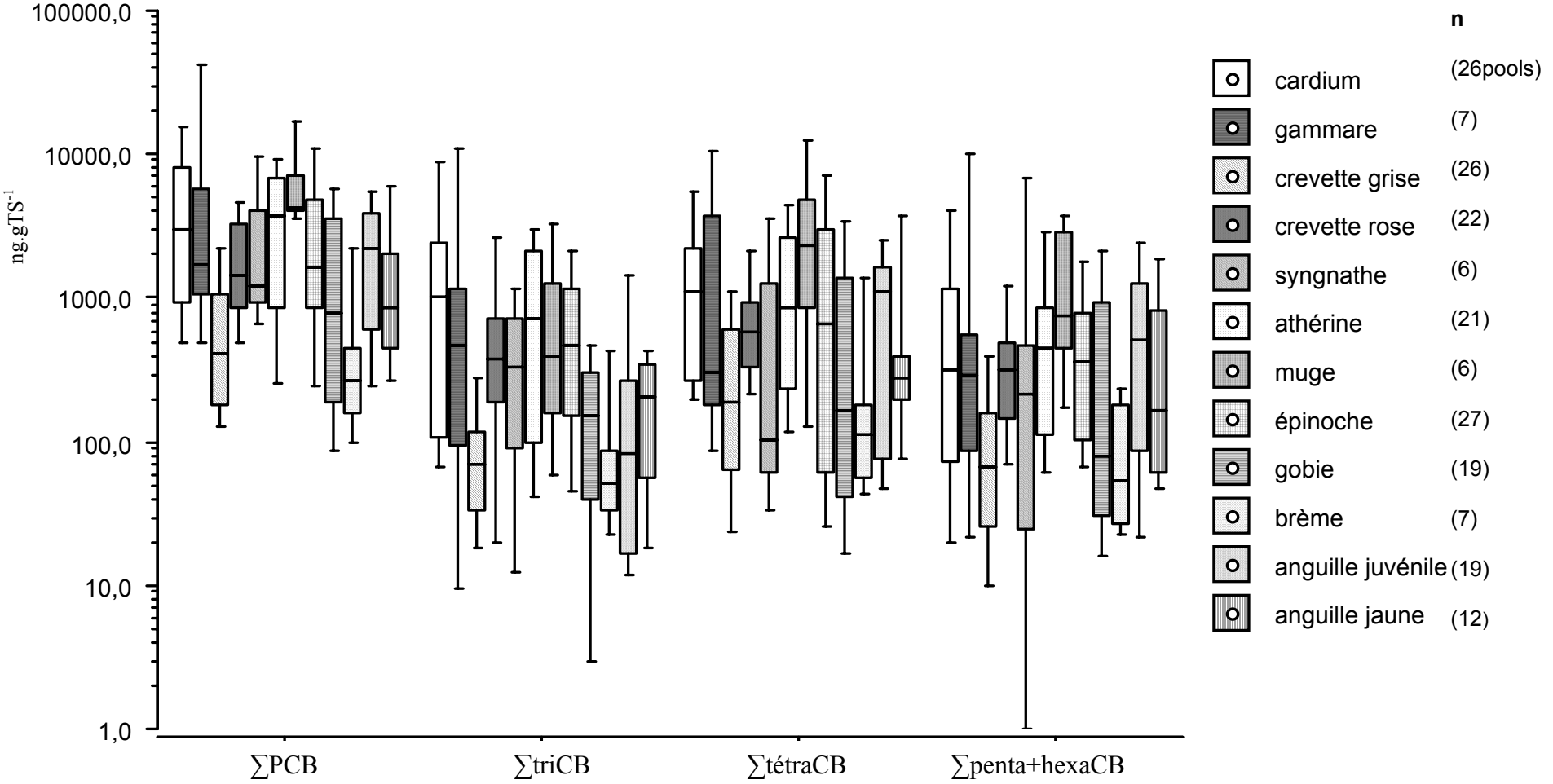


Figure 2.6 Imprégnation tissulaire par les PCBs chez les espèces dominantes de l'étang de Vaccarès

semences et épisodiquement pour le traitement des charpentes. C'est pourquoi ces quatre molécules ont particulièrement retenu notre attention.

Les fréquences relatives des 3 classes de contamination chez les représentants les plus stables de la communauté biologique du Vaccarès: les mollusques (cardium, n=26), les crustacés (crevette grise, n=26), les poissons de petite taille (athérine, n=29) et de grande taille (anguille jaune, n=15) ont été évaluées.

La répartition globale des 4 pesticides montre une large prévalence du diuron chez toutes les espèces, s'étalant de 58% chez les cardiums à 90% chez les athérines (Figure 2.7a). D'autre part, les cardiums sont les plus chargés en fipronil et les moins riches en dieldrine, comparés aux anguilles jaunes, aux athérines et aux crevettes grises.

Cette répartition se confirme par l'analyse de la distribution des classes de contamination pour les 4 pesticides chez les 4 espèces (Figure 2.7b). L'examen global de la répartition des classes de contamination révèle que la majorité des espèces appartienne à la classe moyennement contaminée (+) en lindane et dieldrine, alors que les insecticides en cours d'utilisation (fipronil et diuron) sont caractérisés par une forte contamination des individus. Le pourcentage d'individus très contaminés en diuron est très élevé et augmente quand on s'élève dans la chaîne trophique, il représente 40% des cardiums, 50% des crevettes grises, 57% des athérines (0% d'individus non contaminés) et 67% des anguilles jaunes (8% d'individus non contaminés). Comme le lindane, le fipronil touche le pourcentage le plus faible d'individus très contaminés, à l'exception des cardiums (50%). Cependant, contrairement à diuron, le pourcentage d'individus très contaminés en fipronil diminue avec le niveau trophique croissant (50% des cardiums, 46% des crevettes grises, 46% des athérines et 13% des anguilles jaunes). On révèle, en outre, une importante proportion d'individus non contaminés, notamment chez les anguilles jaunes (38%) et chez les athérines (21%).

II.3.3.2 PCBs

De la répartition en classes de contamination par les différentes familles de PCBs émerge une variété de profils interspécifiques (Figure 2.8). Les premiers constats sont que d'une part, aucune des quatre espèces considérées ne sont exemptes de tétra-CB et d'autre part, la totalité des anguilles jaunes est contaminée par les di-CB, tétra-CB et hepta-CB. On observe, en outre, un certain équilibre entre les pourcentages d'individus fortement et faiblement contaminés (˜ 50%) à l'exception des anguilles jaunes, dont 25% sont très imprégnées par les tétra-CB, et les cardiums chez qui les PCBs dominants sont les di-CB (70%). Les crevettes grises non contaminées par les di-CB constituent jusqu'à 15% de

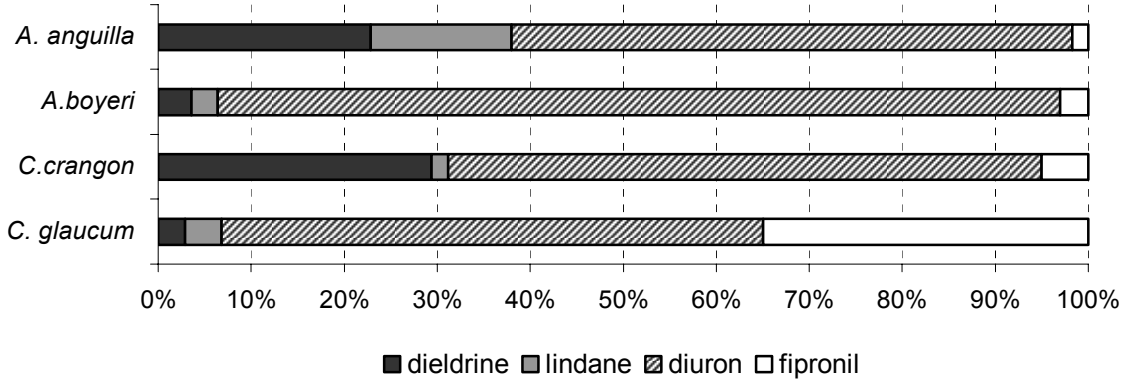


Figure 2.7a Répartition des pesticides chez 4 espèces appartenant à différents niveaux trophiques

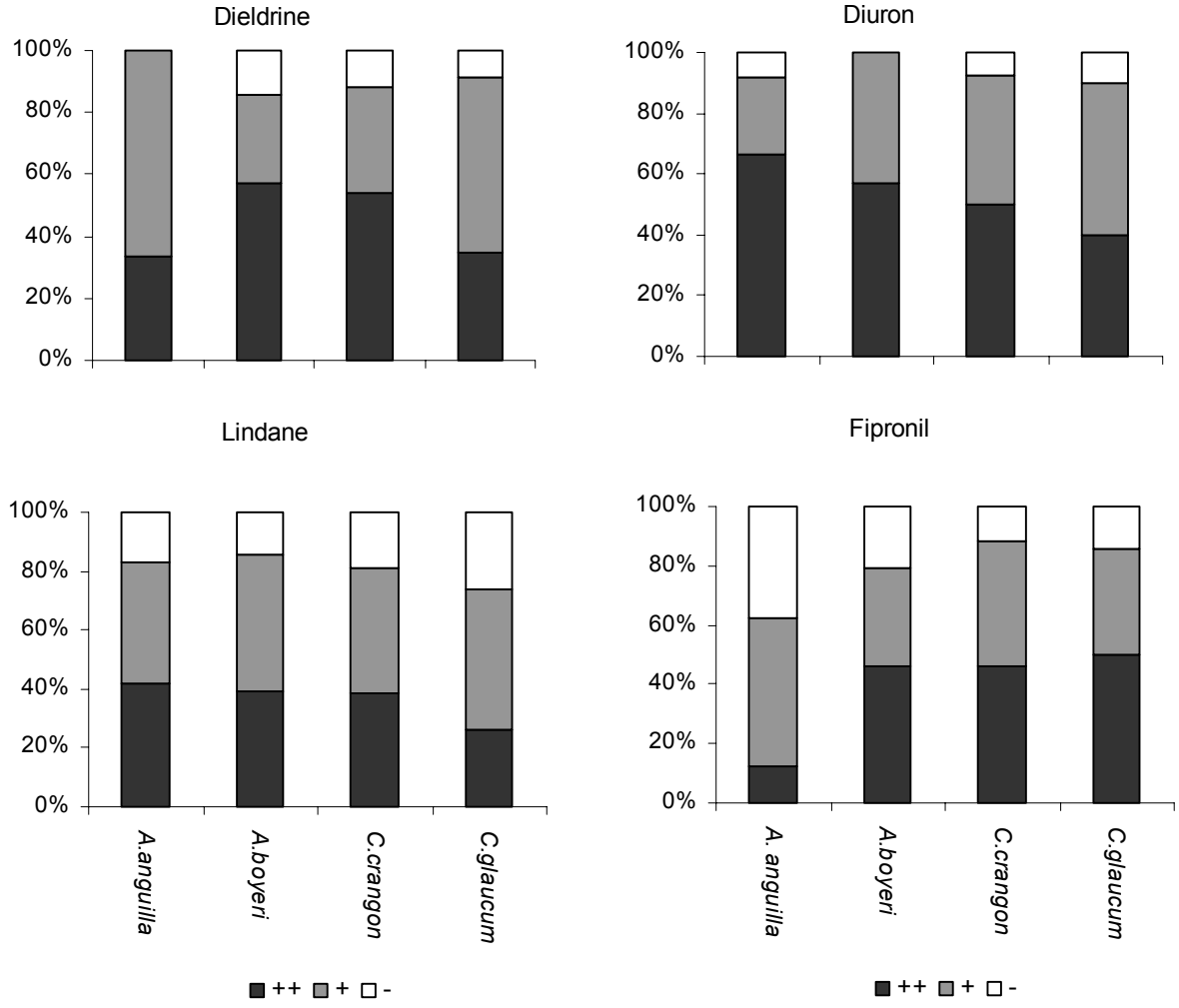


Figure 2.7b Répartition par classes de contamination par les pesticides « type » (++ classe très contaminée, + classe moyennement contaminé, - classe « non » contaminée)

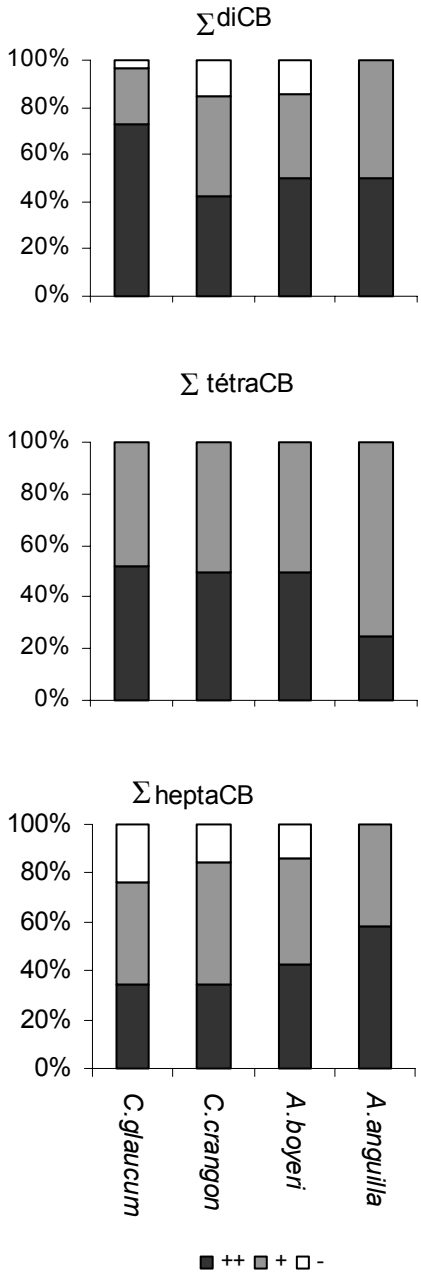


Figure 2.8 Répartition par classes de contamination par les PCBs (++ classe très contaminée, + classe moyennement contaminé, - classe « non » contaminée)

l'effectif et 24% des cardiums sont faiblement contaminés en hepta-CB .

II.3.4 Influence des guildes trophiques dans l'amplitude de la contamination

La capacité des organismes à accumuler les micropolluants OC dépend, dans une large mesure, de leurs spécificités biologiques, physiologiques et écologiques. Celles-ci déterminent leurs relations avec les paramètres abiotiques et biotiques du milieu extérieur en définissant leur propre niche écologique. Dans ce contexte, l'appartenance à des guildes trophiques différentes joue un rôle fondamental dans l'accumulation et le transfert des contaminants présents dans un écosystème. En conséquence, nous avons examiné la distribution des contaminants OC dans des guildes trophiques de l'étang de Vaccarès, comme elles ont été définies dans le Chapitre I. Les guildes trophiques prises en compte (filtreurs, zooplanctonophages, poissons benthivores, poissons prédateurs secondaires et poissons superprédateurs ichtyophages) représentent les guildes d'appartenance des espèces les plus nombreuses dont la collecte a été assurée lors de toutes les campagnes de prélèvement (cardiums, crevettes grises et roses, athérines, épinoches, gobies, anguilles juvéniles et jaunes).

II.3.4.1 Pesticides

Les profils de distribution des pesticides OC chez les individus classés « très contaminés » appartenant aux différentes guildes trophiques varient considérablement en fonction du polluant considéré. Le cas des « pesticides types », la dieldrine non autorisée mais très persistante, l'heptachlor, irrégulièrement utilisé, le fipronil activement employé et l'aldrine interdite mais suspectée d'utilisation secondaire sont présentés sur la Figure 2.9. Si l'on suit le tracé du réseau trophique, l'imprégnation tissulaire par la dieldrine augmente des organismes filtreurs jusqu'aux poissons ichtyophages contrairement au fipronil qui suit la voie inverse. L'heptachlor présente un profil irrégulier, ses concentrations sont plus élevées chez les filtreurs, plus faibles chez les zooplanctonophages, augmentées chez les benthivores puis encore diminuées chez les prédateurs et les superprédateurs. Dans la première partie du réseau, l'aldrine semble amorcer un profil parallèle à celui de l'heptachlor - des concentrations supérieures chez les filtreurs puis plus faibles chez les zooplanctonophages - mais ensuite son évolution est semblable à celle de la dieldrine - les concentrations tendent à augmenter jusqu'aux poissons ichtyophages.

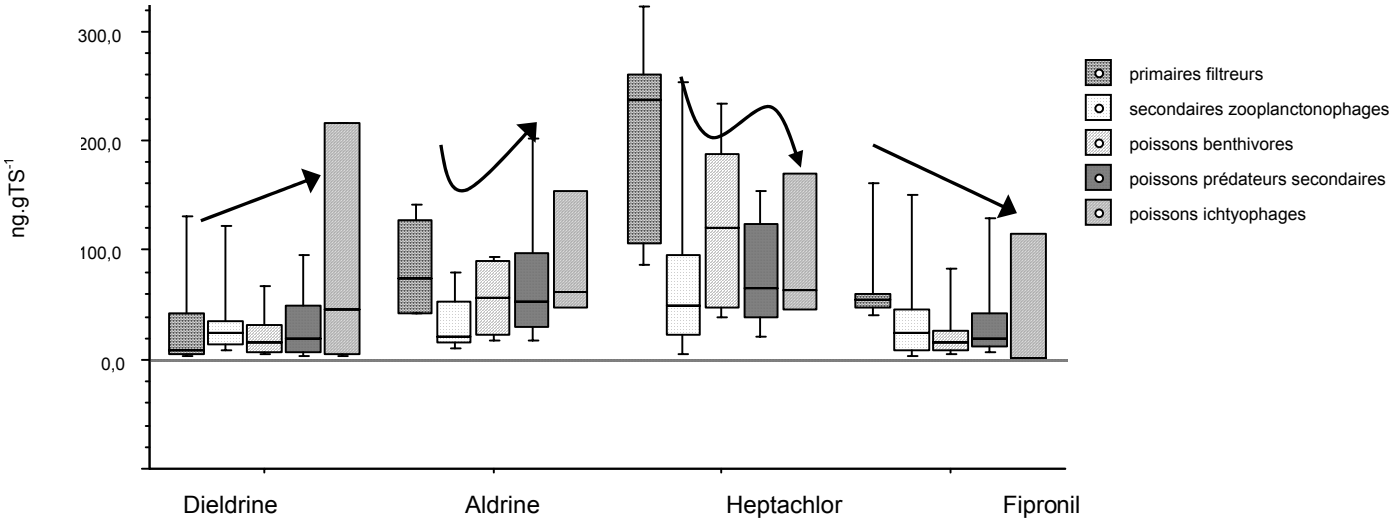


Figure 2.9 Profil de contamination par les pesticides dans les guildes trophiques

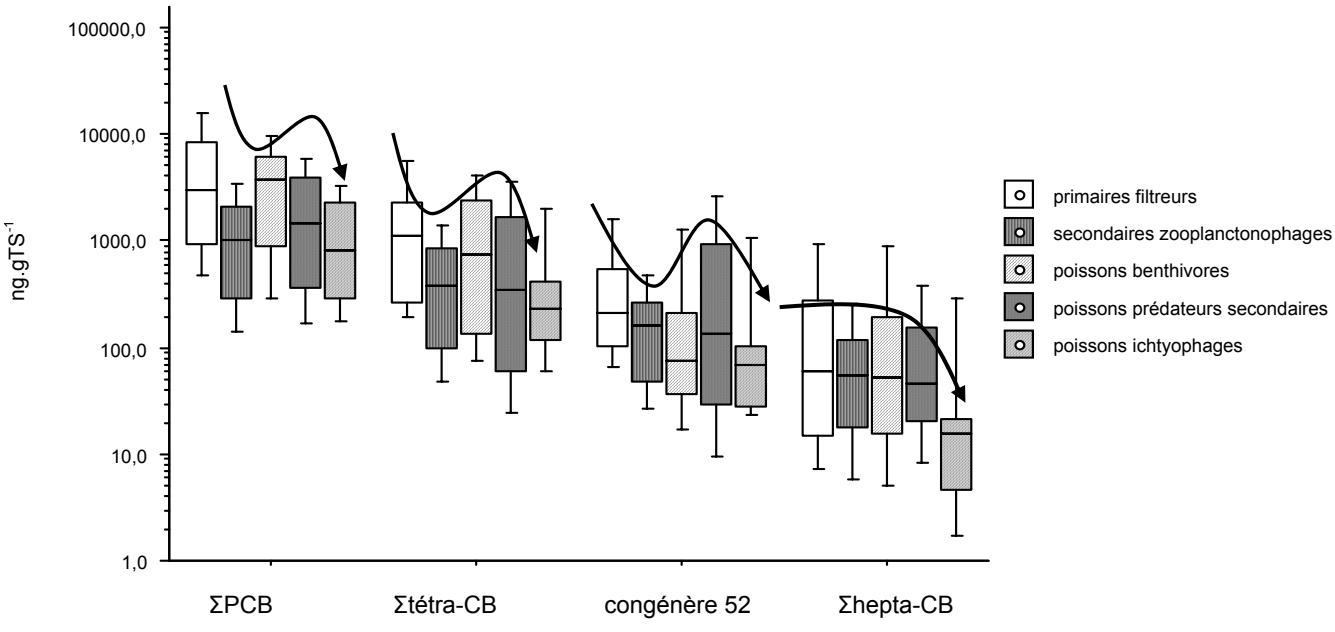


Figure 2.10 Profil de contamination par les PCBs dans les guildes trophiques

II.3.4.2 PCBs

Les deux guildes extrêmes du réseau trophique, des poissons ichtyophages et des filtreurs primaires, se sont révélées respectivement la moins et la plus contaminée par les divers PCBs. En conséquence, les imprégnations par l'ensemble des PCBs et par la famille dominante, celle des tétra-CB, tendent à diminuer lorsqu'on s'intéresse aux niveaux trophiques supérieurs avec un accroissement au niveau des poissons benthivores (Figure 2.10). Les molécules PCBs les plus simples, les di-CB, montrent une même évolution chez les organismes contaminés qui constituent 80% de la communauté analysée. En ce qui concerne les PCBs les plus lourds, les hepta-CB, les niveaux de contamination détectés chez 78% des organismes analysés sont constants des organismes filtreurs aux poissons prédateurs secondaires et diminuent chez les poissons ichtyophages.

II.3.5 Variations temporelles de la contamination

Les variations au cours du temps de la contamination sont abordées par l'analyse des variations sur deux cycles annuels et celles de l'évolution saisonnière pendant l'année 2002. Comme cela a été décrit précédemment (§II.2.1), les campagnes de prélèvement ont été programmées en fonction des périodes de traitement des zones rizicoles riveraines (avant, pendant et après). Elles ont eu lieu en mars et en avril, époque correspondant à la reprise alimentaire post-hivernale avant les premiers traitements, en mai, période pré-estivale de traitement et à la fin de l'été en septembre après une période d'activité alimentaire intense.

II.3.5.1 Pesticides OCs

Variations annuelles

Les variations annuelles sont estimées par la comparaison des teneurs tissulaires en HCB, *pp'*-DDE, dieldrine, lindane et diuron chez les cardiums, les athérines et les anguilles aux mois de septembre 2001 et 2002. Le test de l'analyse des variances ne nous autorisant pas à utiliser un test paramétrique (test t de Student), c'est le test de rangs U de Mann-Whitney qui est retenu pour cette analyse. Les teneurs sont exprimées par leurs valeurs extrêmes (minimales et maximales) en ng par g de tissu sec.

Alors qu'aucune différence de concentration n'est observée pour le *pp*'-DDE, le diuron, le lindane et l'HCB, montrent une tendance à la diminution entre septembre 2002 et septembre 2001 de manière plus ou moins significative selon l'espèce (Tableau 2.5).

Tableau 2.5 Variations annuelles de l'imprégnation par les pesticides OCs (*différence significative, p<0,05, selon le test U de Mann Whiteny, entre septembre 2001 et septembre 2002; les valeurs médianes [max-min] sont exprimés en ng.gTS^{-1})

	Cardium		**Athérine**		**Anguille juvénile**		**Anguille jaune**	
	Sept 2001	Sept 2002	Sept 2001	Sept 2002	Sept 2001	Sept 2002	Sept 2001	Sept 2002
pp'DDE	2,32 [nd-26,6]	1,61 [0,01-7,2]	10,4 [1,49-31,2]	6,54 [0-14,5]	12,1 [nd-25,5]	8,02 [4,99-32,0]	8,0 [1,48-13,6]	24,4 [6,60-35,7]
HCB	108 [2,76-04]	0,95* [nd-6,88]	137 [102-453]	0,49* [0-1,81]	234 [0-395]	2,28 [0-14,8]	54,4 [6,05-121]	3,04 [0-7,42]
Dieldrine	2,58 [0,48-27]	12,70 [nd-151]	9,21 [1,20-16,8]	18,5 [nd-118]	4,82 [2,76-7,77]	0,65 [nd-30,07]	1,87 [0,82-5,70]	44,9* [19,2-216]
Lindane	5,33 [nd-977]	0* [nd-19,4]	69,0 [33,3-530]	1,47* [nd-49,0]	10,5 [nd-54,9]	5,72 [nd-28,3]	103 [11,30-211]	0* [nd-5,71]
Diuron	22,04 [nd-62,3]	11,0 [2,47-13]	150 [99,1-657]	9,40* [0,19-02]	99,1 [55,6-150]	21,6* [18,8-101]	34,7 [15,2-120]	84,8 [0-283]
n	6	6	5	6	4	8	4	3

A l'opposé, l'imprégnation par la dieldrine s'élève pendant la même période, notamment chez les anguilles jaunes.

Variations saisonnières

Pour l'analyse des variations saisonnières de la contamination par les pesticides, les teneurs des mois de mars, mai et septembre 2002, représentées par leurs médianes encadrées des valeurs extrêmes figurent dans le Tableau 2.6. Le mois de mars se singularise par les concentrations maximales en aldrine chez toutes les espèces, exceptées les anguilles jaunes. En revanche, la dieldrine, présente un optimum au mois de septembre chez la plupart des espèces. A la fin de l'été, on observe, en outre, une augmentation des teneurs en lindane et en heptachlor, sauf chez les cardiums et les athérines qui manifestent un haut niveau de lindane en mars. La contamination par le diuron et le fipronil, substances actives déversées au cours des traitements phytosanitaires, est élevée en mai et septembre avec, cependant, plus ou moins d'ampleur selon les espèces.

Une analyse interspécifique de l'importance de la date de prélèvement sur l'imprégnation tissulaire et les pesticides impliqués, est donnée par une analyse des variances (ANOVA) rapportée dans le Tableau 2.7. D'une manière générale, *C. glaucum* est l'espèce chez laquelle la contamination par le diuron, l'α endosulfan, l'heptachlor et les pesticides

Tableau 2.6 Niveaux d'accumulation des pesticides avant, pendant et après les traitements agricoles en 2002 (valeurs médianes [min-max] sont exprimées en ng.gTS^{-1} ; 3<n mesures < 6, cf. Tableau 1.3; en rouge les valeurs les plus hautes)

	HCB			**Dieldrine/Aldrine**			**Lindane**			**Diuron**			**Fipronil**		
	Mars	**Mai**	**Sept**	**Mars**	**Mai**	**Sept**	**Mars**	**Mai**	**Sept**	**Mars**	**Mai**	**Sept**	**Mars**	**Mai**	**Sept**
Cardium	0,04 [nd-2,36]	18,1 [4,44-443]	0,95 [nd-1,81]	1,68/74,5 [0,59-5,63]/ [35,4-143]	0,9/5,88 [0,001-21,36]/ [0,001-25,1]	18,5/21,0 [nd-151]/ [nd-41,4]	3,79 [2,72-7,98]	0,80 [nd-24,3]	nd [nd-19,4]	17,7 [nd-125]	232 [154-506]	10,9 [2,47-113]	24,1 [nd-171]	33,1 [3,28-67,0]	48,6 [2,34-59,6]
Crevette grise	0,18 [nd-37,7]	0,99 [nd-7,36]	0,86 [nd-1,68]	3,22/1,75 [1,8nd-6,73]/ [1,01-7,72]	14,2/0,1 [0,001-48,2]/ [nd-15,4]	33,4/20,6 [nd-195]/ [0,62-71,9]	0,32 [0,23-0,43]	0,08 [nd-4,12]	7,17 [nd-35,8]	17,7 [1,7nd-66,7]	9,84 [nd-1030]	12,1 [1,42-22,0]	0,53 [0,27-1,18]	11,9 [nd-39,3]	0,18 [0,001-290]
Crevette rose	0,90 [nd-1,86]	7,08 [nd-7,36]	0,67 [0,05-3,75]	5,33/17,9 [1,87-14,8]/ [7,09-48,7]	14,0/1,93 [0,003-34,2]/ [nd-19,2]	43,7/6,87 [4,53-112]/ [2,86-489]	1,55 [0,3nd-3,63]	0,79 [nd-13,0]	7,62 [nd-306]	10,9 [nd-116]	24,5 [15,9-238]	40,8 [10,4-66,9]	10,9 [0,75-25,9]	24,5 [0,003-94,5]	40,8 [nd-269]
Athèrine	0,90 [nd-4,19]	26,5 [5,29-33,1]	0,49 [nd-1,81]	2,03/89,6 [nd-22,8]/ [48,7-94,5]	6,45/1,92 [0,001-23,1]/ [0,001-8,01]	18,5/21,2 [nd-118]/ [nd-64,5]	5,25 [1,83-10,2]	0,19 [nd-2,99]	1,47 [nd-48,9]	43,6 [11,8-138]	1082 [21nd-1932]	9,40 [0,19-202]	21,9 [8,77-31,5]	4,18 [0,001-15,4]	0 [nd-200]
Epinoche	9,14 [nd-12,3]	0,26 [nd-25,5]	51,7 [0,97-102]	1,11/23,6 [0,51-4,14/ [12,9-190]	1,61/0,01 [0,001-135]/ [0,001-11,1]	26,5/36,2 [19,7-33,2] [147-57,7]	2,24 [1,83-5,50]	0,83 [nd-18,2]	30,9 [6,24-55,7]	92,2 [24,1-223]	521 [0,4nd-764]	224 [9,26-439]	2,45 [0,15-10,8]	17,0 [0,001-228]	25,9 [19,1-32,8]
Gobie	0 [nd-0,63]	3,67 [nd-15,7]	0 [nd-26,4]	0,42/44,0 [nd-8,72]/ [12,6-72,5]	12,9/8,70 [0,003-88,2]/ [0,002-14,1]	5,18/5,22 [nd-64,1]/ [nd-36,2]	1,46 [nd-31,0]	1,46 [nd-4,19]	1,38 [nd-20,9]	57,1 [19,1-287]	28,3 [11,1-318]	99,44 [2,87-397]	57,1 [19,1-287]	28,3 [11,1-318]	99,4 [2,87-397]
Anguille juvénile	0,11 [nd-0,22]	0 [nd-11,3]	2,28 [0,001-14,8]	0,16/30,2 [0,27-0,97]/ [8,35-51,9]	0/190 [nd-557]/ [179-1199]	4,86/20,2 [nd-30,1]/ [2,32-66,5]	2,49 [2,19-2,80]	8,34 [nd-99,1]	5,72 [nd-28,2]	1,16 [0,46-1,77]	27,1 [nd-574]	6,06 [nd-42,0]	10,2 [6,05-14,3]	0 [nd-0,25]	21,6 [18,8-101]
Anguille jaune	1,79 [0,12-14,8]	9,40 [9,4nd-9,40]	3,04 [0,001-7,42]	1,5/27,6 [1,16-2,20]/ [9,59-55,5]	216/240 [22,2-282]/ [34,6-250]	44,1/11,8 [19,2-216]/ [2,32-66,5]	1,65 [1,09-3,27]	31,9 [17,9-51,9]	103 [nd-5,71]	1,69 [0,47-2,08]	228 [121-349]	nd [nd-nd]	29,5 [nd-53,9]	569 [321-642]	84,8 [0,004-283]

Tableau 2.7 ANOVA de l'effet de la saison de prélèvement sur la contamination par les pesticides (*p<0,05 ; **p<0,0001)

	Cardium (26pools)	**Crevette grise** (22)	**Crevette Rose** (27)	**Athèrine** (28)	**Epinoche** (21)	**Gobie** (27)	**Anguille juvénile** (19)
HCB	NS	NS	*	**	*	NS	NS
Dieldrine,	**	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Aldrine	*	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Lindane	**	NS	NS	NS	*	NS	NS
α endosulfan	**	*	NS	*	NS	NS	NS
Endosulfan sulfate	NS	NS	NS	*	*	*	NS
Heptachlor	**	NS	NS	**	NS	**	NS
Hetachlor-epoxyde	*	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Diuron	**	NS	NS	**	NS	NS	NS
Fipronil	NS	NS	NS	NS	NS	**	NS

interdits (la dieldrine, l'aldrine et le lindane) exprime le plus et de manière très significative l'influence de la saison ce qui n'est pas le cas des anguilles juvéniles et des crevettes grises et roses.

Une autre variation saisonnière concerne certains pesticides en usage limité dans la région et leurs métabolites. Par exemple, chez les athèrines la concentration en heptachlor diminue significativement du mois de mars au mois de septembre, alors que les concentrations en heptachlor-epoxyde ne varient pas. Autre exemple, pour l'α endosulfan et l'endosulfan-sulfate les profils mensuels sont similaires, leurs concentrations augmentent progressivement de mars à septembre (Figure 2.11).

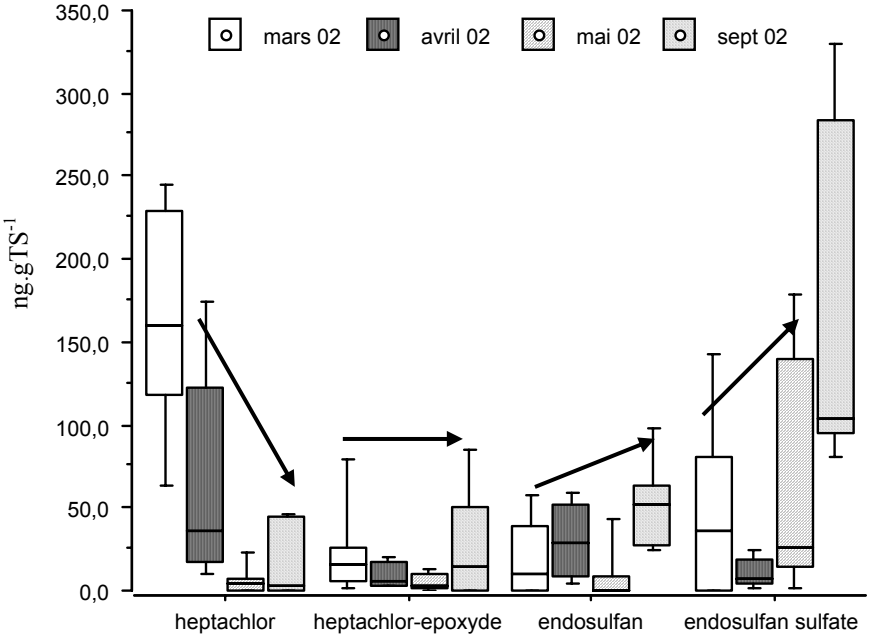


Figure 2.11 Evolution saisonnière de l'imprégnation par les pesticides et leurs métabolites chez *A. boyeri* (n=6)

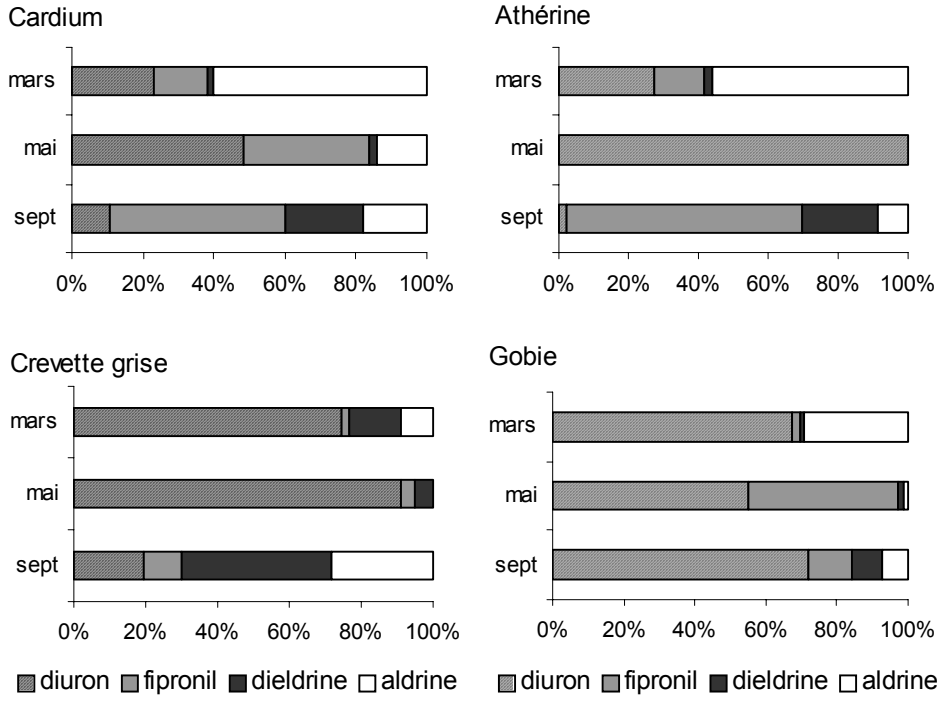


Figure 2.12 Evolution saisonnière de la répartition des pesticides types (n=6)

Variations de l'importance relative des pesticides majeurs en fonction de la période de traitement agricole

L'importance relative des pesticides actuellement utilisés dans les traitements agricoles et déversés de manière directe (le fipronil) ou indirecte (le diuron) dans l'écosystème du Vaccarès et de la dieldrine et de l'aldrine qui occupent une place importante dans la contamination globale du biota est analysée en fonction de la période de traitement agricole chez 4 espèces physiologiquement très différentes (le cardium, la crevette grise, l'athérine et le gobie). La Figure 2.12 illustre la distribution des moyennes géométriques chez les individus contaminés aux mois de mars, mai et septembre 2002 soit avant, pendant et après le traitement phytosanitaire. Celle-ci varie selon l'espèce et selon la période considérées. D'une manière générale, avant le traitement, la présence d'un contaminant très persistant, l'aldrine est prépondérante notamment chez les cardiums (60%) et les athérines (56%). Sa contribution à la contamination globale diminue de manière importante lors du traitement agricole quand le pourcentage de diuron augmente considérablement (de 55% chez les gobies à 100% chez les athérines) suivi par celui de fipronil qui atteint 42% de la contamination globale chez les gobies. Quatre mois après le traitement agricole, le pourcentage du fipronil, molécule rapidement dégradée, diminue chez les crevettes grises et les gobies et augmente chez les cardiums et les athérines. D'une manière générale, il s'instaure une alternance : lorsque le pourcentage de diuron diminue chez les cardiums, les crevettes grises et les athérines, le pourcentage de fipronil est renforcé (jusqu'à 68% chez les athérines) et vice-versa. Ainsi chez les gobies, le pourcentage de diuron augmente à 72%, quand le pourcentage de fipronil diminue significativement (13%). En même temps la permanence de pesticides interdits pour l'usage agricole mais persistants dans l'environnement, augmente dans les tissus biologiques, notamment chez les cardiums, les athérines et les crevettes grises.

II.3.5.2 PCBs

Variation annuelle

La variation de la contamination totale en PCBs entre septembre 2001 et septembre 2002 est évaluée chez les cardiums, les athérines et les anguilles. Une diminution significative des teneurs tissulaires en PCBs en septembre 2002 par rapport à septembre 2001 est mise en évidence chez toutes les espèces à l'aide du test t de Student (Figure 2.13). Des diminutions significatives sont observées pour la plupart des familles de PCBs, à l'exception des tétra-CB,

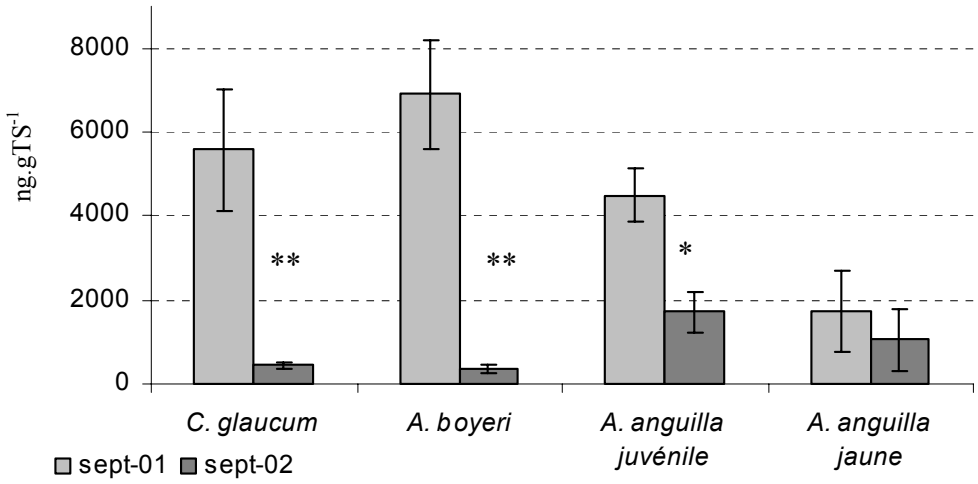


Figure 2.13 Variations annuelles de l'imprégnation par la somme des PCBs (* p<0,05 ; **p< 0,0001 ; nombre de mesures comme Tableau 2.5)

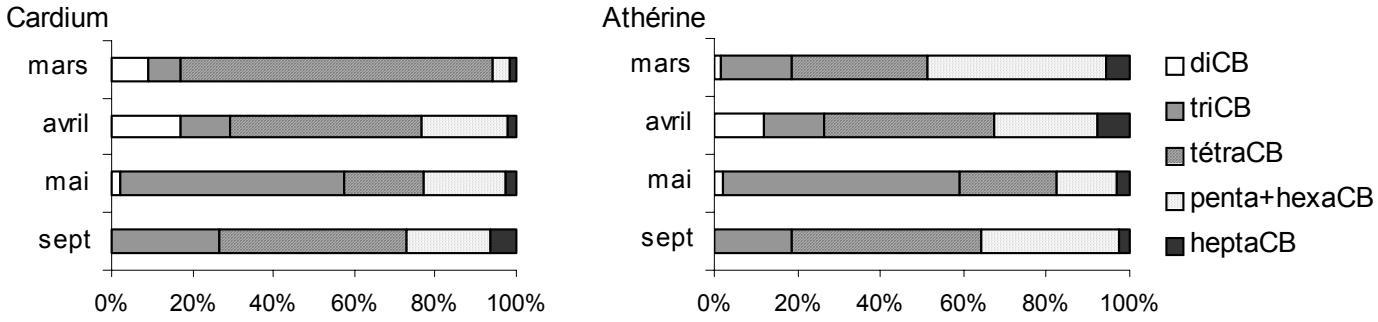


Figure 2.14 Evolution saisonnière de la répartition des différentes familles de PCBs chez le cardium (2pools<n<6pools) et l'athérine (n=6 individus)

dont les niveaux d'imprégnation tissulaires chez les anguilles jaunes n'ont pas changé de manière significative durant les périodes considérées.

Variations saisonnières

Les teneurs en PCBs pendant les mois caractérisés par une forte activité alimentaire (mars, avril, mai et septembre 2002) chez les espèces les plus stables de Vaccarès figurent dans le Tableau 2.8a et 2.8b. Elles sont exprimées par les médianes et tiennent compte des valeurs extrêmes (§II.3.1.).

A l'exception des gobies et des épinoches, l'imprégnation globale par les PCBs des espèces du Vaccarès est maximale au mois de mai. Chez les gobies, l'optimum se situe en avril et chez les épinoches en septembre. Considérées individuellement les familles de PCBs montrent une évolution saisonnière similaire. Les di-, tri- et tétra-CB) ainsi que les PCBs plus lourds (penta+hexa- et hepta-CB sont plus concentrés en printemps (mars, avril, mai). Cependant cette règle n'est pas générale, on dénote une exception: les épinoches sont plus imprégnées par les tétra-, penta+hexa- et hepta-CB en septembre. Ces divergences auxquelles s'ajoute la faible significativité concourent à conclure que les fluctuations saisonnières de la contamination par les PCBs sont peu intenses.

Variations de l'importance relative des familles de PCBs en fonction de la date de prélèvement

L'évolution saisonnière de l'importance relative des divers PCBs est analysée chez les athérines et les cardiums, espèces qui en sont les plus imprégnées.

De l'examen de la Figure 2.14 il ressort une différence de la répartition des tétra-CB et penta+hexa-CB en mars avec une nette prévalence des tétra-CB chez les cardiums (77% contre 32% chez les athérines) et des penta+hexa-CB chez les athérines (43% contre 4% chez les cardiums). Cependant, aux mois d'avril, de mai et de septembre, la répartition des PCBs est très semblable chez les deux espèces considérées avec une prédominance des tétra-CB en avril et septembre (=40%) et des tri-CB en mars (=55%). Le pourcentage des hepta-CB ne dépasse pas 10% et les di-CB atteignent leurs maxima (12% chez les athérines et 17% chez les cardiums) au mois d'avril.

Tableau 2.8$_1$ Valeur médiane et [min-max] de l'imprégnation par les PCBs au cours d'un cycle annuel (2002) exprimée en ng.gTS^{-1} (n comme rapporté dans Tableau 2.6)

	∑PCB				∑diCB				∑triCB				∑tetraCB			
	Mars	**Avril**	**Mai**	**Sept**	**Mars**	**Avril**	**Mai**	**Sept**	**Mars**	**Avril**	**Mai**	**Sept**	**Mars**	**Avril**	**Mai**	**Sept**
Cardium	1115 [578-2047]	8373 [1520-15226]	**12339** [6825-84806]	487 [146-684]	96,7 [28,9-207]	**901** [178-1623]	271 [168-1588]	0,01 [0,01-0,01]	88,7 [20,8-174	503 [179-826]	**8405** [2146-31666]	105 [21,2-253]	790 [388-1750]	**5916** [194-11638]	1168 [391-8871]	199 [85,6-250]
Crevette grise	786 [85,6-3262]	370 [138-2212]	**945** [188-3043]	178 [82,6-624]	**51,0** [20,5-103]	37,0 [15,2-165]	8,92 [2,84-268]	25,9 [3,59-47,9]	**111** [17,6-268]	42,4 [24,1-531]	89,5 [38,6-1466]	26,5 [4,21-92,3]	526 [106-1108]	151 [47,7-1581]	**547** [11,5-1495]	90,3 [8,17-294]
Crevette rose	1671 [691-3399]	2230 [638-3580]	**2957** [724-31033]	516 [90,5-1476]	**156** [91,6-1690]	112 [73,0-362]	11,8 [11,8-11,8]	26,8 [26,8-26,8]	411 [61,2-708]	250 [184-2464]	**937** [185-3245]	16,4 [7,13-159]	572 [278-1110]	507 [278-1943]	**968** [329-3194]	433 [48,0-913]
Athérine	2325 [1379-4284]	3949 [404-7686]	**8403** [3755-48496]	262 [165-872]	20,0 [4,75-683]	**155** [13,7-2530]	112 [30,8-1204]	0,67* [0,002-23,7]	246 [108-1534]	237 [14,0-2167]	**2870** [2151-18524]	49,3 [26,0-89,6]	630 [258-1077]	871 [129-3795]	**1650** [690-8059]	123 [41,2-426]
Epinoche	1098 [390-1605]	4833 [3281-14124]	776 [177-3971]	**22121** [157-44085]	162 [50,8-317]	**171** [91,4-533]	17,3 [4,01-77,1]	nd	165 [82,8-381]	**1275** [51,5-4474]	350 [33,2-1163]	565 [24,5-1106]	191 [108-1057]	3115 [1289-7738]	40,2 [21,4-669]	**5331** [17,7-10644]
Gobie	936 [229-3842]	**4238** [878-6016]	84,2 [55,3-167]	589 [157-6829]	30,1 [2,55-191]	**129** [44,0-469]	0,62 [0,62-0,62]	28,0 [0,002-261]	115 [38,8-217]	**252** [117-563]	1,80 [0,28-14,9]	**252** [21,7-537]	332 [145-1363]	**2904** [277-4953]	15,8 [1,33-41,8]	61,4 [24,8-2402]
Anguille juvénile	962 [446-1477]	-	**3049** [1882-17101]	543 [181-3825]	95,1 [95,1-95,1]	-	**119** [32,7-206]	9,67 [0,01-60,8]	-	**221** [177-266]	49,4 [11,3-86,4]	32,1 [13,6-99,4]	499 [40,1-958]	-	**818** [59,4-9885]	222 [65,8-2117]
Anguille jaune	827 [672-3535]	-	**16500** [12500-18750]	322 [281-2538]	21,6 [20,1-193]	-	**237** [149-325]	10,4 [0,01-75,3]	-	**306** [65,2-401]	205 [205-205]	25,1 [18,3-76,3]	292 [70,3-1068]	-	**14066** [15066-21006]	223 [147-2204]

Tableau 2.8$_2$ Valeur médiane et [min-max] de l'imprégnation par les PCBs au cours d'un cycle annuel (2002) exprimée en ng.gTS^{-1} (n comme Tableau 2.6)

	∑penta+hexaCB				**∑heptaCB**			
	Mars	Avril	Mai	Sept	Mars	Avril	Mai	Sept
Cardium	46,6 [11,2-150]	926 [303-1548]	**1536** [930-41119]	68,1 [16,0-399]	15,4 [1,46-235]	126 [16,3-236]	**372** [135-1596]	17,8 [10,5-83,7]
Crevette grise	**145** [26,0-879]	32,8 [5,45-607]	84,2 [28,6-403]	31,2 [3,07-216]	**68,3** [9,00-842]	12,8 [2,20-66,9]	21,7 [15,9-86,3]	37,3 [2,19-72,4]
Crevette rose	301 [144-492]	302 [77,1-1193]	**594** [130-14276]	74,1 [13,9-348]	58,3 [28,6-250]	50,5 [8,87-256]	**192** [55,4-8132]	2,45 [2,45-2,45]
Athérine	792 [236-1864]	484 [35,7-3645]	**847** [81,5-16451]	93,4 [18,7-344]	138 [16,2-967]	**294** [6,31-1819]	100 [70,3-1913]	5,01 [2,70-68,3]
Epinoche	384 [63,8-605]	**657** [117-2087]	103 [43,6-1560]	**15278** [115-30441]	40,1 [33,3-142]	48,2 [5,32-306]	61,1 [21,1-68,1]	**1096** [523-2046]
Gobie	**272** [22,4-2700]	180 [18,1-2209]	37,7 [10,1-136]	62,4 [0,004-2664]	**151** [20,2-1091]	46,3 [8,38-220]	nd	109 [11,9-826]
Anguille juvénile	130 [67,1-194]	-	**2219** [1446-6319]	74,4 [10,7-1261]	62,5 [34,4-90,6]	-	**208** [45,7-603]	23,6 [2,53-302]
Anguille jaune	380 [56,5-1706]	-	**1356** [1356-1356]	76,8 [40,5-249]	18,2 [15,3-245]1	-	**491** [nd-491,394]	14,5 [0,01-29,4]

II.3.6 Relations entre les paramètres biologiques et la contamination

Dans cette étude de terrain, l'hétérogénéité intraspécifique est courante, voire générale, puisque la constitution des lots expérimentaux dépend des aléas de la capture. Cette particularité est d'autant plus prononcée que l'on s'adresse à des espèces de « grande taille », chez lesquelles sont collectés des individus de classe de taille différente (juvéniles ou adultes). Il est donc probable que la variabilité classique au sein d'un groupe d'individus de même espèce soit liée à l'état physiologique des individus. Il semble donc essentiel de rechercher si la variabilité intraspécifique de l'imprégnation par les OC est reliée à certains paramètres morphométriques ou constitutifs. Les données collectées ici sont la taille, le poids et la teneur tissulaire en lipides. L'analyse fait appel au test des corrélations de Pearson pour lequel une probabilité *p* inférieure à 0,05 a été considérée comme significative.

II.3.6.1 Pesticides

Les corrélations significatives entre les paramètres biométriques et le niveau de l'imprégnation tissulaire sont présentées dans le Tableau 2.9. Bien qu'il s'agisse de contaminants lipophiles, leurs concentrations dans les tissus sont rarement corrélées avec la charge totale en lipides des organismes. Les quelques corrélations significatives entre la teneur en lipides et le niveau de contamination sont positives pour le *pp*'-DDE, l'aldrine et le β endosulfan, chez les athérines, et pour l'α endosulfan chez les épinoches. Chez les cardiums, ces corrélations sont plus nombreuses et intéressent l'αHCH, la dieldrine, l'heptachlor, le fipronil et l'α endosulfan. D'autre part, les concentrations en δHCH, chez les athérines comme chez les anguilles jaunes sont corrélées négativement avec le taux de lipides.

Les corrélations avec les deux classes lipidiques sont très variables selon l'espèce et le contaminant considérés. Néanmoins, au moins en ce qui concerne les anguilles jaunes, les épinoches, les gobies et les crevettes roses, la plupart des pesticides est positivement corrélée avec la charge en lipides polaires.

Chez les épinoches et les anguilles jaunes, des corrélations sont mises en évidence entre les teneurs en contaminants et la taille des individus. Chez les épinoches, elles sont systématiquement négatives, ce qui pourrait signifier une imprégnation plus intense chez les individus de petite taille. Chez les anguilles, il s'agit de corrélations positives manifestant qu'il y aurait une augmentation de l'imprégnation avec l'âge des individus. Cependant, la comparaison statistique basée sur la distribution des fréquences de tailles ou la taille moyenne

Tableau 2.9 Corrélations de Pearson (p<0,05) entre le taux d'imprégnation par les pesticides et les paramètres biologiques (+ les variables évoluent dans le même sens, - les variables évoluent en sens opposé)

	Cardium (26pools)			**Crevette grise** (26)					**Crevette rose** (22)					**Athérine** (28)					**Gobie** (26)					**Epinoche** (21)					**Anguille jaune** (12)				
	L	PL	LN	T	P	L	PL	LN	T	P	L	PL	LN	T	P	L	PL	LN	T	P	L	PL	LN	T	P	L	PL	LN	T	P	L	PL	LN
HCB									+			+	-	-								+		-								
pp'DDE																+		+														
Dieldrine	+																										+		+			
Aldrine												+				+		+										+	+			+
Lindane												+												-	-				+			
α HCH	+												-			+		+											+			+
δ HCH												+		+	+	-						-		-					+		-	+
α endosulfan	+			-	-	+	+	+			+											+		-					+		-	+
β endosulfan										+						+							+	-			+		+			+
Endosulfan-sulfate																						+							+			+
Heptachlor	+																															+
Diuron												+					+												+			+
Fipronil	+																					+		-			+					+

de l'ensemble de la population, ne confirme pas la différence d'imprégnation entre les deux classes de taille ni chez les épinoches ni chez les anguilles jaunes.

II.3.6.2 PCBs

Des corrélations significatives entre les niveaux de contamination par les PCBs et les paramètres morphométriques sont relevées uniquement chez deux espèces, les athérines et les épinoches (Tableau 2.10). Chez les athérines et les épinoches, la taille des individus est corrélée négativement avec la somme des PCBs et les groupes de PCBs les plus concentrés, les tri-CB et les tétra-CB pour les athérines et les tétra-, penta+hexa- et hepta-CB pour les épinoches. On peut donc considérer que chez ces poissons de petite taille, les plus jeunes individus sont les plus chargés. D'autre part les concentrations tissulaires en penta- et hexa-CB augmentent avec les charges lipidiques des athérines, comme la contamination globale en PCBs des épinoches et l'imprégnation en tétra-CB des cardiums.

Cependant, des corrélations sont mises en évidence entre les teneurs en PCBs et la charge en différentes classes lipidiques, les phospholipides des crevettes, des athérines, des gobies et des anguilles jaunes et les lipides neutres des épinoches et des cardiums.

II.3.7 Mode de contamination par les micropolluants OC

Dans les milieux aquatiques, les organismes sont exposés à deux voies principales de transfert des contaminants biodisponibles : le transfert direct à partir de l'eau ou/et des sédiments et le transfert alimentaire. Afin de comprendre la modalité de la contamination des espèces du Vaccarès, nous avons concentré notre attention sur l'analyse d'un éventuel transfert trophique des micropolluants OC au sein du réseau trophique. En utilisant les valeurs de $\delta^{15}N$ et $\delta^{13}C$ (mesurés sur les mêmes échantillons), qui sont des indicateurs de niveau trophique et de la source du carbone primaire (voir le Chapitre I de ce manuscrit).La recherche d'une éventuelle bioamplification est réalisée par l'étude des corrélations entre ces facteurs et les niveaux de l'imprégnation tissulaire au moyen des tests de Pearson.

II.3.7.1 Pesticides

Sur la totalité des espèces analysées du réseau trophique (225 échantillons), aucune corrélation entre le $\delta^{15}N$ et les teneurs en pesticides n'est révélée. Cependant, si l'on s'intéresse aux individus collectés lors d'une même campagne de prélèvement plusieurs relations se révèlent significatives. Ainsi, au mois de mars, des corrélations significatives sont

Tableau 2.10 Corrélations de Pearson ($p<0,05$) entre le taux d'imprégnation par les PCBs et les paramètres biologiques (+ les variables évoluent dans le même sens, - les variables évoluent en sens opposé)

	Cardium			**Crevette grise**					**Athérine**					**Epinoche**					**Gobie**					**Anguille jaune**				
	L	PL	LN	P	T	L	PL	LN	P	T	L	PL	LN	P	T	L	PL	LN	P	T	L	PL	LN	P	T	L	PL	LN
∑PCB							+			-		+			-	+		+				-					+	
∑diCB																												
∑triCB										-		+										-						
∑tetraCB	+		+						-	-				-	-	+		+									+	
∑penta+hexaCB							+				+				-	+		+				-						
∑heptaCB								+				+			-	+		+									+	

mises en évidence pour le fipronil et l'endosulfan sulfate. A cette période précédant les traitements agricoles, les teneurs diminuent quand on s'élève dans le réseau trophique. Mais, si l'on s'adresse aux individus appartenant à la classe moyennement contaminée (+), telle qu'elle a été précédemment définie, des corrélations positives entre le $\delta^{15}N$ et l'endosulfan sulfate, le β endosulfan et l'α chlordane sont mises en évidence. Dans la classe très contaminée (++), seul l'α endosulfan est corrélé avec le $\delta^{15}N$. Il s'avère, donc, que l'intensité de l'imprégnation est un facteur déterminant pour la révélation, ou non, d'un processus de bioamplification. D'autre part, on peut estimer qu'un classement en fonction de l'ampleur de l'imprégnation renseigne sur l'ancienneté et la chronicité des intoxications, compte tenu de l'efficacité des processus de métabolisation des polluants organiques persistants.

Puisque la bioamplification a lieu par voie alimentaire, les cardiums, bivalves filtreurs occupent une position particulière dans le réseau trophique. Ils ne sont *a priori* pas consommés par les autres espèces considérées, il en est de même pour les muges juvéniles qui sont préférentiellement herbivores. Ces deux espèces ne sont pas prises en compte pour les analyses de corrélations qui intéressent donc dorénavant la totalité du réseau restant. Cette analyse a confirmé la corrélation positive entre le $\delta^{15}N$ et les concentrations en α endosulfan et en a révélé une autre entre le $\delta^{15}N$ et l'HCB. Néanmoins, si on réalise le test de Pearson dans la classe très contaminée (++), outre la corrélation avec l'α endosulfan, une autre, de sens opposé, est trouvée pour le diuron. Chez les individus moyennement contaminés, un grand nombre de corrélations entre les concentrations tissulaires en pesticides et les signatures isotopiques sont significatives. Il s'agit surtout de pesticides persistants comme l'α chlordane, l'endrine et son métabolite principal, l'HCB et le *pp*'-DDE et les métabolites de l'α endosulfan. La plupart de ces relations sont confirmées dans les mois précédant les traitements agricoles.

Une autre approche consiste à réduire le réseau trophique en une seule chaîne de proies-prédateurs. Celle qui nous intéresse est constituée de gammares (7 pools-environ 57 individus), d'athérines (29) et d'anguilles jaunes (12). Dans cette chaîne, des corrélations positives sont révélées entre le $\delta^{15}N$ et les teneurs en dieldrine, β endosulfan, endosulfan sulfate et endrine aldéhyde, ce qui suggère que ces pesticides sont bioamplifiés dans la chaîne considérée. Cette bioamplification se confirme surtout pour les individus très contaminés. Chez ces derniers une corrélation négative très significative entre le $\delta^{15}N$ et le diuron confirme le mode de contamination des espèces par cet herbicide. En effet le sens négatif de cette relation signifie que plus l'on s'élève dans la chaîne trophique moins les espèces sont

contaminées. En d'autres termes lorsque la surface corporelle de l'espèce augmente sa concentration tissulaire en pesticides diminue. Cette imprégnation est donc liée à la surface de tégument en contact avec le pesticide, contact qui ne peut avoir lieu que si le xénobiotique est présent dans l'environnement aquatique.

La bioamplification de certains pesticides organochlorés dont la structure moléculaire est proche de celle des constituants membranaires des cellules pourrait s'effectuer par une incorporation dans bicouche phospholipidique (Roche *et al*., 2000). Un des exemples les plus classiques concerne le lindane et le phosphatidyl inositol, c'est ce qui nous a motivé à rechercher les liens potentiels entre l'incorporation phospholipidique des pesticides organochlorés lipophiles et les emplacements trophiques des espèces estimés par le $\delta^{15}N$. Ainsi, si l'on excepte les cardiums, dans le réseau trophique, l'analyse les corrélations entre le $\delta^{15}N$ et le pourcentage d'incorporation phospholipidique des pesticides précédemment déclarés « bioamplifiables » chez les individus moyennement contaminés fournit des indications contradictoires. En effet, des corrélations significatives sont effectivement décelées pour l'α endosulfan, le β endosulfan et la dieldrine, mais elles sont de signe négatif, alors qu'elles sont positives pour le diuron.

Enfin, certaines relations au sein d'une même espèce sont mises en évidence entre les valeurs $\delta^{15}N$ et l'imprégnation tissulaire. Elles sont négatives avec le diuron chez les athérines et les cardiums et avec l'endosulfan sulfate chez les épinoches. Ces observations pourraient suggérer une plus grande sensibilité des individus les plus jeunes dont l'activité de prédation se limiterait à des proies de taille inférieure.

Comme nous l'avons montré dans le Chapitre I, le $\delta^{13}C$ peut servir de facteur discriminant entre les sources de production primaire benthique ou pélagique. L'analyse des corrélations entre le $\delta^{13}C$ et les teneurs en pesticides sur l'ensemble des organismes analysés révèle une corrélation négative avec les teneurs en αendosulfan suggérant une plus forte contamination chez les organismes à tendance pélagivores. En effet, lorsqu'une distinction est établie entre les individus benthiques (valeurs de $\delta^{13}C$ >-20) et pélagiques (valeurs de $\delta^{13}C$ <-20), la contamination en α endosulfan est significativement plus élevée chez les espèces pélagiques (49,7±14,1 $ng.gTS^{-1}$) que chez les espèces benthiques (23,8±3,0 $ng.gTS^{-1}$).

Au mois d'avril et de mars 2002 le $\delta^{13}C$ est systématiquement inversement corrélé avec l'α et le β endosulfan, l'endrine-aldhéyde, l'aldrine et le fipronil.

Si l'on considère les classes de contamination, chez les individus moyennement contaminés,

des corrélations toujours négatives sont observées notamment pour les pesticides encore autorisés pour les traitements agricoles (l'heptachlor et son métabolite principal, le fipronil et l'α endosulfan) à la période précédant les traitements, ainsi que pour certains pesticides interdits depuis plusieurs décennies (l'endrine et l'aldrine).

Cependant, l'évaluation d'une bioamplification sur l'ensemble du réseau trophique, cardiums et muges non compris, par le test de Pearson révèle une corrélation très significative et positive entre les teneurs en HCB et le $\delta^{15}N$ des individus benthiques, alors qu'aucune corrélation n'est mise en évidence chez les organismes pélagiques.

Toutes les corrélations significatives sont rassemblées sur le Tableau 2.11a.

II.3.7.2 PCBs

Sur l'ensemble du réseau trophique étudié, le test de Pearson, révèle une corrélation négative entre les signatures $\delta^{15}N$ des individus analysés et les niveaux de contamination globale par les PCBs, ainsi que par les tri-, penta- + hexa- et hepta-CB, ainsi que les congénères 8, 28+31, 51+53, 70 et 177. Des résultats semblables sont trouvés dans les deux classes de contamination (+ et ++). L'analyse par saison indique que ces corrélations ne sont confirmées qu'au mois de mai.

En regard des niches écologiques, alors qu'aucune corrélation n'est mise en évidence entre le $\delta^{15}N$ et les teneurs en PCBs chez les organismes pélagiques (n=67), une corrélation de signe négatif est décelée chez les organismes benthiques (n=155) pour les tri- et les hepta-CB. Comme précédemment, les signatures $\delta^{13}C$ ont été utilisées pour distinguer les organismes benthiques ou pélagiques.

Dans l'ensemble du réseau trophique, cardiums et muges non compris, ce sont les tri- et les hepta-CB qui restent négativement corrélées avec le $\delta^{15}N$, ainsi que le congénère 8. C'est encore au mois de mai que sont détectées ces nombreuses corrélations négatives avec la contamination en PCBs (∑PCB, les tri-, les penta + hexa-CB et les congénères 51+53, 44 et 177). D'autre part, lorsque le $\delta^{15}N$ augmente, c'est-à-dire lorsque l'on s'élève dans la chaîne trophique, les concentrations en hepta-CB diminuent chez les organismes benthiques ainsi que les concentrations en penta- + hexa-CB chez les pélagiques.

Les résultats comparables sont obtenus au sein de la chaîne alimentaire réduite, constituée de gammares, d'athérines et d'anguilles jaunes où ce sont les teneurs en tri- et hepta-CB, des congénères 52 et 8 qui diminuent significativement quand le niveau trophique s'élève, ce qui indique une absence formelle de bioamplification des PCBs dans le réseau

Tableau 2.11a Corrélations de Pearson utilisées pour déterminer une éventuelle bioamplification des pesticides OCs dans le réseau trophique de l'étang de Vaccarès

	δ^{15}**N** *vs*				δ^{13}**C** *vs*			
Ensemble du réseau (N=225)								
	HCB	-0,301	0,044	mai	α endosulfan	-0,173	0,015	
	fipronil	-0,321	0,033	mars	α endosulfan	-0,295	0,015	avril
	endosulfan-sulfate	-0,381	0,010	mars	β endosulfan	-0,351	0,041	avril
	lindane	-0,279	0,009	classe +	endrine-aldehyde	-0,312	0,030	mars
	α endosulfan	+0,218	0,049	classe ++	aldrine	-0,422	0,004	mars
	endosulfan-sulfate	+0,284	0,060	classe +	fipronil	-0,304	0,044	mars
	β endosulfan	+0,284	0,043	classe +	heptachlor	-0,282	0,031	classe +
	α chlordane	+0,357	0,034	classe +	aldrine	-0,336	0,008	classe +
					heptachlor-epoxyde	-0,308	0,0193	classe +
					fipronil	-0,503	<0,0001	classe +
					α endosulfan	-0,277	0,011	classe ++
					α chlordane	-0,387	0,021	classe +
					endrine	-0,515	0,0004	classe +
Réseau sans cardiums et muges (N=191)								
	α endosulfan	+0,176	0,021					
	HCB	+0,195	0,007					
	α endosulfan	+0,361	0,021	avril				
	endosulfan-sulfate	-0,326	0,042	mars				
	α endosulfan	+0,040	0,002	classe ++				
	β endosulfan	+0,416	0,005	classe +				
	endosulfan-sulfate	+0,472	0,0003	classe ++				
	endosulfan-sulfate	+0,313	0,027	classe +				
	α chlordane	+0,354	0,043	classe +				
	endrine	+0,336	0,045	classe +				
	endrine-aldehyde	+0,347	0,032	classe +				
	HCB	+0,225	0,052	classe ++				
	pp'DDE	+0,296	0,033	classe +				
	diuron	-0,321	0,051	classe ++				
Chaîne trophique gammare-athérine-anguille								
	β endosulfan	+0,352	0,029					
	endosulfan-sulfate	+0,302	0,064					
	dieldrine	+0,285	0,053					
	endrine-aldehyde	+0,351	0,030					
	diuron	-0,426	0,029	classe ++				

trophique étudié et, en conséquence, l'implication d'autres voies de contamination par ces micropolluants OCs.

Enfin, aucune corrélation significative entre les signatures $\delta^{13}C$ et les niveaux d'imprégnation tissulaire en PCBs ne sont révélées ni globalement, ni en fonction de la saison de prélèvement ou des classes de contamination. Aussi, les taux d'imprégnation par les PCBs ne montrent aucune différence entre les niches écologiques benthiques et pélagiques (Tableau 2.11b).

II.3.8 Contamination par les pesticides OCs des organismes collectés dans les canaux camarguais

Les niveaux d'imprégnation par les pesticides les plus importants chez les organismes collectés dans les canaux de drainage et d'irrigation sont présentés dans les Figures 2.15a et 2.15b.

Il s'agit de trois espèces différentes de point de vue biologique et écologique, cependant, l'imprégnation tissulaire des écrevisses, des crevettes roses et des poissons-chats est généralement homogène. Les seules différences concernent les niveaux des isomères du lindane, la teneur en δ HCH étant significativement plus élevée chez les poissons chats (186±53,3 $ng.gTS^{-1}$) que chez les écrevisses (67,7±13,8 $ng.gTS^{-1}$) et l'α HCH est au contraire, plus concentré chez les écrevisses que chez les poissons chats 4,75±1,33 $ng.gTS^{-1}$et 1,26±0,33 $ng.gTS^{-1}$, respectivement.

Ces organismes ont été échantillonnés dans divers sites des canaux camarguais, il en résulte des variations de la contamination en lindane, dieldrine, fipronil, heptachlor et αendosulfan entre les sites de Fumemorte (canal de drainage des rizières) et du Pont des Garcines (canal d'irrigation). Les niveaux de contamination les plus élevés concernent les vertébrés et invertébrés provenant d'un canal d'irrigation au niveau du Pont des Garcines, notamment les crevettes roses.

D'autre part, la contamination des crevettes roses du Vaccarès est nettement supérieure à celle des crevettes roses collectées dans les canaux, en particulier celle en heptachlor, aldrine et β endosulfan ($p<0.05$) (Tableau 2.12). Les divergences entre les teneurs en pesticides OCs de ces deux populations ne sont pas liées aux charges lipidiques ni aux $\delta^{15}N$ ou $\delta^{13}C$ puisque aucune de ces variables n'est corrélée avec le niveau d'imprégnation.

Les poissons-chats et les anguilles jaunes sont des superprédateurs dans les

Tableau 2.11b Corrélations de Pearson utilisées pour déterminer une éventuelle bioamplification des PCBs dans le réseau trophique de l'étang de Vaccarès

δ^{15}**N** *vs*			
Ensemble du réseau (N=223)	r	p	
∑PCB	-0,198	0,003	
Congénère 8	-0,239	0,0003	
Congénère 28+31	-0,209	0,002	
Congénère 177	-0,158	0,019	
∑tri-CB	-0,273	<0,0001	
∑penta+hexa-CB	-0,141	0,035	
∑PCB²	-0,522	0,0002	mai
Congénère 8	-0,409	0,005	mai
Congénère 18	-0,499	0,0004	mai
Congénère 51+53	-0,467	0,001	mai
Congénère 44	-0,340	0,021	mai
Congénère 70	-0,437	0,002	mai
Congénère 177	-0,440	0,002	mai
∑di-CB	-0,409	0,005	mai
∑tri-CB	-0,631	<0,0001	mai
∑penta+hexa-CB	-0,425	0,0033	mai
Congénère 52	-0,382	0,0091	mars
Congénère 101	+0,447	0,0018	mars
Congénère 8	-0,313	0,028	avril
∑PCB	-0,280	0,005	classe ++/+
∑tri-CB	-0,360	<0,0001	classe ++/+
∑tétra-CB	-0,301	0,0021	classe ++/+
∑heptaCB	-0,199	0,021	chez les organismes benthiques
Réseau excepté cardiums et muges (N=190)			
Congénère 8	-0,174	0,017	
∑tri-CB	-0,167	0,021	
∑hepta-CB	-0,150	0,040	
Congénère 8	-0,306	0,046	avril
Congénère 101	+0,479	0,002	mars
Congénère 18	-0,614	0,0001	sept
∑PCB	-0,465	0,003	mai
Congénère 51+53	-0,339	0,034	mai
Congénère 44	-0,505	0,0009	mai
Congénère 177	-0,363	0,003	mai
∑tri-CB	-0,543	0,003	mai
∑penta+hexaCB	-0,432	0,006	mai
Chaîne trophique gammare-athérine-anguille			
Congénère 8	-0,455	0,004	
Congénère 52	-0,435	0,004	
∑PCB	-0,312	0,032	
∑tri-CB	-0,402	0,005	
∑hepta-CB	-0,305	0,005	

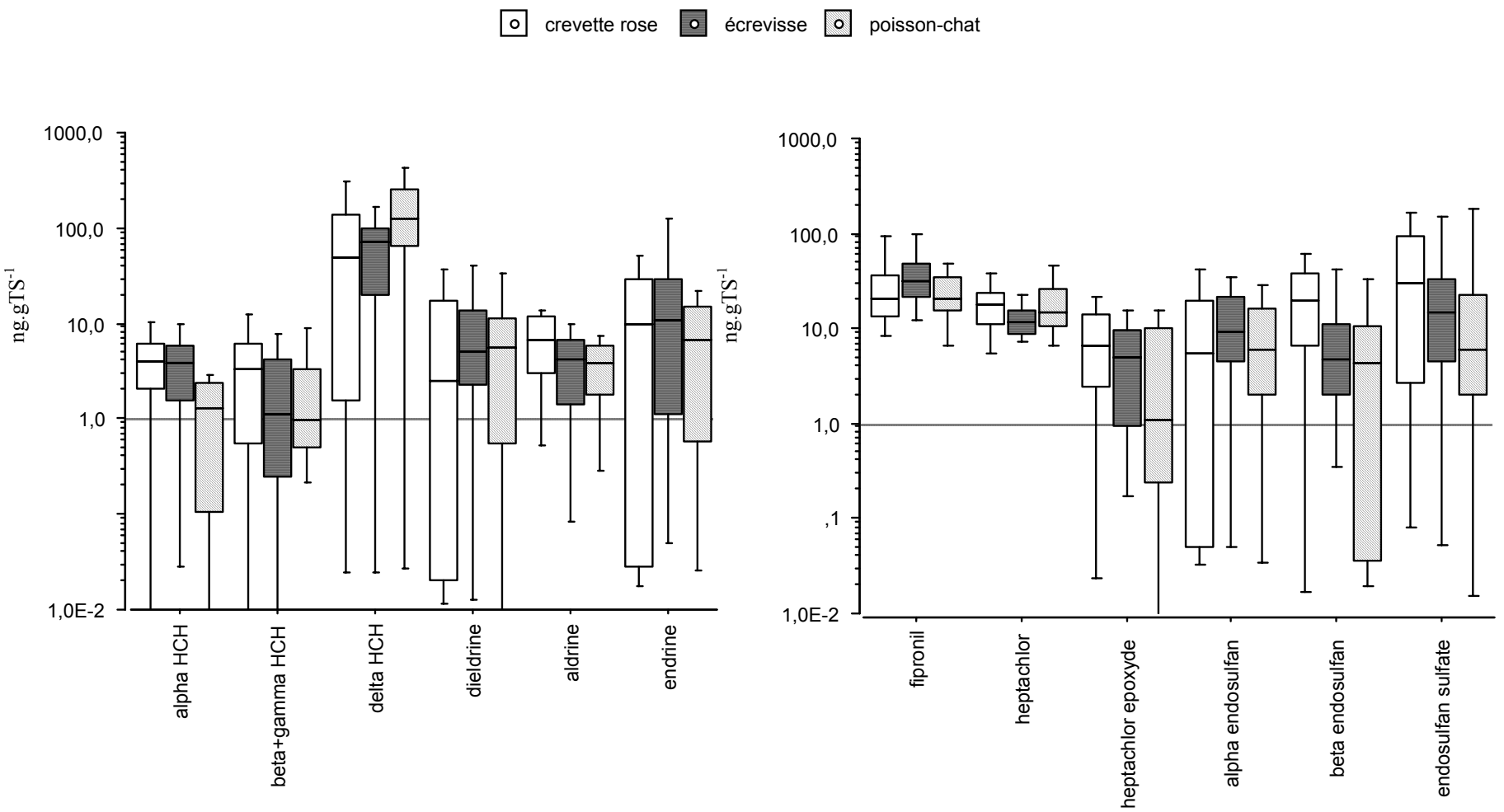


Figure 2.15 Imprégnation tissulaire par les pesticides OCs chez le biota collecté dans les canaux de drainage (n=38, 18, 12 pour crevette rose, écrevisse et poisson-chat, respectivement)

écosystèmes analysés et ont des signatures isotopiques en azote ($\delta^{15}N$) très proches (12,8±0,3‰ chez les anguilles et 12,8 ±0,5‰ chez les poissons chats). Cependant leur morphologie est très différente comme leur richesse en graisses, leur taille et leur $\delta^{13}C$ (Tableau 2.13). Les anguilles sont manifestement plus imprégnées par certains pesticides, de manière plus significative pour l'aldrine et l'α HCH. Seul le δHCH est plus abondant chez les poissons-chats.

L'analyse de corrélations entre les divers paramètres biotiques montrent l'existence d'une corrélation positive entre la taille et les concentrations en lindane ainsi que pour le δ HCH, négative pour l'α HCH et positives entre le $\delta^{13}C$ et l'aldrine et l'α HCH. Aucune corrélation n'a été décelée entre les teneurs lipidiques et les niveaux de contamination.

Tableau 2.12 –2.13 Variations remarquables entre les crevettes roses et les superprédateurs des canaux et du Vaccarès (*p<0,05)

	Crevette rose Vaccarès (22)	**Crevette rose Canaux (38)**
αHCH (ng.gTS^{-1})	8,64±2,31	7,45±3,26
β+γHCH (ng.gTS^{-1})	19,9± 14,4	13,6± 8,56
δHCH (ng.gTS^{-1})	334±306	185±84,3
Dieldrine (ng.gTS^{-1})	19,4±6,17	16,0±5,40
Aldrine (ng.gTS^{-1})	43,0±23,1*	8,71±1,62
Endrine (ng.gTS^{-1})	37,6±15,2	19,7±4,92
Fipronil (ng.gTS^{-1})	*35,6±13,6*	*47, 8±14,1*
Heptachlor (ng.gTS^{-1})	90,0±36,5*	21,7±3,02
Heptachlor-epoxyde (ng.gTS^{-1})	24,1±12,4	9,37±1,66
α endosulfan (ng.gTS^{-1})	38,1±16,4	14,4±3,31
β endosulfan (ng.gTS^{-1})	78,9±32,6*	26,9±4,98
Endosulfan-sulfate (ng.gTS^{-1})	74,8±23,6	63,4±22,9
LT (mg.gTS^{-1})	86,5±5,76	122±6,15*
δ^{13}C (‰)	-21,7±0,7*	-23,4±0,38
δ^{15}N (‰)	9,93±0,14	11,7± 0,16*

	Anguilles jaunes Vaccarès (15)	**Poissons chats Canaux (12)**
α HCH (ng.gTS^{-1})	31,1±14,7	1,26±0,33
δ HCH (ng.gTS^{-1})	29,3±20,5	186,±53,3
Aldrine (ng.gTS^{-1})	55,2±27,7	3,99±0,82
LT (mg.gTS^{-1})	258±52,5	49,6±5,21
Taille (cm)	44,7±1,97	198±9,27
δ^{13}C (‰)	-17,7±1,24	-26,7±0,41

II.4. DISCUSSION

Le processus de bioamplification des polluants organiques persistants au sein d'un réseau trophique est le transfert de la contamination par le biais de la chaîne alimentaire. Il consiste en une augmentation de l'imprégnation chez le prédateur par rapport à sa proie. Cependant pour mettre en évidence un tel phénomène l'expérimentateur se heurte à un certain nombre de difficultés inhérentes à la morphométrie et à la physiologie des organismes (Ruus *et al*.,2002; Fisk *et al*.,2003; Borga *et al*.,2001a). En théorie, la concentration en micropolluants devrait être déterminée sur la totalité de la masse corporelle. En pratique, lorsque l'on s'intéresse à des organismes de grande taille, les analyses sont réalisées sur des échantillons de muscle; quand la taille le permet c'est l'individu entier qui fait l'objet de l'étude; dans les autres cas, l'extraction est effectuée sur des «pools» d'individus aussi homogènes que possible. Cette diversité de traitement pourrait altérer la conformité des résultats, en raison des divergences tissulaires dans les capacités métaboliques et la qualité des lipides, comme celles entre le foie et le muscle (Roche *et al*.,2002a ;2002b, Roche *et al*., 2000). Cependant, dans notre étude, les espèces situées au sommet du réseau trophique (poissons prédateurs et superprédateurs) ont des rapports hépatosomatiques voisin de 1 ce qui amoindrit l'erreur que pourrait engendrer une analyse exclusivement musculaire. D'autre part l'influence de la charge lipidique tissulaire est réduite grâce à l'expression du taux de contamination par rapport au tissu sec.

II.4.1 Contamination par les pesticides OCs du réseau trophique de l'étang de Vaccarès

Parmi les nombreux pesticides analysés, ceux qui sont actuellement utilisés, bien que de manière strictement contrôlée, le diuron, l'α endosulfan et l'heptachlor présentent les concentrations les plus élevées chez les organismes du Vaccarès.

Le diuron est un herbicide utilisé dans la Vallée du Rhône. Il est, entre autres, dispersé par voie aérienne pour le traitement des zones viticoles et des nombreuses exploitations fruitières. Il atteint donc l'étang de Vaccarès par voie atmosphérique mais aussi par les canaux d'irrigation des rizières dont l'eau est captée directement dans le Rhône. Son apport est donc très important. La substance active de l'endosulfan (son isomère alpha) est plus concentrée dans l'ensemble du réseau que son isomère, le β endosulfan, et que l'endosulfan sulfate une

de ses formes hydrolysées. Cette disparité s'explique par l'origine de ce contaminant (le rapport des stéréoisomères dans la substance commercialisée), mais aussi par la biodisponibilité supérieure de l'α endosulfan dans la colonne d'eau. En effet, en étudiant le comportement de l'α endosulfan et ses métabolites dans les écosystèmes aquatiques, Peterson et Bately (1993) ont montré que l'α endosulfan étant plus hydrosoluble (0,32 mg par litre d'eau), a un temps de rétention plus long dans un écosystème aquatique, ce qui facilite son incorporation dans les réseau trophiques. Perez Ruzafa *et al*. (2000) ont suggéré que celle-ci s'amorce par les herbivores et les détritivores. L'heptachlor et son principal produit de dégradation par époxydation, l'heptachlor-epoxyde sont concentrés chez les détritivores et les filtreurs qui sont capables d'accumuler dans leurs tissus de grandes quantités de ces pesticides à partir de l'eau, des sédiments et à travers l'alimentation (Perez-Ruzafa *et al*., 2000). Par ailleurs, le fipronil (dont les produits commercialisés, «Le Régent», par exemple, est en cours d'interdiction) est présent en concentrations relativement faibles en raison de sa rapide dégradation biotique et abiotique. Cependant, son métabolite principal, la fipronil sulfone, est beaucoup plus persistant et plus toxique, en effet il s'agit d'une bioactivation et les éventuels hauts niveaux de ce composé pourraient affecter la santé des organismes (Beeler *et al*., 2001).

En ce qui concerne les pesticides interdits, l'HCB, le *pp*'-DDE et le chlordane sont présents en concentrations faibles. Ils sont prétendus inutilisés dans la zone qui nous intéresse. Il en est de même pour le lindane, abondamment utilisé en riziculture camarguaise avant 1998, dont les niveaux chez les organismes du Vaccarès continuent à diminuer depuis son interdiction (Roche *et al*., 2002a). Les hautes teneurs de son isomère, le δHCH, indiquent sa plus grande persistance dans l'écosystème considéré. En revanche, les concentrations en dieldrine et en aldrine sont relativement élevées ce qui suggère une nouvelle utilisation incontrôlable de l'aldrine pour la protection des semences et le traitement des bois de charpente.

II.4.1.1 Bioaccumulation des pesticides OCs dans les maillons du réseau trophique du Vaccarès

Tous les pesticides ont été détectés chez toutes les espèces, à une exception prés, l'α chlordane. Cette substance a été décelée à l'état de traces uniquement chez les épinoches et les anguilles jaunes. L'absence de ce pesticide dans le reste du biota est potentiellement dû à l'efficacité de sa dégradation dans les sédiments (1/2 vie de 2 ans environ) et plus certainement, parce que son utilisation, alors minime dans l'aire camarguaise, a été

complètement interdite en 1972.

Les pesticides en cours d'utilisation sont, en toute logique, les plus concentrés dans les tissus des espèces examinées, c'est le cas notamment du diuron à tous les niveaux du réseau trophique. Comme le diuron est facilement dégradé dans le milieu naturel et métabolisé chez les organismes, il semble que ses teneurs très élevées révèlent les fortes concentrations de ce pesticide déversées lors des traitements agricoles. Alors que le diuron est peu toxique pour les invertébrés aquatiques, son principal produit de biodégradation, le 3,4 dichloroaniline est très toxique pour les animaux aquatiques (CL_{50}(28 jours)=6,8mg/l chez *Dario rerio*). De plus, des concentrations élevées de diuron peuvent être nuisibles pour les oiseaux aquatiques si cet herbicide pouvait être bioamplifié et atteindre les niveaux trophiques supérieurs (Giacomazzi et Cochet, 2004). Dans le réseau trophique du Vaccarès, les espèces bioaccumulant le plus activement le diuron sont les athérines et les épinoches. Puisque l'un des apports du diuron est en partie atmosphérique, l'équilibre de répartition de ce micropolluant relativement peu hydrophobe s'instaure d'abord entre l'air et la colonne d'eau impliquant une exposition préférentielle des espèces pélagiques plutôt que les espèces benthiques.

Les teneurs tissulaires en pesticides prohibés les plus élevées ont été observées chez les anguilles jaunes, les muges et les cardiums. Les anguilles jaunes sont des espèces traditionnelles de l'écosystème du Vaccarès qui présentent une grande sédentarité (Buet, 2002). Leur forte imprégnation tissulaire par les pesticides les plus persistants est liée à différents facteurs comme : -la durée d'exposition, elle-même reliée à l'âge (Borga *et al*., meps), -un faible taux d'élimination en raison d'une moindre efficacité du transfert à travers les branchies et -un temps de circulation des contaminants prolongé (Olsson *et al*., 2000). Enfin, chez les superprédateurs, les concentrations élevées en micropolluants lipophiles peuvent être imputées d'une part à la taille des individus et à l'accroissement des charges lipidiques (Leblanc, 1995), et d'autre part, au transfert alimentaire (Ruus *et al*., 2002 ; Kidd *et al*., 2001) indépendant de la taille et des teneurs en lipides.

Chez le muge, les niveaux élevés en aldrine accréditent les suggestions de Perez Ruzafa (2000) qui soulignent l'importance des macrophytes dans l'accumulation des OCs persistants comme source principale de contamination chez les herbivores.

Les capacités de bioaccumulation des micropolluants lipophiles mais moins hydrophobes (fipronil) chez les cardiums dépendent de leur mode d'alimentation particulier. En tant que filtreurs, ces organismes sont très sensibles à la présence de micropolluants dans le milieu, y compris la fraction dissoute dans l'eau (Perez Ruzafa, 2000) et celle liée aux sédiments ou aux particules organiques (Voie *et al*., 2002).

Parmi les espèces moins touchées par une contamination par les OCs figurent la crevette grise et le syngnathe. Les crustacés sont, d'une manière générale, caractérisés par une grande efficacité de leurs systèmes d'élimination, soit par diffusion à travers leurs téguments, soit par métabolisation des POP comme les PCBs (Gonzales Sagrado, 2004). D'autre part chez les syngnathes c'est la forme de corps qui semble être adapté pour une élimination efficace. Randell *et al*. (1998) estiment, en effet, que l'aspect longiforme offre un rapport Surface/Volume optimum pour que se mette en place un échange rapide des micropolluants entre le milieu interne et externe.

II.4.1.2 Différences de bioaccumulation liées aux niveaux trophiques des organismes

Certains auteurs estiment qu'aux niveaux trophiques (NT) inférieurs le profil de contamination dépend de la bioconcentration (transfert eau-organismes). Celle-ci est dépendante de l'hydrosolubilité des composés et des charges lipidiques des organismes (plus les contaminants sont hydrophiles, plus ils sont disponibles pour une bioconcentration à partir de l'eau). D'autre part, aux NT supérieurs, les facteurs qui déterminent le niveau général de la contamination sont la lipophilicité et la persistance des composés, ainsi que l'activité métabolique et l'accroissement de l'apport alimentaire (Kidd *et al*., 1998b; Fisk *et al*., 2001; Ruus *et al*., 2002 ; Borga *et al*., 2001a).

L'analyse de la répartition des pesticides majeurs dans le biota du Vaccarès a mis en évidence une différence de gradation dans les capacités d'accumulation en fonction des emplacements trophiques. On relève ainsi les ordres suivants: -pour les cardiums: diuron >fipronil >lindane >dieldrine; -pour les crevettes grises: diuron >dieldrine >fipronil> lindane; -pour les athérines: diuron >dieldrine> lindane ≈fipronil; -pour les anguilles jaunes: diuron >dieldrine> lindane >fipronil. Ces différences d'accumulation sont liées à la biodisponibilité des molécules déterminées par le type d'exposition (molécules constamment introduites dans l'écosystème ou molécules persistantes), par les caractéristiques physicochimiques des molécules (K_{ow} diuron =2,7, K_{ow} lindane=3, K_{ow} fipronil=4 ; K_{ow} dieldrine=6), mais aussi par les capacités de métabolisation ou l'élimination directe des molécules.

Parmi les deux molécules utilisées à proximité, le diuron est le plus présent chez les organismes. Cette molécule dont la 1/2 vie est relativement courte, est rapidement intégrée dans les réseaux trophiques aquatiques. Son hydrosolubilité augmente la fraction présente dans l'eau et ainsi, accroît sa disponibilité pour une bioconcentration directe à partir de l'eau notamment chez les filtreurs et les organismes de petite taille. Ces derniers, qui ont des rapports surfaces respiratoires/poids corporel supérieurs, peuvent bioaccumuler plus

efficacement. D'autre part, le fait que la proportion d'organismes très contaminés augmente en remontant la chaîne trophique des cardiums aux anguilles jaunes, indique une diminution de la capacité d'élimination du diuron par diffusion directe vers le milieu environnant.
Chez les cardiums, il semble que c'est effectivement le caractère hydrophile des molécules qui détermine leur niveau d'accumulation, alors qu'aux échelons trophiques supérieurs, excepté le diuron, c'est la lipophilicité des molécules qui influence le niveau d'imprégnation tissulaire. Chez les athérines et les anguilles jaunes, la moindre accumulation du fipronil suggère une dégradation plus efficace de ce xénobiotique, corroboré par un plus faible pourcentage d'individus très contaminés. La dégradation du fipronil peut être biotique et abiotique (Beeler *et al*., 2001). Puisque les cardiums, susceptibles de refléter la proportion de micropolluants présents dans le milieu, manifestent une forte imprégnation par le fipronil et un pourcentage élevé d'individus très contaminés, on peut évoquer la prédominance d'un processus de métabolisation et de biotransformation par rapport à une dégradation abiotique.

Un premier aperçu de l'importance du transfert trophique des contaminants est fourni par l'analyse du profil de bioaccumulation dans les différentes guildes trophiques. Fisk *et al*. (2001b) rapportent que pour les composés dont le coefficient de partage octanol-eau $\log K_{ow}$ est supérieur à 4-5, l'importance du transfert alimentaire aux niveaux trophiques supérieurs conduit à une bioamplification dans le réseau trophique. Or, nos résultats concernant 4 pesticides, dont le logKow est supérieur ou égal à 4, révèlent une seule bioamplification celle de la dieldrine, la substance la plus persistante. Pour les autres composés, notamment le fipronil et l'heptachlor les concentrations diminuant vers les NT supérieurs suggèrent d'autres voies de contamination liées à la biologie et à l'écologie des espèces concernées.
En définitive, nos résultats montrent l'importance des facteurs influençant l'accumulation des pesticides dans le réseau trophique étudié: la durée et la source de contamination, les caractéristiques physico-chimiques de la molécule, la biologie et l'écologie des espèces.

II.4.1.3 Profils des variations temporelles de la bioaccumulation des pesticides OC dans le réseau trophique du Vaccarès

Une tendance à la diminution du niveau de la majorité des micropolluants, qu'ils soient autorisés ou interdits, a été observée entre septembre 2001 et septembre 2002. Cette tendance est en accord avec une diminution générale de contamination par les POPs observée ces dernières années dans la plupart des écosystèmes (Fromberg *et al*., 2003; Buet, 2002) en raison de l'efficacité des réglementations sur l'utilisation des pesticides OCs.

Par contre la tendance vers une imprégnation tissulaire plus importante en 2002 par rapport au 2001 a été mise en évidence de manière significative pour la dieldrine chez les anguilles jaunes. Ces résultats pourraient confirmer l'utilisation, en Camargue, de semences de riz prétraitées par l'aldrine et la dieldrine pour leur conservation, commercialisés par des pays dont les réglementations sont plus souples. Cette hypothèse est confortée par une augmentation de la concentration en aldrine au mois de mars qui correspond à la période d'ensemencement des rizières. Les teneurs maximales en dieldrine, mesurées en septembre peuvent s'expliquer par le temps nécessaire à l'époxydation abiotique de l'aldrine en dieldrine - dans les sols, la re-suspension des sédiments libère ensuite une fraction de dieldrine disponible pour la bioaccumulation - et biotique, le principal métabolite de l'aldrine dans l'organisme étant la dielrine.

D'une manière générale, l'imprégnation des espèces les plus stables dans le Vaccarès est peu affectée par la saison de capture. Cependant, *C. glaucum* représente l'espèce dont la contamination par le diuron, l'α endosulfan, l'heptachlor et les pesticides interdits (la dieldrine, l'aldrine, le lindane) varie de manière significative en fonction de la saison. Il est probable que ces variations sont le reflet de la présence des pesticides dissous dans l'eau (Perez Ruzafa *et al*., 2000) et ce filtreur peut donc être considéré comme étant une bonne espèce sentinelle pour la biosurveillance de la RNC, au même titre que les moules dans les programmes littoraux du RNO (Réseau National d'Observation) du Ministère chargé de l'environnement.

Chez les autres espèces, malgré l'absence d'une stricte significativité statistique, nos résultats ont mis en évidence un optimum pour les pesticides utilisées (fipronil, diuron) en mai, en conformité avec la période de traitement des rizières environnantes (Tourenq *et al*., 2001). Ces observations corroborent l'importance du transfert direct des contaminants à partir de l'eau à travers les surfaces d'échange tégumentaires.

Néanmoins, des différences interspécifiques existent. Chez les épinoches, tous les pesticides sont plus abondants au mois de septembre. Poizat *et al*. (2002), ainsi que Poizat et Crivelli (1997), ont décrit le cycle migratoire de cette espèce dans les écosystèmes aquatiques du Vaccarès, en mettant à jour la migration des adultes vers les canaux en hiver et l'entrée des juvéniles dans l'étang de Vaccarès au printemps. Puisque la taille des individus n'a pas changé de manière significative entre les saisons de capture, la population capturée en mars pourrait être qualifiée d'«immigrée» et la population capturée en septembre de «sédentaire». Selon Ridal *et al*. (2001), les écosystèmes aquatiques peu profonds et riches en nutriments, comme les canaux de drainage camarguais, impliquent de bas niveaux de contamination des

poissons en raison d'une biodisponibilité réduite. En conséquence, les poissons des canaux sont moins contaminés que les organismes de l'étang et la diminution de l'imprégnation en mars et mai par rapport à septembre pourrait être liée à un effet migratoire ou phénomène d'évitement.

Puisque le niveau de contamination dépend, entre autres, des capacités métaboliques des organismes, les variations saisonnières de l'activité métabolique pourraient affecter l'imprégnation tissulaire en OCs. Cette hypothèse ne semble pas être confirmée par les variations temporelles de la contamination par l'heptachlor et son métabolite principal et par l'α endosulfan et son métabolite principal chez les athérines. Les concentrations d'heptachlor augmentent de mars à septembre, alors que les concentrations en heptachlor-epoxyde restent stables. Les niveaux de l'α endosulfan et de son métabolite augmentent parallèlement de mars à septembre.

II.4.1.4 Importance de la niche écologique et de la source de contamination dans la bioaccumulation des pesticides OCs

L'analyse de la répartition des pesticides types, le diuron, le fipronil, l'aldrine et la dieldrine, chez les cardiums, les athérines, les gobies et les crevettes grises a révélé la valeur de la niche écologique en tant que facteur influençant la bioaccumulation des xénobiotiques dans l'écosystème étudié. Le diuron est probablement transféré dans le Vaccarès à la fois par voie atmosphérique et par les canaux d'irrigation des rizières, alors que le fipronil y arrive *via* les canaux de drainage. Il est probable que ces deux voies de propagation affectent de manière différente les populations pélagiques et benthiques. En effet, lors des traitements agricoles, en mai, les concentrations en diuron et fipronil sont plus importantes chez les espèces analysées avec, cependant, une nette prévalence du fipronil par rapport au diuron chez les gobies (espèce benthique) contrairement aux autres espèces, notamment les athérines (espèce préférentiellement pélagique). En septembre la fraction de diuron diminue chez les athérines, éliminé probablement par voie directe, et le fipronil y est présent de manière plus prononcée alors que, chez les gobies, le pourcentage de diuron augmente et le pourcentage de fipronil diminue de manière significative puisque il est probablement en partie métabolisé ou éliminé.

II.4.1.5 Influence des facteurs biologiques

De nombreuses études soulignent l'importance des paramètres biologiques tels que les teneurs lipidiques, ou l'allométrie, dans la contamination du biota aquatique par les POPs (Randall *et al*., 1998; Dufour *et al*., 2001; Roche *et al*., 2001a; Fisk *et al*., 2001a).

Dans notre étude, les analyses de corrélations entre les paramètres biologiques et l'imprégnation tissulaire donnent des réponses très hétérogènes selon l'espèce et les pesticides examinés. Le fait le plus marquant est l'absence de corrélation positive entre la teneur en lipides et celle en pesticides, exception faite des cardiums (pour la plupart des pesticides), des athérines (pour le *pp*'-DDE, l'α endosulfan et l'aldrine) et les épinoches (pour le α endosulfan). Puisque chez les espèces concernées, la charge lipidique est plus élevée en mars, ce facteur biologique ne semble pas expliquer les variations temporelles en termes de contamination par les OCs.

D'autre part, de nombreuses corrélations significatives avec les PL confirment la tendance à une bioaccumulation dans les lipides de structure (Roche *et al*., 2002a; Roche *et al*., 2002b) qui sont, cependant, spécifiques à chaque espèce et chaque pesticide analysés. Néanmoins, d'une manière générale, l'augmentation de la concentration en PL au mois de mai (Chapitre III) pourrait en partie expliquer l'augmentation des concentrations en pesticides à cette période, au moins en ce qui concerne les espèces de poissons examinées.

Les corrélations entre les teneurs en pesticides et la taille des organismes sont fréquentes chez les épinoches et les anguilles jaunes. Chez les épinoches, il s'agit des corrélations négatives indiquant une diminution de contamination quand la taille augmente, explicable pour partie par une diminution de l'efficacité de l'élimination à travers les surfaces corporelles d'échanges. D'autre part, chez cette espèce, la taille est liée au sexe des organismes, les femelles sont significativement plus grandes que les mâles (4,68±0,3cm et 3,34±0,2cm, respectivement) et, même si aucune différence significative n'a pas été trouvée entre les niveaux de contamination des femelles et des mâles, la métabolisation des OCs pourrait être plus efficace chez les femelles. De plus, les surfaces tégumentaires plus étendues chez les femelles pourraient augmenter non seulement l'imprégnation par les OCs, mais également leur élimination (Burreau *et al*., 2004; Randall *et al*., 1998). Contrairement aux épinoches, chez les anguilles jaunes les corrélations sont positives, chez ces anguilles pré-matures, les plus grandes sont les plus contaminées car elles sont également les plus âgées, en conséquence soumises à une exposition chronique pendant une longue durée (plusieurs années).

II.4.1.6 Transfert des contaminants dans l'écosystème de l'étang de Vaccarès - l'importance relative de la bioconcentration et du transfert trophique

La bioaccumulation des micropolluants OCs chez les organismes aquatiques est directe à partir de l'eau et des sédiments ou/et par la voie alimentaire (Jobbling, 1995). L'importance de l'alimentation en tant que source de contamination par les POPs en général, et les OCs en particulier, chez les organismes aquatiques, notamment chez les poissons, est difficile à évaluer. Certains auteurs estiment que l'apport trophique des contaminants chez les poissons est insignifiant par rapport à la bioconcentration à travers les branchies (Randall, 1998; LeBlanc, 1995). D'autres chercheurs, utilisant le rapport isotopique de l'azote pour définir le niveau trophique des organismes afin d'analyser le transfert alimentaire des POPs, estiment que celui-ci se manifeste principalement aux niveaux trophiques supérieurs mais qu'il dépend de la lipophilicité et de la persistance du contaminant (Fisk, 2001; Ruus, 2002; Burreau *et al*., 2004; Olsson *et al*., 2000).

Dans cette étude, l'analyse des corrélations entre le $\delta^{15}N$ et les niveaux d'imprégnation ont démontré: 1) une bioamplification de la dieldrine, de l'α, β endosulfan et endosulfan sulfate, en fonction, entre autres, de l'intensité de l'imprégnation tissulaire; 2) une importance accrue du transfert trophique des pesticides analysés dans la période précédant les traitements agricoles chez les organismes moyennement contaminés; 3) une bioaccumulation directe à partir de l'eau dans le cas du diuron; 4) l'absence de relation entre les niveaux trophiques et l'incorporation des micropolluants dans la bicouche phosholipidique.

Le comportement du diuron et de la dieldrine dans le réseau trophique de l'étang de Vaccarès accrédite l'hypothèse de la lipophilicité et de la persistance des molécules en tant que facteurs déterminant du transfert trophique, en regard à la bioaccumulation directe au travers des téguments. En revanche, la bioamplification des molécules relativement peu lipophiles, facilement dégradables et continuellement introduites dans l'écosystème, comme l'endosulfan et son métabolite principal, est liée à une rétention à la base du réseau trophique (phyto et zooplancton, macrophytes). En conséquence, leur biodisponibilité pour une accumulation directe diminue et la potentialité de leur transfert trophique augmente. C'est la raison pour laquelle une bioamplification est révélée uniquement à la période précédant les traitements. En effet, en accord avec Ridal *et al*. (2001), il est probable qu'au moment des traitements phytosanitaires le déversement des micropolluants dans le milieu favorise la voie directe d'accumulation de l'α endosulfan et de l'endosulfan sulfate et masque ainsi la reconnaissance d'une bioamplification. Puisque la bioconcentration est plus efficace à la base

du réseau trophique, l'accumulation de ce pesticide dans le phytoplancton et le zooplancton est le point de départ de son incorporation dans les chaînes alimentaires, surtout au niveau des chaînes pélagiques (en effet les organismes pélagiques sont plus contaminés que les organismes benthiques). Au cours du temps, sans un apport supplémentaire du micropolluant et avec une diminution de la biomasse planctonique, l'importance relative du transfert trophique augmente et l'on observe une augmentation de la contamination aux niveaux trophiques supérieurs due au phénomène de bioamplification.

La différence de comportement de l'α endosulfan par rapport au diuron dans le réseau trophique de l'étang de Vaccarès peut difficilement être attribué à la lipophilicité des molécules, leurs K_{ow} étant inférieurs à 4. Elle est plus probablement imputable à la persistance ou dégradation de ces polluants et à leur rémanence. Une différence entre ces deux molécules est leur incorporation dans la fraction phospholipidique tissulaire. Dans le cas du diuron, elle augmente avec le niveau trophique, contrairement à l'α endosulfan et aux autres molécules susceptibles d'être bioamplifiées (le β endosulfan et la dieldrine). Ces résultats suggèrent l'implication d'un processus chimique à la base du phénomène de bioamplification. En effet, quand un organisme est consommé par un autre la dégradation chimique des xénobiotiques lipophiles est accélérée (Gobas *et al*., 1999), elle concerne en premier lieu la fraction de contaminants solubilisée dans les lipides de réserve (Larsson *et al*., 2000).

L'analyse des corrélations entre le $\delta^{13}C$ et les niveaux de contamination ont mis en évidence 1) une contamination supérieure des organismes pélagiques, 2) une bioamplification de l'HCB chez les organismes benthiques.

Le fait que les organismes pélagiques soient plus exposés à une contamination par la plupart des pesticides présents dans la colonne d'eau est déterminé par une plus grande biodisponibilité qui facilite à la fois une bioconcentration et, à plus long terme, un transfert trophique. De plus, selon Kidd *et al*. (2001), contrairement aux producteurs pélagiques, les producteurs à la base des chaînes alimentaires benthiques ont un turn-over du carbone plus rapide et un taux de croissance accéléré ce qui conduit à une «biodilution» des polluants et, en conséquence, réduit l'exposition aux pesticides des consommateurs benthiques.

D'autre part, la bioamplification de l'HCB chez les organismes benthiques montre l'importance de l'origine du micropolluant. L'HCB est un fongicide très lipophile, très persistant et pourvu d'une grande rémanence. Inutilisé depuis de longues années, il est présent dans la couche sédimentaire et est surtout transféré par la voie alimentaire dans les chaînes

benthiques ou il se bioamplifie par transfert trophique.

Toutefois, certaines considérations doivent être prises en compte dans l'interprétation de l'intensité relative du transfert trophique dans les écosystèmes aquatiques basée sur la méthode des isotopes stables. Elles concernent les taux de changement des deux paramètres, le niveau de contamination et le rapport isotopique. Selon Fisk *et al*. (2003) le rapport entre le niveau de contamination et le $\delta^{15}N$ change d'un niveau trophique à l'autre uniquement quand l'élimination du contaminant est plus lente que le turn-over du $\delta^{15}N$. Au contraire, quand l'élimination du xenobiotique est plus rapide ou égale à l'évolution de $\delta^{15}N$, le rapport « niveau de contamination/$\delta^{15}N$ » est maintenu le long la chaîne alimentaire en limitant la révèlation experimentale des transferts trophiques et du phénomène de bioamplification. Cette problématique affecte surtout les niveaux trophiques inférieurs, notamment producteurs et consommateurs primaires de petite taille (phyto et zooplancton) chez lesquels la rapidité des processus d'élimination (excrétion et respiration) et les variations spatio-temporelles des rapports isotopiques peuvent masquer l'intensité du transfert trophique du contaminant. Néanmoins, ce «bruit de fond» à la base de réseaux trophique peut être minimisé si les données sont suffisamment nombreuses et concernent 3 ou plus niveaux trophiques (Fisk *et al*., 2003).

D'autre part, les brusques variations du niveau de contamination, liées à la rapidité de dégradation pourraient masquer l'importance du transfert trophique des molécules les moins lipophiles ou les plus facilement dégradables (diuron, fipronil). Cependant, la bioamplification de l'α endosulfan et de son métabolite principal montrent la puissance de la méthode des isotopes stables pour étudier le transfert trophique des POPs, même dans le cas de molécules relativement peu lipophiles (Kow≈3.55)

II.4.2 Comparaison de la contamination par les pesticides OCs des écosystèmes aquatiques camarguais

Les deux écosystèmes camarguais qui ont fait l'objet de cette étude différent en termes de biodiversité et de densité de populations animales et végétales, volume et équilibre hydrique et richesse en nutriments. Les canaux de drainage sont caractérisés par une forte variabilité hydrique due aux conditions climatiques (température, évaporation) et aux activités humaines (les rizières sont en eau d'avril à août). Ils sont riches en nutriments (P, N) provenant des marais salants et des zones agricoles et hébergent différentes espèces végétales,

de nombreux invertébrés et des poissons préférentiellement dulçaquicoles (Poizat et Crivelli, 1997). Des études récentes ont montré que l'état trophique des écosystèmes aquatiques influence les caractéristiques biologiques des organismes ainsi que la biodisponibilité et la mobilité des contaminants OCs (Skei *et al*., 2000 ; Larsson *et al*., 2000; Ridal *et al*., 2001; Berglund *et al*., 2001). D'une manière générale, les niveaux plus bas de contamination observés chez les organismes provenant des milieux riches en nutriments, s'expliquent par l'augmentation de la biomasse à la base du réseau trophique entraînée par un apport accru de nutriments. Les conséquences de cette augmentation sont -d'une part une diminution des niveaux de contamination chez les producteurs et les consommateurs primaires, due à un phénomène de «biodilution» général et induite par un fort taux de croissance (Larsson *et al*., 2000), et -d'autre part une diminution de la biodisponibilité des contaminants par l'augmentation du taux de sédimentation de la matière organique qui retient les contaminants aux niveaux des sédiments en les rendant, de ce fait, moins disponibles pour les organismes (Ridal *et al*., 2001). Une autre explication est basée sur le fait que, contrairement aux consommateurs, la charge lipidique du phytoplancton diminue avec l'apport de nutriments ce qui implique une réduction de la bioaccumulation des contaminants (Berglund *et al*., 2001).

Une bioaccumulation inférieure (significative pour l'aldrine, l'heptachlor et le βendosulfan) chez les organismes provenant des canaux de drainage, notamment chez les crevettes roses, corrobore l'hypothèse d'une réduction de la biodisponibilité dans les écosystèmes peu profonds et très productifs. Les crevettes provenant des canaux sont significativement plus riches en lipides que celles de l'étang de Vaccarès et ont des $\delta^{15}N$ supérieurs, indépendamment de la taille et du poids, probablement en raison de la richesse en nutriments. Mais une biodisponibilité réduite semble jouer un rôle primordial dans l'amplitude de la contamination de ces organismes.

D'autre part, l'imprégnation des superprédateurs, généralement supérieure dans le Vaccarès, à l'exception d'un isomère du lindane (le δHCH), dépend de l'importance du transfert trophique augmenté dans les écosystèmes plus pauvres en nutriments (Larsson *et al*., 2000), mais est également liée à la taille des organismes et à la niche écologique. Ces réflexions sont cependant hypothétiques puisque les deux espèces de poisson au sommet des réseaux trophiques diffèrent en de nombreuses caractéristiques physiologiques et biologiques.

II.4.3 Contamination par les PCBs du réseau trophique de l'étang de Vaccarès

L'omniprésence des PCBs dans les écosystèmes aquatiques a été largement démontrée par les nombreuses études menées dans les biotopes les plus variées, allant des zones océaniques (Hargrave *et al*., 1992), marines (Fisk *et al*., 2001), fluviales (Cho *et al*., 2004), lacustres (Berglund *et al*., 2001) et lagunaires (Roche *et al*., 2002).
Les précédents travaux de notre équipe ont mis en évidence une imprégnation par les PCBs de trois espèces de poisson (*A. anguilla*, *Carassius carassius* et *Ictalurus nebulosus*) de l'étang de Vaccarès (Roche *et al*., 2002; Buet *et al*., 2001).

II.4.3.1 Niveaux de contamination par les PCBs des invertébrés et des poissons de l'étang de Vaccarès

Les PCBs les plus concentrés chez les organismes du Vaccarès sont les tri-CB et tétra-CB par opposition aux di-CB et hepta-CB. Ces différences d'accumulation peuvent s'expliquer par la répartition des différents types de PCBs qui s'instaure entre les divers compartiments des écosystèmes aquatiques: l'eau, les particules organiques en suspension ou liées aux sédiments et le biota. L'accumulation des PCBs chez les organismes dépend de la répartition de ces molécules entre l'eau, les sédiments et l'organisme ; elle est fortement influencée par leur lipophilicité qui augmente avec le nombre d'atomes de chlore présent dans la molécule (Bremle, 1995). Les chlorobiphényles les moins lipophiles se trouvent sous forme complètement dissoute dans l'eau et les plus lipophiles sont complètement absorbées dans la matière organique des sédiments ou dans les lipides des organismes (Ruus *et al*., 2002; Zhang *et al*., 2003). Selon Bremle (1995), la solubilité des PCBs semble être plus faible dans la fraction lipidique des organismes par rapport à sa solubilité dans le carbone organique des sédiments et, en conséquence, les composés les plus lipophiles tendent à s'accumuler dans les sédiments et ne sont pas directement disponibles pour les organismes. Ces notions expliquent, donc, les fortes concentrations en tri-CB et tétra-CB, et les faibles concentrations en hepta-CB chez les organismes analysés.

D'autre part, la concentration en PCBs dans les tissus des organismes aquatiques résulte de la combinaison de leurs taux d'absorption et d'élimination; les composés les moins chlorés sont plus facilement éliminées ou métabolisés que les PCBs à haut degré de chloration (Goerke et Weber, 2001), d'où une faible présence de di-CB chez les organismes du Vaccarès.

Parmi les espèces analysées, les muges, les athérines et les cardiums sont les espèces

les plus chargées en PCBs. La sensibilité particulière des muges juvéniles pourrait être liée à leur alimentation préférablement herbivore. En effet, Gonzalez Sagrado *et al* (2004) suggèrent que les macrophytes aquatiques, chez lesquels aucun métabolisme des PCB n'a été rapporté, présentent la route principale de l'introduction de ces composés dans les réseaux trophiques à travers les consommateurs herbivores ou détritivores. Cette voie pourrait être à l'origine de la forte contamination générale des muges, ainsi que de l'imprégnation élevée par les hepta-CB des gammares, les détritivores.

La niche écologique bentho-pélagique caractéristique des athérines est à l'origine de sa forte contamination en toutes les familles de PCBs. En effet, en traversant la colonne d'eau, cette espèce est exposée à toutes les sources de contamination, soit aux PCBs dissous dans l'eau ou adsorbées sur les particules organiques en suspension et ceux liés à la matière organique carbonée des sédiments (si l'on considère un transfert direct), soit aux proies benthiques et pélagiques (si l'on considère un transfert trophique des micropolluants). En accord avec Stappelton *et al*. (2001), les organismes exposés aux sources de contamination benthiques et pélagiques ou bien sédimentaires et atmosphériques, accumulent le plus les PCBs présents dans le milieu aquatique. L'analyse des classes de contamination chez cette espèce révèle une absence d'individu non imprégné par les tétra-CB ce qui indique une accumulation préférentielle des PCBs dissous dans la colonne d'eau. De plus, la proportion équivalente d'individus moyennement et très contaminés (50%) pourrait découler d'une moindre efficacité des processus de métabolisation ou d'élimination des tétra-CB.

Les hauts niveaux de concentration en PCBs chez les cardiums sont probablement en rapport avec leurs niches écologiques particulières. Ce sont des organismes filtreurs, qui accumulent les PCBs dissous dans l'eau, mais également ceux qui sont adsorbés sur les particules en suspension (Voie *et al*., 2002). Les concentrations en tri-CB et en tétra-CB accumulés s'accordent avec les teneurs disponibles dans les deux compartiments en jeu, l'eau et les particules organiques (Bremle et Ewald 1995) dont le filtrage augmente avec la diminution du nombre d'atomes du chlore (Voie *et al*., 2002). L'analyse des classes de contamination a mis en évidence une grande proportion d'individus très contaminés en di-CB (70%). Puisque les di-CB sont facilement éliminés par d'autres organismes, leur biodisponibilité pour les cardiums est très élevée et l'équilibre de répartition des di-CB entre l'eau et l'animal n'est jamais atteint, même si les concentrations sont généralement faibles, l'accumulation semble être constante.

Ces indications conduisent à considérer le rôle important des bivalves filtreurs dans la répartition des PCBs dans les écosystèmes aquatiques. En étudiant la bioconcentration et la

re-déposition des PCBs chez *Dreissena polymorpha*, Cho *et al*. (2004) ont montré l'impact des filtreurs sur la dynamique des PCBs. En effet, les filtreurs ont la capacité d'augmenter le temps de rétention des PCBs dans les écosystèmes aquatiques par le biais de la bioconcentration, de la purification des particules en suspension, de leur libération dans l'eau sous forme dissoute ou de leurs re-déposition dans les sédiments, autant de mécanismes qui contribuent à les rendre disponibles pour les chaînes alimentaires benthiques à travers les détritivores. Cette interprétation est corroborée par les niveaux élevés d'hepta-CB chez les gammares.

Les crevettes grises sont moins chargées en PCBs. Gonzalez Sagrado *et al*. (2004) expliquent les bas niveaux de PCBs qu'ils ont trouvé chez *Palaeomonetes argentinus* par la courte durée de son cycle vital et la capacité généralement faible à bioaccumuler les PCBs chez les crustacés par comparaison aux poissons ou aux mollusques. En effet, ceux-ci manifestent une biotransformation des PCBs plus efficace en condition de contamination chronique. Si cette notion est valable chez les crevettes grises, elle est en désaccord avec les observations faites chez les crevettes roses qui montrent une forte imprégnation par les PCBs. Puisqu'une des principales différences entre les crevettes grises et les crevettes roses est leur habitat naturel, respectivement benthique et pélagique, les différences pourraient être liées à la biodisponibilité des contaminants en zone pélagique ou benthique. En effet, les sédiments sont une source importante de la contamination par les PCBs, impliquant une accentuation de la contamination chez les espèces benthiques. Cependant des études récentes (Morrison *et al*., 2002; Voie *et al*., 2002) montrent que dans les écosystèmes aquatiques peu profonds où il existe un mélange régulier de sédiments et, donc, une répartition constante des contaminants entre les sédiments et l'eau, c'est la concentration en PCBs dans l'eau qui détermine la bioconcentration chez les organismes. En conséquence les organismes pélagiques sont plus contaminés que les organismes benthiques.

Les anguilles juvéniles ont tendance à être plus imprégnées par les familles de molécules «lourdes» de PCB (hepta-, hexa- et penta- et tétra-CB) que les anguilles jaunes chez qui ce sont les familles «légères» qui prédominent. Plusieurs hypothèses, basées sur les taux d'absorption et de métabolisation des PCBs pourraient expliquer une répartition différente des familles de PCBs au cours du cycle vital des anguilles. Le rapport surface branchiale sur surface corporelle est plus élevé chez les jeunes anguilles que chez les plus âgées, ce qui entraîne une surface de «diffusion libre» plus importante et, en conséquence, une accumulation plus élevée des PCBs biodisponibles (Randall *et al*., 1995). D'autre part, pour un même motif, l'élimination des PCBs légers par échange directe avec le milieu environnant

est plus efficace chez les juvéniles, chez lesquels les activités enzymatiques de détoxication sont, en outre, plus sensibles à une contamination chronique par les POPs (Buet, 2002). En revanche, l'hypothèse d'une métabolisation plus efficace des PCBs plus hydrophobes chez les anguilles jaunes semble peu probable puisque l'épuration des familles hautement chlorées semble être extrêmement lente ou même peu significative comme le rapportent Ashely *et al*. (2003). C'est la raison pour laquelle les PCBs très hydrophobes tendent à être bioamplifiés dans les chaînes alimentaires (Ruus *et al*., 2002 ; Gonzalez Sagrado *et al*., 2004), ce qui n'est pas le cas chez les anguilles du Vaccarès alors que nous avons montré que les individus juvéniles et jaunes occupaient deux niveaux trophiques distincts (Chapitre 1). Cependant, on peut déplorer les difficultés rencontrées dans la définition de ces 2 groupes en raison des particularités biologiques de cette espèce.

Sur l'ensemble de la communauté analysée, le profil de contamination par les PCBs des guildes trophiques montrant une décroissance des niveaux de contamination quand on s'élève dans la chaîne trophique, démontre que ni la concentration de la somme des PCBs ni celle des différentes familles de PCBs ne reflètent un mécanisme de bioamplification. Il y a, donc, d'autres modalités de contamination qui déterminent les niveaux de contamination des espèces de ce réseau trophique ou, plus probablement, un ensemble de modes de contamination dominé par la bioaccumulation directe.

II.4.3.2 Modalités de contamination par les PCBs dans l'écosystème de Vaccarès

Les espèces les plus contaminées sont celles qui bioconcentrent les contaminants présents dans le milieu le plus efficacement à travers des dispositifs de diffusion correspondant surtout aux surfaces tégumentaires et respiratoires. Le flux des contaminants à travers ces surfaces est très rapide et les animaux aquatiques devraient se nourrir très activement pour que le transfert trophique ait un effet significatif sur la concentration en xénobiotiques (Randall *et al*., 1995).

Nos résultats indiquent que l'imprégnation tissulaire dans le biota du Vaccarès provient, pour une large part, des contaminants dissous dans l'eau. L'accumulation supérieure de tri- et tétra-CB par rapport aux PCBs plus lipophiles suggère que c'est la fraction hydrosoluble de PCBs qui détermine la biodisponibilité et en conséquence, la bioaccumulation.

Les variations saisonnières corroborent l'hypothèse de la biodisponibilité des PCBs dans la colonne d'eau comme facteur déterminant les niveaux de contamination chez les organismes (Bruhn et McLachlan, 2002). Elles confirment également l'influence de la structure biotique

et abiotique de l'écosystème dans la dynamique des PCBs dans les milieux naturels (Voie *et al*., 2002; Morisson *et al*., 2002). Dans l'écosystème étudié, les particules organiques, qui sont en compétition avec les organismes pour la liaison des molécules de PCBs, sont d'origine biologique (produits par la biomasse planctonique) et sédimentaire (générés par la re-suspension des particules organiques associées aux sédiments).

Au mois de mars la fraction de PCBs dissoute dans l'eau et donc, disponible aux organismes est diminuée à la suite du fort développement des espèces phytoplanctoniques (Chapitre I) qui absorbent de manière efficace les PCBs (Bruhn et McLachlan, 2002). En septembre, les conditions climatiques (le vent, les pluies) entraînent un panachage mécanique des particules organiques liées aux sédiments, qui auraient préalablement adsorbés les PCBs. En conséquence, c'est en mai que la fraction de PCB dissoute dans l'eau est la plus importante et c'est à cette saison que les concentrations tissulaires en PCBs sont plus élevées chez les espèces du Vaccarès.

Chez les cardiums et les athérines, aux variations saisonnières de la biodisponibilité s'ajoutent les facteurs biologiques, comme la taille et la teneur tissulaire en lipides. Ainsi, la taille des athèrines est corrélée négativement avec les PCBs les plus fréquents (tri et tetraCB) indiquant un mode de contamination à travers les surfaces d'échange. Par ailleurs les penta- + hexa-PCBs sont positivement corrélés avec les taux de lipides. Les athérines sont plus riches en lipides en mars, c'est à cette époque que l'on relève les plus fortes concentrations en PCBs très chlorés. Inversement chez les cardiums, ce sont les tétra-CB qui sont positivement corrélés avec la charge lipidique, ce qui révèle leur abondance au mois de mars. Chez les épinoches, les taux de PCBs sont globalement très élevés en septembre. Comme la taille est négativement corrélée avec l'imprégnation, on peut conclure que ce sont les petits individus qui sont les plus chargés.

Les corrélations positives entre la teneur en phospholipides (PL) chez les crevettes, les athérines et les anguilles jaunes, notamment pour les molécules les plus polaires, confirme une tendance à l'incorporation des PCBs dans la phase lipidique polaire, comme le suggèrent divers auteurs (Bergen *et al*., 2001, Roche *et al*., 2002). Afin d'approfondir l'influence de la structure chimique des PCBs sur le mode de contamination, une étude plus détaillée de la bioaccumulation et de la localisation lipidique des différents congénères de PCBs a été envisagée. Dans un premier temps, il apparaît que la teneur en PL tend à augmenter au mois de mai parallèlement à l'élévation de l'imprégnation par les PCBs dans cette période du cycle annuel. Cependant, en contradiction avec l'étude de Bergen *et al*. (2001), chez les bivalves filtreurs du Vaccarès, les cardiums, aucune corrélation n'est mise en évidence entre les PL et

la charge en PCBs, alors que les lipides neutres et la teneur en PCBs les plus abondants, les tétra-CB sont positivement corrélés.

En définitive, l'absence de bioamplification des PCBs dans le réseau trophique du Vaccarès a été démontrée par l'analyse de corrélations entre les niveaux de contamination et le $\delta^{15}N$ des organismes, si elles existent ces relations sont négatives signifiant la prédominance de la contamination par voie directe. Néanmoins, bien qu'un transfert trophique significatif n'a pas été démontré chez les organismes analysés, on ne peut pas exclure les potentialités de bioamplification chez les oiseaux piscivores, qui constituent un des composants principaux de la biodiversité de la Camargue (Roche *et al*. 2002). En effet chez les animaux homéothermes la bioamplification est la combinaison d'un taux d'alimentation accru à la suite d'une demande énergétique supérieure et l'impossibilité d'élimination directe (Fisk *et al*., 2001 ; Borga *et al*., 2001). Des études complémentaires sont nécessaires pour comprendre la voie de contamination des oiseaux camarguais.

II.4.4 Comparaison avec d'autres écosystèmes aquatiques

Le Tableau 2.14 fait état d'une tentative de comparaison entre les organismes aquatiques issus d'écosystèmes similaires. Malgré l'abondance de données dans la littérature, la modicité de ce récapitulatif montre surtout la difficulté de réaliser une telle étude comparative. Les raisons sont nombreuses, mais signalons les plus courantes: la diversité des substances analysées, de leur état moléculaire, des méthodologies mises en œuvre et de l'expression des résultats, ainsi que la diversité des espèces considérées et de leurs activités métaboliques au moment de l'analyse. Néanmoins, d'une manière générale, notre étude confirme les considérations rapportées par Roche *et al* (2000) sur une moindre imprégnation des organismes échantillonnés dans l'étang de Vaccarès, comparée à d'autres écosystèmes aquatiques. Cela est dû à la moindre urbanisation, l'éloignement de grandes agglomérations et de zones industrielles et les strictes réglementations du statut de Réserve. Cependant, l'écosystème du Vaccarès fait face à des contaminations chroniques et persistantes exogènes.

Espèce	Site	∑PCB	HCB	pp'DDE	∑HCH	∑endosulfan	∑heptachlor
Cerastoderma glaucum	*Etang de Vaccarès*	*430*		*0,57*	*7,38*	*7,34*	*10,4*
	**Delta du Ebro (Espagne)[1]	18					
	**Estuaire du Hudson-Raritan (Etats-Unis)[2]	1980					
	Etang de Mer Manoor (Espagne)[3]			nd	5,25	25,9	16,1
***Gammaridae* sp.**	*Etang de Vaccarès*			*1,09*	*40,2*	*15,4*	*27,2*
	Etang de Mer Manoor (Espagne)[3]			nd	479	nd	560
***Paleomonetes* sp.**	*Etang de Vaccarès*	*46*					
	Lac Los Padres, peu profond (Argentine)[4]	9,7					
***Pomatoschistus* sp.**	*Etang de Vaccarès*		*nd-3,21*	*0,97*	*11,2*	*20,2*	*11,7*
	Etang de Mer Manoor (Espagne)[3]			nd	71,5	82,3	nd
	Estuaire de Scheldt Occidental (Belgique)[5]		0,05-0,48	0,51-5,2	nd-1,2		
***Mugilus* sp.**	*Etang de Vaccarès*	*40**	*18**				
	Delta du Ebro (Espagne)[6]	109*	539*				
Anguilla anguilla	*Etang de Vaccarès*	*227*	*3,97*	*3,79*			
	Delta du Po (Italie)[7]	265	0,18	29,65			

Tableau 2. 14 Imprégnation tissulaire moyenne, exprimée en ng.g tissu frais à l'exception de *ng. g lipides, d'espèces aquatiques lagunaires. Comparaison des données bibliographiques avec celles de l'*étang de Vaccarès*. (** *Mytilus* sp.)

[1] Solé *et al*., 2000a ; [2] Peven *et al*., 1996 ; [3] Pérez-Ruzafa *et al*., 2000 ; [4] Voorspoels *et al,* 2004 ; [5] Gonzales Sagrario *et al*. ,2002 ; [6] Pastor *et al*., 1996 ; [7] Bressa *et al.,* 1997

II.4.5 Prédiction de la dynamique des contaminants OCs et de ses effets sur la communauté animale du Vaccarès

Etant donné le grand nombre de facteurs influençant les niveaux de contamination chez les espèces aquatiques, une question se pose sur l'aptitude des écotoxicologues à révéler de façon précoce l'effet de contaminants OCs sur la dynamique et la santé des populations de l'étang de Vaccarès. Peut-on donc prédire ses effets en analysant certains paramètres biologiques et les considérant comme signaux d'alerte? Nous avons donc analysé quelques biomarqueurs traditionnels *a priori* définis comme étant des signaux d'alerte d'une contamination par les micropolluants OCs. Les résultats sont présentés dans le Chapitre suivant.

CHAPITRE III
ANALYSE DES BIOMARQUEURS (PARAMETRES BIOCHIMIQUES ET BIOMETRIQUES) *IN SITU* – EFFET DE L'EMPLACEMENT TROPHIQUE, DE LA SAISON ET DE LA CONTAMINATION

III.1. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

Pris dans leur intégralité, les écosystèmes aquatiques se montrent sensibles à l'exposition aux polluants organiques persistants. Ces derniers, individuellement et/ou dans l'ensemble peuvent provoquer des modifications à tous les niveaux de l'organisation biologique en induisant des réponses biologiques qui se manifestent de manière hiérarchisée à l'échelle des molécules, des cellules, des organismes, des populations et enfin des écosystèmes. Cette hiérarchie de réponses selon le type de perturbation, sa chronicité ou son intensité se révèle fondamental pour une détection précoce et pour la prédiction des conséquences des stress environnementaux causés par la présence des xénobiotiques dans les milieux aquatiques. Ainsi, dans les programmes de biosurveilance on a recours, entre autres, à des indicateurs sublétaux d'exposition et des effets des substances chimiques d'origine antropiques aux niveaux moléculaires, biochimiques et physiologiques, qui précèdent celles des niveaux écologiques supérieurs. Ces indicateurs sont collectivement appelés biomarqueurs. Le potentiel des biomarqueurs est donc considérable, cependant leur utilisation et leur validité dans les études *in situ*, fait l'objet de nombreuses controverses écotoxicologiques et de gestion.

III.1.1 Biomarqueurs : définition et rôle dans les études de biosurveillance

Les études de biosurveillance *in situ* sont basées à la fois sur l'évaluation de la perturbation de l'équilibre dynamique des organismes, des populations et des communautés, et de la mise en place de réponses physiologiques, biochimiques ou écologiques compensatoires (Roche, 1998). En conséquence, l'évaluation du risque environnemental implique plusieurs niveaux de biosurveillance: le niveau sub-organistique (biomarqueurs), le niveau de l'organisme (tests d'écotoxicologie *in vivo* et *in vitro*), le niveau de la population (bioindicateurs) et le niveau des écosystèmes (indicateurs écologiques) (Van Gestel et Van

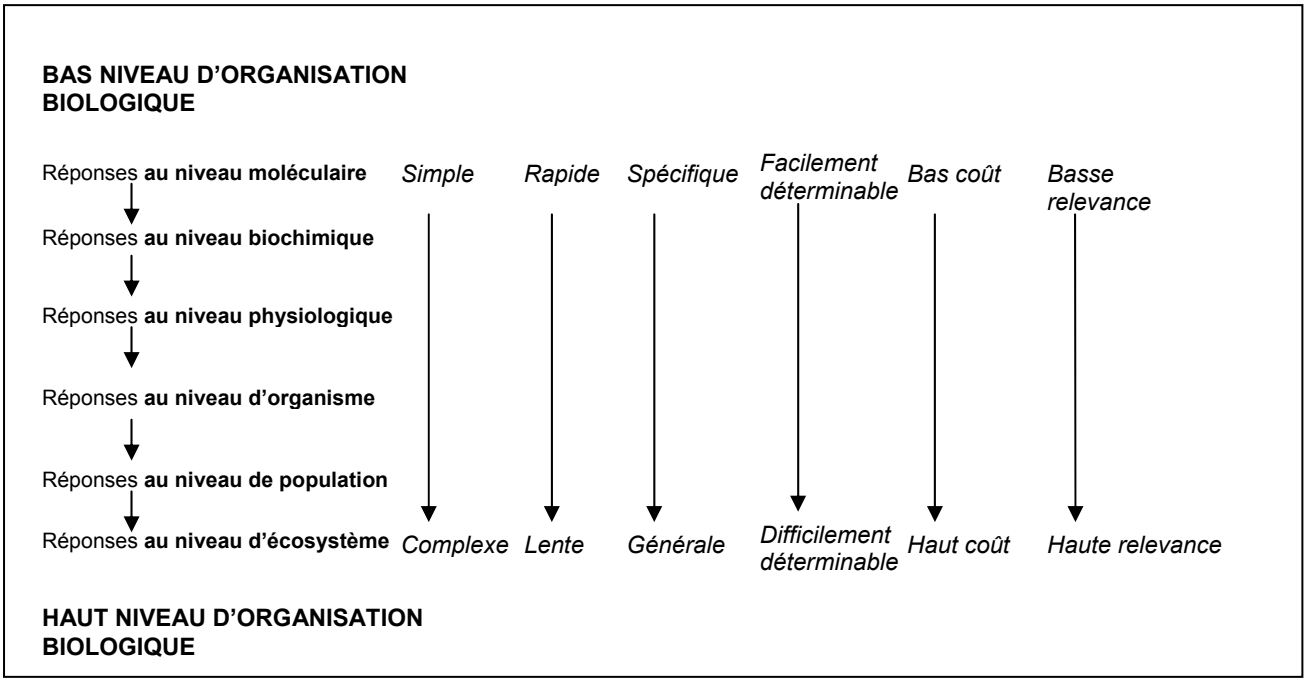


Figure 3.1 Caractéristiques des approches écotoxicologiques dans l'évaluation du risque environnemental (d'après Lam et Wu, 2003)

Brummelen, 1996). Les avantages et les désavantages de chacune de ses approches sont présentés sur la Figure 3.1

Les **biomarqueurs** sont définis comme « toute altération moléculaire, biochimique, histologique, ou physiologique chez des organismes susceptibles d'être utilisés pour estimer soit l'exposition à des contaminants présents dans leur milieu de vie, soit les effets induits par la pollution » (Lagadic *et al*, 1998). En révélant une perturbation biologique moléculaire, cellulaire ou physiologique de caractère généralement réversible, les biomarqueurs sont susceptibles d'agir en tant que « signaux d'alarme » indiquant la présence dans le milieu des xénobiotiques d'origine anthropique susceptibles d'exercer à plus ou moins long terme des effets toxiques aux niveaux écologiques supérieurs. Cependant, dans les milieux naturels, la réponse des biomarqueurs est associée d'une part aux stress induits par les activités humaines, mais aussi à ceux d'origine naturelle. C'est la raison pour laquelle Roche (1998) souligne la nécessité d'intégration de l'évaluation des indicateurs biologiques au sein d'hypothétiques populations « témoins » dans les études *in situ.* Dans une étude de terrain, comme celle rapportée dans ce mémoire, la limite posée par l'absence de témoins a été réduite en intégrant la mesure du taux d'imprégnation par les micropolluants organochlorés chez différents organismes aquatiques à une analyse individuelle d'un grand nombre de paramètres biologiques, notamment des paramètres biométriques et biochimiques.

Pour assurer sa signification écotoxicologique, un biomarqueur mesuré au niveau individuel doit permettre de décrire, d'expliquer et, éventuellement, de prédire les effets des activités anthropiques sur les populations et les communautés évoluant dans leur environnement naturel (Lagadic *et al*., 1997). Qu'ils interviennent dans le maintien de l'homéostasie ou qu'ils traduisent des perturbations fonctionnelles, le rôle principal des biomarqueurs dans les études de biomonitoring mesurés chez les individus est de fournir des marqueurs précoces de dysfonctionnement ultérieurs aux niveaux supérieurs de l'organisation biologique (Lam et Gray, 2001).

III.1.2 Paramètres biologiques et biochimiques en tant que biomarqueurs

Dans les milieux aquatiques, il est possible d'analyser l'impact des xénobiotiques toxiques en utilisant différents types de biomarqueurs décrits dans le Tableau 3.1
Dans cette étude, nous avons focalisé notre attention sur un nombre limité de biomarqueurs biologiques et biochimiques.

Tableau 3.1[1] Biomarqueurs utilisés dans les études écotoxicologiques

BIOMARQUEURS	FONCTION - ACTIVITÉ	POLLUANT
Enzymes de biotransformation *Phase 1* **oxydases à fonction multiple (MFO)** cytochrome P450 (CYP) dépendantes **EROD, B(a)PMO, ECOD** ***Phase 2*** **transférases** **GST, UDPGT…**	Transformation chimique des xénobiotiques sous des formes plus hydrosolubles pour faciliter leur élimination. Fonctionnalisation - introduction dans la molécule cible d'un groupement polaire – OH, -COOH ou $–NH_2$ Conjugaison – liaison s'un groupement hydrophile endogène sur une partie polaire de la molécule cible	HAP, PCB, pesticides OCs, PCDDs, métaux lourds
Paramètres de stress oxydatif *Enzymatiques* superoxyde **dismutases : SOD** **peroxydases : CAT, GPx** **réductases : GRED** *Non-enzymatiques* **vitamines (C, E)** *Indices biochimiques* peroxidation des lipides, oxydation d'ADN, formation de la methémoglobine	Systèmes de détoxication contre les dérivés actifs de l'oxygène Accélération de la dismutation spontanée de l'anion superoxyde Dismutation du peroxyde d'hydrogène, maintenance de l'équilibre du gluthation réduit et oxydé Importants antioxydants Effets biochimiques et physiologiques associés aux flux d'oxyradicaux.	HAP, PCB, HCB
Produits de biotransformation	À la suite de l'exposition aux xénobiotiques facilement dégradables, les métabolites, parfois plus toxiques que la molécule mère, sont bioaccumulés dans l'organisme contaminé (i.e. HAPs). Des niveaux élevés des produits de biotransformation peuvent être utilisés comme biomarqueurs d'exposition.	HAP
Protéines de stress **Choc thermique (*hsp*)** **Glucose-régulés (*grp*)** **Métallothionéines (MTs)** **Résistance multixénobiotique (*MXR*) –** P-glycoprotéines (PGP)	Défense contre une variété de stress (osmotique, anoxique, infectieux, stress oxydant, métaux lourds, agents tératogènes, rayonnement ultraviolets, micro polluants organiques) par la repartion et/ou l'élimination des protéines cellulaires endommagées ou par la régulation ou la neutralisation de du facteur responsable du stress.	Métaux lourds, PCBs, lindane, diazinon, molécules tératogènes et hépatocarcinogènes
Paramètres sanguins **Hématologiques** (hématocrite, teneur en hémoglobine, sérum transaminases)) **Plasmatiques (taux de cortisol, glycémie)**	Ces paramètres ne répondent pas de manière spécifique aux agents stressants d'origine chimique, cependant ils peuvent fournir des indications précieuses sur la physiologie générale et l'état sanitaire de l'organisme.	

Tableau 3.1$_2$ Biomarqueurs utilisés dans les études écotoxicologiques (d'après Van der Oost et al., 2003)

BIOMARQUEURS	FONCTION - ACTIVITÉ	POLLUANT
Paramètres immunologiques **Altérations du système immunitaire** (leucocytes, protéines plasmiques, organes lymphoïdes) **immunité non spécifique** (phagocytose, cellules tueuses, réponse inflammatoire) **immunité spécifique** (anticorps, réponse cellulaire) **fonctions régulées par le système immunitaire** (maladies, tumeurs)	Le système immunitaire joue un rôle fondamental dans la défense de l'organisme contre certains agents pathogènes, les substances étrangères ou anormales. Etroitement intégré dans l'organisme, son fonctionnement interagit de façon intime avec celui de nombreux organes et systèmes d'organes, il est vulnérable aux atteintes des xénobiotiques. A des niveaux d'intoxication inférieurs à ceux responsables d'une toxicité aiguë, il présente des changements subtils de certains composants que l'on peut envisager d'utiliser comme biomarqueurs.	PCB, PCDD, HCB, dieldrine, DDT, HAP, organométaux
Paramètres reproductifs et endocrines	La diminution du succès de reproduction est un des effets les plus préoccupants d'une contamination chimique. De nombreux xénobiotiques affectent l'activité hormonale et touchent directement ou indirectement la reproduction.	PCBs, DDT, HCHs,
Paramètres neuromusculaires **Cholinestérases (AChE…)**	AChE inactive l'acétylcholine et empêche la stimulation du récepteur cholinergique et par conséquent le transfert du signal nerveux. De nombreux neurotoxiques agissent sur l'AChE en inhibant son activité ce qui peut avoir des conséquences létales.	Insecticides organophosphorés, carbamates
Carboxylétserases	Détoxification de nombreux esters lipophiles par l'hydrolyse des xénobiotiques lipophiles comportant une liaison ester.	
Paramètres génotoxiques **Adduits à l'ADN,** **Cassures de mono-brin(s) d'ADN** **Micronoyaux**	Informent sur les effets des xénobiotiques au niveau de l'ADN.	HAP, insecticides organochlorés
Paramètres physiologiques et morphométriques **Histopathologie - Cytopathologie** **Indices de condition (indice relatif de condition, indice hépatosomatique, indice gonadosomatique)**	Informent sur l'état sanitaire des organismes, des communautés et des populations et peuvent permettre de déceler des anomalies différentes (croissance, reproduction, allocation énergétique)	

III.1.2.1 Biomarqueurs biologiques : les paramètres biométriques et la constitution tissulaire

Les paramètres et indices biométriques des animaux aquatiques sont des données faciles à collecter qui ne sont pas influencées par les conditions de capture des organismes et de prélèvement des échantillons tissulaires. Le **poids** et la **taille** permettent la détermination approximative de la classe d'âge de l'organisme. La relation taille-poids, évaluée à l'aide de 1'**indice relatif de condition**, donne une idée de l'état sanitaire de l'animal. II correspond au rapport du poids réel sur le poids théorique de l'individu, lequel est obtenu à partir d'une population de référence (Chapitre I).

La constitution tissulaire en **lipides** (neutres et phopholipides), au delà de simple aspect énergétique et structurel, représente un des éléments clés des phénomènes de bioaccumulation et de bioamplification des polluants organiques apolaires et de l'adaptation physiologiques des organismes aquatiques aux facteurs physiques du milieu contaminé (Roche, 1998).

Il semble, néanmoins, que ce type de biomarqueurs biologiques ne soit pas tellement sensible à la seule présence des xénobiotiques dans le milieu en étant affectés par d'autres facteurs non liés à la contamination (la saison, les maladies, le cycle vital), ils sont très utiles comme premiers signaux d'exposition et effets d'une anomalie environnementale (Van der Oost, 2003).

III.1.2.2 Biomarqueurs biochimiques : enzymes de biotransformation et de défense antioxydative

De nombreux moyens de défense ont évolué chez les organismes vivants afin de pourvoir la protection contre de multiples stress environnementaux auxquels ils sont constamment soumis. Au niveau cellulaire, dans le cas d'un stress induit par la présence des xénobiotiques, cette défense s'organise par le biais de réactions enzymatiques (Parant, 1998). Les variations des activités enzymatiques impliquées dans la défense contre les xénobiotiques, constituent l'une des réponses biologiques actuellement utilisée comme biomarqueurs dans les études de biosurveillance. Parmi les réponses les plus étudiées figurent celles des activités enzymatiques de biotransformation et la défense antioxydante.

a) Les systèmes enzymatiques de biotransformation

Les organismes aquatiques métabolisent les xénobiotiques organiques à l'aide de différents systèmes enzymatiques regroupés en deux catégories principales: les enzymes de phase I, II et III (Parant, 1998).

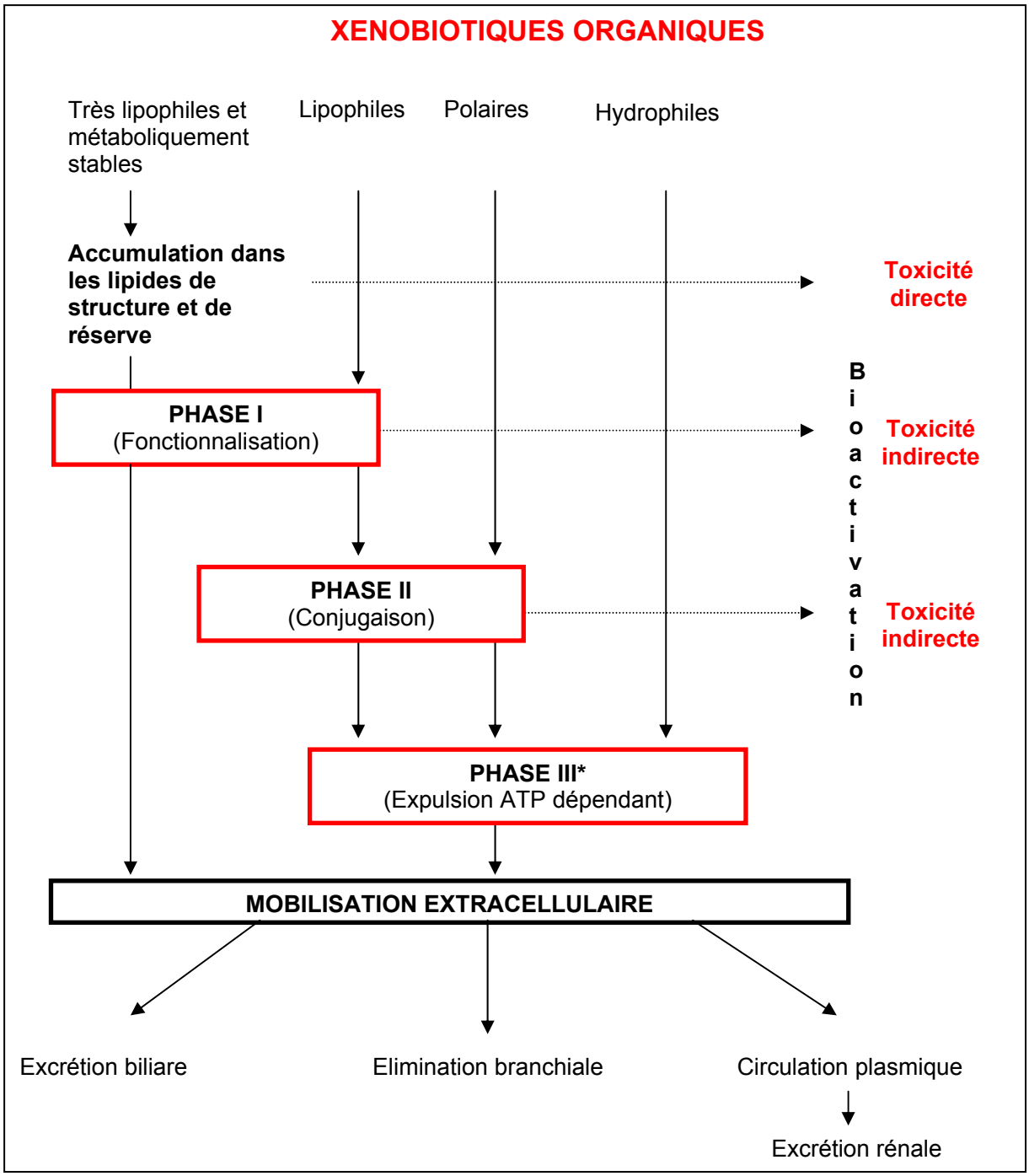
Les enzymes de phase I, ou phase de fonctionnarisation, ont pour rôle essentiel d'ajouter un groupe fonctionnel au xénobiotique par des réactions d'oxydation, de réduction ou d'hydrolyse, d'introduire dans la molécule cible un groupe polaire hydroxyl-(OH), carboxyl-(COOH) ou amino- (NH_2) (Di Giulio *et al*., 1991). Cette phase regroupe essentiellement les oxydases à fonctions multiples (MFO) associées au cytochrome P450 (CYP) qui catalysent l'oxydation des xénobiotiques à structure plane, de façon spécifique pour l'éthoxyrésorufine-*O*-dééthylase (EROD) et la benzo(*a*)pyrène monooxygénase (B(a)PMO) ou non-spécifique pour la 7-éthoxycoumarine-*O*-dééthylase (ECOD). Leur induction par des xénobiotiques comme les PCBs et les pesticides OCs a été très largement étudiée, aussi bien chez les vertébrés que les invertébrés (Lagadic *et al*., 1997)

Dans la phase II ou phase de conjugaison, le xénobiotique est rendu plus hydrosoluble grâce à la liaison d'une substance hydrophile endogène avec un groupe polaire de la molécule. Elle a lieu soit à la suite de la phase I, soit directement sur les molécules à groupements polaires. Les métabolites issus de la phase II peuvent être éliminés ou subir de nouvelles réactions de biotransformation. Les enzymes qui interviennent dans la phase II sont essentiellement des enzymes de conjugaison, comme les gluthation tranférases (GST) et l'uridine diphosphate-glucuronyl transfèrase (UDPGT), les suphotransférases (ST) et les époxydes hydrolases (EH).

Les enzymes de la phase III, comme la protéine MRP, étudiée chez les mammifères, expulsent hors de la cellule un xénobiotique modifié par les premières deux phases de biotransformation selon un mécanisme ATP dépendant.

Le résultat des réactions de biotransformation va déterminer à la fois l'excrétion (ou la bioaccumulation) et la toxicité secondaire du composé (Lemaire et Livingstone, 1993).

Nous avons centré notre attention sur l'une des classes principales des enzymes de la phase II - les **GST.** Essentiellement situées dans la phase cytosolique du foie et des glandes digestives, elles conjuguent les molécules électrophiles avec le groupe -SH du glutathion réduit pour former un dérivé mercapturique généralement moins toxique que la molécule mère. Les isoformes des GST (α, μ, π, θ), largement distribuées dans le règne animal (Livingstone, 1991; George, 1994), agissent spécifiquement sur de nombreux substrats en offrant aux cellules, outre une fonction essentielle dans le transport intracellulaire, une protection contre les effets nocifs de nombreuses substances. Toutefois, leur utilité en tant que biomarqueurs est souvent remise en cause. Bien que, d'une manière générale, les GST jouent un rôle principal dans les mécanismes de neutralisation des organochlorés xénobiotiques chez les organismes aquatiques (Lagadic *et al*, 1997), les études citées par Van der Oost (2003) et Solé (2000) montrent la variabilité des réponses souvent contradictoires ou non significatives,



*d'après Parant (1998)

Figure 3.2 Représentation schématique des étapes principales de la détoxication et de la toxication des xénobiotiques chez les animaux (modifié de Buet, 2002)

de l'activité des GST des poissons et mollusques bivalves après l'exposition aux composés OCs dans les milieux naturels. De plus, leur utilité en tant que biomarqueurs peut être limitée par le fait que les réponses semblent être masquées par des facteurs autres que la contamination : la saison (Nyogi, 2001; Power et Sheen, 1996); l'âge et le sexe (Ruus *et al*., 2002a); les facteurs abiotiques (Robillard, 2003).

Les études récentes, cependant, indiquent une nouvelle voie d'utilisation des GST dans les études de biosurveillance : les différents isomères de la GST semblent être des indicateurs plus sensibles et plus spécifiques des effets d'exposition aux xénobiotiques particulières (PCB non planaires) (Hori *et al*., 1997)

Les enzymes de biotransformation sont parmi les premières à répondre à la présence d'un xénobiotique dans un organisme vivant (Figure 3.2). Bien que le résultat de ces réactions soit généralement bénéfique pour l'organisme, la métabolisation de certains composés aboutit parfois à une augmentation de la toxicité des produits (bioactivation) *via* la formation d'intermédiaires plus réactifs comme les époxydes, les diols ou de molécules électrophiles, comme les radicaux libres. Ces derniers sont à l'origine du phénomène du **stress oxydant**.

b) Les systèmes enzymatiques de défense antioxydative

Le stress antioxydant est provoqué par les oxyradicaux libres (l'anion superoxyde $O_2^{\underline{0}}$, le radical perhydroxyle $HO_2^{\underline{0}}$, le radical hydroxyle $OH^{\underline{0}}$ et le singulet d'oxygène $O^{\underline{0}}$) libérés lors des réactions d'oxydation et d'oxygénation. En milieu aérobie, les oxyradicaux sont continuellement produits dans les systèmes biologiques au cours des processus métaboliques endogènes (réactions d'oxydo-réduction associées à la production d'énergie lors de la respiration cellulaire, de la synthèse des prostaglandines et de l'activité phagocytaire) (Lagadic *et al*., 1997). En même temps, la formation des espèces réactives de l'oxygène est consécutive à la métabolisation de substances exogènes dont la structure est proche de celle de composés endogènes (Roche et Bogé, 1996a) et à l'auto-oxydation de métabolites réduits. Ces dérivés très actifs réagissent avec un grand nombre de substrats et leurs effets nocifs s'exercent sur l'ensemble de constituants cellulaires: désactivation enzymatique par l'oxydation de groupements thiols, peroxydation des lipides membranaires, l'altération des acides nucléiques (adduits à l'ADN, cancérogenèse) et finalement la mort cellulaire (Winston et Di Giulio, 1991).

La défense contre les formes actives de l'oxygène est assurée par les systèmes antioxydants enzymatiques incluant les superoxydes dismutases (SOD), les peroxydases dont la glutathion peroxydase (GPx) et les catalases (CAT) et par les composés non enzymatiques

y compris les niveaux de vitamines C et E, du β carotène et des caroténoïdes, en général, et de l'acide urique et du glutathion (Van der Oost *et al*., 2003).

Les **superoxyde dismutases** sont des métalloenzymes caractérisées par la nature du métal présent au niveau du site actif, ou par leur poids moléculaire et par leur localisation cellulaire. On décrit trois isoenzymes: Cu-ZnSOD cytosoliques (PM = 32 600), MnSOD mitochondriale (PM= 40 000) et FeSOD (PM= 39 000) absente chez les eucaryotes (Roche, 1998). Les SOD catalysent la dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) dont les effets oxydants sont inhibés par sa transformation immédiate en radical hydroxyle (OH°) à l'aide de deux classes principales de peroxydases, la catalase et la gluthation peroxydase. Le rôle de la **catalase** est essentiel dans l'élimination de l'H_2O_2 des cellules. Située dans les peroxysomes de la plupart des cellules et naturellement impliquée dans le métabolisme des acides gras, elle catalyse la transformation de l' H_2O_2 en eau et oxygène moleculaire (O_2) mais elle est également capable d'en catalyser la dismutation. Alors que la catalase utilise une molécule d'H_2O_2 comme cofacteur dans la réduction d'une autre molécule d'H_2O_2, la **glutathion peroxydase** (GPx) utilise le glutathion réduit comme intermédiaire. En effet, le métabolisme de l'H_2O_2 catalysé par les GPx implique l'oxydation du glutathion réduit en forme oxydée. En conséquence, en plus de son rôle dans la protection antyoxidante son intérêt tient à fonction dans le cycle de régénération du glutathion. Ce sont surtout **les GPx sélénium-dépendantes** (SeGPx) et les GST de classe α qui interviennent dans ces réactions (Lemaire et Livingstone, 1993 ; Lagadic *et al* ; 1997).

Différents auteurs ont étudié l'efficacité des systèmes antioxydants pour contrer les effets oxydants des composés organochlorés chez les poissons et les mollusques bivalves (Di Giulio *et al*., 1993; Solé, 2000; Orbea *et al*., 2002; Ruus *et al*., 2002). Les activités de ces systèmes peuvent être induites ou inhibées à la suite de l'exposition des organismes aux polluants chimiques et, en conséquence, peuvent être étudiées en tant que biomarqueurs biochimiques. Cependant, la plupart des études centrées sur la validation *in situ* des biomarqueurs cités ci-dessus signalent la variabilité des réponses et l'inadéquation avec les données des études en laboratoire (PNETOX, 2004). Parihar *et al*. (1997) et Robillard *et al*. (2003) ont montré l'influence des variables environnementales (l'oxygène dissous, le pH et la température) sur les processus oxydatifs dans les écosystèmes aquatiques.

De plus, les différences dans l'efficacité des défenses antioxydatives sont largement influencées par la biologie et la physiologie des espèces examinées affectant leur comportement dans des conditions de stress environnementaux (Pérès et Roche, 1989; Roche

et Bogé, 1996a; Roche et Bogé, 1996b). C'est la raison pour laquelle le choix d'espèces sentinelles présente l'étape principale dans la construction des plans de biosurveillance des milieux naturels.

III.1.3 Mollusques bivalves et poissons : organismes bioindicateurs dans les écoystèmes aquatiques

Parmi les nombreux organismes aquatiques, les poissons et les mollusques bivalves font partie des organismes bioindicateurs les plus utilisés dans les études de suivi de pollution aquatique (Parant, 1998 ; Corsi *et al*., 2003 ; Van der Oost *et al*., 2003 ; Roche *et al*, 2003a).

Les mollusques bivalves, essentiellement sédentaires et filtreurs, sont dotés d'un comportement et d'un métabolisme en rapport étroit avec leur environnement aquatique et/ou sédimentaire et, en conséquence, sont directement concernés par le niveau de pollution dans un site donné. Ils possèdent de nombreux caractères qui en font de bonnes espèces sentinelles d'une contamination chimique (Parant, 1998; Sheean et Power, 1996).

D'autre part, la plupart des poissons répondent rapidement et significativement aux différents stress environnementaux, y compris la présence de xénobiotiques toxiques, par l'altération ou par l'adaptation de paramètres biométriques et de certaines fonctions métaboliques (Pacheco et Santos, 2002; Corsi *et al*., 2003; Orbea *et al*., 2002). Cependant, les diverses espèces de poissons ne répondent pas de manière uniforme aux stress environnementaux (Van der Oost *et al*., 2003). Leurs capacités métaboliques et leur activité de défense dépendent dans une large mesure de leur position au sein de la communauté dont ils sont issus et notamment de leurs emplacements au sein des réseaux trophiques (Ruus *et al*., 2002).

III.1.4 Biomarqueurs et niveaux trophiques

De nombreuses études rapportent les variabilités interspécifiques des réponses biologiques et biochimiques vis-à-vis de l'exposition à des composés chimiques persistants dans les milieux naturels (Van der Oost, 2003). Ces différences ont souvent été expliquées par la variabilité des caractéristiques démoécologiques et/ou écophysiologies des espèces aquatiques, sensibles aux variations saisonnières de facteurs biotiques (reproduction, migration) et abiotiques (température de l'eau, modification de sa composition chimique,…) qui agissent au niveau de l'ensemble des compartiments métaboliques. La constitution et

l'activité métabolique des tissus des espèces aquatiques, ainsi que leur sensibilité aux contaminants environnementaux, dépend principalement de leur régime alimentaire, de leur habitat et de leur mode de reproduction, il est donc étroitement lié à leur emplacement dans un réseau trophique donné.

Comme cela a été souligné dans le Chapitre II de ce manuscrit, dans les écosystèmes aquatiques, les composés organochlorés sensés induire des réponses biologiques à l'échelle de l'individu se bioaccumulent dans les tissus des organismes à partir du milieu environnant ou par les biais de la chaîne alimentaire. Ces deux types de transfert de contamination agissent sur son amplitude et influencent la mise en œuvre des systèmes de défense et en conséquence la nature et l'intensité des effets toxiques qui en résultent. L'utilité, donc, des études associant les analyses des biomarqueurs et la détection des contaminations à différents maillons des réseaux trophiques dans une communauté aquatique naturelle, est manifeste. Cependant, l'intérêt pour une telle approche écotoxicologique est très récent et les études centrées sur cette thématique sont peu nombreuses (Brown *et al*., 2004; Ruus *et al*., 2002; Orbea *et al*., 2002; Knopper et Siciliano, 2002 ; PNETOX, 2004)

Malgré, ce défaut de données, les écotoxicologues contemporains s'accordent sur le fait qu'une telle approche non seulement complète les études de biosurveillance, mais encore participe à la plus grande problématique actuelle des biomarqueurs, c'est-à-dire leur validation pour la prédiction d'effets aux plus hauts niveaux d'organisation biologique, qui n'est toujours pas clairement établie.

III.1.5 Limites des biomarqueurs

L'une des principales limites des biomarqueurs dans les études de biosurveillance repose sur l'extrapolation des résultats obtenus *in vitro* aux niveaux supérieurs de l'organisation biologique. Même si il est largement reconnu que les effets sub-organismiques (moléculaires, biochimiques, physiologiques) anticipent ceux des niveaux supérieurs (Fent, 2003; Lam et Gray, 2001), les relations entre les réponses des biomarqueurs et les effets sur les populations, les communautés et l'écosystème ne sont pas encore bien définies.

De plus, les particularités qui permettent aux biomarqueurs d'intégrer une large gamme de facteurs écologiques, toxicologiques et environnementaux, lesquels contrôlent et modifient l'exposition aux xenobiotiques et leurs effets, déterminent leur faculté à être de puissants outils lors des campagnes de biosurveillance. Cependant, ces mêmes particularités compliquent l'interprétation des biomarqueurs en tant que « signaux d'alerte » d'effets

biologiquement significatifs de la présence des contaminants dans un écosystème étudié (Van der Oost *et al*., 2003). Ainsi dans les écosystèmes aquatiques naturels, où les conditions expérimentales ne sont pas complètement connues ni contrôlées, de nombreuses variables qui ne sont pas *a priori* liées à la contamination peuvent interférer avec les réponses des marqueurs biologiques, limitant de ce fait leur utilité dans les études de biosurveillance. Elles concernent l'organisme analysé (le sexe, l'age, le niveau trophique, l'état nutritionnel, l'activité métabolique, le comportement migratoire, le stade reproductif ou développemental de l'organisme), la population (la densité), les paramètres abiotiques (la saison, la température, l'hétérogénéité de la contamination).

Une autre limite concerne d'autres paramètres aléatoires liés aux milieux aquatiques naturels : la validation *in situ* des biomarqueurs requiert une connaissance des relations dose/réponse, donc la durée et le mode d'exposition, et le type de contamination par des substances particulières. Or, dans les écosystèmes naturels, des substances de sources diverses peuvent stimuler les mêmes biomarqueurs sur des périodes de temps variables. De même, la plupart des réponses biologiques ne sont pas spécifiques d'un xénobiotique particulier (Van der Oost, *et al*., 2003) et les organismes sont soumis à un ensemble de stress (Figure 3.3). Il est probable que des processus adaptatifs touchent les organismes vivant pendant de longues périodes en environnement pollué, grâce au renforcement de leurs défenses. Cette éventualité pourrait présenter une limite supplémentaire à l'usage biomarqueurs *in situ* (Orbea *et al*., 2002).

En conclusion, l'intérêt potentiel des biomarqueurs dans l'évaluation des risques environnementaux dus à la présence de polluants reste évident, cependant cette approche en milieu naturel doit être combinée aux autres méthodes de biosurveillance, y compris les approches chimiques et biologiques traditionnelles, ainsi que les approches statistiques et mathématiques (Allen et Moore, 2004).

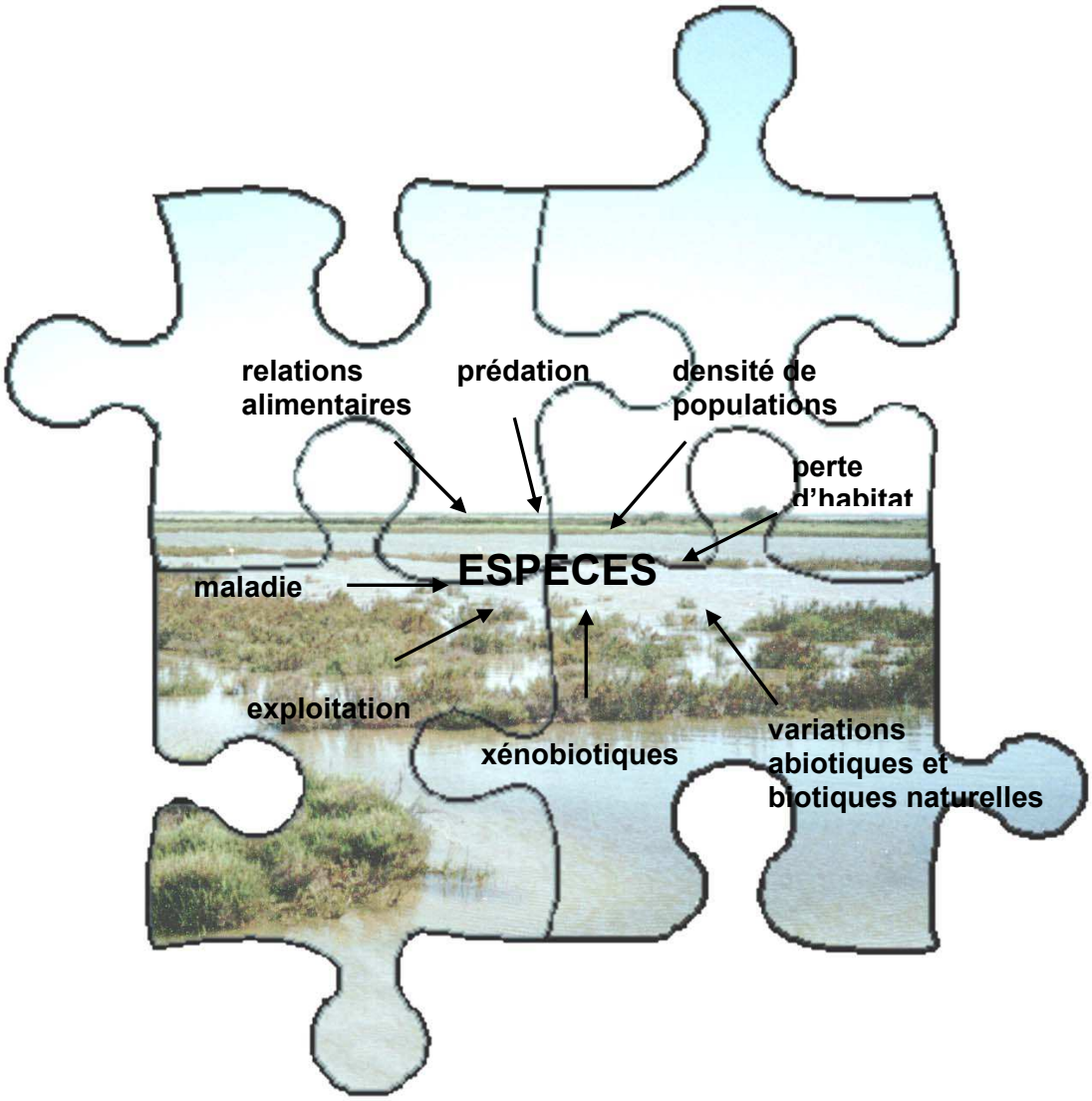


Figure 3.3 Sources de stress pour les organismes dans un écosystème aquatique

III.2.MATERIEL ET METHODES

III.2.1 Site de prélèvement et matériel biologique

Le site de La Capelière à l'est de l'étang de Vaccarès, composante principale de la Réserve de Biosphère de Camargue (Chapitre I) a constitué notre zone d'étude. Le biota analysé y a été collecté aux mois de mars, d'avril, de mai et de septembre 2002. Les techniques de capture des espèces et de collecte des échantillons sont détaillées dans le Chapitre I. Les caractéristiques des échantillons sur lesquels ont été réalisées les mesures biométriques et biochimiques sont présentés dans le Tableau 3.2. Ils sont issus des mêmes populations que les individus chez lesquels l'imprégnation tissulaire en OC et les niveaux trophiques ont été déterminés.

III.2.2 Biométrie et composition tissulaire

Les données morphométriques (détermination du poids, de la taille et de l'indice de condition) et constitutives (teneurs en graisses et répartition des classes de lipides tissulaires), ont été collectées chez la totalité des individus examinés grâce aux méthodes décrites dans le Chapitre I de ce manuscrit.

III.2.3 Analyses biochimiques

III.2.3.1 Préparation des échantillons

Les mesures des activités enzymatiques ont été effectuées sur les fractions post-mitochondriales du foie des poissons (échantillons regroupés à l'exception des anguilles) et des glandes digestives des cardiums (échantillons regroupés), sites principaux des processus métaboliques impliqués dans la biotransformation des xénobiotiques et les réponses de défense. Les organismes entiers ou les tissus prélevés ont été congelés à l'azote liquide (-120°C) immédiatement après la capture afin de prévenir toute altération *post mortem* des activités enzymatiques.

Tableau 3.2 Caractéristiques biométriques [min-max] et nombre d'analyses biochimiques effectués sur les organismes collectés dans l'étang de Vaccarès

	Taille (cm)	**Poids (g)**	**N mesures**				
			Mars 02	Avril 02	Mai 02	Sept 02	**Total**
anguille jaune	38,5-55,5	112-203	3	-	2	2	7
anguille juvénile	23,5-39	18-96,5	3	-	4	3	10
athérine	4,95-8,5	1,9-6,7	4	4	5	5	18
epinoche (♂)	2,2-4,5	0,13-1,35	3	5	5	-	13
gobie	3,1-6	0,49-1,91	5	4	5	5	19
cardium		*0,21-2,69	6		3	5	14

*poids individu sans coquille

III.2.3.1.1 Préparation des fractions post-mitochondriales

Les étapes de la préparation des fractions post-mitochondriales du foie et des glandes digestives sont schématisées dans le Schéma 3.1.

Les prélèvements de foie et de glandes digestives sont homogénéisés au Potter Elvehjem dans du tampon Tris 50 mM pH 7,4. Une centrifugation de l'homogénat à 5000 g et 4°C (1g), à l'aide d'une centrifugeuse Beckman J21C équipée d'un rotor angulaire, permet d'éliminer les débris tissulaires et les noyaux. Le surnageant S5 ou « homogénat clarifié » est ensuite centrifugé à 12000 g, 4°C avec la même centrifugeuse ou une centrifugeuse de paillasse (Eppendorf Amilabo) pour les échantillons de petit volume, pour récupérer la fraction S12 ou post-mitochondriale sur laquelle les mesures enzymatiques seront effectuées.

III.2.1.2 Précipitation de l'hémoglobine

L'hémoglobine interfère avec le dosage de certaines activités enzymatiques dont l'activité SOD, notamment dans un tissu hépatique très irrigué. Elle est donc précipitée lors du traitement d'un aliquote d'environ 500 µL de fractions post-mitochondriales auquel sont ajoutés 1/2 volume d'éthanol et 1/4 de volume de chlorofome. Une centrifugation 15 minutes à 14000 g à 4°C fait apparaître un anneau d'hémoglobine entre les phases polaire et apolaire. Seule la phase aqueuse supérieure (eau/éthanol) est prélevée et conservée pour les dosages de SOD.

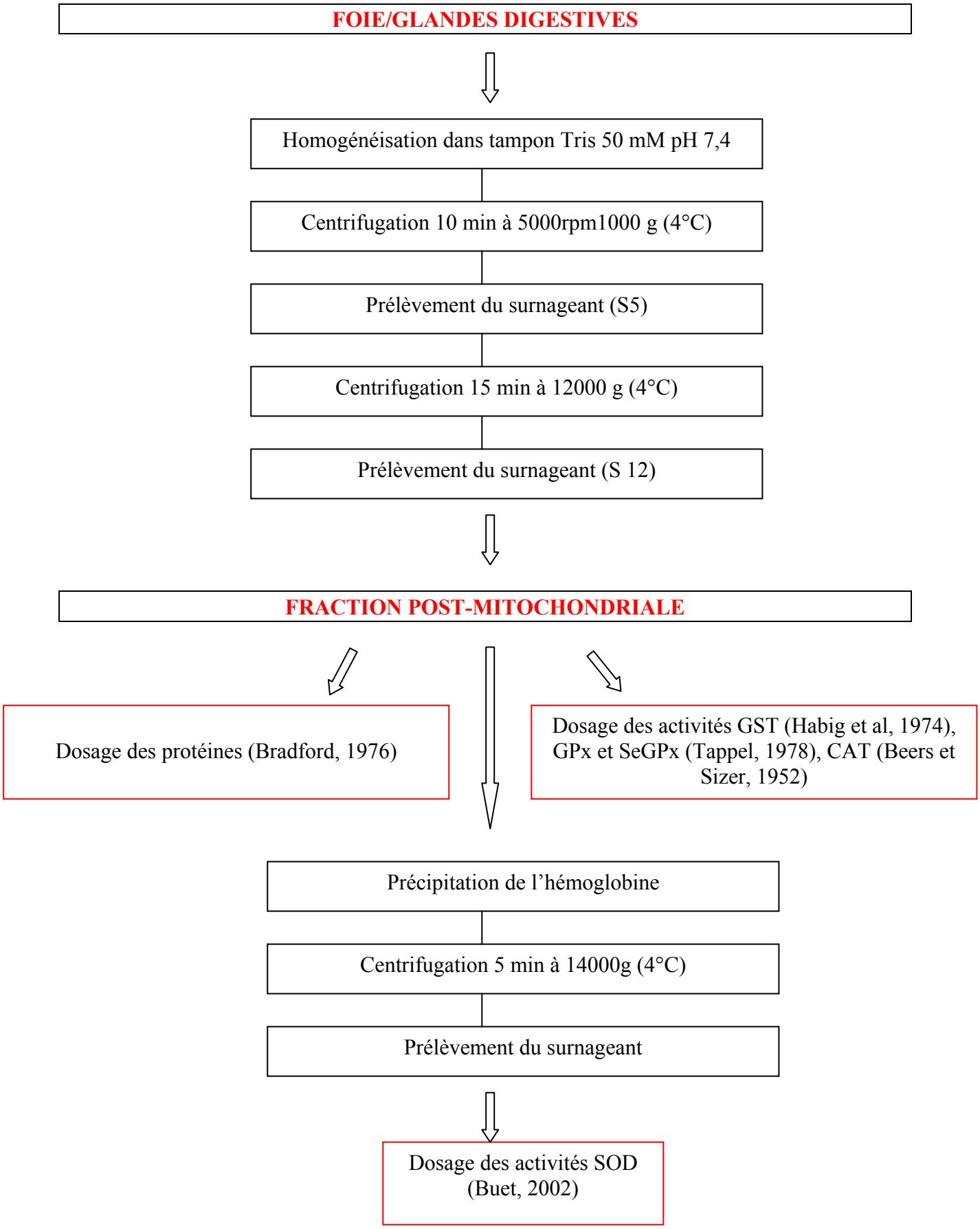


Schéma 3.1 Schématisation de la préparation des fractions post-mitocondriales du foie et des glandes digestives pour l'analyse des activités enzymatiques

III.2.2 Dosage des protéines

Les teneurs en protéines sont estimées par la méthode colorimétrique de Bradford (1976) au bleu de Coomassie. Le bleu de Coomassie existe sous trois formes: cationique, neutre et anionique. Sous sa forme anionique, il se fixe aux protéines par des interactions électrostatiques avec les groupements cationiques. Le complexe ainsi formé a la propriété d'absorber à 595 nm, la densité optique étant proportionnelle à la quantité de protéines dans l'échantillon. Une gamme est réalisée à partir d'une solution mère d'albumine sérique bovine à 2 $mg.mL^{-1}$.

III.2.3 Mesure des activités enzymatiques

III.2.3.1 Gluthation *S*-transférases

L'activité des glutathion *S*-transférases (GST) est mesurée sur les fractions post-mitochondriales d'après la technique spectrophotométrique de Habig *et al* (1974).

Le principe du dosage est basé sur la mesure de la cinétique d'apparition du thioéther formé lors de la conjugaison du substrat 1-chloro 2,4-dinitrobenzène (CDNB) avec le glutathion réduit (GSH) utilisé comme cofacteur. La solution réactionnelle (GSH 0,2mM, CDNB 0,2mM et tampon phosphate pH 7,2) est ajoutée à chaque échantillon et la densité optique est suivie à 340 nm.

Le coefficient d'extinction molaire du produit de conjugaison (9,6 mM/.cm) permet le calcul de l'activité enzymatique des GST, exprimée en micromoles de CDNB conjugué par minute et par mg de protéines.

III.2.3.2 Gluthation peroxydases

Les activités des gluthation peroxydases totales et sélénium dépendantes (GPx et SeGPx) sont évaluées selon la méthode de Tappel (1978) sur les fractions mitochondriales du foie des poissons et des glandes digestives des coques. Les GPx catalysent la dégradation du peroxyde d'hydrogène et des hydroperoxydes lipidiques par l'intermédiaire du glutathion réduit (GSH). Le glutathion oxydé (GSSG) est réduit par l'action de la glutathion réductase (GR) parallèlement à la transformation du NADPH en NADP. Les GPx assurent le recyclage du GSSG en GSH en présence d'un deuxième peroxyde: l'hydroperoxyde de cumène pour l'activité GPx totale et le peroxyde d'hydrogène pour l'activité peroxydasique sélénium-dépendante. Dans ce dernier cas, la présence dans le milieu réactionnel d'azide de sodium est nécessaire pour inhiber l'action des catalases et des autres peroxydases.

Les fractions post-mitochondriales sont pré-incubées 5 minutes à 25°C. Le réactif contenant le glutathion réduit GSH 2,4 mM, le NADPH 0,144 mM et la glutathion réductase 0,5 unités dans du tampon Tris-EDTA à pH 7,6 est ensuite ajouté avec, pour la Se-GPx, l'azide de sodium 3mM. La réaction est déclenchée par l'hydroperoxyde de cumène 0,24 M ou par le peroxyde d'oxygène à 30%. L'oxydation du NADPH est suivie au spectrophotomètre à 340 nm.

L'activité est exprimée en micromoles de NADPH consommées par minute et par mg de protéines avec un coefficient d'extinction molaire du NADPH de 6,22.

III.2.3.3 Catalase

L'activité de la catalase (CAT) est basée sur le suivi en UV à 240 nm de la dégradation du peroxyde d'hydrogène par l'enzyme. L'activité est exprimée en micromoles de peroxyde d'hydrogène consommées par minute et par mg de protéines (coefficient d'extinction molaire de H_2O_2 = 0,015).

III.2.3.4 Superoxyde dismutases cytosoliques

L'activité des superoxyde dismutases (SOD) est estimée sur les fractions post-mitochondriales hépatiques après précipitation de l'hémoglobine. La méthode de dosage est une adaptation de la technique originale de Misra et Fridovich (1972) explicitée en détails par Buet (2002). La mesure de l'activité SOD est basée sur l'inhibition, par la SOD, de l'oxydation des catécholamines par les radicaux libres de l'oxygène générés par le système enzymatique, hypoxanthine-xanthine oxydase à pH 7,4. Les réactions se déroulent à 25°C par la mise en présence de surnageant convenablement dilué (ou de solution de dilution exempte d'enzyme) et de solution réactionnelle tamponnée contenant de l'adrénaline (0,3 mM) et de l'hypoxanthine (1,1 mM), celle-ci présente une meilleure hydrosolubilité que la xanthine. La réaction est déclenchée par l'addition de xanthine oxydase. La cinétique de réaction est suivie au spectrophotomètre à 480 mm, jusqu'à ce que la réaction se trouve dans une phase ascendante linéaire. La ΔE (écart d'absorbance par minute) est alors calculée sur 4 minutes.
Les mesures sont également effectuées en absence de SOD et ces résultats, pris comme référence (contrôle), permettent d'évaluer le pourcentage d'inhibition de la réaction d'oxydation. L'unité SOD est définie de manière arbitraire comme donnant lieu à 50% d'inhibition.

L'absence de linéarité classique de la relation entre la quantité d'enzyme et l'inhibition (courbe en S) est contrecarrée par la mesure d'un nombre suffisant de réplicats pour linéariser la réponse de la réaction en faisant appel à de transformation log-logit.
On estime alors le volume de prise d'essai induisant une inhibition de 50% de la réaction et qui contient, par conséquent, 1 Unité SOD.

III.2.4 Analyses statistiques

Les principes d'analyse statistique et les tests utilisés sont expliqués dans les Chapitres I et II de ce manuscrit.

III. 3. RESULTATS

Dans un contexte de validation *in situ* de certains biomarqueurs « traditionnels », les résultats exposés ici montrent un aperçu des variations des paramètres biologiques et biochimiques considérés comme des réponses biologiques à une contamination par les micropolluants OC chez différentes espèces prélevées, au cours de l'année 2002, dans l'étang de Vaccarès. Comme les espèces concernées occupent divers emplacements trophiques d'un même écosystème, les résultats devraient contribuer l'évaluation de leur pertinence en tant que réponse biologique individuelle pouvant servir de signal d'alarme pour les niveaux écologiques supérieurs, comme la population et la communauté d'un écosystème aquatique.

III.3.1 Paramètres constitutifs des espèces du Vaccarès

Les teneurs en lipides et des indices de condition ont été évaluées chez les individus qui ont fait l'objet des analyses toxicologiques et isotopiques (Chapitre I et Chapitre II).

III.3.1.1 Lipides tissulaires

Les données rapportées dans le Chapitre II n'ont pas permis de mettre en évidence de relation entre les concentrations en contaminants lipophiles et la charge en lipides des organismes. Néanmoins les variations de la teneur lipidique à la période de forte activité alimentaire coïncidant, en outre, à un niveau de contamination maximale, fournissent des informations sur le métabolisme lipidique et l'état nutritionnel des individus dans des conditions de contamination chronique (Chapitre II).

La teneur en lipides ainsi que la répartition des lipides neutres et des phospholipides chez les espèces les plus stables du Vaccarès ont été mesurées aux mois de mars, d'avril, de mai et de septembre (Tableau 3.3).

Les concentrations lipidiques les plus élevées sont détectées au début du printemps, en mars, chez toutes les espèces de poissons et chez les crevettes grises. Les autres invertébrés, cardiums et crevettes roses, sont plus chargés en lipides au mois d'avril. Il s'agit principalement de lipides neutres (triglycérides notamment), ce qui caractérise une reprise alimentaire post-hivernale relativement précoce dans cet écosystème ou les variations thermiques ont été relativement limitées. Cependant l'accumulation des réserves lipidiques en

Tableau 3.3 Paramètres biologiques des espèces du Vaccarès au cours de l'année 2002 (en gris les valeurs les plus élevées, en rouge les valeurs qui s'éloignent de l'équilibre poids frais-poids total (pour les cardiums), taille-poids (pour les autres animaux) ; 3<n mesures < 6, cf. Tableau 1.3)

	LIPIDES TOTAUX (mg/gTS)				LIPIDES NEUTRES (mg/gTS)			PHOPHOLIPIDES (mg/gTS)			INDICE DE CONDITION			
	Mars	**Avril**	**Mai**	**Sept**	**Mars**	**Avril**	**Mai**	**Mars**	**Avril**	**Mai**	**Mars**	**Avril**	**Mai**	**Sept**
Cardium	66,3 ±11,0	109 ±28,2	67,8 ±3,83	70,5 ±14,1	35,1 ±5,95	66,8 ±25,0	25,8 ±1,39	31,2 ±6,37	42,5 ±3,21	41,9 ±2,57	1,05 ±0,05	0,91 ±0,03	1,03 ±0,06	1,41 ±0,06
Gammare	-	38,1 ±2,68	87,0	115 ±48,3	-	33,3 ±3,23	11,5	-	4,74 ±0,97	75,4	-	0,96 ±0,14	1,3	
Crevette grise	92,3 ±6,34	52,4 ±9,73	61,3 ±8,41	74,8 ±12,2	48,3 ±3,32	26,7 ±3,57	18,2 ±1,45	44,0 ±3,02	27,8 ±6,3	21,5 ±2,17	1,09 ±0,07	0,97 ±0,06	1,08 ±0,04	1,06 ±0,07
Crevette rose	84,3 ±11,3	104 ±9,81	72,8 ±7,22	82,9 ±17,8	59,8 ±8,47	22,3 ±5,94	23,3 ±2,71	24,5 ±4,1	82,6 ±11,8	49,5 ±6,73	0,96 ±0,03	1,27 ±0,10	1,12 ±0,02	0,87 ±0,07
Athérine	169 ±12,4	83,2 ±11,0	117 ±26,0	123 ±13,2	131 ±13,0	17,9 ±4,69	30,1 ±6,12	38,1 ±7,73	65,3 ±11,4	87,1 ±20,1	1,02 ±0,03	1,09 ±0,06	1,11 ±0,04	0,98 ±0,03
Epinoche	134 ±21,9	97,1 ±13,3	89,1 ±16,9	41,9 ±13,9	78,2 ±21,6	55,8 ±8,87	19,6 ±1,68	55,8 ±3,44	40,1 ±5,95	69,5 ±17,1	1,35 ±0,12	0,93 ±0,08	0,96 ±0,08	1,08 ±0,17
Gobie	137 ±7,64	94,7 ±13,3	135 ±11,5	127 ±30,1	106 ±6,94	57,1 ±9,25	50,7 ±4,50	31,7 ±2,96	37,6 ±4,4	101 ±11,5	0,93 ±0,04	1,23 ±0,15	1,07 ±0,06	1,08 ±0,04
Anguille juvénile	203 ±63,4	-	139 ±24,4	146 ±33,8	175 ±63,4	-	16,4 ±0,95	27,6 ±0,06	-	123 ±25,0	0,88 ±0,14	-	0,86 ±0,19	1,04 ±0,07
Anguille jaune	370 ±84,0	-	196 ±37,4	375 ±96,5	324 ±72,7	-	11,1 ±2,78	46,6 ±12,78	-	185	0,79 ±0,04	-	0,71	1,40 ±0,27

fin de période estivale (septembre) est également très significative, de manière particulièrement prononcée chez les anguilles jaunes.
Les phospholipides tissulaires sont élevés en mai chez les poissons, en avril chez les cardiums et crevettes roses et en mars chez les crevettes grises. Cette variabilité découle des variations interspécifiques de métabolisme et de synthèse des lipides de structure.

III.3.1.2 Indices de condition

La relation taille-poids exprimée par l'indice de condition donne une des premières informations sur l'état de santé des individus. Sur le Tableau 3.3 figurent en rouge les échantillons dont l'indice de condition (K) indiquent un éloignement de l'équilibre taille-poids: $0.85<K<1.15$. Ces limites ont été déterminées pour chaque espèce à partir des histogrammes de fréquences des valeurs K sur l'ensemble des individus examinés.
La population d'anguilles jaunes montre un certain déséquilibre indépendamment de l'époque de prélèvement. D'autres espèces montrent occasionnellement une surcharge pondérale ce qui pourrait suggérer un éventuel effet d'une contamination chronique et persistante par les contaminants OC sur la croissance ou l'assimilation des nutriments chez ces espèces.

III.3.1.3 Indices de condition – biomarqueurs de la contamination par les micropolluants OCs ?

L'analyse des corrélations entre les indices de conditions et les teneurs en contaminants OC est réalisée par le test de Pearson. Les relations significatives sont reportées dans le tableau 3.4.

Sur l'ensemble des individus des espèces examinées peu de corrélations sont mises en évidence. Elles concernent les crevettes grises chez lesquelles l'indice de condition augmente avec la concentration en *pp*'-DDE et 2 congénères de PCB (8 et 153). Néanmoins, dans ce cas, ces contaminants sont en faible concentration.

Si l'on s'intéresse uniquement à la classe de contamination élevée, les corrélations sont plus nombreuses et toujours négatives. Ce constat suggère qu'une imprégnation accrue de certains contaminants entraînerait un déficit pondéral. C'est le cas du *pp'*-DDE, de l'aldrine et de la dieldrine chez les crevettes grises et de l'HCB chez les athérines, ainsi que des tétra-CB chez les anguilles juvéniles et des di- et tri-CB chez les anguilles jaunes. Cette observation confirme, en outre, chez cette espèce, la différence de sensibilité liée à l'âge vis-à-vis des molécules de PCBs lourdes ou légères.

Tableau 3.4 Corrélations de Pearson entre les indices de condition calculé sur l'ensemble de la population (K) et sur la classe « très contaminée » (K_{++} ; $1<nK_{++}<16$) (+=p<0,05, même sens d'évolution des variables ; -= p<0,05, sens opposé d'évolution des variables)

	Crevette grise		**Athérine**		**Gobie**		**Anguille juvénile**		**Anguille jaune**	
	K (27)	K_{++}	**K** (27)	K_{++}	**K** (26)	K_{++}	**K** (20)	K_{++}	**K** (12)	K_{++}
HCB				-						
***pp*'-DDE**	+	-								
Aldrine		-								
δ HCH		-								
Fipronil						+				
DiCB										-
TriCB										-
TetraCB								-		
Congénère 8	+									
Congénère 153	+									

Tableau 3.6 Corrélations de Spearman entre les activités enzymatiques et l'imprégnation tissulaire en xénobiotiques organiques chez les anguilles

	Anguille juvénile (10)	**Anguille jaune** (6)
SOD *vs* heptachlor	p=0,03 (-)	
CAT *vs* endosulfan-sulfate	p=0,01 (+)	
GPx *vs* α HCH **aldrine** **heptachlor-epoxyde** **endrine**	p=0,05 (-) p=0,04 (-) p=0,03 (-) p=0,005 (-)	
SeGPx *vs* lindane	p=0,04 (+)	
GST *vs* endosulfan-sulfate	p=0,02 (+)	

III.3.2 Biomarqueurs enzymatiques

Les activités des enzymes de détoxication (GST, CAT, GPx, Se-GPx et SOD) ont été mesurées chez les cardiums, les athérines, les gobies, les épinoches et les anguilles du Vaccarès échantillonnés aux mois de mars, d'avril, de mai et de septembre 2002 (n ≥5 par mois).

III.3.2.1 Activités enzymatiques chez les espèces de différents niveaux trophiques du réseau du Vaccarès

Il a été technologiquement possible de mesurer l'activité de toutes les enzymes à tous les niveaux trophiques, à l'exception de la SeGPx qui n'a pas été détectée chez les bivalves filtreurs du Vaccarès, les cardiums. Les variations temporelles des activités des enzymes antioxydantes et des enzymes de biotransformation figurent dans le Tableau 3.5. Issues d'une population normale, les activités mesurées au sein des mêmes espèces aux périodes différentes ont été comparées en utilisant l'ANOVA suivie par le test t. Les résultats mettent en évidence, d'une part l'absence de variations temporelles significatives des activités enzymatiques chez les cardiums et d'autre part l'existence d'une variation saisonnière chez quelques espèces de poissons pour certaines enzymes.

Chez les épinoches, la GPx et la SeGPx sont significativement plus actives au mois de mai et il en est de même pour la CAT qui est également stimulée chez les athérines.
Chez les gobies, la CAT et la GPx sont plus actives au mois de mars et la GST en septembre.
Chez les anguilles (jaunes et juvéniles) l'optimum d'activité de la CAT est en mai, celui de la GPx en mars et de la GST en septembre. Les activités SOD ne montrent pas d'évolution saisonnière significative, néanmoins, on note une tendance à l'augmentation de mars à septembre chez toutes les espèces de poissons.

Ces variations interspécifiques trouvent leur explication dans la relation entre les activités enzymatiques et les activités métaboliques des espèces d'une part et les facteurs physico-chimiques du milieu d'autre part.

III.3.2.2 Influence de facteurs non toxicologiques sur les activités biochimiques

Le test de Pearson a été utilisé afin d'analyser les corrélations éventuelles entre les paramètres biométriques de base, la taille et le poids et le niveau d'activité d'enzymes de détoxication. De rares corrélations significatives et positives sont mises à jour uniquement

Tableau 3.5 Variations saisonnières des activités enzymatiques chez les organismes du Vaccarès au cours de l'année 2002 ([a] valeurs significativement plus élevées (test t de Student $p<0.05$) en mars, [b] en mai, [c] en septembre, 3<n mesures<6, cf. Tableau 3.2)

		C. glaucum	***A. boyeri***	***G. aculeatus***	***Pomastoschistus sp.***	***A.anguilla***
SOD (U/mg protéine)	*Mars*	5,48 ±0,7	5,86 ±0,65	3,63 ±1,03	3,99 ±1,04	11,3 ±6,15
	Avril	-	2,75 ±0,67	1,44 ±0,13	1,75 ±0,35	-
	Mai	3,36 ±1,22	8,54	5,48 ±1,63	3,76 ±0,49	17,1 ±3,33
	Sept	8,63 ±4,19	14,7 ±2,54	-	5,22 ±1,08	15,5 ±5,99
CAT (µM/mg protéine)	*Mars*	162 ±19,2	85,0 ±11,5	32,1 ±4,72	83,2[a] ±13,8	68,2 ±11,2
	Avril	-	71,4 ±8,78	24,1 ±3,68	16,9 ±2,05	-
	Mai	140 ±23,3	290[b] ±97,3	86,6[b] ±20,8	39,7 ±2,51	326[b] ±50,9
	Sept	132 ±44,9	251 ±84,2	-	38,1 ±8,07	30 ±59,0
GPx (µM/mg protéine)	*Mars*	nd	147 ±34,4	102 ±12,0	307[a] ±37,5	154[a] ±29,2
	Avril	-	75,9 ±28,3	131 ±37,7	54,0 ±12,5	-
	Mai	30,5 ±21,5	nd	342[b] ±122	106 ±15,6	58,9 ±7,08
	Sept	42,9 ±19,4	92,3 ±20,7	-	80,7 ±25,4	73,1 ±7,17
Se-GPx (µM/mg protéine)	*Mars*	nd	52,8 ±7,96	71,1 ±15,6	105[a] ±21,7	26,7 ±7,85
	Avril	-	nd	43,2 ±22,4	46,3 ±22,2	-
	Mai	nd	nd	199[b] ±61,7	75,6 ±44,3	59,9 ±31,6
	Sept	nd	87,4 ±49,7	-	30.7 ±10.6	172 ±115
GST (µM/mg protéine)	*Mars*	77,8 ±22,1	55,2 ±29,2	73,9 ±16,5	66,6 ±11,0	152 ±48,2
	Avril	-	19,5 ±4,49	21,6 ±2,44	28,5 ±5,77	-
	Mai	30,8 ±6,53	48,8 ±15,5	79,6 ±7,72	62,1 ±4,16	333 ±20,8
	Sept	32,2 ±11,5	106 ±44,5	-	92,2[c] ±13,3	405[c] ±43,3

chez les espèces prédatrices secondaires (*G. aculeatus* et *Pomatoschistus sp.*) et les espèces superprédatrices (*A. anguilla* jaune). Elles concernent la GPx chez les épinoches, positivement corrélée avec le poids et la taille, la SOD chez les gobies, avec le poids, et la GST chez les gobies, corrélée avec le poids et la taille, et chez les anguilles jaunes corrélée avec la taille. Ces diverses observations soulignent l'influence du « développement » corporel souvent lié à l'âge ou la maturité des individus.

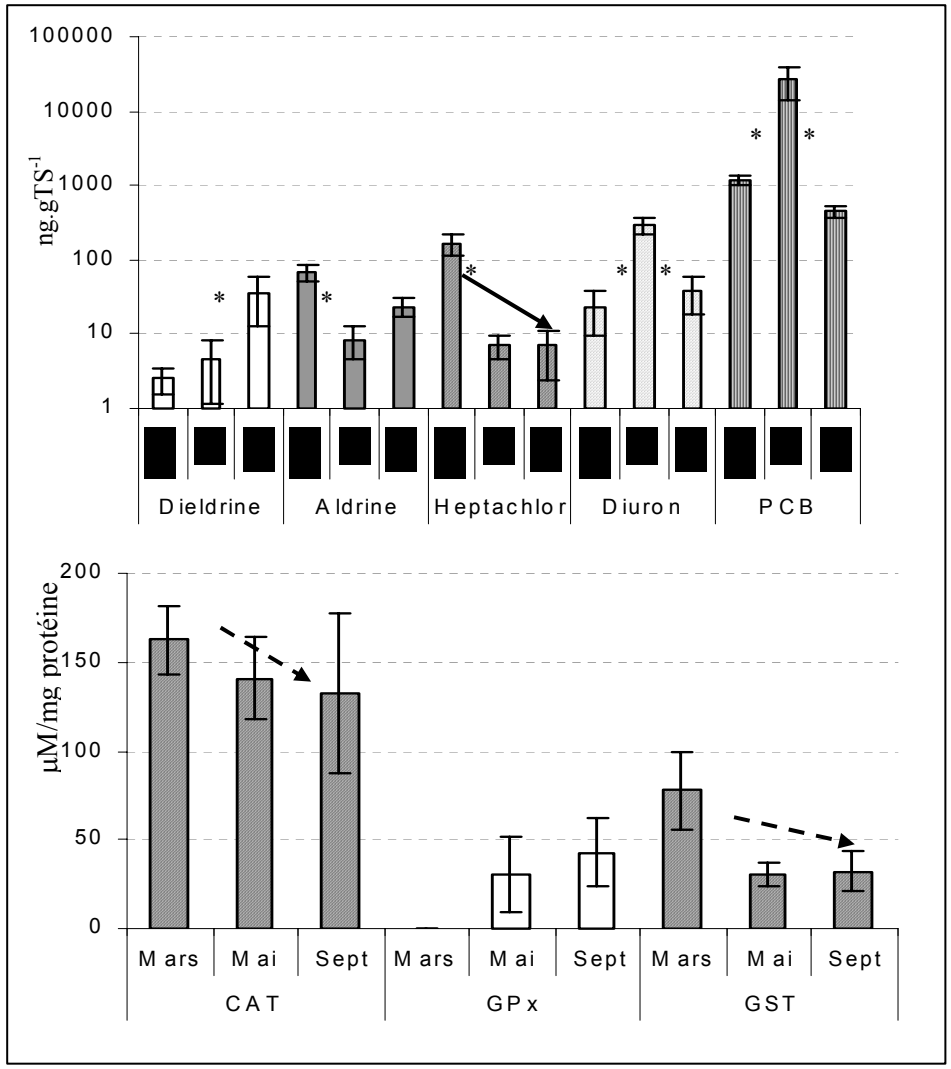
III.3.3 Réponses biologiques à la contamination par les polluants OC

Afin d'analyser l'effet des contaminants sur l'activité des enzymes de détoxication, les corrélations entre ces activités et le niveau d'imprégnation musculaire en micropolluants OCs chez les anguilles ont été évaluées en utilisant le test de Spearman à cause de l'effectif réduit.
Des corrélations « anarchiques » et relativement peu nombreuses, eu égard à la gamme de variables considérées, ont été mises en évidence chez les anguilles juvéniles exclusivement (Tableau 3.6). Ces corrélations désordonnées remettent en question la validité de ces activités enzymatiques hépatiques en tant que biomarqueurs significatifs d'une contamination relativement faible mais constante dans un écosystème protégé tel que l'étang de Vaccarès. Cependant, il est difficile de tirer des conclusions rigoureuses étant donné le nombre d'échantillons analysés très réduit (10 anguilles juvéniles et 6 anguilles jaunes). On peut également s'interroger sur la pertinence de l'anguille en tant qu'organisme sentinelle.

III.3.3.1 Variations des activités enzymatiques – réponses aux variations de la contamination par les micropolluants OCs ?

Chez les cardiums, les athérines, les épinoches et les gobies, nous avons tenté de rechercher une éventuelle correspondance entre l'évolution saisonnière de la contamination par les OC les plus abondants (heptachlor, diuron, PCBs) et les plus persistants (dieldrine, aldrine) et les variations des activités enzymatiques. Ces deux analyses ont été effectuées chez des individus différents, mais appartenant à la même population et capturés au même endroit lors de la même campagne de prélèvement.
Les Figures 3.4-3.7 présentent la superposition des profils de variations saisonnières de la contamination et des activités enzymatiques.
Généralement, les cardiums montrent un optimum de contamination par la totalité des composés OC au mois de mai. Or, en mai, les activités enzymatiques détectées ne sont pas les plus élevées. Cependant, si l'on considère séparément les différents OC, une correspondance

C. glaucum



A.boyeri

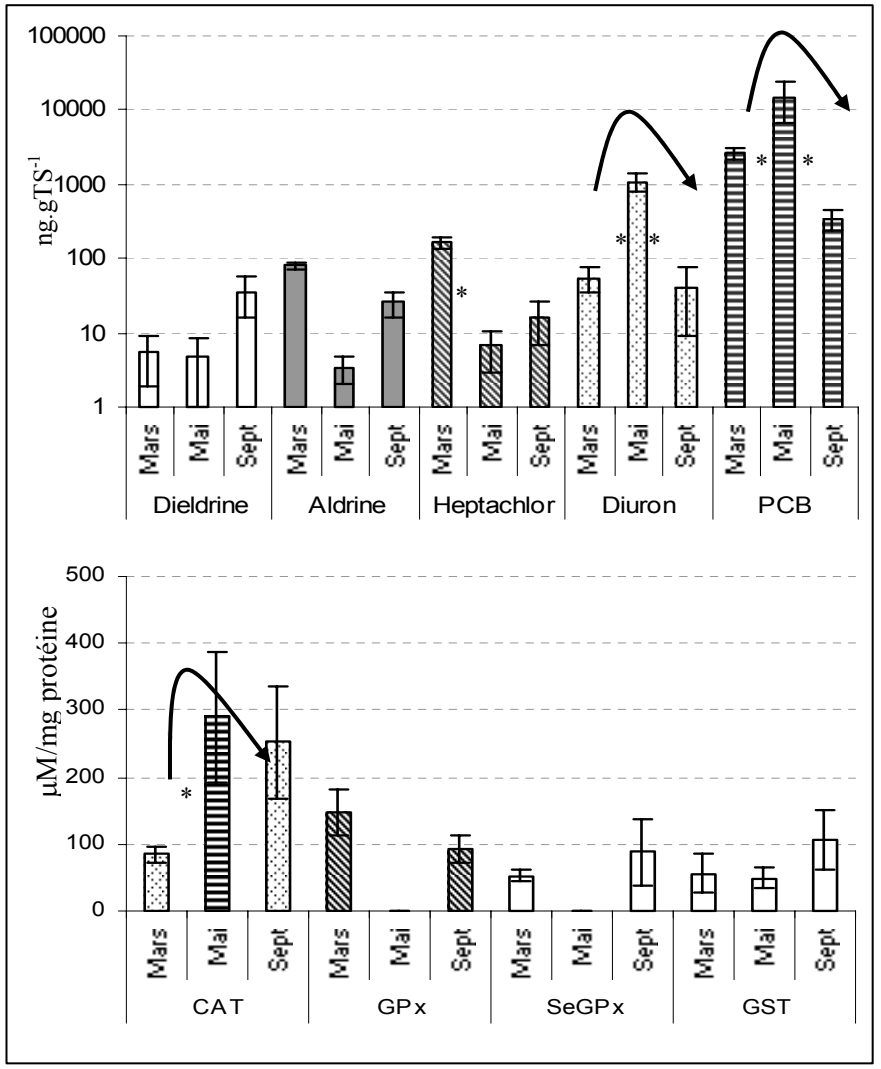
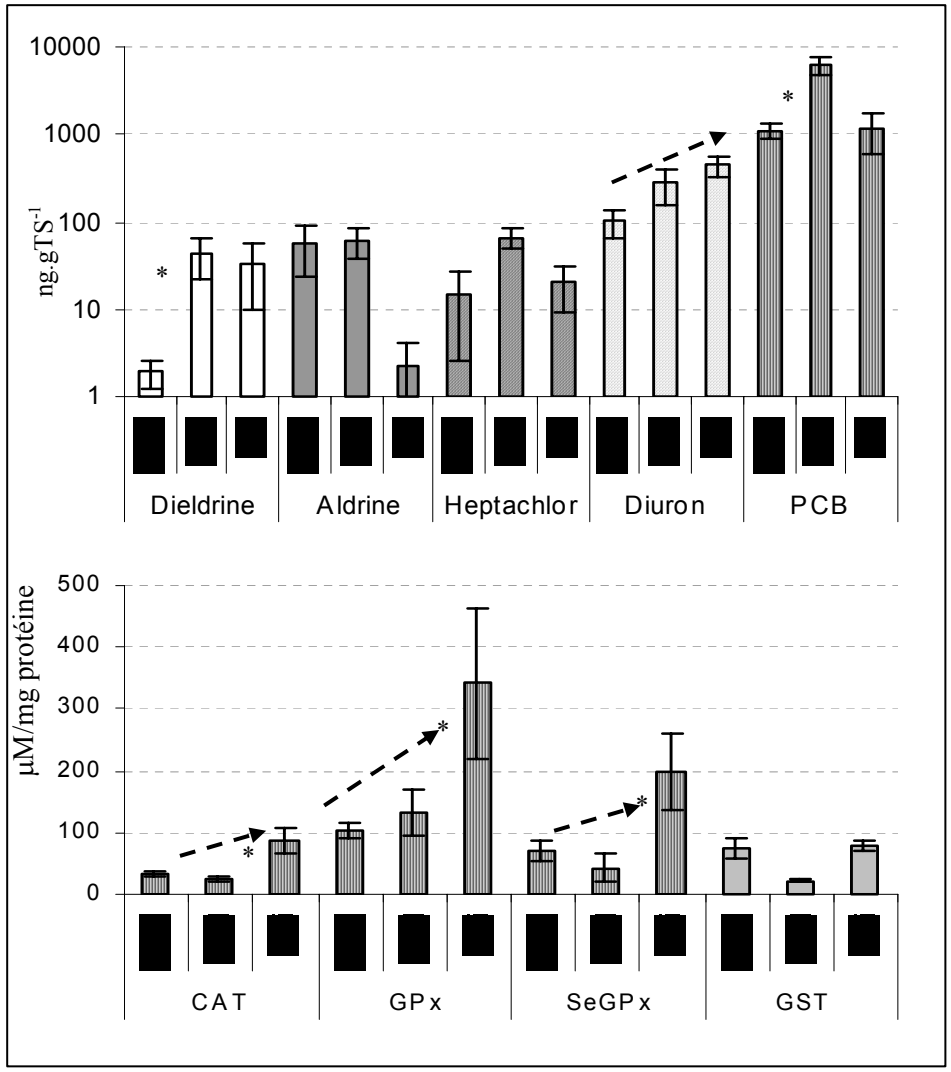


Figure 3.4 – Figure 3.5 Variations saisonnières de l'imprégnation tissulaire et des activités enzymatiques de défense chez le cardium et l'athérine (* variations significatives, test t de Student $p<0,05$)

G. aculeatus



Pomatoschistus sp.

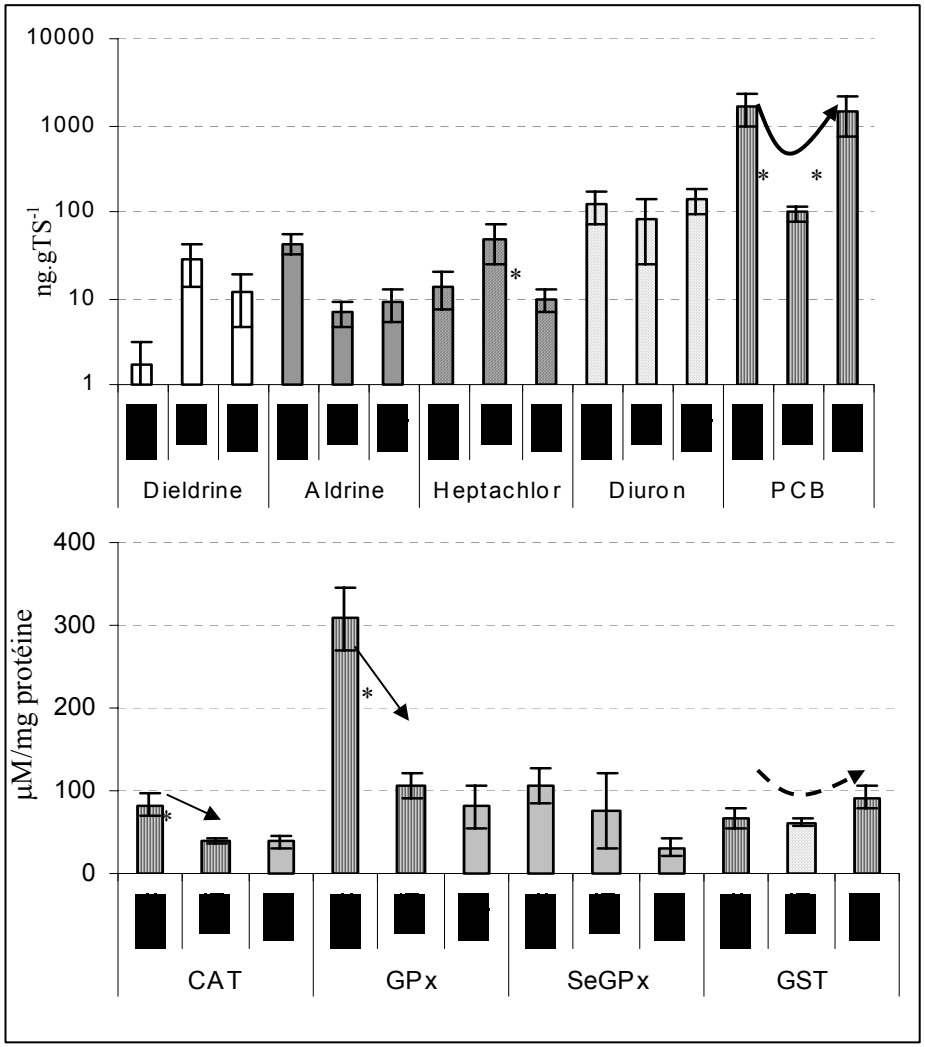


Figure 3.6 – Figure 3.7 Variations saisonnières de l'imprégnation tissulaire et des activités enzymatiques de défense chez l'épinoche et le gobie (* variations significatives, test t de Student $p<0,05$)

se manifeste entre les activités de la **GST** et les niveaux de contamination en **heptachlor** (qui diminue de mars à septembre).
Les athérines sont plus imprégnées au mois de mai ce qui correspond au maximum d'activité de la CAT. De plus, le profil saisonnier des activités de la **CAT** suit parfaitement les profils des deux types de composés OC les plus abondants, le **diuron** et les **PCBs**.
En remontant dans l'échelle trophique, chez les épinoches (dont les analyses concernent les mois de mars, d'avril et de mai) on observe une correspondance, bien que moins flagrante, entre l'évolution de la **CAT**,de la **GPx** et de la Se-GPx, et la concentration en **diuron**, qui augmente de mars à mai. Enfin, chez les gobies, contrairement aux autres espèces, les contaminations les plus élevées s'observent en mars et en septembre (**aldrine**, diuron, **PCBs**) elles correspondent à une augmentation de l'activité de la **GST**. La CAT et de la GPx montrent également une diminution en mai par rapport au mois de mars, cependant, ces activités restent faibles en septembre.

Ces observations, bien que statistiquement peu significatives, argumentent la discussion sur la conformité des activités enzymatiques en tant que biomarqueurs fiables. De plus, la variabilité des réponses à différents maillons du réseau trophique aquatique étudié, exclut la vraisemblance d'un biomarqueur universel de la contamination en OC indépendant de l'espèce considérée. En ce qui concerne l'une des principales enzymes antioxydantes, la SOD, la tendance à l'augmentation d'activité, mise à jour chez toutes les espèces analysées, du printemps (mars) vers l'automne (septembre) pourrait être liée à des facteurs métaboliques naturels, masquant de ce fait un éventuel effet d'une contamination par les micropolluants. Ceci confirme la difficulté de faire abstraction de facteurs métaboliques propres à l'espèce.

III. 4.DISCUSSION

Le nombre élevé de micropolluants OCs présents à tous les niveaux du réseau trophique de l'étang de Vaccarès constitue une importante source de stress chimique affectant la composante biotique de cet écosystème paralique (Chapitre II). Afin d'en évaluer un éventuel effet « précoce », nous avons eu recours à l'analyse de certains biomarqueurs traditionnels.

Le défi majeur de l'utilisation de biomarqueurs repose sur l'intégration des réponses individuelles à des conditions de stress dans un ensemble d'outils et d'indices capables de détecter et de surveiller l'état sanitaire des organismes (Allen et Moore, 2004). La démarche suivante consiste en l'extrapolation des résultats à des niveaux supérieurs de l'organisation biologique. Dans cette optique, nous avons analysé des paramètres constitutifs des espèces du Vaccarès, les teneurs en lipides et les indices de condition chez les individus qui ont fait l'objet des analyses toxicologiques et isotopiques (Chapitre I et Chapitre II), et les activités d'enzymes antioxydantes chez d'autres individus, mais issus de la même population, c'est-à-dire capturés dans le même site et lors de la même campagne de prélèvement.

La charge lipidique en tant que facteur biologique déterminant le niveau de bioaccumulation des composés OCs a été considérée dans le Chapitre précédant. Ici nous nous intéressons à la constitution lipidique en tant qu'indicateur du métabolisme lipidique et de l'état nutritionnel des individus dans des conditions de stress environnemental (Larsson et la, 2000). La concentration en lipides suit les variations naturelles liées à la disponibilité des nutriments et l'activité alimentaire conséquente, ainsi qu'aux différences interspécifiques du métabolisme et de la synthèse des phospholipides (Zwingelstein, 1981 ; Fremont et Léger, 1981), indépendamment des considérations écotoxicologiques.

Un autre paramètre morphométrique a été utilisé pour définir l'état sanitaire des organismes (Van der Oost *et al*, 2003). Une relation taille-poids, ou indice relatif de condition K est l'une des mesures classiquement utilisées pour estimer l'équilibre pondéral chez les organismes aquatiques (Roche, 1998). La recherche de corrélations entre le taux de contamination et l'indice de condition pour la classe d'espèces dont la contamination est très élevée, a mis en évidence un déficit pondéral lié à une imprégnation accrue par le *pp'*-DDE, par l'aldrine et la dieldrine chez les crevettes grises, par l'HCB chez les athérines, ainsi que

par les tétra-CB chez les anguilles juvéniles et les di- et tri-CB chez les anguilles jaunes. Ce déficit pondéral associé à une contamination persistante (il s'agit de molécules très persistantes dans l'écosystème considéré) pourrait être la conséquence de la chronicité de la contamination de l'environnement. Les organismes utilisent, alors, plus d'énergie en réponse au stress chimique ce qui réduit la fraction énergétique disponible pour la croissance, comme l'ont indirectement démontré Toro *et al* (2003) dans une population de mollusques *Choromytilus chorus* exposée à des polluants organiques, des OCs et des hydrocarbures aromatiques polycyclique (HAPs). Cependant, des analyses supplémentaires sont nécessaires pour confirmer cette hypothèse, puisque une réponse physiologique au stress dépend, dans une large mesure, des conditions naturelles, telles que la disponibilité des nutriments, l'activité alimentaire, le cycle vital, et les fluctuations des paramètres physico-chimiques du milieu.

Les réponses biochimiques chez les organismes aquatiques sont fréquemment utilisées, certaines homologuées (ou en cours d'homologation) en tant que biomarqueurs d'exposition aux contaminants toxiques (Cheung *et al*, 2002 ; Solé, 2000 ; Corsi *et al*., 2003). Dans cette étude, nous nous sommes intéressés aux activités enzymatiques de défense contre les radicaux libres de l'oxygène. A part la SeGPx, dont les activités sont inférieures à la limite de détection chez les cardiums, les activités antioxydantes (GST, SOD, CAT, GPx et SeGPx) mesurées chez toutes les espèces examinées confirment la capacité de défense contre les oxyradicaux chez la plupart des organismes aquatiques (Winston et DiGiulio, 1991).
Or, les radicaux libres oxygénés peuvent être induits par des molécules exogènes, comme les micropolluants organiques ou métalliques, mais ils sont aussi constamment générés lors de nombreuses réactions métaboliques induites par des molécules endogènes et à ce titre ils dépendent de la biologie et la physiologie des espèces considérées (Ruus *et al*, 2003).
Les corrélations significatives et de sens positif entre certaines activités enzymatiques et données morphologiques descriptifs soulignent, dans cette étude, l'influence des paramètres biométriques, souvent liés à l'âge ou à la maturité indépendamment du niveau de contamination des individus, ce qui limite la portée des biomarqueurs antioxydants

Le principe des biomarqueurs est basé sur une réponse individuelle à une condition de stress chimique. C'est la raison pour laquelle, dans les études *in situ*, certains écotoxicologues cherchent à établir la validité de biomarqueurs biochimiques en se basant sur une population témoin, *a priori* dépourvue de ce type de stress (Cossu *et al*, 1997). Au contraire, comme dans notre étude, en l'absence de population témoin, la validité des biomarqueurs

antioxydatifs a été évaluée en comparant les variations de ces paramètres avec celle de la contamination. Cette analyse n'a pas donné les résultats escomptés, en effet il est difficile de démontrer la fiabilité de ces paramètres biochimiques comme indicateurs d'une contamination par les OCs en raison du caractère chronique de celle-ci chez les organismes de l'étang de Vaccarès et de son ancienneté.

Chez les anguilles juvéniles, l'hétérogénéité des réponses, dénote les interactions complexes de la vaste gamme de micropolluants organiques comme métalliques , auxquels sont exposés les organismes. Elle entraîne des difficultés d'interprétation qui sont inéluctables *in situ* - une interprétation rigoureuse devrait tenir compte de l'influence potentielle, de tous les contaminants présents dans le milieu, une tâche qui se révèle extrêmement difficile dans les conditions réelles des écosystèmes aquatiques naturels (Cheung *et al*, 2002). Cependant, nos résultats s'accordent avec les suggestions de Buet (2002) sur les différences des réponses enzymatiques relatives à la localisation tissulaire de l'imprégnation chez les anguilles. Ainsi, les activités enzymatiques hépatiques répondent plus à une accumulation musculaire chez les anguilles juvéniles, révélant l'importance de la maturité en tant que facteur déterminant les capacités de détoxication chez cette espèce.

Chez les cardiums, les athérines, les épinoches et les gobies, les variations saisonnières des activités enzymatiques ont été analysées parallèlement aux variations de la contamination par les OC les plus abondants (heptachlor, diuron, PCBs) et les plus persistants (dieldrine, aldrine) chez les individus différents. Rappelons que, des variations significatives de contamination ont été observées surtout chez les cardiums (Chapitre II) ce qui conforte en premier lieu, l'utilité de ces filtreurs dans les études de biosurveillance et en deuxième lieu, l'existence d'une contamination chronique dans l'écosystème étudié. Par ailleurs, l'étude enzymatique a mis en évidence l'absence de variation temporelle significative chez les cardiums, mais l'existence d'un effet saisonnier chez quelques espèces de poissons, pour certaines enzymes. Pour résumer - stimulation en mai de la GPx, la SeGPx chez les épinoches, -de la CAT chez les athérines. Chez les gobies, la CAT et la GPx sont plus actives au mois de mars et la GST au mois de septembre). Les correspondances entre les profils saisonniers des activités enzymatiques et l'amplitude de l'imprégnation sont décelées pour la GST et l'heptachlor chez les cardiums, la CAT et le diuron ainsi que les PCBs chez les athérines, de la CAT, la GPx et la SeGPx et le diuron chez les épinoches et finalement de la GST et de l'aldrine plus les PCBs chez les gobies. Pour résumer, la variabilité des réponses à différents maillons du réseau trophique, exclut la validation d'un biomarqueur universel de la contamination en OC indépendant de l'espèce. Cependant, si l'on part du principe que les

activités enzymatiques doivent augmenter dans les conditions d'une contamination accrue, conformément à l'hypothèse de départ, alors la CAT, la GST et la GPx pourraient être prises en compte comme éventuels signaux d'alerte dans le cas d'une contamination par les xénobiotiques en solution ou en dispersion dans l'eau, transférés chez les organismes *via* les mécanismes de diffusion directe (diuron, heptachlor et les PCBs) (Chapitre II). Il serait intéressant de voir si cette réponse est encore plus forte et significative au niveau des branchies qui constituent la première et une des principales surfaces d'absorption des contaminants en milieu aquatique (Sayeed *et al*, 2003). De plus, contrairement, aux biomarqueurs biométriques, les biomarqueurs biochimiques ne semblent pas répondre à une contamination de faible intensité mais persistante, dont la rétention dans le biota est assurée principalement *via* un transfert trophique (dieldrine) ce qui maintient une contamination chronique des organismes. Ces résultats suggèrent que la contamination chronique induit un processus adaptatif et, dans un contexte de tolérance, l'utilité des biomarqueurs repose sur le fait que seuls les contaminants exerçant une pression sélective sont biologiquement significatifs et susceptibles d'induire une réponse biologique individuelle suivie par des changements structurels de la communauté contaminée (Orbea *et al*, 2002)

Ces réflexions renforcent les considérations largement développées depuis quelques années, d'une part, les biomarqueurs biochimiques possèdent un réel potentiel d'alarme *in situ*, d'autre part la variabilité des réponses découle de l'influence de différents facteurs biotiques et abiotiques. Ainsi on ne peut pas exclure l'effet de la disponibilité des nutriments, de la température de l'eau (Niyogi *et al*, 2001), du pH (Roillard *et al*, 2003) de la salinité (Roche *et al*, 1989 ; Roche et Bogé, 1996), des variations saisonnières (Bacanskas *et al*, 2004 ; Power et Sheehan, 1996), de l'âge, du sexe (Ruus *et al*, 2003), de la localisation tissulaire de la contamination (Roche *et al*, 2004).

Finalement, on doit aussi s'interroger sur le choix d'espèce sentinelle. Dans l'écosystème étudié, les anguilles et les cardiums représentent en théorie de bonnes espèces sentinelles grâce à leur capacité d'accumulation des contaminants biodisponibles dans le milieu, associée à leur sédentarité (Chapitre II). Or, ni les anguilles ni les cardiums n'ont montré de réponses biologiques directement liées à la contamination en OCs. En tant qu'espèces sédentaires dans un écosystème très variable, comme l'étang de Vaccarès, ces organismes doivent développer certains mécanismes physiologiques adaptatifs à la variabilité naturelle du milieu (la salinité, la température, le niveau d'eau, la richesse biologique), les

réponses antioxydantes, pourraient, dans ce cas, être plus dépendantes de ces facteurs naturels que de l'exposition aux contaminants. Ces résultats confirment surtout l'absence de stress aigu chez ces espèces, ils ne mettent, donc, pas en défaut la validité de ces biomarqueurs. Dans le Vaccarès, la persistance des contaminants conduits à des effets à plus long terme mais certainement plus délétères, comme des états pathologiques chroniques, mis en évidence lors d'études très récentes (Ribeiro *et al*., en cours de publication). D'autres travaux mettent en valeur les invertébrés de la famille *Nereididae* en tant qu'espèces sentinelles de haute fiabilité (Perez *et al*, 2004 ; Geracitano *et al*, 2004).

En conclusion, l'hétérogénéité des réponses biochimiques face à l'imprégnation tissulaire en composés OCs remet en question la pertinence de ces paramètres en termes de prédiction ou de révélation de l'état sanitaire de l'écosystème du Vaccarès et confirme les limites des biomarqueurs biochimiques dans les environnements exposés à une contamination complexe et chronique (Solé, 2000 ; Allen et Moore, 2004 ; PNETOX, 2004).

Il est évident que l'interprétation de nos résultats soit limitée d'abord à cause d'un effectif réduit du aux conditions d'échantillonnage. Ensuite, la majorité des biomarqueurs a du être mesurée sur des pools et les deux types d'analyse (imprégnation et biomarqueurs) n'ont pas toujours été réalisés chez les mêmes individus, ce qui rend délicate la recherche des relations entre ces facteurs (Cheung *et al*, 2002). Néanmoins nos travaux offrent un bon exemple des potentialités des biomarqueurs antioxydants, en insistant sur les difficultés liées à l'intégration de cette approche écotoxicologique dans les études de biosurveillance *in situ*. L'évaluation des perturbations dans les écosystèmes naturels causées par la présence de contaminants est extrêmement complexe, puisque la plupart des sites présente différentes sources de stress (physiques, biologiques et chimiques), dont la contribution relative doit être bien définie afin d'extrapoler de manière correcte les informations fournies par les biomarqueurs et, en conséquence, pour mettre en place des mesures de protection efficaces (Burton, 1999).

En accord avec de nombreux écotoxicologues (Solé, 2000 ; Cheung, 2002 ; Van der Oost, 2003 ; Burton, 1999) nous soulignons l'importance d'une approche globale basée sur l'analyse d'un grand nombre d'indicateurs et marqueurs biologiques et autres, couplés aux analyses chimiques afin d'avoir une vision globale du stress chimique induit par les polluants OCs dans les écosystèmes naturels. De plus, au niveau préventif et diagnostic, il est important d'intégrer les données écologiques et écotoxicologiques aux concepts de modèles

mathématiques et statistiques ce qui représente en effet les étapes en cours dans de nombreux laboratoires pour la biosurveillance des écosystèmes.

CONCLUSION GENERALE

Dans les années 1930, l'écologiste Arthur Tansley a introduit le concept de l'écosystème pour désigner l'association de deux composantes en constante interaction l'une avec l'autre: une communauté vivante (biocœnose) étroitement liée à son substrat géologique et son milieu atmosphérique (biotope). Reconnaissant le rôle central des écosystèmes naturels dans la hiérarchie biologique générale, les études orientées sur leur fonctionnement sont aujourd'hui en plein essor. Elles se révèlent d'importance cruciale dans l'élucidation de l'organisation et de l'évolution des systèmes biologiques en relation avec l'environnement qui les entoure et, en conséquence, construisent les bases de la résolution de nombreux problèmes environnementaux causés, entre autres, par les activités humaines. Cependant, elles font face à un antagonisme entre l'approche globale dite «holistique», allant de la population jusqu'au niveau de l'écosphère et l'approche à petite échelle dite «réductionniste» dont la limite est représentée par le maillon de l'individu isolé.

L'étude présente, ne peut que se situer à l'interface de ces deux approches et montre toute la complexité, mais aussi l'utilité, de leur intégration dans l'élargissement des horizons de l'écologie scientifique nécessaire dans les résolutions des perturbations écologiques, en général, et écotoxicologiques, en particulier. Réalisée dans un site modèle d'importance internationale, la Réserve de Biosphère de Camargue, sa finalité était de définir la structure spatio - temporelle spécifique de ses réseaux trophiques aquatiques et de déterminer des impacts des variations naturelles et anthropiques, notamment la présence des micropolluants organochlorés, auxquelles ils sont constamment soumis.

La méthode des isotopes stables du carbone et de l'azote, a permis de définir les relations trophiques entre les espèces dominantes, les invertébrés et les poissons, en intégrant l'importance de l'emplacement trophique, ainsi que de la niche écologique dans le flux d'énergie et de matière dans l'écosystème aquatique de l'étang de Vaccarès. L'état actuel d'avancement de nos travaux a permis de confirmer le haut niveau de complexité des relations trophiques dans le Vaccarès, mais aussi, leur stabilité. Dans ce milieu, les contraintes générées par les fluctuations environnementales sont, en partie, contrecarrées par l'intervention humaine pour obtenir un équilibre dont le maintien est assuré depuis quelques années. Cependant, l'image complète des réseaux trophiques camarguais implique une analyse de toutes ses composantes. Ainsi, il peut être envisagé de compléter l'analyse du

réseau trophique en élargissant les chaînes alimentaires vers le « bas », au niveau de producteurs et vers le « haut », au niveau des oiseaux aquatiques dont la diversité et l'abondance fait de la Camargue un site unique.

Bien que les rapports isotopiques, $\delta^{15}N$ et $\delta^{13}C$, fournissent un excellent outil pour la description des réseaux trophiques, notre étude en a révélé les limites liées -au site de prélèvement et à la saison de capture, -à la morphologie et la morphométrie des organismes,
- aux groupes taxonomiques, -aux types d'habitat. Il paraît, donc, primordial d'entreprendre des recherches complémentaires basées sur l'analyse des facteurs biotiques et abiotiques influençant le processus de fractionnement isotopique dans les écosystèmes lagunaires, notamment aux niveaux organismique et sub - organismique. Pour une meilleure interprétation des données isotopiques, il conviendra de considérer non seulement ces effets discriminants, mais aussi les éventuelles variations de l'allocation des isotopes lourds dans les différents organes des invertébrés et des poissons. Celle-ci peut être modulée par l'activité métabolique du tissu dont l'intensité pourrait fluctuer en fonction des variations environnementales.

Parmi les perturbations anthropogènes, la présence de molécules OCs d'origine industrielle et agricole se révèle être la plus préoccupante. En effet, nous avons constaté une imprégnation tissulaire faible, mais chronique par une vaste gamme de substances chimiques, activement utilisées, strictement limitées ou interdites, à tous les niveaux des réseaux trophiques étudiés. L'intensité de l'imprégnation s'est avérée variable selon la population, l'espèce et même selon l'individu en fonction des nombreuses caractéristiques écologiques, biologiques et physiologiques des organismes, mais aussi des propriétés physico - chimiques des molécules et de l'écosystème considérés. Les analyses centrées sur la détermination des modalités de contamination par les POPs des réseaux trophiques à l'aide de la méthode des isotopes stables ont mis en évidence la bioamplification de molécules parmi les plus persistantes (dieldrine, HCB) mais aussi de l'α endosulfan, un pesticide moins hydrophobe et couramment utilisé dans les traitements agricole en région camarguaise et/ou à sa proximité. Son transfert trophique dépend de l'intensité de la contamination résultant de la biodisponibilité de la substance, elle-même liée à la saison. Par contre, pour les autres substances analysées, la voie d'accumulation directe à partir de l'eau et des sédiments semble être la voie principale et dominante. Dans le cas des PCBs, nos résultats ne montrent pas de processus de bioamplification, mais une bioconcentration préférentielle à partir de l'eau plutôt qu'à partir des sédiments. Ce phénomène est déterminé par les caractéristiques particulières

de l'écosystème, c'est-à-dire peu profond et exposé aux conditions climatiques qui privilégient le brassage continu des sédiments. Concrètement, nous avons confirmé que, dans le cas de la Réserve de la Biosphère de Camargue, seules les analyses de l'eau peuvent mener à des conclusions erronées sur les sources et l'intensité de l'exposition des organismes aquatiques. Elles sont cependant indispensables pour une étude de biosurveillance complète.

Le principal débat entre les écotoxicologues contemporains concerne les scientifiques supportant l'hypothèse de la bioconcentration en tant que voie principale de contamination par les POPs des organismes aquatiques (Gray, 2002) et ceux qui insistent sur l'importance du transfert trophique (Fisk et al., 2003a). Notre étude trouve sa juste position à l'interface de ces deux points de vue, mettant en évidence l'importance de l'écosystème dans son ensemble en tant que facteur déterminant la modalité d'imprégnation des organismes aquatiques.

Un autre débat est centré sur l'utilité des biomarqueurs en tant qu'indicateurs de la qualité du milieu et de signaux d'alarme d'une perturbation d'origine anthropique. Si l'on considère que l'écosystème représente la somme de ces composantes, l'impact d'une perturbation à un bas niveau d'organisation biologique peut prédire l'effet aux niveaux supérieurs. L'analyse des biomarqueurs biochimiques et biométriques dans différents maillons de réseau trophique a montré l'incohérence du principe d'un biomarqueur universel et la complexité d'interprétation des résultats en indiquant les lacunes des études centrées sur les relations cause-effet isolées. C'est la raison pour laquelle un paramètre biologique synthétique des capacités métaboliques de l'organisme représenterait un atout considérable dans la validation des biomarqueurs. Les méthodologiques isotopiques pourraient ouvrir cette voie d'investigation. Le principe selon lequel l'allocation métabolique du ^{13}C et du ^{15}N devrait montrer une certaine régularité dans des conditions codifiées, il semble possible d'établir une « cartographie » isotopique d'un organisme et d'en analyser les variations sous l'influence d'une perturbation chimique ou physique.

En définitive, les nombreuses données présentées dans cette étude fournissent des outils pour les futures études d'écologie et d'écotoxicologie fondamentales basées sur le fonctionnement des écosystèmes aquatiques dans leur globalité et peuvent également apporter des éléments de réflexion pour la gestion de la Réserve de Biosphère de Camargue et, de ce fait, être appliquées dans un but général de plus grande portée, la conservation de la Biosphère.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Agrell C., Larsson P., Okla L. et Agrell J., 2002. PCB congeners in precipitation, wash out ratios and depositional fuxes within the Baltic Sea region, Europe. *Atmospheric Environment* 36: 371-383.

Allen J. I. et Moore M. N., 2004. Environmental prognostics: Is the current use of biomarkers appropriate for environmental risk evaluation? *Marine Environmental Research* 58: 227-232.

Ashley J. T. F., Horwitz R., Steinbacher J. C. et Ruppel B., 2003. A comparison of congeneric PCB patterns American eels and striped bass. *Marine Pollution Bulletin* 46.

Bacanskas L. R., Whitaker J. et Di Giulio R. T., 2004. Oxidative stress in two populations of killifish (*Fundulus heteroclitus)* with differing contaminant exposure histories. *Marine Environmental Research* 58: 597-601.

Banas D., Grillas, P., Auby, I., Lescuyer, F., Coulet, E., Moreteau, J.C., Millet, B., 2004. Short time scale changes in underwater-irradiance in a wind-exposed lagoon (Vaccarès lagoon, France): Efficiency of infrequent field measures of water turbidity or weather data to predict irradiance conditions in the water column. Soumis pour publication dans *Hydrobyologia*.

Bardin O. et Pont D., 2002. Environmental factors controlling the spring immigration of two estuarine fishes *Atherina boyeri* and *Pomatoschistus spp.* into a Mediterranean lagoon. *Journal of fish biology* 61: 560-578.

Baumard P., Budzinski, H., Garrigues, P., Sorbe, J.C., Burgeot, T., et Bellocq J., 1998, Concentrations of PAHs (Polyciclic aromatic hydrocarbons) in various marine organismes in relation to those in sediments & trophic level. *Marine Pollution Bulletin*, 36(8):951-960.

Beaudoin C. P., Prepas E. E., Tonn W. M., Wassenaar L. I. et Kotak B. G., 2002. A stable carbon and nitrogen isotope study of lake food webs in Canada's Boreal Plain. *Freshwater Biology* 46: 465-477.

Beeler, A .B., Schlenk, D. K. et Rimoldi, J. M., 2001. Synthesis of fipronil sulfide, an active metabolite, from the parent insecticide fipronil. *Tetrahedron Letters*, 42(32):5371-5372.

Bergen B. J., Nelson W. G., Quinn J. G. et Jayaramani S., 2001. Relationships among total lipid, lipid classes, and polychlorinated biphenyl concentrations in two indigenous populations of ribbed mussels (*Geukensia Demissa*) over annual cycle. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20(3): 575-581.

Berglund O., Larsson P., Ewald G. et Okla L., 2001. The effect of lake trophy on lipid content and PCB concentrations in planktonic food web. *Ecology* 82(4): 1078-1088).

Bethemont J. et Rivière-Honegger A., 1998. Les inondations en Camargue d'octobre 1993 et janvier 1994. In: Régulation de l'eau en milieu méditerranéen, risques et tensions (ed Drain M.) Territoires en Mutation 3 CNRS-Université Paul Valéry, Montpellier, pp. 45-59.

Binelli A. et Provini A., 2003. The PCB pollution of Lake Iseo (N. Italy) and the role of biomagnification in the pelagic food web. *Chemosphere* 53: 143-151.

Bode A., Carrera P. et Lens S., 2003. The pelagic food web in the upwelling ecosystem of Galicia (NW Spain) during spring : naturel abundance of stable carbon and nitrogen isotopes. *ICES Journal of Marine Science* 60: 11 -22.

Borga K., Gabrielsen G. W. et Skaare J. U., 2001. Biomagnification of organochlorines along a Barents Sea food chain. *Environmental Pollution* 113: 187-198.

Borga K., Poltermann M., Polder A., Pavlova O., Gulliksen B., Gabrielsen G. W. et Skaare J. U., 2002a. Influence of diet and sea ice drift on organochlorine bioaccumulation in Arctic ice-associated amphipods. *Environmental Pollution* 117: 47-60.

Borga K., Gulliksen B., Gabrielsen G. W. et Skaare J. U., 2002b. Size-related bioaccumulation and between-year variation of organochlorines in ice-associated amphipods from the Arctic Ocean. *Chemosphere* 46(9/10).

Borga K., Gabrielsen G. W. et Skaare J. U., 2002c. Differences in contamination load between pelagic and sympagic invertebrates in the Arctic marginal ice zone: influence of habitat, diet and geography. *Marine Ecology Progress Series* 235: 157-169.

Bouchereau J. L., Guelorget O., Vergne Y. et Perthuisot J. P., 2000. L'ichtyofaune dans l' organisation biologique d'un système paralique de type lagunaire : le complexe des étangs du Prévost et de l'Armel (Languedoc, France). *Vie Milieu* 50: 19-27.

Bradford M. M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantited of protein utilizing the principe of protein-dye binding. *Analitical Biochemistry* 72: 248-254.

Bremle G. et Ewald G., 1995. Bioconcentration of Polychlorinated Biphenyls (PCBs) in Chironomid Larvae, Oligochaete Worms and Fish from Contaminated Lake Sediment. *Marine and Freshwater Research* 46: 267-273.

Bressa G., Sisti E. et Cima F., 1997. PCBs and organoschlorinated pesticides in een (*Anguilla anguilla* L.) from the Po Delta. *Marine Chemistry* 58:261-266.

Briand F., 1983. Environmental control of food web structure. *Ecology* 64: 253-263.

Brown S. S., Gaston G. R., Rakocinski C. F. et Heard R. W., 2000. Effects of Sediment Contaminants and Environmental Gradients on Macrobenthic Community Trophic Structure in Gulf of Mexico Estuaries. *Estuaries* 23(3): 411-484.

Bruhn R. et Mclachlan M. S., 2002. Seasonal variation of polychlorinated biphenyl concentrations in the southern part of the Baltic Sea. *Marine Pollution Bulletin* 44: 156-163.

Brusca R. C. et Brusca G. J., 1996. Invertebrates. (eds.) Sinaner Ass. INC. Publishers Sunderland, Massachusettss.

Buet A., Roche H., Anheim S. et Ramade F., 2001. Méthode d'évaluation du niveau de contamination par les micropolluants organiques des communautés de la Réserve de Biosphère de Camargue. *Ichtyophysiologica Acta* 23: 57-70.

Buet A., 2002. Impact biologique des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) chez l'anguille européenne. Définition et validation *in situ*. Thèse de doctorat, Université de Paris XI, 203pp.

Burreau S., Zebühr Y., Broman D. et Ishaq R., 2004. Biomagnification of polychlorinated biphenyls (PCBs) and polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) studied in pike (*Esox lucius*), perch (*Perca fluviatilis*) and roach (*Rutilus rutilus*) from the Baltic Sea. *Chemosphere* 55: 1043-1052.

Burton G. A. J., 1999. Realistic assessments of ecotoxicity using traditional and novel approaches. *Aquatic Ecosystem Health and Management* 2: 1-8.

Carson. R., 1962. Silent Spring. (eds.) G. K. Hall & Company, Boston.

Chase J. M., 2000. Are there real differences among aquatic and terrestrial food webs? *Trends in Ecology and Evlolution* 15: 408-412.

Cheung C. C. C., Zheng G. J., Lam P. K. S. et Richardson B. J., 2002. Relationships between tissue concentrations of chlorinated hydrocarbons (polychlorinated biphenyls and lorinated pesticides) and antioxidative responses of marine mussels, *Perna viridis*. *Marine Pollution Bulletin* 45: 181-191.

Cho Y. C., Frohnhoefer R. C. et Rhee G. Y., 2004. Bioconcentration and redeposition of polychlorinated biphenyls by zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) in the Hudson River. *Water research* 38: 769-777.

Cognetti G., Sara' M. et G. M., 1999. Biologia Marina. (eds.) Caldrini, Bologna: 516.

Connoly R. M., Guest M. A., Melville A. J. et Oakes J. M., 2004. Sulfur stable isotopes separate producers in marine food-web analysis. *Oecologia* 138: 161-167.

Corsi I., Mariottini M., Sensini C., Lancini L. et Focardi S., 2003. Fish as bioindicators of brackish ecosystem health: integrating biomarker responses and target pollutant concentrations. *Oceanologica Acta* 26: 129-138.

Cossu C., Doyotte A., Jacquin M. C., Babut M., Exinger A. et Vasseur P., 1997. Glutathione Reductase, Selenium-Dependent Glutathione Peroxidase, Glutathione Levels, and Lipid Peroxidation in Freshwater Bivalves, *Unio tumidus*, as Biomarkers of Aquatic Contamination in Field Studies. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 38: 122-131.

Das K., Lepoint G., Loizeau V., Debacker V., Dauby P. et Bouquegneau J. M., 2000. Tuna and Dolphin Associations in the North-east Atlantic: Evidence of Different Ecological Niches from Stable Isotope and Heavy Metal Measurements. *Marine Pollution Bulletin* 40(2): 102-109.

Davies R. P., 1984. The prediction of bioconcentration in fish. *Water research* 18 (10): 1253-1262.

De Niro M. J. et Epstein S., 1978. Influence of diet on the distribution of carbon isotopes in animals. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 42: 495-506.

Di Giulio R. T., Habig C. et Wolf T., 1989. Phase I et pahes II biotransformation enzyme activities in channel catfish exposed to contaminanted sediment. *Toxicologist* 9: 43.

Di Giulio R.T., Behar J.V., Carlson D.B., Hasspieler B.M. et D.E. W., 1995. Determinants of species susceptibility to oxidative stress : a comparison of channel catfish and brown bullhead. *Marine Environmental Research* 39: 175-179.

Dietz R., Riget K., Cleemann M., Aarkrog A., Johansen P. et Hansen J. C., 2000. Comparison of contaminants from different trophic levels and ecosystems. *The Science of Total Environment* 245: 221-231.

Dufour E., Gerdeaux D., Corvi C., Khim-Heang S. et Mariotti A., 2001. Assessment of the Contaminant Concentration Variability among Lake Geneva Arctic Char Using Stable Isotopic Composition ($\delta^{15}N$ and $\delta^{13}C$).

Durand G., Forteza R. et Barcélo D., 1989. Determination of chlorotriazine herbicides, their dealkylated degradation products and organophosphorus pesticides in soil samples by means of two different clean up procedures. *Chromatographia* 28: 597-604.

Ehrlich, P.R., Echrlich, A.H., Holdren, J.P., 1997. Ecoscience – Population, resources, environment. (eds.)W.H. Freeman & Company, San Francisco, 561-567.

Fent K. 2003. Ecotoxicological problems associated with contaminated sites. *Toxicology letters* 140-141: 353-365.

Fisk A. T., Stern G. A., Hobson K. A., Strachan W. J., Loewen M. D. et Norstrom R. J., 2001a. Persistent Organic Pollutants (POPs) in a Small, Herbivorous, Arctic Marine Zooplankton (*Calanus hyperboreus*): Trends from April to July and the Influence of Lipids and Trophic Transfer. *Marine Pollution Bulletin* 43: 93-101.

Fisk A. T., Hobson K. A. et Norstrom R. J., 2001b. Influence of Chemical and Biological Factors on Trophic Transfer of Persistent Organic Pollutants in the Northwater Polynya Marine Food Web. *Environmental Science and Technology* 35: 732-738.

Fisk A. T., Hoekstra P. F., Gagnon J. M., Duffe J., Norstrom R. J., Hobson K. A., Kwan M. et Muir D. C. G., 2003. Influence of habitat, trophic ecology and lipids on, and spatial trends of, organochlorine contaminants in Arctic marine invertebrates. *Marine Ecology Progress Series* 262: 201-214.

Fisk A. T., Hoekstra P. F., Borga K. et Muir D. C., 2003a. Biomagnification. *Marine Pollution Bulletin* 46(4): 522-524.

Fiske C. et Subarrow Y., 1925. The colorimetric determination of phosphorus. *Journal of Biological Chemistry* 66: 375-400.

Fleeger J. W., Carman K. R. et Nisbet R. M., 2003. Indirect effects of contaminants in aquatic ecosystems. *The Science of Total Environment* 317: 207-233.

Folch J., Less M. et Sloane-Stanley G. H., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry* 226: 497-509.

France R. L., 1995. Differentiation between littoral and pelagic foodwebs in lakes using stable carbon isotopes. *Limnology and Oceanography* 40: 1310-1313.

France R.L., 1997. $\delta^{15}N$ examination of the Lindeman – Hutchinson-Peters-Theory of Increasing Omnivory with Trophic Hight in Aquatic Food web. *Researches in Population Ecology*, 39(2):121-125

Frémont L. et Léger C., 1981. Le transport des lipides plasmiques Actes du colloque C.N.E.R.N.A., Fontaine F. (eds.), Editions du C.N.R.S., Paris: 263-281.

Fromberg A., Cleemann M. et Carlsen L., 1999. Review on Persistent Organic Pollutants in the Environment of Greenland and Faroe Islands. *Chemosphere* 38(13): 3075-3093.

Gannes L. Z., O'brien D. M. et Martinez Del Rio C., 1997. Stable isotopes in animal ecology : Assumptions, caveats, and a call for more laboratory experiments. *Ecology* 78(4): 1271-1276.

Garnerot F., Bouchereau J. L., Rebelo J. E. et Guelorget O., 2004. L'ichtyofaune dans l'organisation biologiqued'un système paralique de type lagunaire, la Ria d'Averio (Portugal), en, 1987-1988 et 1999-2000. *Cybium* 28(1): 63-75.

Gaye-Siessegger J., Focke U., Muetzel S., Hansjorg A. et Becker K., 2004. Feeding level and individual metabolic rate affect $\delta^{13}C$ and $\delta^{15}N$ values in carp: implications for food web studies. *Oecologia* 138: 175-183.

Gelin A., Crivelli A. J., Rosecchi E. et Kerambrun P., 2000. Is the brown shrimp *Crangon crangon* (L.) population of the Vaccares lagoon (Camargue, France, Rhone delta) an annual population? *Comptes-rendus del'Academie des Sciences III Life Sciences* 323: 741-748.

Giacomazzi S. et Cochet N., 2004. Environmental impact of diuron transformation: a review. *Chemosphere*.

Gobas F. A. P. C., Wilcockson J. B., Russel R. W. et Haffner G. D., 1999. Mechanism of biomagnification in fish under aboratory and field conditions. *Environmental Science and Technology* 33: 133-141.

Goerke H. et Weber K., 2001. Species-specific elimination of polychlorinated biphenyls in estuarine animals and its impact on residue patterns. *Marine Environmental Research* 51(2): 131-149.

Gonzalez Sagrario M. A., Miglioranza K. S. B., Aizpun De Moreno J. E., Moreno V. J. et Escalante A. H., 2002. Polychlorinated biphenyls in different trophic levels from a shallow lake in Argentina. *Chemosphere* 48: 1113-1122.

Gray J. S., 2002. Biomagnification in marine systems: the perspective of an ecologist. *Marine Pollution Bulletin* 45(1-2): 46-52.

Gu B., Schelske C. L. et Hoyer M. V., 1996. Stable isotopes of carbon and nitrogen as indicators of diet and trophic structure of the fish community in a shallow hypereutrophic lake. *Journal of fish biology* 49: 1233-1243.

Guiguer K. R. R. A., Reist J. D., Power M. et Babaluk J. A., 2002. Using stable isotopes to confirm the trophic ecology of Arctic charr morphotypes from Lake Hazen, Nunavut, Canada J. *ournal of Fish Biology* . 60: 348-362.

Gurevitch J. et Padilla D. K., 2004. Are invasive species a major cause of extinctions? *Trends in Ecology and Evlolution Sous publication*.

Habig W. H., Pabst M. J. et Jakoby W. B., 1974. Glutathione S-transferase. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry* 249: 7130-7139.

Hairston N. G., Jr, et Hairston N. G., Sr, 1997. Does food web complexity eliminate trophic-level dynamics? *American Naturalist* 149: 1001-1007.

Hansen H. J. M., Grosell M. A. et Rosenkilde P., 1999. Gill lipid metabolism and unidirectional Na+ flux in the European eel (*Anguilla anguilla*) after transfer to dilute media: the formation of wax alcohols as a primary response. *Aquaculture* 177: 277-283.

Hargrave B. T., Harding G. C., Vass W. P., Erickson P. E., Fowler B. R. et Scott V., 1992. Organochlorine Pesticides and Polychlorinated Biphenyls in the Arctic Ocean Food Web. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 22: 41-54.

Hayward P. J. et J.S. R., 1995. Handbook of the Marine Fauna of North-West Europe. (eds.) Oxford University Press.

Hecky R. E. et Hesslein R. H., 1995. Contributions of benthic algae to lake food webs as revealed by stable isotope analysis. *Journal of the North American Benthological Society* 14: 631-653.

Heeler A. B., Schlenk D. K. et Rimoldi J. M., 2001. Synthesis of fipronil sulfide, an active metabolite, from the parent insecticide fipronil. *Tetrahedron Letters* 42: 5371-5372.

Heikoop M., Risk M. J., Lazier A. V., Edinger E N., Jompa J., Limmon G. V., Dunn J. J., Browne D. R. et Schwarcz H. P., 2000. Nitrogen-15 Signals of Anthropogenic Nutrient Loading in Reef Corals. *Marine Pollution Bulletin* 40 (7): 628-636.

Herendeen R. A., 2004. Bottom-up and top-down effects in food chains depend on functional dependence: an explicit framework. *Ecological Modelling* 171: 21-33.

Hesslein R. H., Hallard K. A. et Ramlal P., 1993. Replacement of sulfur, carbon and nitrogen, in tissue of growing broad whitefish (*Coregonus nasus*) in response to a change in diet traced by $\delta^{34}S$, $\delta^{13}C$ and $\delta^{15}N$. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 50: 2071-2076.

Hobson K. A. et Welch H. E., 1992. Determination of trophic relationships within a high Arctic marine food web using $\delta^{13}C$ and $\delta^{15}N$ analysis. *Marine Ecology Progress Series* 84: 9-18.

Hobson K. A., Schell D. M., Renouf D. et Noseworthy E., 1996. Stable carbon and nitrogen isotopic fractionation between diet and tissues of captive seals: implications for dietary reconstructions involving marine mammals. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 53: 528-533.

Hobson K. A., Fisk A., Karnovsky N., Hoist M., Gagnon J. M. et Fortier M., 2002. A stable isotope ($\delta^{13}C$, $\delta^{15}N$) model for the North Water food web: implications for evaluating trophodynamics and the flow of energy and contaminants. *Deep-Sea Research II* 49: 5131-5150.

Hoekstra P. P., O Hara T. M., Fisk A. T., Borga K., Solomon K. R. et Muir D. C. G., 2003. Trophic transfer of persistent organochlorine contaminants (OCs) within an Arctic marine food web from the southern Beaufort-Chukchi Seas. *Environmental Pollution* 124: 509-522.

Hoffman D. J., Rattner B. A., Burton G. A. J. et Cairns J. J., 1995. Handbook of Ecotoxicology. (eds.) CRC Press Inc., Boca Raton, Sect. 2, Chap.13: 275-301.

Hori, M., Kondo, H., Ariyoshi, N., Yamada, H., Hiratsuka, A., Watabe T. et Oguri K., 1997. Changes in the hepatic glutathione peroxidase redox system produced by coplanar polychlorinated biphenyls in Ah-responsive and -less-responsive strains of mice: mechanism and implications for toxicity. *Environmental Toxicology and Pharmacology,* 3(4) 1997:267-275.

Hsieh H. L., Chen C. P., Chen Y. G. et Yang H. H., 2002. Diversity of benthic organic matter flows through polychaetes and crabs in a mangrove estuary:$\delta^{13}C$ and $\delta^{34}S$ signals. *Marine Ecology Progress Series* 227: 145-155.

Hsu P. C., Guo Y. L. et Li M. H., 2004. Effects of acute postnatal exposure to 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl on sperm function and hormone levels in adult rats. *Chemosphere* 54: 611-618.

Jobling, M., 1995. Envoronmental Biology of fishes. (eds.)Chapman &Hall *Fish et Fisheries Series* 16, London, 455pp.

Kaluzny M. A., Duncan L. A., Merritt M. V. et Epps D. E., 1985. Rapid separation of lipid classes in high yield and purity using bonded phase columns. *Journal of Lipid Reserach* 26: 135-140.

Kang C. K., Sauriau P. G., Richard P. et Blanchard G. F., 1999. Food sources in the infaunal suspension-feeding bivalve Cerastoderma edule in muddy sandflat of Marennes-Oléron Bay, as determined by analyses of carbon and nitrogen stable isotopes. *Marine Ecology Progress Series* 187.: 147-158.

Khim B. K., Woo K. S. et Je J. G., 2000. Stable isotope profiles of bivalve shells: seasonal temperature variations, latitudinal temperature gradients and biological carbon cycling along the east coast of Korea. *Continental Shelf Research* 20: 843-861.

Kidd K. A., Schindler D. W., Hesslein R. H. et Muir D. C. G., 1998a. Effects of trophic position and lipid on organochlorine concentrations in fishes from subarctic lakes in Yukon Territory. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 55: 869-881.

Kidd K. A., Hesslein R. H., Ross B. J., Koczanski K., Stephens G. R. et Muir D. C. G., 1998b. Bioaccumulation of organochlorines through an remote freshwater food web in the Canadian Arctic. *Environmental Pollution* 102: 91-103.

Kidd K. A., Schindler D. W., Hesslein R. H. et Muir D. C. G., 1998b. Effects of trophic position and lipid on organochlorine concentrations in fishes from subarctic lakes in Yukon Territory. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*.

Kidd K. A., Bootsma H. A., Hesslein R. H., Muir D. C. G. et Hecky R. E., 2001. Biomagnification of DDT through the Benthic and Pelagic Food Webs of Lake Malawi, East Africa: Importance of Trophic Level and Carbon Source. *Environmental Science and Technology* 35: 14-20.

Lagadic L. Caquet T., Amiard J. T. et Ramade F., 1997. Biomarqueurs en écotoxicologie:Aspects fondamentaux. (eds.) Masson, Paris, 419 pp.

Lagadic L. Caquet T., Amiard J. T. et Ramade F., 1998. Utilisation de biomarqueurs pour la sourveillance de la qualité de l'environnement. (eds.) Lavoisiser Technique et Documentation, Paris, 320pp.

Lam P. K. S. et Gray J. S., 2001. Predicting effects of toxic chemicals in the marine environment. *Marine Pollution Bulletin* 42: 169-173.

Lam P. K. S. et Gray J. S., 2003. The use of biomarkers in environmental monitoring programmes. *Marine Pollution Bulletin* 46: 182-186.

Lam P.K.S. et Wu, R.S.S, 2003. Use of biomarkers in Environmental Monitoring. Actes du colloque the *Use of Bioindicators, Biomarkers and Analytical Methods for the Analysis of POPs in Developing Countries* (10-12 décembre 2003), STAP/GEF et Gouvernement du Japon, 1-65.

Larsson P., Andersson A., Broman D., Nordback J. et Lundberg E., 2000. Persistent Organic Pollutants (POPs) in Pelagic Systems. *Ambio* 29(4-5): 202-209.

Larsson P., Andersson A., Broman D., Nordback J. et Lundberg E., 2000. Persistent Organic Pollutants (POPs) in Pelagic Systems. *Ambio* 29(4-5): 202-209.

Leblanc G. A., 1995. Trophic-Level Differences in the Bioconcentration of Chemicals: Implications in Assessing Environmental Biomagnification. *Environmental Science and Technology* 28(1): 154-160.

Lee Y. W., Park H. J., Son K. W., Hennig B., Robertson L. W. et Toborek M., 2003. 2,2',4,6,6'-Pentachlorobiphenyl (PCB 104) induces apoptosis of human microvascular endothelial cells through the caspase-dependent activation of CREB. *Toxicology and Applied Pharmacology* 189: 1-10.

Léveque, C., 2001. Ecologie – De l'écosystème à la biosphère. (eds.) Dunod, Paris, 502pp.

Lemaire P. et Livingston D. R., 1993. Xenobiotics and oxyradicals in marine animals. *Trends in Comparative Biochemistry and Physiology* 1: 1119-1149.

Livingston D. R., 1991. Towards a specific index of impact by organic pollution for marine invertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology* 100C: 151-155.

Mackay D. et Fraser A., 2000. Bioaccumulation of persistent organic chemicals: mechanisms and models. *Environmental Pollution* 110: 375-391.

Mckinney R. A., Lake J. L., Alien M. et Ryba S., 1999. Spatial variability in Mussels used to assess base level nitrogen isotope ratio in freshwater ecosystems. *Hydtvbiologia* 412: 17-24.

Mckinney R. A., Nelson W. G., Charpentier M. A. et Wigand C., 2001. Ribbed mussel nitrogen isotope signatures reflect nitrogen sources in coastal salt marshes. *Ecological Applications* 11(1): 203-214.

Melville A. J. et Connolly R. M., 2003. Spatial analysis of stable isotope data to determine primary sources of nutrition for fish. *Oecologia* 136: 499-507.

Miller P. J., 1975. Age-structure and life span in the common goby, *Pomatoschistus microps*. *Journal of Zoology* 177: 425-448.

Minagawa M. et Wada E., 1984. Stepwise enrichment of ^{15}N along food chains: further evidence and the relation between $\delta^{15}N$ and animal âge. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 48: 1135-1140.

Misra H.P. F. I., 1972. The role of superoxide anion in the autoxidai epinephrine and a simple assay for superoxide dismutases. *Journal of Biological Chemistry* 247: 3170-3175.

Moor M.N., Allen, J.I., 2003. Environmental Prognostics: Biomarkers, Modelling and Explanatory Frameworks for the harmful effects of chemical pollutants. Actes du colloque the *Use of Bioindicators, Biomarkers and Analytical Methods for the Analysis of POPs in Developing Countries* (10-12 décembre 2003), STAP/GEF et Gouvernement du Japon, 76-94.

Morrison H. A., Whittle D. M. et Haffner G. D., 2002. A comparison of the transport and fate of polychlorinated biphenyl congeners in three great lakes food webs. *Environmental Toxicology and Chemistry* 21(4): 683-692.

Neumann T., Stogbauer A., Walpersdorf E., Stuben D. et Kunzendorf H., 2002. Stable isotopes in recent sediments of Lake Arendsee, NE Germany: response to eutrphication and remediation measures. *Palaeogeographv. Palaeoclimatologv, Palaeoecologv* 178(1-2): 75-90.

Niyogi S., Biswas S., Sarker S. et Datta A. G., 2001. Seasonal variation of antioxidant and biotransformation enzymes in barnacle, *Balanus balanoides*, and their relation with polyaromatic hydrocarbons. *Marine Environmental Research* 52: 13-26.

Nobbs D. et Chipman G., 2003. Contaminated site investigation and remediation of chlorinated aromatic compounds. *Separation and Purification Technology* 31: 37-40.

O' Reilly C. M. et Hecky R. E., 2002. Interpreting stable isotopes in food webs: Recognizing the role of time averaging at different trophic levels. *Limnology and Oceanography* 47(1): 306-309.

Oliveira Ribeiro C. A., Vollaire, Y., Sanchez-Chardi, A., Roche H., 2004. Accumulation and Effects of Pesticides, PAHs and Heavy metals in Eels (Anguilla anguilla) from Camargue Biosphere Reserve-France. *En cours de préparation*

Olsson A., Valters K. et Burreau S., 2000. Concentrations of Organochlorine Substances in Relation to Fish Size and Trophic Position: A Study on Perch (*Perca fluviatilis* L.). *Environmental Science and Technology* 34: 4878-4886.

Orbea A., Ortiz-Zarragoitia M., Solé M., Porte C. et Cajaraville M. P., 2002. Antioxidant enzymes and peroxisome proliferation in relation to contaminant body burdens of PAHs and PCBs in bivalve

molluscs, crabs and fish from the Urdaibai and Plentzia estuaries (Bay of Biscay). *Aquatic toxicology* 75-98.

Pacheco M. et Santos M. A., 2002. Biotransformation, genotoxic, and histopathological effects of nvironmental contaminants in European eel (Anguilla anguilla L.). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 53: 331-347.

Pampoulie C., Bouchereau J. L., Rosecchi E., Poizat G. et Crivelli A. J., 2000. Annual variations in the reproductive traits of Pomatoschistus microps in a Mediterranean lagoon undergoing environmental changes: evidence of phenotypic plasticity. *Journal of fish biology* 57: 1441-1452.

Pampoulie C., Chauvelon P., Rosecchi E., Bouchereau J. L. et Crivelli A. J., 2001. Environmental factors influencing the gobiid assemblage of a Mediterranean Lagoon: Empirical evidence from a long-term study. *Hydrobiologia* 445: 175-181.

Parant M., 1998. Le métabolisme des xénobiotiques chez les bivalves. *C.R. Académie des Sciences de Paris, Sciences de la vie* 321: 485-494.

Parihar M.S., Javeri, T., Hemnani, T., Dubey, A.K. et Prakash, P., 1997. Responses of superoxide dismutase, glutathione peroxidase and reduced glutathione antioxidant defenses in gills of the freshwater catfish (*Heteropneustes fossilis*) to short-term elevated temperature. *Journal of Thermal Biology*, 22(2):151-156.

Pastor D., Boix J., Fernandez V. et Albaiges J., 1996. Bioaccumulation of Organochlorinated Contaminants in Three Estuarine Fish Species (*Mullus barbatus*, *Mugil cephalus* and *Dicentracus labrax*). *Marine Pollution Bulletin* 32(3):257-262.

Pearson J., Wells D. M., Seller K. J., Bennett A., Scares A., Woodall J. et Ingrouille D. M. J., 2000. Traffic exposure increases natural 15N and heavy metal concentrations in mosses. *New phytologist* 147: 317-326.

Perez E., Blasco J. et Solé M., 2004. Biomarker responses to pollution in two invertebrate species: *Scrobicularia plana* and *Nereis diversicolor* from the Cadiz bay (SW Spain). *Marine Environmental Research* 58: 275-279.

Perez-Ruzafa V., Navarro S., Barba A., Marcos C., Camara M. A., Salas F. et Gltierrez J. M., 2000. Presence of Pesticides throughout Trophic Compartments of the Food Web in the Mar Menor Lagoon (SE Spain). *Marine Pollution Bulletin* 40(2): 140-151.

Persic A. Roche, H., Ramade, F., 2004. Stable carbon and nitrogen isotope quantitative structural assessement of dominant species from the Vaccarès Lagoon trophic web (Camargue Biosphere Reserve, France). *Esturine Coastal and Shelf Science*, 60: 2661-272.

Peterson B. J. et Fry B., 1987. Stable isotopes in ecosystem studies. *Annual Review of Ecology and Systematics* 18.

Peterson S. M. et Bately G. E., 1993. The fate of endosulfan in aquatic ecosystems. *Environmental Pollution* 82: 143-152.

Peterson B. J., 1999. Stable isotopes as tracers of organic matter input and transfer in benthic food webs : a review. *Acta Oecologica* 20: 479-487.

Pérès G. et Roche H., 1989. Effets d'une diminution expérimentale de la salinite aquatique sur les activites superoxyde dismutase, catalase et peroxydase de l'hématie d'un Poisson euryhalin, le Loup (Dicentrarchus labrax L.). *C.R. Société de Biologie* 183: 247-255.

PNETOX, 2004. Apport de la recherche à la gestion des milieux, (eds.)Babut, M., Bastien Ventura, C., MEDD, Paris, 98pp.

PNUE, 1999. Lignes directrices pour l'identification des PCB et du matériel contenant des PCB, http://www.chem.unep.ch/pops/pdf/PCBident/pcbidfr.pdf.

Poizat G. et Crivelli A. J., 1997. Use of seasonally flooded marshes by fish in a Mediterranean wetland: timing and demographic consequences. *Journal of fish biology* 51: 106-119.

Poizat G., Rosecchi E. et Crivelli A. J., 2002. Life-history variation within a three-spined stickleback population in the Camargue. *Journal of fish biology* 60: 1296-1307.

Poizat G., Rosecchi E., Chauvelon P., Contournet P. et Crivelli A. J., 2004. Long-term fish and macro-crustacean community variation in a Mediterranean lagoon. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 59: 615-624.

Polis G. A. et Strong D. R., 1996. Food web complexity and community dynamics. *American Naturalist* 147: 813-846.

Ponsard S. et Arditi R., 2001. Detecting omnivory with $\delta^{15}N$. *Trends in Ecology and EvoIution* 16: 20-21.

Post D. M., Pace M.L. et Hairston N.G., 2000. Ecosystem size determines food-chain lenght in lakes. *Nature* 405: 1047-1049.

Post D. M., 2002. Using stable isotopes to estimate trophic position : models, methods and assumptions. *Ecology* 83(3): 703-718.

Power A. et Sheehan D., 1996. Seasonal Variation in the Antioxidant Defence Systems of Gill and Digestive Gland of the Blue mussel, *Mytilus edulis*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 114C (2): 99-103.

Preston T., 1992. The measurement of stable isotope natural variations. *Plant Cell Environment* 8: 335-345.

Quental T., Ferreira A. M. et Vale C., 2003. The distribution of PCBs and DDTs in seston and plankton along the Portuguese coast. *Acta Oecologica* 24: 333-339.

Ramade 1998. Dictionnaire encyclopédique des sciences de l'eau. (eds.) Ediscience international, Paris, 786pp.

Ramade F., 2002. Dictionnaire encyclopedique de l'écologie et des sciences de l'environnement. (eds.) Dunod, Paris, 1085pp.

Randall D. J., Connell D. W., Yang R. et Wu S. S., 1998. Concentrations of persistent lipophilic compounds in fish are determined by exchange across the gills, not through the food chain. *Chemosphere* 37(7): 1263-1270.

Rau G. H., Mearns A. J., Young D. R., Olson R. J., Schafer H. A. et Kaplan I. R., 1983. Animal $^{13}C/^{12}C$ correlates with trophic level in pelagic food webs. *Ecology* 64: 1314-1318.

Renones O., Polunin N. V. C. et Goni R., 2002. Size related dietary shifts of *Epinephelus marginatus* in a western Mediterranean littoral ecosystem: an isotope and stomach content analysis. *Journal of fish biology* 61: 122-137.

Richter H., Focken U. et Becker K., 1999. A review of the fish feeding model MAXIMS. *Ecological Modelling* 120: 47-64.

Ridal J. J., Mazumder A. et Lean D. R. S., 2001. Effects of nutrient loading and planktivory on the accumulation of organochlorine pesticides in aquatic food chains. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20(6): 1312-1319.

Robillard S., Beauchamp G. et Laulier M., 2003. The role of abiotic factors and pesticide levels on enzymatic activity in the freshwater mussel *Anodonta cygnea* at three different exposure sites. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 135: 49-59.

Roche H. et Bogé G., 1996a. Réponses des activités antioxydantes érythrocytaires du loup (*Dicentrarchus labrax*) a des modifications expérimentales de paramètres chimiques ou physiques du milieu. *Marine Life* 6: 53-61.

Roche H. et Bogé G., 1996b. Fish Blood Parameters as a Potential Tool for Identification of Stress Caused by Environmental Factors and Chemical Intoxication. *Marine Environmental Research* 41(1): 27-43.

Roche H., 1998. Du laboratoire aux Ecosystèmes Naturels - Les Indicateurs biochimiques de Contamination chez le Poisson -. Diplome National d'Habilitation à Diriger des Recherches, Université de Paris-Sud.

Roche H., Buet A., Jonot O. et Ramade F., 2000. Organochlorine residues in european eel (*Anguilla anguilla*), crucian carp (*Carassius carassius*) and catfish (*Ictalurus nebulosus*) from Vaccares lagoon (French National Nature Reserve of Camargue) - effects on some physiological parameters. *Aquatic toxicology* 48: 443-459.

Roche H., Buet A. et Ramade F., 2002a. Relationships between persistent organic chemicals residues and biochemical constituents in fish from a protected area: the French National Nature Reserve of Camargue. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 133: 393-410.

Roche H., Buet A. et Ramade F., 2002b. Accumulation of Lipophilic Microcontaminants and Biochemical Responses in Eels from the Camargue Biosphere Reserve. *Ecotoxicology* 11: 155-164.

Roche H., Buet A. et Ramade F., 2003a. Mise ne évidence et validation de biomarqueurs écotoxicologiques dans la population d'anguilles d'un étang de la Réserve Naturelle Nationale de

Camargue, le Vaccarès, exposée à des polluants organiques persistants. *Revue d'écologie -Terre et vie* 58: 127-141.

Roche H., Buet A., Tidou A. et Ramade F., 2003b. Contamination du peuplement de poissons d'un étang de la Réserve Naturelle Nationale de Camargue, le Vaccarès, par des polluants organiques persistants. *Revue d'écologie -Terre et vie* 58: 77-101.

Roche H., Buet A. et Ramade F., 2004. Rechreches écotoxicologiques sur la contamination des peuplements de poissons de la Réserve Naturelle Nationale de Camargue par le polluants organiques persistants. *Revue d'écologie -Terre et vie* 59: 101-111.

Rosecchi E., Poizat G. et Crivelli A. J., 1997. Introductions de poissons d'eau douce et d'écrevisses en Camargue : historique, origines et modifications des peuplements. *Bulletin français de la Pêche et de la Pisciculture*, 344/345: 221-232.

Russel R. W., Gobas F. A. P. C. et Haffner G. D., 1999. Role of chemical and ecological factors in trophic transfer of organic chemicals in aquatic food webs. *Environmental Toxicology and Chemistry* 1999: 1250-1257.

Ruus A., Ugland K. I. et Skaare J. U., 2002. Influence of trophic position on organochlorine concentrations and compositional patterns in a marine food web. *Environmental Toxicology and Chemistry* 21(11): 2356-2364.

Ruus A., Sandvik M., Ugland K. I. et Skaare J. U., 2002a. Factors influencing activities of biotransformation enzymes, concentrations and compositional patterns of organochlorme contaminants in members of a marine food web. *Aquatic toxicology* 61: 73-87.

Sauriau P. G. et Kang.C.K., 2000. Stable isotope evidence of benthic microalgae-based growth and secondary production in the suspension feeder *Cerastoderma edule* (Mollusca, Bivalvia) in the Marennes-Oléron Bay. *Hydrobiologia* 440: 317-329.

Schenck F. J., Calderon L. et Podhorniak L. V., 1996. Determination of organochlorine pesticide and polychlorinated biphenyl residues in fatty fish by Tandem Solid Phase Extraction Cleanup. *Journal of AOAC International* 79(5): 1209-1214.

Schmidt K., Mcclelland J. W., Mente E., Montoya J. P., Atkinson A. et Voss M., 2004. Trophic-level interpretation based on $\delta^{15}N$ values: implications of tissue-specific fractionation and amino acid composition. *Marine Ecology Progress Series* 266: 43-58.

Sheehan D. et Power A., 1999. Effects of seasonality on xenobiotic and antioxidant defence mechanisms of bivalve molluscs. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 123: 193-199.

Shultz, E.D.,1995. Flux control at the ecosystem level. *Trends in Ecology and Evolution*,10(1):40-43.

Skei P., Larsson P., Rosenberg R., Jonsson P., Olsson M. et Broman D., 2000. Eutrophication and Contaminants in Aquatic Ecosystems. *Ambio* 29(4-5): 184-194.

SNPN, 2001. Compte rendu scientifique de la Réserve Nationale de Camargue, 141pp.

SNPN, 2002. Compte rendu scientifique de la Réserve Nationale de Camargue, 120pp.

Solé M., 2000. Assassement of the results of chemucal analyses combined with the biological effects of organic pollution on mussels. *Trends in Analytical Chemistry* 19(1): 1-9.

Solé M., Porte S., Barcelo D. et Albaiges J., 2000a. Bivalves Residue Analysis for the Assessemnet of Coastal Pollution in the Ebro Delta (NW Mediterranean). *Marine Pollution Bulletin* 40(9):746-753.

Sondergaard M., Jeppesen E. et Aaser H. F., 2000. *Neomysis integer* in a shallow hypertrophic brackish lake: distribution and predation by three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*). *Hydrobiologia* 428: 151-159.

Stapleton H. M., Masterson C., Skubinna J., Ostrom P., Ostrom N. E. et Baker J. E., 2001. Accumulation of Atmospheric and Sedimentary PCBs and Toxaphene in a Lake Michigan Food Web. *Environmental Science and Technology* 35: 3287-3293.

Tanaka T. et Rassoulzadegan F., 2004. Vertical and seasonal variations of bacterial abundance and production in the mesopelagic layer of the NW Mediterranean Sea: bottom-up and top-down controls. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers* 51: 531-544.

Tappel A. L., 1978. Glutathione peroxidases and hydroperoxidases. *Methodes in Enzymology* 52: 506-513.

Toro B., Navarro J. M. et Palma-Fleming H., 2003. Relationship between bioenergetics responses and organic pollutants in the giant mussel, *Choromytilus chorus* (Mollusca: Mytilidae). *Aquatic toxicology* 63: 257-269.

Tourenq C., Bennetts R. E., Kowalski H., Vialet E., Lucchesie J. L., Kayser Y. et Isenmann P., 2001. Are ricefields a good alternative to natural marshes for waterbird communities in the Camargue, southern France? *Biological Conservation* 100: 335-343.

Van Der Oost R., Beyerb J. et Vermeulen N. R. E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 13: 57-149.

Van Gestel C. A. M. et Van Brummelen T. C., 1996. Icorporation of the biomarker concept in ecotoxicology calls for a redefinition of terms. *Ecotoxicology* 5: 217-225.

Vander Zanden M. J., Cabana G. K. et Rasmussen J. B., 1997. Comparing trophic position of freshwater fish calculated using stable nitrogen isotope ratios ($\delta^{15}N$) and literature dietary data. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 54: 1142-1158.

Vander Zanden M. J. et Rasmussen J. B., 1999. Primary consumer $\delta^{13}C$ and $\delta^{15}N$ and the trophic position of aquatic consumers. *Ecology* 80: 1395-1403.

Vander Zanden M. J., Casselmant J. M. et Rasmussen J. B., 1999a. Stable isotope evidence for the food web consequences of species invasions in lakes. *Nature* 41(30): 464-467.

Vander Zanden M. J., Shuter B. J., Lester N. et Rasmussen J. B., 1999b. Patterns of food chain lenght in lakes: a stable isotope study. *American Naturalist* 154: 406-414.

Vanderklift M. et Ponsard S., 2003. Sources of variation in consumer-diet $\delta^{15}N$ enrichment : a meta-analysis. *Oecologia* 136: 169-182.

Vizzini S. et Mazzola A., 2002. Stable carbon and nitrogen ratios in the sand smelt from a Mediterranean coastal area: feeding habits and effect of season and size. *Journal of fish biology* 60: 1498-1510.

Vizzini S. et Mazzola A., 2003. Seasonal variations in the stable carbon and nitrogen isotope ratios ($^{13}C/^{12}C$ and $^{15}N/^{14}N$) of primary producers and consumers in a western Mediterranean coastal lagoon. *Marine Biology* 142: 1009-1018.

Vizzini S., Sara G., Mateo M. A. et Mazzola A., 2003. $\delta^{13}C$ et $\delta^{15}N$ variability in *Posidonia oceanica* associated with seasonality and plant fraction. *Aquatic botany* 76: 195-202.

Voie O. A., Johnsen A. et Rossland H. K., 2002. Why biota still accumulate high levels of PCB after removal of PCB contaminated sediments in a Norwegian fjord. *Chemosphere* 46: 1367-1372.

Voorspoels S., Covaci A., Maervoet J., De Meester I. et Schepens P., 2004. Levels and profiles of PCBs and OCPs in marine benthic species from the Belgian North SEa and the Western Scheldt Estuary. *Marine Pollution Bulletin* 49:393-404.

Voss M., Larsen B., Leivuori M. et Vallius H., 2000. Stable isotope signals of eutrophication in Baltic Sea sediments. *Journal of Marine Systems* 25: 287-298.

Wada E., Terazaki M., Kabaya Y. et Nemoto T., 1987. ^{15}N and ^{13}C abundances in the Antarctic Ocean with emphasis on the biogeochemical structure of the food web. *Deep-Sea Research* 34: 829-841.

Wainright S. C., Weinstein M. P., Able K. W. et Currin C. A., 2002. Relative importance of benthic micro algae, phytoplankton and the detritus of smooth cordgrass *Spartina alternlflora* and the common reed *Phragmites australis* to brackish-marsh food webs. *Marine Ecology Progress Series* 200: 77-91.

Wania F., Axelman J. et Broman D., 1998. A review of processes involved in the exchange of persistent organic pollutants across the air-sea interface. *Environmental Pollution* 102: 3-23.

Warren N., Allan I. J., Carter J. E., House W. A. et Parker A., 2003. Pesticides and other micro-organic contaminants in freshwater sedimentary environments-a review. *Applied Geochemistry* 18: 159-194.

Winston G. W. et R.T. D. G., 1991. Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. *Aquatic toxicology* 19: 137-161.

Woo Lee Y., Park, H.J, Won Son, K., Hennig, B., Robertson, L.W. et Toborek, M., 2003. 2,2′,4,6,6′-pentachlorobiphenyl (PCB 104) induces apoptosis of human microvascular endothelial cells through the caspase-dependent activation of CREB *Toxicology and Applied Pharmacology,* 189(1): 1-10.

Zhang Z. L., Hong H. S., Zhou J. L., Huang J. et Yu G., 2003. Fate and assessment of persistent organic pollutants in water and sediment from Minjiang River Estuary, Southeast China. *Chemosphere* 52: 1423-1430.

Zwingelstain G., 1981. Les lipides amphiphiles du poisson. *In* Nutrition des poissons. Actes du colloque C.N.E.R.N.A., Fontaine F. (eds.), Editions du C.N.R.S., Paris: 247-260.

ANNEXES

COMMUNICATIONS ET PUBLICATIONS

BIOTRANSFORMATION AND ANTIOXIDATIVE ACTIVITY IN MEMBERS OF THE VACCARES LAGOON FOOD WEB (INTERNATIONAL BIOSPHERE RESERVE OF CAMARGUE, FRANCE)

Persic A., Roche H.

Communication au colloque national croate d'écotoxicologie "CROTOX", Plitvice, Croatie (avril, 2004)

In this field study the enzymatic defence activities in the Vaccarès lagoon fishes and bivalves were analyzed. This protected brackish ecosystem results influenced by anthropic activity and one of the main problems is the presence of organochlorine (OC) pesticides reaching the lagoon from the bordering agricultural areas. Since biotransformation and antioxidative activity can be induced by such xenobiotics, the corresponding biomarkers (GST, SOD, GPx, Se-GPx, catalase) were used to get an insight to biological responses in aquatic species from distinct trophic levels in Vaccarès food web. Since the major pesticide input occurs in May as result of pest treatments of adjacent rice fields, the enzymatic activities were measured in March, May and September. Our results showed different interspecies and temporal variations of defence activities. Biotransformation biomarker (GST) was particularly important in eels where it displayed important increase in May and September samples. Among the other species no significant variations were recorded and the GST increases in post treatment period was not statistically significant. SOD and catalase measurements exhibited important increases in March and remained high in September, particularly in eels and sand smelts. The same temporal pattern, less significant, was observed for Se-GPx activities. On the contrary, the GPx activities attained the highest levels in March. Although many natural factors may act as significant stressors making it more difficult to identify relationships between OC contamination and organisms responses, the intensification of defence mechanisms (particularly SOD, catalase and GST) in Vaccarès superpredators corresponds to pesticide treatment and consequent increase of OC concentration in the environment. In order to confirm these suggestions the evaluation of tissue and lipid impregnation is being performed on the organisms from the same sampling campaign.

CONTAMINATION BY ORGANOCHLORINE PESTICIDES THOROUGH VACCARES LAGOON TROPHIC COMPARTMENTS

Persic A., Roche H., Ramade F.

Communication orale au colloque national croate "Huitième congres de biologie de Croatie", Zagreb, Croatie (septembre 2003)

Littoral wetlands are ranged amongst most endangered aquatic ecosystems. Even the largest protected coastal wetland in Western Europe, the UNESCO's Reserve of Biosphere of Camargue, is under various stresses due to anthropogenic environmental modifications. In particular, organochlorine (OC) pesticides sprayed on the adjacent agricultural areas get transferred, mainly *via* the irrigation ditches, into the Vaccarès lagoon causing chronic contamination of this aquatic ecosystem.

The objective of this study was to determine the contamination of the Vaccarès lagoon food-web by prohibited and/or strongly restricted and permanently used OC pesticides. In order to establish the lagoon trophic structure the stable isotopes method was used. The isotopic signatures ($\delta^{15}N$, $\delta^{13}C$) and the tissue OC amounts were measured on Vaccarès organisms from different trophic levels (bivalves, crustaceans, prey and predator fishes).

The main goal was to develop pesticide-trophic level relationships in order to estimate the extent of the biomagnification phenomenon.

The results demonstrate the presence of investigated pesticides through all trophic compartments. In the up to date research the infrequency of positive relation between $\delta^{15}N$, $\delta^{13}C$ and pesticide concentration does not indicate regular trophic level biomagnification and suggests that the contamination by OC pesticides in the Vaccarès lagoon food web is not due to trophic transfer only but also to other accumulation processes. It highlights the fact that physiological and metabolic parameters play a significant role in determining bioaccumulation in investigated species. Therefore the effects of OCs on metabolic processes such as biotransformation and oxidative stress will also be evaluated on selected Vaccarès biota.

ORGANOCHLORINE PESTICIDES RESIDUES IN FOOD WEB ORGANISMS FROM A CAMARGUE LAGOON

Persic A., Roche H.

Communication orale au colloque international "Défense des Cultures", Aix-en-Provence, France (mai 2003)

The Reserve of Biosphere of Camargue is a strictly protected area frequently exposed to anthropogenic perturbation related to agricultural and industrial activities. In particular, organochlorine (OC) pesticides sprayed on the adjacent rice fields get transferred, mainly *via* the irrigation ditches, into the Vaccarès lagoon resulting in a chronic contamination of this aquatic ecosystem.

The objective of this study was to determine the contamination by prohibited (or strongly restricted) OC pesticides - lindane, dieldrin, *pp*'-DDE, HCB - and permanently used as diuron and fipronil, in the Vaccarès lagoon food-web. In order to establish its complex trophic structure the stable isotopes method was used. The concentration of ^{15}N and ^{13}C ($\delta^{15}N$, $\delta^{13}C$), as well as the tissue OC amounts were measured on organisms from different trophic levels (bivalves, crustaceans, prey and predator fishes) collected from the lagoon in March, May and April 2002.

The main goal was to develop pesticide - trophic level relationships in order to estimate the extent of the biomagnification phenomenon eventually occurring in this protected ecosystem.

The results demonstrate the presence of pesticides in all the species involved and through all the trophic compartments. In the up to date research, the infrequency of positive relation between $\delta^{15}N$, $\delta^{13}C$ and contaminant concentration does not suggest a trophic level biomagnification of the investigated pesticides. In fact, the tissue impregnation tends to decrease with increasing trophic level, especially within the benthic species. Therefore we suggest that the accumulation of pesticides in the Vaccarès lagoon biota occurs primarily by a passive diffusion process (at the body surface *via* the gills and teguments) directly from water.

BIOAMPLIFICATION DES PESTICIDES ORGANOCHLORÉS DANS LE RESEAU TROPHIQUE AQUATIQUE DE LA RESERVE DE BIOSPHERE DE CAMARGUE

Persic A., Roche H.

Communication orale au colloque national "Deuxièmes Rencontres de l'Ichtyologie en France", Paris, France (mars 2003)

La Réserve Naturelle Nationale de Camargue, constitue l'une des zones humides protégées les plus étendues de l'Europe occidentale. Bien qu'*a priori* protégée par un statut international très strict, elle n'est pas exempte des perturbations liées aux activités humaines qui s'exercent à sa périphérie. Des polluants organiques persistants, notamment des pesticides organochlorés (OC), sont apportés dans l'étang de Vaccarès *via* les canaux d'irrigation des zones rizicoles situées aux abords de la Réserve. Les conséquences écotoxicologiques de ces apports en xénobiotiques se traduisent par une contamination systématique mais fluctuante des poissons du Vaccarès, dont une part pourrait être induite par le biais de la chaîne alimentaire par un mécanisme de bioamplification. Ce mode de contamination fait l'objet de l'étude présentée ici, laquelle concerne, en outre, l'impact des OC sur la structure des réseaux trophiques lagunaires camarguais et leur transfert chez les organismes qui les constituent.

10 espèces, dont un bivalve (*Cerastoderma glaucum*), des invertébrés (*Gammarus salinus, Crangon crangon, Palaemonetes varians*), des poissons - proies préférentielles (*Gobius niger*, *Pomatoschistus microps*, *Gastrosteus aculéates*, *Atherina boyeri*) - prédateurs et super prédateurs (*Anguilla anguilla*, *Stizostedion lucioperca*) - ont été collectés dans le Vaccarès. Le niveau trophique de chaque organisme, basé sur le taux d'enrichissement isotopique en $\delta^{15}N$ (et en $\delta^{13}C$), est déterminé conjointement à l'évaluation de l'imprégnation tissulaire en substances OC (le lindane, la dieldrine, le *pp*'DDE, l'HCB et les PCBs). La description du réseau trophique par la méthode des isotopes stables de l'azote montre une bonne distribution des espèces dans les différentes niches alimentaires dans l'écosystème du Vaccarès. Au sein d'un réseau trophique, une relation statistique entre la charge tissulaire en OC et les $\delta^{15}N$ serait significative du processus de bioamplification.

Cependant, si nos premiers résultats confirment une contamination générale par les OC, quels que soient l'espèce, le niveau trophique ou la saison de prélèvement, ils ne démontrent aucune corrélation significative entre les taux d'imprégnation et le niveau trophique des organismes décrit par le $\delta^{15}N$ ou le $\delta^{13}C$. Au contraire, les concentrations tissulaires en OC diminuent quand le niveau trophique s'élève notamment chez les espèces benthiques. Cette observation suggère un transfert préférentiel des polluants OC par les téguments et les branchies plutôt que par la voie alimentaire, lorsque la concentration en polluants du milieu est très faible. Comme le rapport de la surface corporelle sur le poids est plus important chez un organisme de petite taille que chez une espèce de taille supérieure, la concentration tissulaire en polluants lipophiles est plus élevée aux échelons les plus bas du réseau trophique. A ces niveaux, les mécanismes de bioaccumulation dépendent également des facteurs physico-chimiques des polluants (hydro- et liposolubilité), alors qu'aux niveaux supérieurs ils sont régulés par des facteurs biochimiques, comme les capacités métaboliques. La confirmation de cette hypothèse est envisagée par l'évaluation parallèle de diverses réponses métaboliques chez les organismes situés à tous les niveaux trophiques.

Effect of environmental parameters on the trophic structure of the Vaccarès lagoon ecosystem – A stable isotope approach

Ana PERSIC, Hélène ROCHE, Eric COULET, François RAMADE

(Soumis à *Marine Water Research*, accepté avec corrections)

Abstract

The influence of salinity, temperature and precipitation factors on the evolution of the food web structure of the Vaccarès lagoon (National Nature Reserve of Camargue) determined by stable N and C isotopes, was assessed from autumn 2001 to autumn 2002. 289 organisms, members of 14 aquatic species, were grouped in six trophic categories on the basis of their isotopic signatures, alimentary and habitat preferences. This organization stayed relatively stable in different seasons and no particular dietary shift occurred. Nevertheless, seasonal variations of $\partial^{15}N$ signatures were found. Overall they were not correlated with physico-chemical environmental parameters. They appeared to be linked to metabolic and physiologic processes of individual organisms and to isotopic changes in the bases of food chains. $\partial^{13}C$ seasonal variations depended mainly on the availability of different food resources at the primary production level depending thus directly and indirectly on environmental parameters.

Keywords : trophic web, Mediterranean lagoon, stable isotopes, aquatic ecosystem, environmental parameters

Introduction

The past decades have seen a rise of interest in research concerning aquatic food web structure and organization. The exact determination of the trophic position of organisms as well as an accurate definition of feeding interactions between aquatic biota is fundamental for understanding a wide range of ecologic patterns and processes in aquatic ecosystems. The use of new methods such as stable N and C isotope analysis, based on the fact that both N and C isotope ratios exhibit stepwise enrichment between prey and predator tissues — 3-5‰ for $^{15}N/^{14}N$ ($\partial^{15}N$) and 1‰ for $^{13}C/^{12}C$ ($\partial^{13}C$) (De Niro & Epstein 1978; Minagawa & Wada 1984) — have enabled precise quantification of an organism's trophic position in its natural habitat. However, due numerous biotic and abiotic factors as well as significant environmental variability caused by natural/and or anthropogenic modifications, a precise description of food web dynamics in natural environment is difficult**.**

In terms of ecological complexity and variability, littoral wetlands stand as the most intricate among aquatic ecosystems. The French National Nature Reserve of Camargue (NNRC), designated by UNESCO in 1977 as an 'International Reserve of Biosphere', represents the largest protected coastal wetland in Western Europe (14 000 Ha.). As a deltaic complex of terrestrial, coastal and aquatic areas the NNRC presents natural habitat for a great number of animal and plant species. In this study we focused our attention on aquatic species living in the brackish waters of the Vaccarès lagoon, the largest water body of the NNRC. These species form a particular food web that is constantly exposed to spatial and temporal alterations of salinity gradient and hydrological balance, modified either by climatic events or by human activities. It is also exposed to seasonal, mainly natural, variations in biomass and biodiversity as a result of availability, abundance and species migration factors (Pampoulie 2001).

The present paper reports a study of the Vaccarès lagoon trophic web. The combined stable N and C isotope method was used to assess structure. The main objectives were to investigate seasonal variations of the food web organization in this protected paralic ecosystem and to define and examine the physico-chemical and biological environmental factors influencing its trophic structure.

Materials and Methods

Meteorological measurements were provided by the NNRC staff at the Capelière station located in the East of the Vaccarès lagoon (fig.1) where temperature, precipitation and hygrometry are recorded daily. Salinity levels were measured once a month in 18 sites

covering the whole NRRC aquatic area, including the main water body, the Vaccarès lagoon. Salinity was detected by conductivity using a WTW LF 196 salinity meter with a Tetracon 96A-4 measuring cell that permits direct analysis of water samples *in situ*.

A total of 14 aquatic species (*Copepods sp*., *Cerastoderma glaucum*, *Mysis sp*., *Gammarus salinus*, *Crangon crangon, Palaemonetes varians, Atherina boyer*i, *Pomatoschistus sp., Gastrosteus aculeatus, Syngnatus acus, Abramis sp., Anguilla anguilla, Lepomis gibbosus, Stizosteidon lucioperca*) were collected from La Capelière site in the Vaccarès lagoon from summer 2001 to autumn 2002. The chosen zooplankton, invertebrate and fish species differed in their trophic habits and ecological niches as estimated by the annual NNRC biodiversity report compiled by the French National Nature Conservancy Society (SNPN) (internal publication).

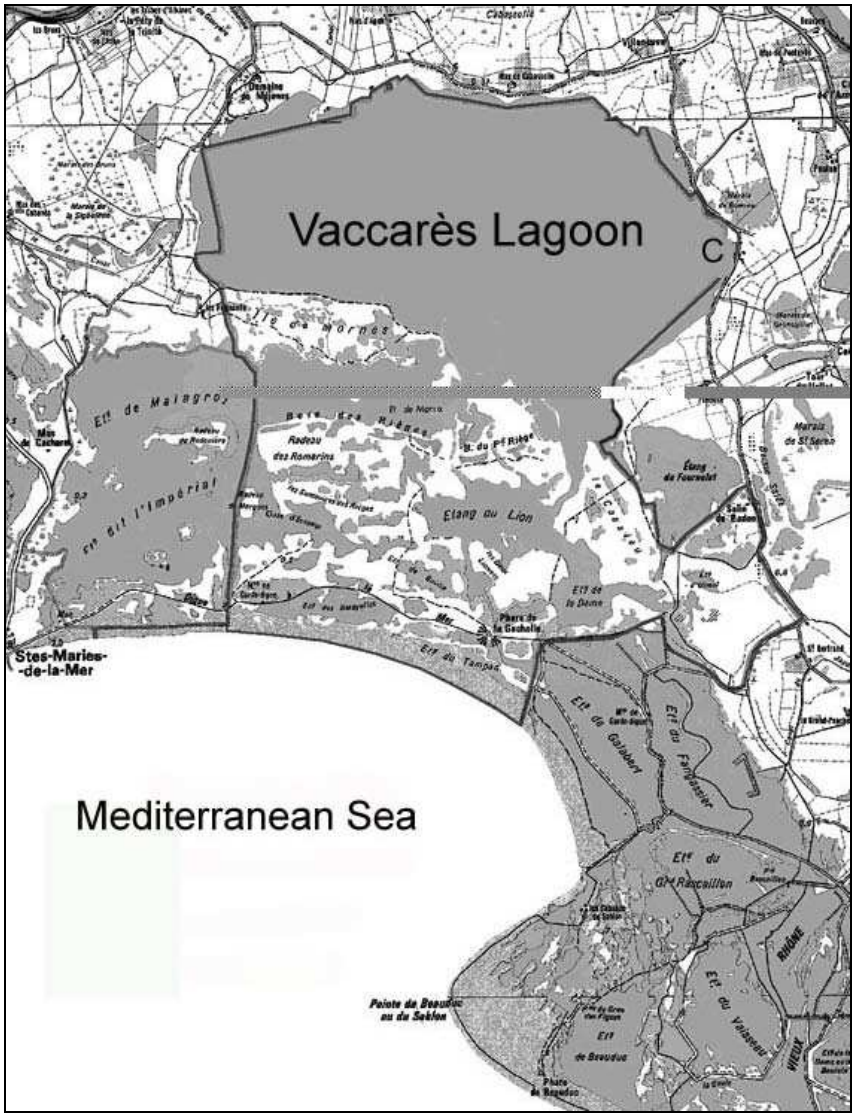


Figure 1 The map of the NNRC area and the sampling site La Capelière (C) in the east of the Vaccarès lagoon.

Fixed fishing nets and metallic-mesh strainers were used for fish and bivalve capture, respectively; crustaceans were trawled in the sampling site. The samples were transported frozen to our laboratory at the Paris-Sud University.

Lipid extraction (dichloromethane/methanol treatment), quantification and separation into phospholipids and neutral lipids (Roche *et al*. 2002) preceded N and C isotopic analyses performed on the same sample; individual data were recorded for fishes and pooled data for invertebrates. The measurements were performed on the whole body mass of organisms with the exception of eels, breams, pike-perches and common sunfishes whose dorsal muscle only was analyzed.

The lipid-free tissues were filtered, freeze-dried and powdered. The 1 mg powder sub-samples were packed into 3.3 X 5 mm tin capsules for N and C isotope measurements performed with a continuous flow isotope ratio mass spectrometer (VG Optima; Model NA-1500, Carlo Erba). Stable isotope abundances were expressed in δ notation as the deviation from standards in parts per thousand (‰) according to the following equation:

$\delta X = \{ (R_{sample} / R_{standard}) - 1 \} \times 1000$,

where X is ^{15}N or ^{13}C and R is the corresponding ratio $^{15}N/^{14}N$ or $^{13}C/^{12}C$. The $R_{standard}$ values were based on atmospheric N_2 for ^{15}N and the PeeDee Belemnite (PDB) values for ^{13}C.

Statistical analyses were achieved with the Statview program. Routine ANOVA was performed to compare isotope readings for the different studied species. Student's t-parametric test was used to search for significant differences ($p<0.05$). Pearson's coefficients of correlation were determined.

Results

Environmental climatic and hydrological characteristics of the Vaccarès lagoon in 2002

Based on the La Capelière station's daily recordings of temperature, precipitation, hygrometry and other environmental data (Table 1), 2002 can be considered a rather wet year with precipitation about 100 mm above the annual mean. The summer and autumn months were exceptionally wet while precipitation during the spring and winter months were lower than the mean values collected from 1944 to 2002 (internal report of the NNRC).

In 2002, average monthly temperatures were generally similar to those recorded in previous years, but the mean annual temperature was 0.8°C higher than that recorded for 1944-2002. This slight tendency towards higher temperature has been noticed over the past few years and seems to be confirmed for 2002. Salinity in the Vaccarès lagoon remained stable during the sampling period (14.0±1.33). The effect of temperature and precipitation factors on salinity

level in the lagoon was thus controlled by careful management of the artificial dykes that introduce fresh water from the Rhone River or sea water from the Mediterranean Sea.

	Sept 2001	Oct 2001	Nov 2001	Dec 2001	Jan 2002	Feb 2002	March 2002	April 2002	May 2002	June 2002	July 2002	Aug 2002	Sept 2002
Temperature (°C)	18.0	18.1	8.8	4.5	6.4	9.6	12.1	14.7	16.8	21.8	22.9	22.2	18.5
Precipitations (mm)	74.8	178.2	29.4	1.2	24.6	59.8	30.8	33.6	66.6	55.2	41.4	51.4	64.4
Salinity (Vaccarès)	14.5	13.5	13.8	14.0	15.1	14.5	14.7	15.5	15.2	14.5	15.1	14.6	13.1

Table 1 - Physico-chemical parameters measured at the Capelière station from September 2001 to September 2002. Salinity was determined by using a WTW LF 196 salinity meter equipped with a Tetracon 96A-4 cell.

Overall stable nitrogen isotopic variability

As expected, there was a large interspecific variability in isotopic content of the 289 analyzed organisms. According to our previous study (Persic, Roche, Ramade, unpublished work), the stable N isotopic values, ranging from 5.65 ± 0.09‰ in zooplankton to 13.25 ± 1.02‰ in *L. gibbosus* (the common sunfish) with a mean trophic enrichment of 3.2± 0.14‰ confirmed trophic emplacement of the selected organisms. Based on N isotopic measurements we were able to group the analyzed species in 6 different trophic categories including primary phytoplanktivorous (zooplankton), depositivorous (cockles and gammarids) and zooplanktivorous (shrimps and mysids) organisms, and secondary benthivorous (gobie, pipe-fish, sand smelt), predator (sticklebacks, breams and juvenile eels), and tertiary top-consumer (yellow eel, common sunfish and pike-perch) (fig.2) fishes. The mean N isotopic values differed significantly between categories, varying from 5.56 ± 0.09‰, 7.81 ± 0.07‰, 9.67 ± 0.13‰ in phytoplanktivorous, depositivorous and zooplanktivorous organisms respectively to 11.00 ± 0.12 ‰, 11.61 ± 0.16‰, 12.40 ± 0.17 ‰ in benthivorous, predator and top-consumer fishes respectively.

This classification is essentially based on the alimentary and habitat characteristics of the collected organisms and represents thus the basis of the complex trophic structure of the Vaccarès lagoon food web.

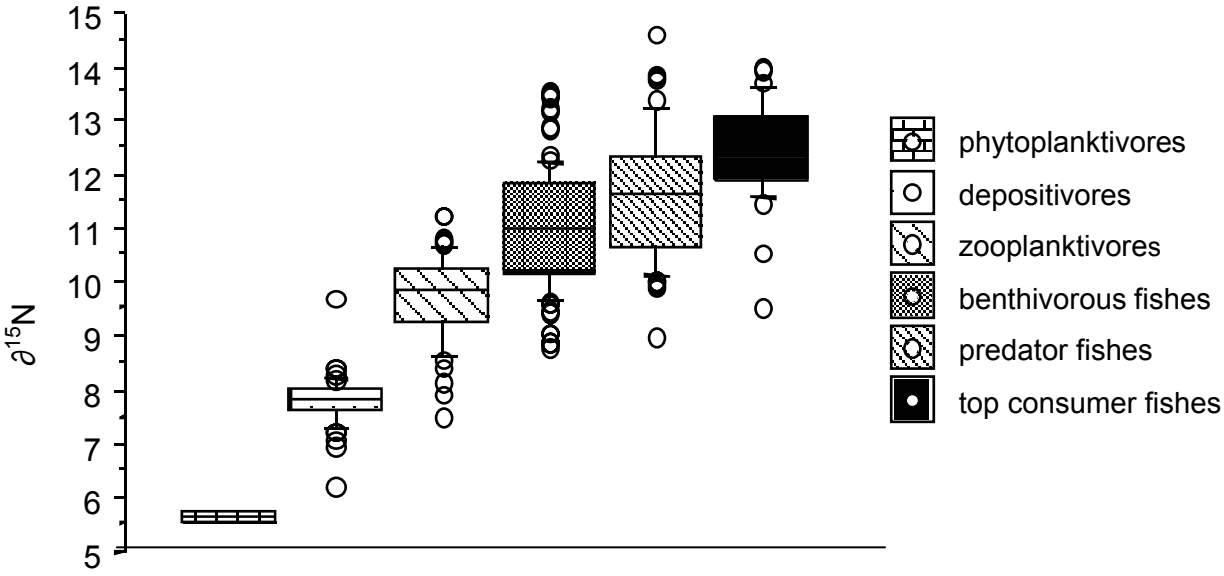


Figure 2 Box-plot graphs of stable nitrogen isotope values through different trophic compartments based on alimentary and habitat preferences of the selected species. 90% of data cent are included in the box distributed around the median and vertical line represent total range of values. Number of individuals $32<n<88$ except phytoplanktivorous : pooled values.

Variations of N isotopic signatures during a year cycle

The figure 3 shows the seasonal evolution of the mean stable N isotopic values through trophic compartments of the Vaccarès lagoon food web from autumn 2001 to autumn 2002. Unfortunately, bad weather conditions and in particular strong wind (mistral) hindered our sampling proceedings during the winter months.

In general our results show a relative stability of the N isotopic values. Seasonal fluctuations were however observed in all the analyzed trophic categories. Top consumers and depositivorous organisms presented regular fluctuations around their mean average values although the patterns were opposing; the values range from 12.24 ± 0.28‰ in autumn 2002 to 13.08‰ in summer 2002 for top consumers. Conversely, depositivorous species presented the highest value (8.07 ± 0.07‰) in autumn 2002 and the lowest in summer 2002 (7.42 ± 0.13‰). The nitrogen isotopic contents in autumn 2001 were significantly lower from the values found in the same season the next year in depositivorous Vaccarès organisms. No such significant annual difference was found in top-consumers.

Secondary predator and benthivorous fishes presented a cyclic seasonal evolution of their N isotopic contents that decreased from autumn 2001 to spring 2002, remaining relatively stable from spring to summer and then increasing from summer 2002 to autumn 2002, when values were similar to those from autumn 2001. The same N isotopic pattern was apparent for the zooplanktivorous biota but the lack of data in autumn 2001 makes this observation entirely hypothetical.

Moreover our results show that the ∂^{15}N differences between the earlier defined trophic compartments remained relatively stable during the seasons. Secondary consumer and top-predator fishes however exhibited an exceptional pattern with a clearly distinct spring and summer period when the difference between ∂^{15}N values reached about 3‰; and then dropped off briskly in autumn when the ∂^{15}N values of predator fishes exceeded slightly those measured in top-consumers. The explanation of this kind of trophic conversion probably lies in the different ecology and biology of individual predated and predator fish species in the Vaccarès lagoon.

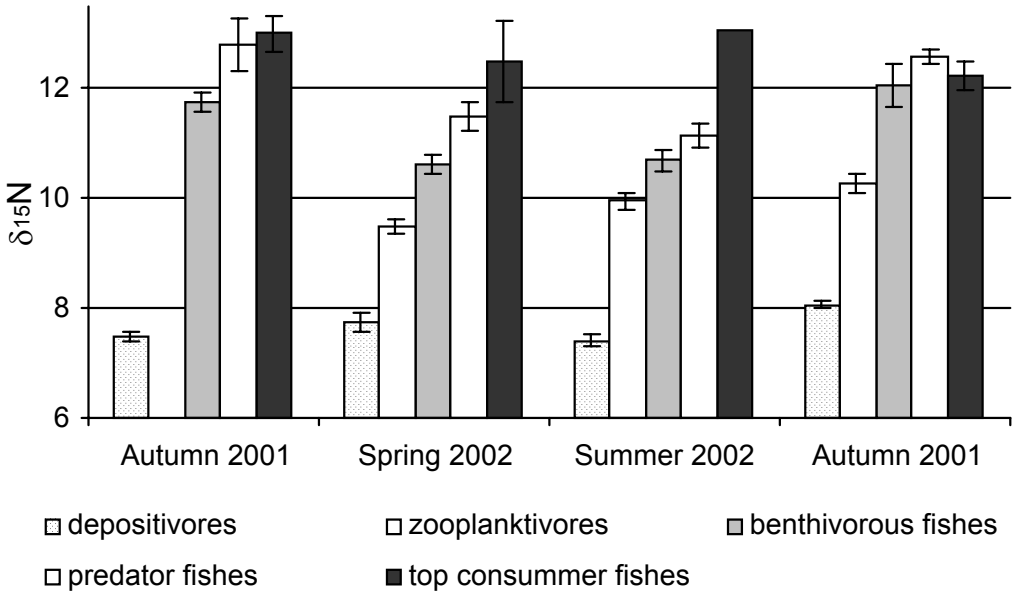


Figure 3 Seasonal variation of the mean stable N isotopic values through trophic compartments of the Vaccarès lagoon food web from autumn 2001 to autumn 2002. Number of individuals $32<n<88$

Stable carbon isotope variability during a year cycle

The stable C isotope measurements did not produce the same pattern as the N values described above. A great inter but also intraspecific variability of the data did not permit the use of C signatures as indicators of trophic emplacement of the organisms confirming the results found in our previous study (submitted article). The values ranged from –26.85 ± 1.97‰ in zooplankton to –15.52 ± 0.40‰ in brown shrimp. The low zooplankton ^{13}C signature was probably due to incorrect non-defatted sample analyses. Generally, mean

average values of $\partial^{13}C$ were highest for zooplanktivorous crustaceans (-18.51 ± 0.58‰) and lowest for top-consumers (-20.84 ± 0.87‰). Both categories presented, however, major variability in interspecific and individual data. In fact the use of $\partial^{13}C$ is relatively limited since the C fractionation process occurs in almost all organisms and environmental reactions; $\partial^{13}C$ values are thus influenced by a large number of natural factors particularly in an unpredictable environment such as the Vaccarès lagoon.

Nevertheless, the seasonal pattern of $\partial^{13}C$ values in the Vaccarès food web showed that isotopic concentration peaks occur during specific periods of the year (fig 4.). In particular, superpredator and benthivorous fishes showed especially high C signatures in springtime (-15.35 ± 0.94‰ and –18.06 ± 0.29‰ respectively). However, deposivorous organisms and predator fishes did not appear to have the same $\partial^{13}C$ pattern, the stable C contents of predators remaining close to the average $\partial^{13}C$ value, while the deposivorous biota presented significant and often intermittent changes of $\partial^{13}C$ profiles through the seasons i.e. -17.13 ± 0.14‰, -19.12 ± 0.51 ‰, –18.15 ± 0.13‰, –22.23 ± 1.00‰ in autumn 2001, spring 2002, summer 2002, and autumn 2002, respectively. We may notice that the minimal and the maximal values were found in autumn. This kind of $\partial^{13}C$ seasonal evolution is probably related to recent changes in environmental factors. For instance the climatic conditions led to a particularly wet summer in 2002 compared with 2001. Such annual variation of $\partial^{13}C$ values is related to physiological and metabolic characteristics of each species, but could probably depend, in a large measure, on abundance, distribution and type of phytoplankton and other organisms that are at the base of all the food chains in this complex trophic web. Moreover, the high $\partial^{13}C$ spring signatures seem to be related to chlorophyll concentrations, measured by the NNRC staff, that presented significant peaks (6 $\mu g.L^{-1}$) in March 2002 for the eastern Vaccarès area. Phytoplankton classification and abundance and biomass determinations have not yet been accomplished.

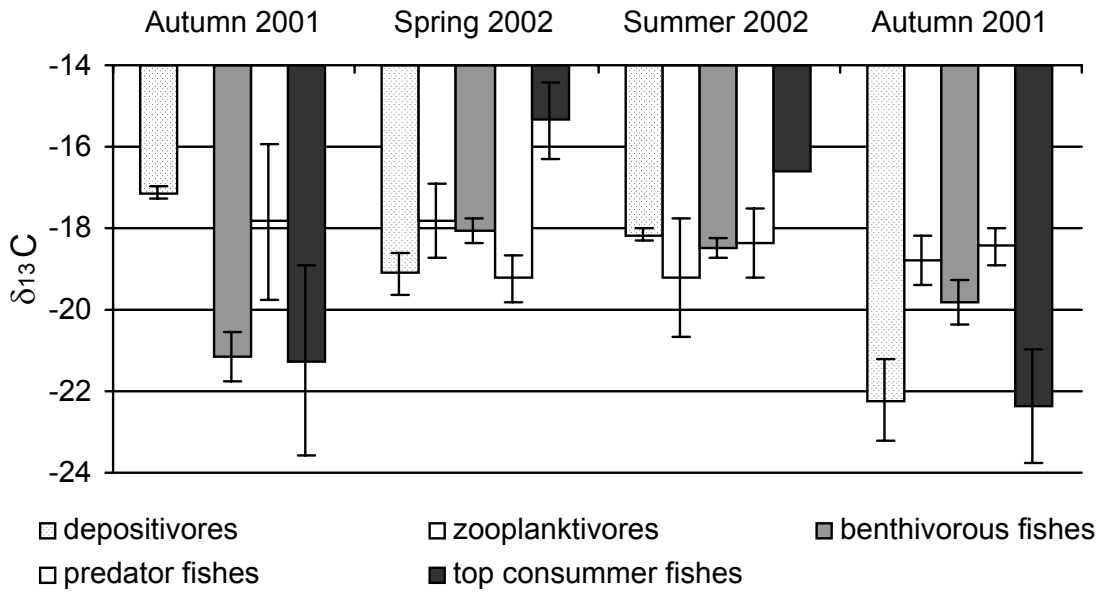


Figure 4 Seasonal variation of the mean stable C isotopic values through trophic compartments of the Vaccarès lagoon food web from autumn 2001 to autumn 2002. Number of individuals $32<n<88$

Effects of natural environmental variations on stable isotope variability

Looking at the ∂^{15}N signatures of the Vaccarès biota, the pooled autumn 2001 - autumn 2002 data did not correlate with studied physico-chemical and climatic factors (temperature, salinity, precipitation). However, ∂^{15}N in specific organisms, mainly zooplanktivorous shrimps and benthivorous gobies, was found to be positively correlated with temperature.

The figure 5 shows seasonal stable N isotope contents in depositivorous cockle and benthivorous goby, two relatively stable and abundant species that share the same benthic habitat but differ considerably for alimentary habits. The rise in ∂^{15}N for gobies from spring (10.75 ± 0.25‰) to summer (13.15 ± 0.13‰) corresponded to an increase in precipitation and a slight decrease in salinity. Conversely, ∂^{15}N signatures were very stable for Cockles, which did not seem to be influenced by temperature, salinity or precipitation level.

In contrast with the above findings, ∂^{13}C values correlated significantly with all studied environmental factors, including the initial but incomplete chlorophyll measurements. When all the data were pooled together, the correlation was found to be positive for chlorophyll concentrations and negative for both temperature and precipitation. Analyzed separately, data for different trophic categories or individual species did not exhibit regular significant correlations (Table 2).

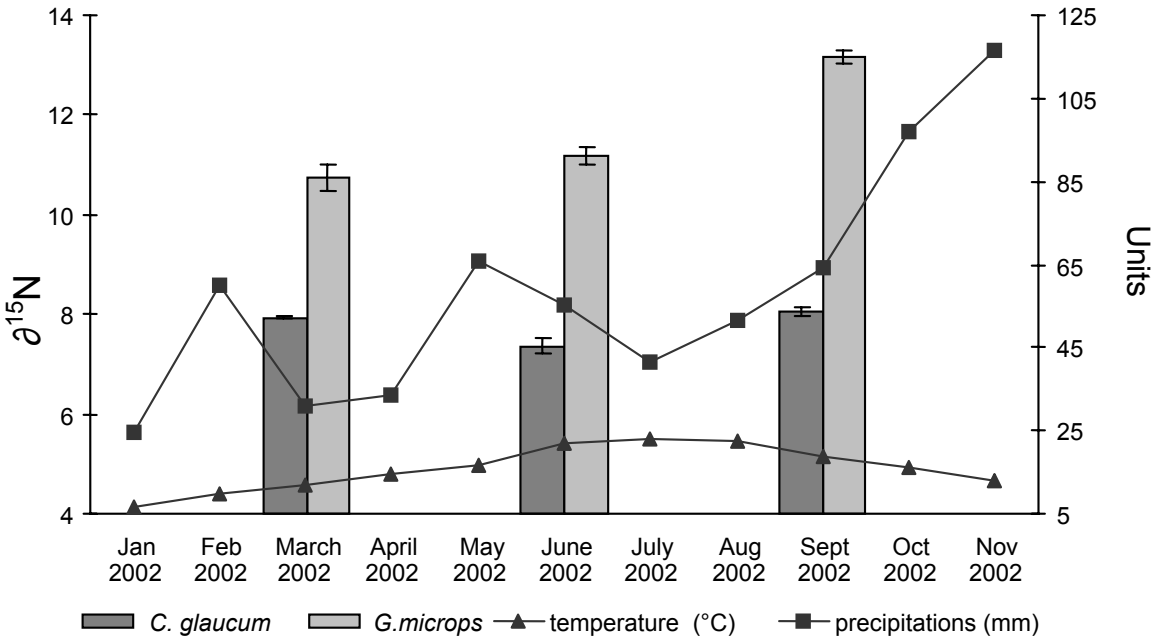


Figure 5 Seasonal stable N isotope contents in depositivorous cockle (number of pools n=14) and benthivorous goby (number of individuals n=17).

	∂^{15}N			∂^{13}C		
	Precipitation	Temperature	Salinity	Precipitation	Temperature	Salinity
C. glaucum (36)			-0.625 *p*=0.0002		-0.421 *p*=0.024	0.698 *p*<0.0001
G. salinus (12)			-0.587 *p*=0.044			
C. crangon (27)	0.492 *p*=0.008	0.461 *p*=0.015	-0.458 *p*=0.015	-0.422 *p*=0.027	-0.593 *p*=0.0008	0.761 *p*<0.0001
P. varians (22)	0.415 *p*=0.054	0.496 *p*=0.027			-0.426 *p*=0.047	
G. microps (28)	0.541 *p*=0.0025	0.69 *p*<0.0001	-0.489 *p*=0.007	-0.419 *p*=0.026	-0.574 *p*=0.001	
A. boyeri (47)		0.437 *p*=0.002				
A. anguilla (25) Juvenile					-0.551 *p*=0.004	

Table 2 –Significant correlations between stable isotope values and environmental parameters (temperature, precipitations and salinity) in invertebrates and fishes from the Vaccarès lagoon. Pearson coefficient, *p* value < 0.05.

Discussion

Changes in certain environmental parameters such as temperature, freshwater input and salinity provide a broad characterization of shallow Mediterranean coastal lagoons (Quignard, 1984). During the year cycle studied here, the Vaccarès lagoon was exposed to variations in temperature and precipitation. Temperature levels followed a regular pattern characteristic of the Mediterranean climate with hot summer months and mild winters and very large variations in precipitation occurred in February, June, August and November when rainfall was unexpectedly high (up to 116 mm in November). Annual precipitation was 100mm above mean average level, defining a particularly wet year.

The salinity level within the Vaccarès lagoon was very stable (14±1.33) as a result of the two environmental parameters described above and the artificial input of freshwater drainage from adjacent agricultural land. In 1993, when the Rhone dykes collapsed pouring 110 million m^3 freshwater into the Vaccarès lagoon, salinity fell substantially from 14 to 5 creating an environmental disaster (Bethemont & Riviere-Honegger, 1998). This problem seems to have been successfully resolved. It must be noted however that such ecological disasters may have a considerable influence on the food web dynamics of the Vaccarès ecosystem by affecting the course of life history traits of all its species, as proposed in the studies reviewed by Pampoulie *et al*. 2000.

In order to determine trophic positions of the Vaccarès organisms we performed stable N and C isotope measurements on the collected biota. As expected on the basis of our previous study (submitted article) and other similar studies (Hobson *et al*. 2002; Bode *et al.* 2003) the isotopic signatures of the studied species showed a general increase of $\partial^{15}N$ signatures with increasing trophic positions. Zooplankton presented the lowest (5.6‰) and top-consumers fishes (eel, pike-perch and common sunfish) the highest (≈ 13‰) $\delta^{15}N$ values with a general enrichment of ≈ 3.2‰ from one level to another in accordance with the trophic enrichment found in the Hobson *et al*. (2002) study. Therefore, by associating $\partial^{15}N$ values, that provided a fine trophic distinction, and the known feeding and habitat preferences we were able to regroup the studied organisms in several trophic compartments: including primary phytoplanktivorous (zooplankton), depositivorous (cockles and gammarids) and zooplanktivorous (shrimps and mysids) organisms, secondary benthivorous (gobies, pipe-fishes, sand smelts), predator (sticklebacks, breams and juvenile eels) and top-consumer (yellow eels, common sunfishes and pike-perches) fishes.

We used this trophic classification as the base of the Vaccarès lagoon trophic structure and we assessed its seasonal evolution from autumn 2001 to autumn 2002. Seasonal variations were

recorded through all the trophic compartments but they did not systematically show the same patterns. While the $\partial^{15}N$ values exhibited in top-consumer and deposivorous species showed regular fluctuations around their mean average values, the predator, benthivorous and probably zooplanktivorous biota showed what seems to be a cyclic evolution with a significant decrease of their ^{15}N contents from autumn to spring, relative stability from spring to summer and another significant increase from summer to autumn when they reached the autumn values of the previous year. Such a seasonal evolution finds its explanation in the physiology of individual species that occupy different trophic compartments. In reality, the stability of $\partial^{15}N$ values found in top-consumer big-sized fishes (adult eels, common sunfishes and pike-perches) is probably based on the fact that whatever the variations of the diet isotopic composition, changes in their own isotopic composition would take more than one year to manifest themselves (Hesslein *et al*. 1993). By contrast, benthivorous (*A. boyeri*, *Pomatoschistus sp*.) or predator fishes (*G. acuelatus*) represent small-size fishes with rapid growth and short lifespan whose $\partial^{15}N$ values might change quickly in response to changes in their diet (Poizat *et al*. 2001; Vizzini & Mazzola 2002). Another hypothesis of seasonal isotopic $\partial^{15}N$ changes in fishes was suggested by different authors (Renones *et al*. 2002). It is based on dietary ontogenic or size-related shifts. In fact, juvenile and adult individuals that dominate estuarine ecosystems in different seasons present various trophic habits, their diet depending on distinct food sources (for example juvenile smelts or gobies feed mainly on zooplankton while the adults consume preferentially benthic preys). However, no significant changes in size and no significant relationships between size and $\partial^{15}N$ were found in this study with the exception of eels confirming thus the different trophic status of juvenile and adult eels.

The stability of $\partial^{15}N$ contents in *C. glaucum* that represents deposivorous organisms could be explained by the overlap and/or the stability of the $\partial^{15}N$ signature of its potential food sources (a mixture of resuspended microphytobenthos and suspended algal particulate organic matter, POM) as suggested by Kang *et al*. 1999 and Sauriau & Kang (2000) who studied isotopic signatures of *C. edule* in the Marennes-Oléron Bay.

The clear image of trophic compartments within the lagoon provided by $\partial^{15}N$ values was only in part supported by $\partial^{13}C$ content found in the selected biota and the use of stable C isotope values were found to be of limited use for trophic level determination. However, when it comes to explaining seasonal trends of trophic structure variations, the $\partial^{13}C$ profiles seem to be of great importance since they highlight sources of production in aquatic ecosystems (Hecky & Heisslein 1995). They are doubtless related to a number of biological effects

closely associated with the seasonal physiology and metabolic processes of single species, as well as the overall environmental conditions (Khim *et al*. 2000). In particular, if we assume that even in the Vaccarès lagoon benthic algae exhibit lower $\partial^{13}C$ values than the phytoplankton (France 1995) and the microphytobenthos presents higher $\partial^{13}C$ values than POM (Sauriau & Kang, 2000), then we could presume that the seasonal $\partial^{13}C$ variations found in our study depended initially on the changes in the availability of food resources at the base of the food web. In fact, spring and summer in the Vaccarès lagoon are characterized by abundance of phytoplankton species (diatoms in spring, *Chlorophyceae* and *Cyanophyceae* in summer) (NNRC report) that explains the peak of chlorophyll concentrations registered in these periods. In accordance, our results show significantly higher $\partial^{13}C$ values of the consumers depending directly (zooplanktivorous) or indirectly (benthivorous, predator and top-consumer fishes) on phytoplankton consuming preys (herbivorous copepods that predominate in the sampling site). By contrast, different seasonal $\partial^{13}C$ profiles of deposivorous organisms with lower ^{13}C content in spring 2002 and a particularly low value in autumn 2002 (≈ -22 ‰) seem to be induced by the difference in availability of their two major food sources, microphytobenthos and POM. The abundant autumn rains could have provoked a more important POM resuspension and consequently facilitated POM uptake by deposivorous cockles causing the recorded decrease of its $\partial^{13}C$ content.

Furthermore, different studies emphasized the important effect of physical environment on the trophic structure of estuarine ecosystems (Briand 1983).

Here we evaluated the correlations between $\partial^{15}N$ and $\partial^{13}C$ signatures of the studied organisms and the temperature, salinity and precipitation values. When the data from the entire study were analyzed together no significant relations were found between $\partial^{15}N$ values and the environmental parameters. However, particularly significant correlations were found in zooplanktivorous brown shrimps and benthivorous gobies whose $\partial^{15}N$ was positively correlated with temperature. It is well known that in paralic ecosystems, most species show migratory movements guided by salinity or temperature preferences resulting in a changing spatial distribution in the course of the day, season or spawning period (Creutzberg,1975). Brown shrimps and gobies present the few truly estuarine species that spend their entire lifetime in the Vaccarès lagoon brackish waters and then develop particular adaptations to its environmental regime (Pampoulie et al. 2000, Gelin et al. 2000). Their $\partial^{15}N$ variations might be explained as an adaptive consequence. Osmoregulatory success in such euryhaline organisms depends on the relationship between net diffusion ion loss and active uptake implying reduced ionic permeability to decrease the effects of osmotic gradients (Hansen et

al,1999). The mechanisms involved in these processes probably imply additional N isotope fractionation that results in variations in $\partial^{15}N$ values exhibited by the lagoon sedentary species.

Furthermore, both shrimps and gobies allocate most of their energy to reproduction during the warm seasons (Pampoulie et al. 2000, Gelin et al. 2000). As assumed by Miller (1975), gobies even cease to grow during the breeding season to obtain higher gonadal investment. These changes in energy allocation certainly depend on a number of biochemical reactions that might favor the lighter N isotope resulting in lower spring and summer $\partial^{15}N$ signatures, as found in this work.

$\partial^{13}C$ values were significantly correlated with the studied environmental factors. In particular a negative correlation was found for both temperature and precipitation features when all data were pooled together. However, when singular species were considered, the correlations were only partial, notably the negative correlations between $\partial^{13}C$ and temperature values that suggest a consistent temperature effect on ^{13}C fractionation. Although the correlations between $\partial^{13}C$ values and environmental parameters were not systematic when different trophic categories or individual species were concerned, the governing patterns of $\partial^{13}C$ variation depend on both biological and physico-chemical variations. Consequently $\partial^{13}C$ values of the Vaccarès biota vary as a result of such a complex combination.

Conclusion

Unpredictable ecosystems, such as shallow estuarine lagoons, imply environmental constraints, in terms of variations in temperature, salinity and water availability. This assigns a greater rigidity of food web shapes and a smaller choice of trophic patterns than those assumed in more constant environmental conditions where weaker interactions may be tolerated, since they can be exploited on a more reliable basis (Briand 1983). In accordance, our results do not demonstrate major alimentary changes or particularly expressed dietary shifts in the Vaccarès lagoon food web during the research period. The $\partial^{15}N$ distinctions were respected in all the seasons excepted the autumn when top-consumer, predator and benthivorous fishes showed less significant difference in their $\partial^{15}N$ profiles. $\partial^{15}N$ and $\partial^{13}C$ seasonal variations probably reflect changes in the lowest levels of the studied trophic web in terms of food source abundance and availability and are certainly induced by different adaptive properties of individual, especially non-migratory, Vaccarès species.

Acknowledgements

We would like to thank François Lescuyer as well as the staff of the National Nature Reserve of Camargue for the meteorological measurements, assistance and technical aid during the samplings. We are also grateful to Caroline Lelarge for stable isotope measurements.

References

Bethemont J. & Rivière-Honegger, A. (1998). Les inondations en Camargue d'octobre 1993 et janvier 1994. In: *Régulation de l'eau en milieu méditerranéen, risques et tensions* (ed Drain M.) Territoires en Mutation 3 CNRS-Université Paul Valéry, Montpellier, pp. 45-59.

Bode, A., Carrera, P. & Lens S. (2003). The pelagic food web in the upwelling ecosystem of Galicia (NW Spain) during spring : naturel abundance of stable carbon and nitrogen isotopes. ICES Journal of Marine Science, 60, 11-22.

Briand F. (1983). Environmental control of food web structure. Ecology, 64, 253-263.

De Niro, M. J. & Epstein, S. (1978). Influence of diet on the distribution of carbon isotopes in animals. Geochimica et Cosmochimica Acta, 42, 495-506.

France, R.L. (1995). Differentiation between littoral and pelagic foodwebs in lakes using stable carbon isotopes. Limnology and Oceanography, 40, 1310-1313.

Gelin, A; Crivelli, A. J., Rosecchi, E. & Kerambrun, P. (2000). Is the brown shrimp *Crangon crangon* (L.) population of the Vaccarès lagoon (Camargue, France, Rhone delta) an annual population. Comptes–rendus de l'Académie des Sciences III Life Sciences, 323, 741-748.

Hecky, R. E. & Hesslein, R. H. (1995). Contributions of benthic algae to lake food webs as revealed by stable isotope analysis. Journal of the North American Benthological Society, 14, 631–653.

Hesslein, R.H., Hallard, K .A. & Ramlal, P. (1993). Replacement of sulfur, carbon and nitrogen, in tissue of growing broad whitefish (*Coregonus nasus*) in response to a change in diet traced by $\partial^{34}S$, $\partial^{13}C$ and $\partial^{15}N$. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 50, 2071-2076.

Hobson, K. A., Fisk, A., Karnovsky, N., Holst, M., Gagnon, J.M. & Fortier, M. (2002). A stable isotope ($\partial^{13}C$, $\partial^{15}N$) model for the North Water food web: implications for evaluating trophodynamics and the flow of energy and contaminants. Deep-Sea Research Part II – Topical Studies in Oceanography, 49, 5131–5150.

Kang, C.K., Sauriau, P.G., Richard P. & Blanchard G.F. (1999). Food sources in the infaunal suspension-feeding bivalve *Cerastoderma edule* in muddy sandflat of Marennes-Oléron Bay, as determined by analyses of carbon and nitrogen stable isotopes. Marine Ecology - Progress Series, 187, 147-158.

Khim, B.K., Woo, K.S & Je J.G. (2000). Stable isotope profiles of bivalve shells: seasonal temperature variations, latitudinal temperature gradients and biological carbon cycling along the east coast of Korea. Continental Shelf Research, 20, 843-861.

Miller, P.J. (1975). Age-structure and life span in the common goby, *Pomatoschistus microps*. Journal of Zoology, 177, 425-448.

Minagawa , M. & Wada, E. (1984) steppique enricment of ^{15}N along food chains : further evidence and the relation between $\partial^{15}N$ and animal age. Geochimica et Cosmochimica Acta, 48, 1135-1140.

Pampoulie, C., Chauvelon, P., Rosecchi, E. Bouchereau, J. L. & Crivelli, A.J. (2001). Environmental factors influencing the gobiid assemblage of a Mediterranean Lagoon: Empirical evidence from a long-term study. Hydrobiologia, 445, 175-181.

Pampoulie, C;, Bouchereau, J.L., Rosecchi, E., Poizat, G. & Crivelli, A.J. (2000). Annual variations in the reproductive traits of *Pomatoschistus microps* in a Mediterranean lagoon undergoing environmental changes: evidences of phenotypic plasticity. Journal of Fish Biology, 57, 1441-1452.

Poizat, G., Rosecchi, E. & Crivelli, A. J. (2002). Life-history variation within a three-spined stickleback population in the Camargue. Journal of Fish Biology, 60, 1296-1307

Quignard, J.P. (1984). Les caractéristiques biologiques et environnementales des lagunes en tant que base biologiques de l'aménagement des pêcheries. In : Aménagement des pêches dans les lagunes côtières (ed. FAO GFCM Etudes et revues) Rome, 61, pp 3-38.

Roche, H., Buet, A. & Ramade, F. (2002). Relationship between persistent organic chemicals residues and biochemical constituents in fishes from a protected area, the French National Nature Reserve of Camargue. Comparative Biochemistry and Physiology C Toxicology and Pharmacology 133C, 393-410.

Renones, O., Polunin, N.V.C. & Goni, R. (2002). Size related dietary shifts of *Epinephelus marginatus* in a western Mediterranean littoral ecosystem: an isotope and stomach content analysis Journal of Fish Biology, 61, 122-137.

Sauriau P.G. & Kang C.K. (2000). Stable isotope evidence of benthic microalgae-based growth and secondary production in the suspension feeder *Cerastoderma edule* (Mollusca, Bivalvia) in the Marennes-Oléron Bay. Hydrobiologia, 440, 317-329.

Vizzini, S., Sara, G., Michener, R. H. & Mazzola, A. (2002). The role and contribution of the seagrass *Posidonia oceanica* (L.) Delile organic matter for secondary consumers as revealed by carbon and nitrogen stable isotope analysis. Acta Oecologica – International Journal of Ecology, 23, 277- 285.

Available online at www.sciencedirect.com
SCIENCE DIRECT
Estuarine, Coastal and Shelf Science 60 (2004) 261–272
ESTUARINE COASTAL AND SHELF SCIENCE
www.elsevier.com/locate/ECSS

Stable carbon and nitrogen isotope quantitative structural assessment of dominant species from the Vaccarès Lagoon trophic web (Camargue Biosphere Reserve, France)

Ana Persic, Hélène Roche*, François Ramade

University of Paris-Sud XI, CNRS UMR 8079, ESE Ecology Systematic and Evolution, Bldg 362, F91405 Orsay Cedex, France

Received 31 July 2003; accepted 5 January 2004

Abstract

The Vaccarès Lagoon (Camargue Biosphere Reserve), a complex brackish ecosystem, is the natural habitat for numerous freshwater, marine and euryhaline species forming a particularly intricate food web. The main objectives of this study were to describe its trophic relations and investigate factors influencing its structure and dynamics. The combined stable C and N isotope method was used to establish a quantitative assessment of the trophic status of Vaccarès organisms. Although the levels of δ^{15}N and δ^{13}C showed large intraspecific and interspecific variations, the isotopic signatures of the species assessed revealed a general trend of ^{15}N enrichment with trophic level. Distribution of the biota into four trophic compartments—depositivore, zooplanktivore, predator, and top-predator—was corroborated by the general analysis of the relationship between δ^{13}C and δ^{15}N. Analysis of seasonal and annual isotopic variations showed that natural environmental changes (increase in food abundance, climatic and salinity variations) as well as individual metabolic capacities would affect the relative stability of an organism's trophic position. No significant correlation was found between isotopic variation and size and growth in fishes except for the eel population where the positive correlation between these two parameters confirmed intra-population trophic variations. Finally, separately examined species exhibited significant, although incoherent, correlation between their isotopic signature and lipid content. This study confirms the efficiency of the isotopic approach in trophic studies and highlights the need for further investigations of anthropic environmental modifications occurring in this protected area and frequently disturbing its food web.
© 2004 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: wetland; stable isotopes; trophic relations; protected area; Camargue

1. Introduction

The French National Nature Reserve of Camargue (NNRC) ranks as the largest strict Nature Reserve (IUCN—UN Category n° 1) of the protected coastal wetlands in Western Europe. Spreading over about 14 000 ha, the NNRC, which is located in the central part of a landscape protected area, the Regional Natural Park of Camargue, is representative of a threatened type of ecosystem and as such was designated in 1977 by UNESCO as an 'International Biosphere' Reserve.

The NNRC currently preserves a complex mosaic of both terrestrial and aquatic habitats enabling extensive biodiversity (Fig. 1). The Vaccarès Lagoon (6400 ha) stands as the largest among the numerous shallow lagoons that occur in the lowest central and southern parts of the NNRC. It is located between two arms of the Rhone River and the coastline. Erection of dikes, high input of fresh water and low water exchange with Mediterranean Sea has generated a positive southward gradient of salinity within the lagoon. In such littoral wetlands the hydrological balance depends on both seasonal variations and freshwater input from canals (Ramade, 1998, 2002; Gelin et al., 2001; Pampoulie et al., 2001). The sheer number, diversity, and complexity of abiotic and biotic factors (Rosecchi et al., 1995; Bardin and Pont, 2002; Roche et al., 2003) render this ecosystem unique and the description of its dynamic food web has proven particularly challenging. Since the food web relationships play a major structuring role in

* Corresponding author.
E-mail address: helene.roche@ibaic.u-psud.fr (H. Roche).

0272-7714/$ - see front matter © 2004 Elsevier Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.ecss.2004.01.009

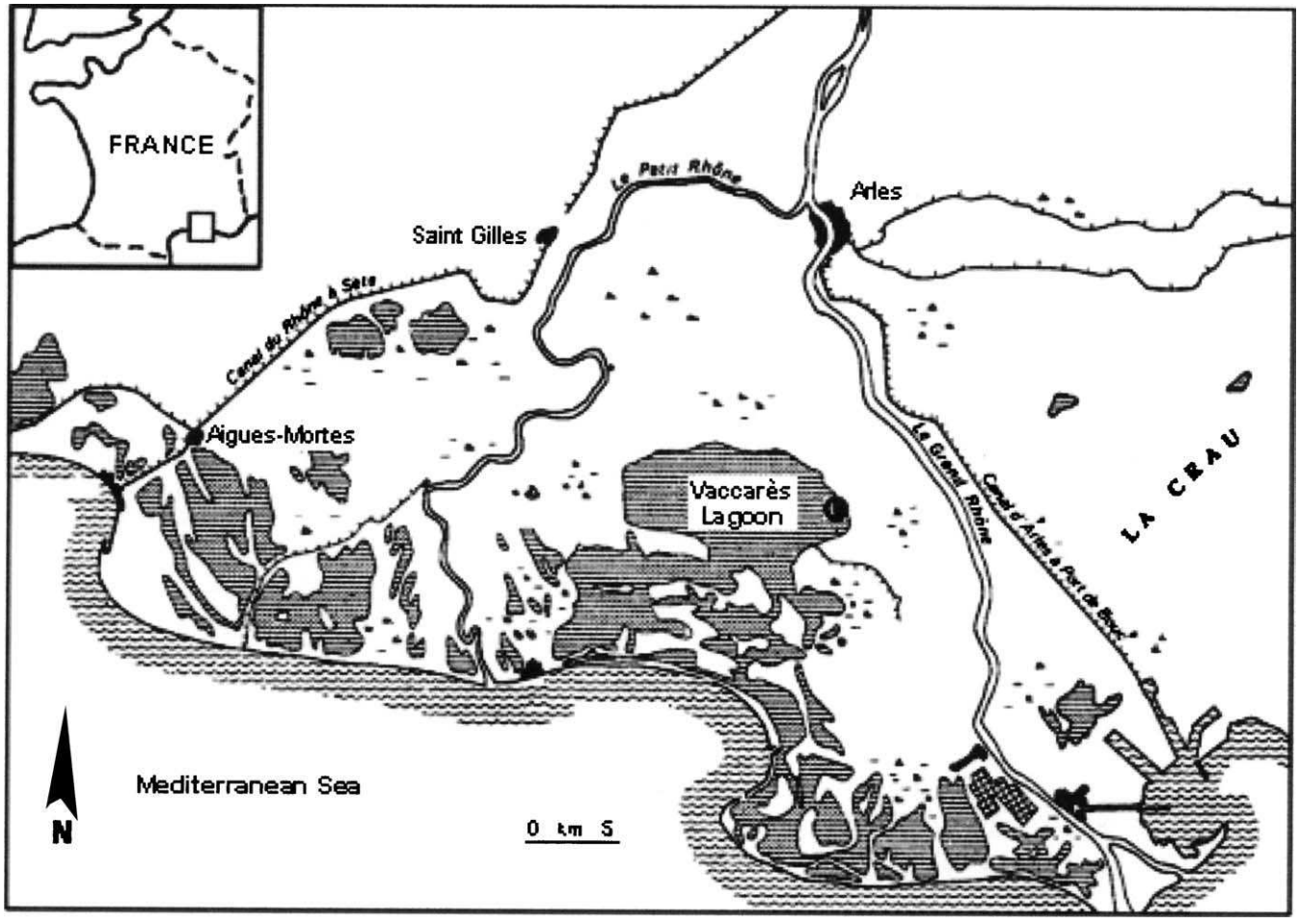


Fig. 1. The Camargue Biosphere Reserve. The sampling site La Capelière (C) is located in the East of the Vaccarès Lagoon.

aquatic ecosystems, determination of the trophic position of an organism highlights numerous aspects of its biology as well as a wide range of ecological patterns and processes. The identification of trophic levels is however confounded by a high level of food web complexity and spatial or temporal variations at a number of scales. Traditional approaches to food web descriptions include gut or stomach content analysis, together with field and laboratory observations (Richter et al., 1999; Beaudoin et al., 2002). These studies highlight what animals feed on with a high degree of taxonomic precision. However, they are labor intensive, subject to errors and delineating what was actually digested and assimilated by consumers remains speculative. The stable isotope method, based on the selective metabolic partition which leads to a preferential waste of lighter isotopes during respiration and excretion (De Niro and Epstein, 1978; Rau et al., 1983), seems to overcome some of these difficulties. This integrative approach distinguishes assimilated rather than ingested food reflecting the complexity of food webs over longer periods (Guiguer et al., 2002; Renones et al., 2002). It has been shown that naturally occurring stable isotopes of nitrogen and carbon display a stepwise enrichment between prey and consumer tissue. In particular, the heavier nitrogen isotope becomes progressively enriched from prey to predator (3–5‰). The values of $\delta^{15}N$ therefore provide a continuous variable which is able to quantify relative trophic positioning of biota (Van der Zanden et al., 1997). Stable carbon isotope ratios ($^{13}C/^{12}C$; $\delta^{13}C$ values) also show trophic enrichment (1‰) but are principally used to elucidate sources of primary production in aquatic ecosystems and to trace carbon flow from primary producers to tertiary consumers (Gu et al., 1996; Vizzini et al., 2002).

This paper presents the first attempt to make an accurate description and representation of the Vaccarès Lagoon food web using the combined stable C and N isotope method. The objectives of this work were to characterize trophic relationships in dominant species within the lagoon, to describe their changes in time and to examine factors influencing the trophic status of individual organisms whose feeding history is poorly understood.

2. Materials and methods

2.1. Biological material and sample collection

Species were selected in accordance with the annual NNRC biodiversity report, an internal publication of the French National Nature Conservancy Society (SNPN). Sixteen different aquatic species were screened according to their estimated trophic level in the Vaccarès Lagoon food web (Crivelli, 1981; Bardin and Pont, 2002). Common and scientific names and the biometry of the investigated fish species are given in Table 1.

For the present study, the lowest trophic level was the zooplankton level, which is mainly composed of phytoplanktivorous copepods. Species in the lower trophic level studied were the cockle *Cerastoderma glaucum*, a bivalve, and crustacean species: Mysidaceae *Mysis* sp.; *Gammarus* sp., gammarid shrimps and *Palaemonetes varians* and *Crangon crangon* pink and brown shrimps, respectively. According to data in the literature, based mainly on classical gut content analysis *C. glaucum* is a filter-feeding species that feeds on phytoplankton and on particulate organic matter deposits. The mysids and the gammarid shrimps are mainly zooplanktivorous, feeding on copepods and detritus. At higher trophic levels three 'groups' of fishes were considered; the first consisted of organisms that feed mainly on smaller crustaceans and zooplankton (*Atherina boyeri*, *Gobius niger*, *Pomatoschistus* sp., *Gasterosteus aculeatus*, *Syngnathus acus*), the second was represented by the predator fishes feeding on smaller fishes (*Anguilla anguilla*, *Lepomis gibbosus*, *Stizostedion lucioperca*). *Abramis* sp. and Mugilidae sp. comprised the third 'group', i.e. preferentially freshwater fishes. Juveniles of mullets and breams generally feed on periphyton and detritus but may also prey on macroinvertebrates such as insect larvae. The sampling site, an area called La Capelière, is located in the eastern part of the lagoon, approximately 300 m to the north of the mouth of the canal which drains rice field irrigation waters (Fig. 1). Biological samples were collected in March, April, May, June and September 2001 and in March, April and May 2002. Fishes were sampled with fixed fishing nets, bivalves were collected with metallic-mesh strainers and crustaceans were trawled in the sampling sites. When collected, all the samples were stored frozen for transport to the laboratory at the Paris-Sud University. The stable isotope analyses were performed on the whole body mass of invertebrates and smaller fishes, whereas samples of dorsal muscle of predator fishes were taken and subsequently analyzed. The same sample, which was pooled for the invertebrates and processed individually for the fishes, was used for C and N measurements.

2.2. Stable isotope analysis

After lipid extraction and separation (chloroform/methanol treatment), the lipid-free residues were filtered and the obtained tissue samples were freeze-dried and powdered. The 1 mg powder sub-samples were packed into 3.3 × 5 mm tin capsules for stable isotope measurements performed with a continuous flow isotope ratio mass spectrometer (VG Optima; Model NA-1500, Carlo Erba). The C and N stable isotopes were analyzed on two separate sub-samples. Stable isotope abundances were expressed in δ notation as the deviation from standards in parts per thousand (‰) according to the following equation:

$$\delta X = [(R_{\text{sample}}/R_{\text{standard}}) - 1] \times 1000,$$

where X is ^{13}C or ^{15}N and R is the corresponding ratio $^{13}C/^{12}C$ or $^{15}N/^{14}N$. The R standard values were based on PeeDee Belemnite (PDB) for ^{13}C and atmospheric N_2 for ^{15}N. Replicate measurements of internal laboratory standards indicate measurement errors of 0.2‰ and 0.3‰ for carbon and nitrogen isotope measurements, respectively.

2.3. Data analysis

Statistical analyses were achieved with the Statview program. When the normality and the variance homogeneity of the data were demonstrated, statistical differences were checked using the parametric Student's

Table 1
Biometry of the analyzed fish species (p: pools; (n) = number of measures)

	Common name	n	Size (cm)	Weight (g)
Atherina boyeri	Sand smelt	41	4.0–10.0	0.6–8.0
Gobius niger	Black goby	4 p.	6.0–6.3	1.77–1.88
Pomatoschistus sp.	Sand goby	16	2.2–5.6	0.24–2.36
Gasterosteus aculeatus	Three-spined stickleback	24	2.0–5.3	0.09–1.84
Sygnathus acus	Pipe-fish	10 p.	5.5–11.6	0.20–0.77
Anguilla anguilla juvenile	European eel	19	20.0–33.0	10.4–89.6
Anguilla anguilla yellow	European eel	14	39.0–57.6	107–387
Lepomis gibbosus	Common sunfish	4	10.5–12.4	26.4–44.7
Stizosteidon lucioperca	Pike-perch	4	27.0–27.9	152–170
Abramis sp.	Common bream	4	9.0–17.6	7.8–52.5
Mugilidae sp.	Mullet	6	2.2–4.1	0.12–0.65

t-test. Correlations were calculated with Pearson's coefficient.

3. Results

3.1. Stable isotope composition

Sixteen species (1 pooled group of copepods; 5 invertebrates; 10 fishes) of the Vaccarès community were analyzed for stable nitrogen and carbon isotopes. This non-exhaustive list was established, notably for fishes, as a function of the capture success by authorized fishermen in this protected area and therefore corresponds to the current (2001–2002) most common species encountered in the Vaccarès Lagoon.

The δ^{15}N and δ^{13}C levels exhibited intraspecific and large interspecific variations (Fig. 2). The mean values of δ^{15}N ranged from $5.65 \pm 0.09‰$ in copepods to $13.2 \pm 1.0‰$ in top-predator sunfish revealing a general enrichment with increasing trophic position. The mean values of δ^{13}C showed different, irregular patterns, ranging from $-14.4 \pm 0.1‰$ in brown shrimp to $-26.4 \pm 0.04‰$ in pike-perch. The particularly low zooplankton ^{13}C signature ($-26.9 \pm 1.9‰$) can be explained by a non-coherent chemical treatment prior to isotope analysis (non-defatted). De Niro and Epstein (1978) showed that lipids present more negative δ^{13}C values compared to other tissues, so higher lipid content in samples would result in lower δ^{13}C in samples. Despite wide variability, the δ^{15}N profiles reflected to a large extent the theoretical trophic emplacement of the analyzed species. The mullet was an exception due to its specific situation in the lagoon. This preferentially herbivorous fish, which is a periphyton consumer (i.e. a primary consumer) also feeding on macroinvertebrates and insect larvae, is present in the Vaccarès only at the juvenile stages. Consequently its δ^{15}N signature ($10.9 \pm 0.1‰$) did not differ from those of the secondary consumers. With the

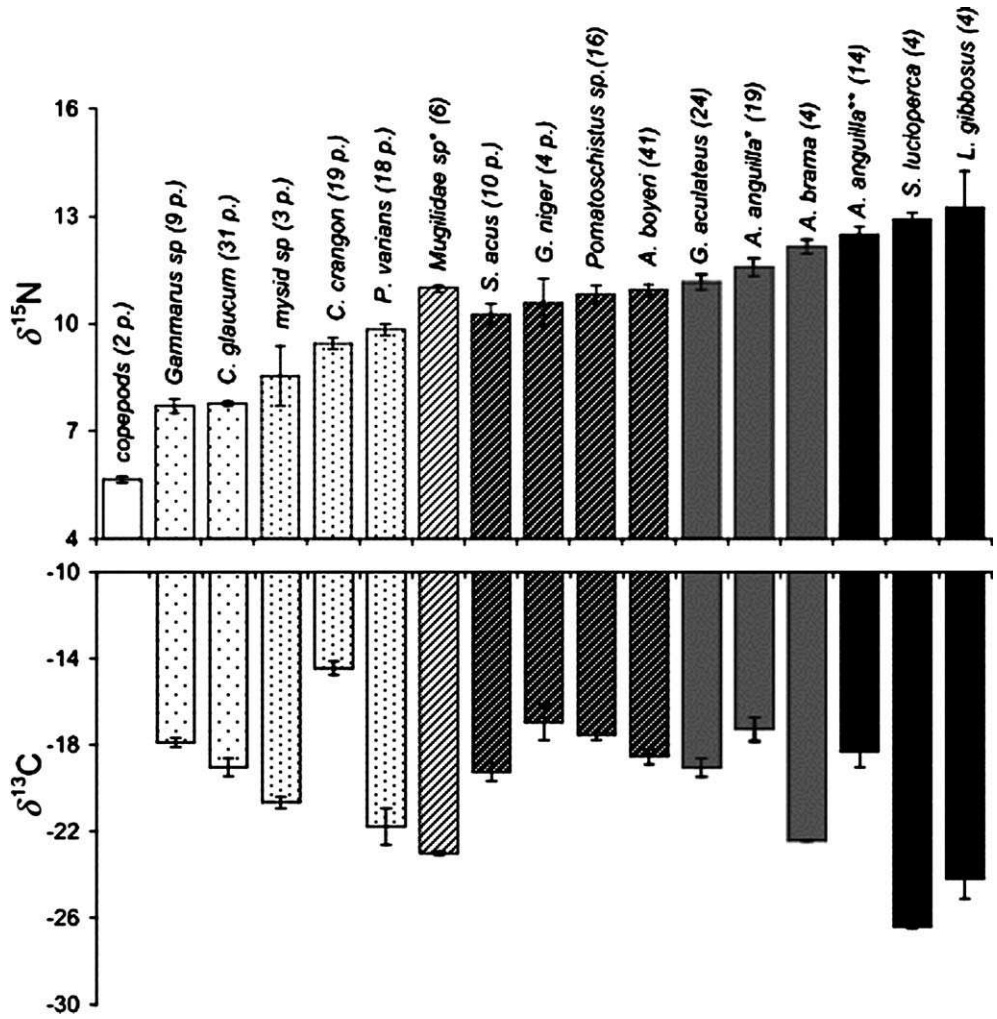


Fig 2. Mean stable isotope values (δ^{15}N and δ^{13}C) in species collected in the Vaccarès Lagoon (Camargue Biosphere Reserve, France). *: Juvenile; **: yellow; p: pools; (*n*) = number of individuals. The bars represent standard errors; □, primary consumer phytoplanktivorous; ⊡, primary consumer depositivorous; ⊡, secondary consumer zooplanktivorous; ▨, primary consumer herbivorous/omnivorous fish; ▨, secondary consumer benthivorous; ■, secondary consumer predator; ■, secondary consumer top-predator.

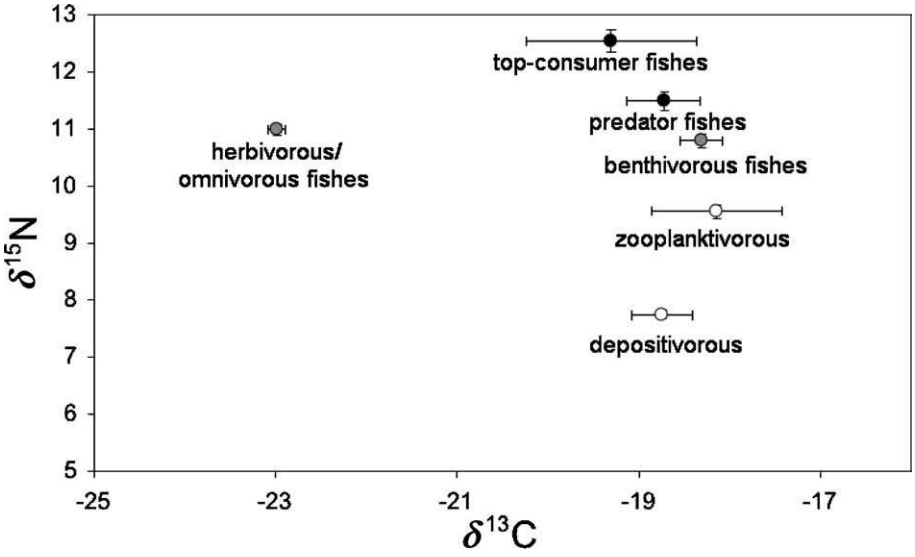


Fig. 3. $\delta^{13}C$ and $\delta^{15}N$ of some trophic categories in the Vaccarès Lagoon.

exception of copepods, which were not processed using the chloroform/methanol procedure, and the juvenile mullet, for the above-mentioned reasons, the $\delta^{13}C$ profile corresponded more or less properly to feeding behavior of the species (Fig. 3).

No correlation was found between $\delta^{13}C$ and $\delta^{15}N$ ($r^2 = -0.09$, Pearson p-value = 0.16, $n = 229$) when data from the entire studied community were pooled together, indicating a non-linear food web ($r^2 = 0.009$). Fig. 4 displays the occurrence of two distinct groups, pelagic versus benthic species, which differ by their pooled mean values of stable isotopes, and also illustrates the presence of approximately three trophic ranks or compartments.

3.2. Isotopic enrichment and trophic levels

Mean isotopic enrichment values were calculated for known consumer–prey couples that were established on the basis of stomach content analysis and other data in the literature. The $\delta^{15}N$ values of consumers exhibited enrichment with increasing food web position but the increase of the $\delta^{13}C$ value was less significant. Consistent with former studies of Hobson and Welch (1992), we noticed that $\delta^{15}N$ enrichment among successive levels was included between 2.8‰ and 3.8‰ with an average of 3.20 ± 0.14‰. Conversely, as previously suggested, the $\delta^{13}C$ did not fit into such classification, because protein, carbohydrate, and lipid components, even in

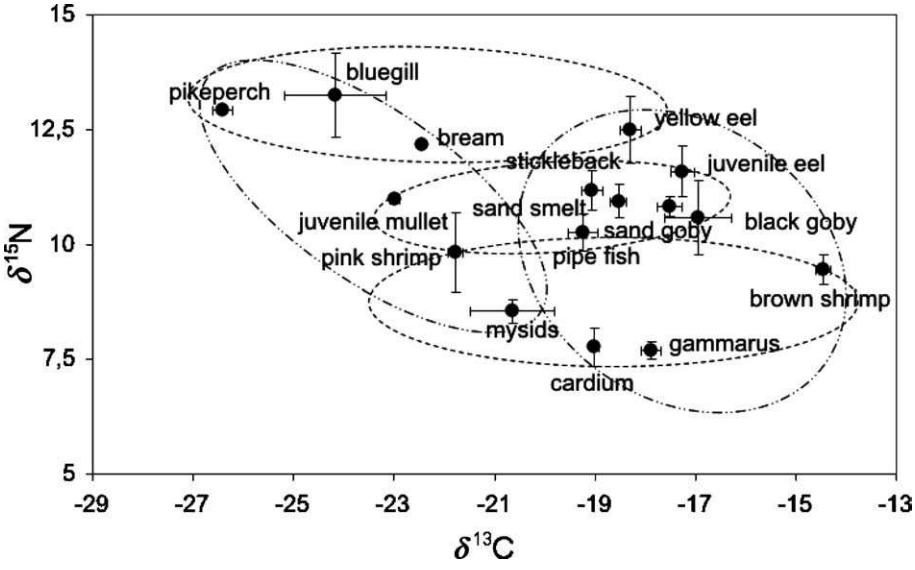


Fig. 4. Trophic relationships between the studied organisms of the Vaccarès Lagoon (Camargue Biosphere Reserve, France), drawn on the basis of stomach contents, literature descriptions, and professional observations and confirmed by ^{15}N analysis (arrow with filled lines), determined from 3.2‰ ^{15}N enrichment (arrow with dotted lines) and 3.2‰ ^{15}N enrichment without possible feeding relations (irregular dotted lines).

previously defatted samples, impinge on the rates of ^{13}C enrichment (Wada et al., 1987). The study was focused on nitrogen isotopes and the trophic level of each of the organisms was estimated on the basis of $\delta^{15}N$ enrichment using the formula:

$$\text{Trophic position} = \lambda + (\delta^{15}\text{N organism} - \delta^{15}\text{N base of the food web})/3.2$$

where $\lambda = 2$ is the trophic position of copepods used to estimate the $\delta^{15}N$ base of the food web, $\delta^{15}N$ organism is measured directly and 3.2 is the calculated average enrichment in $\delta^{15}N$ per trophic level in the Vaccarès Lagoon food web. The results were quite similar after taking into account the estimation of the isotopic enrichment from depositivores.

Consequently the trophic levels were ranked from 2 in zooplankton to 4.37 in the piscivorous sunfish (Table 2). Ultimately, a scheme describing the feeding relationships of the analyzed dominant components of Vaccarès Lagoon trophic web (Fig. 5) was achieved by integrating the theoretical data with the results from the investigations described above.

3.3. Influence of annual cycle on the isotopic composition of food web components

Seasonal variations in $\delta^{15}N$ and $\delta^{13}C$ signatures of the Vaccarès biota were evaluated. In particular the time course was compared of the isotopic profile of two dominant species which have a large population in the lagoon over the entire annual cycle: *Atherina boyeri* ($n = 23$) and *Cerastoderma glaucum* ($n = 17$ pools). Their isotopic composition was monitored from the end of the winter (March) through spring (April, May, June) to the end of the summer (September) 2001.

The results show a general trend towards a slight enrichment of the $\delta^{15}N$ values for both species, from the end of winter to summer (Fig. 6a) with a significant increase of $\delta^{15}N$ signatures in June followed by a slight decrease in late summer. Seasonal changes of $\delta^{13}C$ profiles followed a completely different and rather irregular pattern (Fig. 6b). However, the more or less variable changes in the $\delta^{13}C$ signatures of the two investigated species were similar throughout the seasons, though a rather brisk distortion was observed for the September samples, decreasing for the sand smelt and increasing significantly for the cockle.

The annual spring variations were assessed by comparing $\delta^{13}C$ and $\delta^{15}N$ values obtained in spring 2001 and 2002 for primary (*Cerastoderma glaucum*, *Gammarus salinus*) and secondary (*Atherina boyeri*, juvenile *Anguilla anguilla*) consumers which served as representatives of two different, successive trophic levels (Fig. 7). Some of the considered species showed a tendency towards a slight decline of $\delta^{15}N$, significant in the bivalve and the smelt (DF = 10, t-value = 2.5, $p = 0.03$; DF = 22, t-value = 2.13, $p = 0.04$, respectively) and conversely a slight growth of $\delta^{13}C$, which was significant in juvenile eels and cockles (DF = 10, $t = -4.40$, $p = 0.007$; DF = 8, t-value = -2.70, $p = 0.03$, respectively). The observed variations, never exceeding 2‰ nitrogen enrichment, did not suggest any change in the trophic structure of the Vaccarès Lagoon, but rather confirmed the influence of natural environmental variations on isotope composition of its community.

3.4. Influence of size and growth on the isotopic composition of food web components

The correlations between isotopic composition and weight, length and relative condition index, calculated as a function of the Vaccarès population in 7 fish species were also evaluated (Table 3). A positive significant correlation between size and $\delta^{13}C$ values was found in 3 fishes: three-spine stickleback, juvenile mullet and sand smelt. Although these results might suggest that intra-population habitat and trophic differences may be responsible for the observed variation in body size, no relationship was found regarding the $\delta^{15}N$ signatures with the exception of the European eel whose $\delta^{15}N$ values increased with increasing size.

4. Discussion

The outstanding biodiversity of the Vaccarès Lagoon is related to environmental factors. The structure of its trophic web depends on the balance between tolerance

Table 2
Trophic levels calculated from an enrichment level of ^{15}N equal to 3.2 in food-web components of the Vaccarès Lagoon (Camargue Biosphere Reserve, France)

	Trophic level		Trophic level		Trophic level
Zooplankton	2.00 ± 0.03	Pipefish	3.44 ± 0.09	Carp bream	4.03 ± 0.21
Gammarids	2.64 ± 0.06	Black goby	3.54 ± 0.21	Yellow eel	4.14 ± 0.07
Cockle	2.66 ± 0.03	Sand goby	3.62 ± 0.08	Pike-perch	4.27 ± 0.06
Mysids	2.91 ± 0.26	Sand smelt	3.65 ± 0.05	Sunfish	4.37 ± 0.32
Brown shrimp	3.19 ± 0.05	Juvenile mullet	3.67 ± 0.03		
Pink shrimp	3.31 ± 0.05	Stickleback	3.72 ± 0.07		
		Juvenile eel	3.85 ± 0.08		

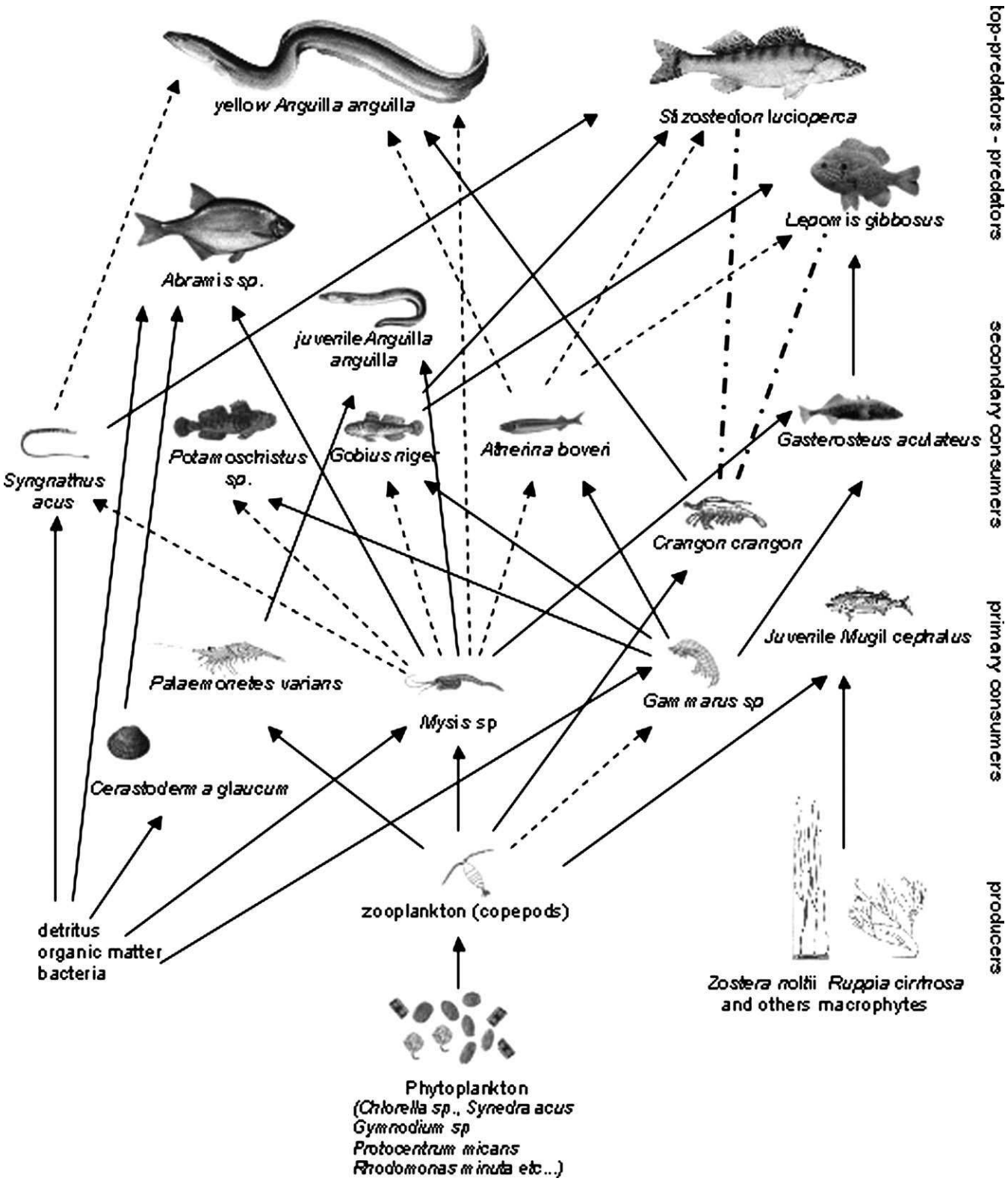


Fig. 5. Stable-carbon and stable-nitrogen isotope values of components of the Vaccarès food web (Camargue Biosphere Reserve, France).

and impacts of their variations (Ramade, 1998, 2002). A large body of work in studies listed by Bardin and Pont (2002) has been devoted to the influence of environmental factors, diel and tidal cycles, tidal currents or wind-induced current patterns, water turbidity, and hydrographic regime prevailing on the numbers of species, notably young fishes, entering the lagoon. The number of fish entering the lagoon is largely influenced

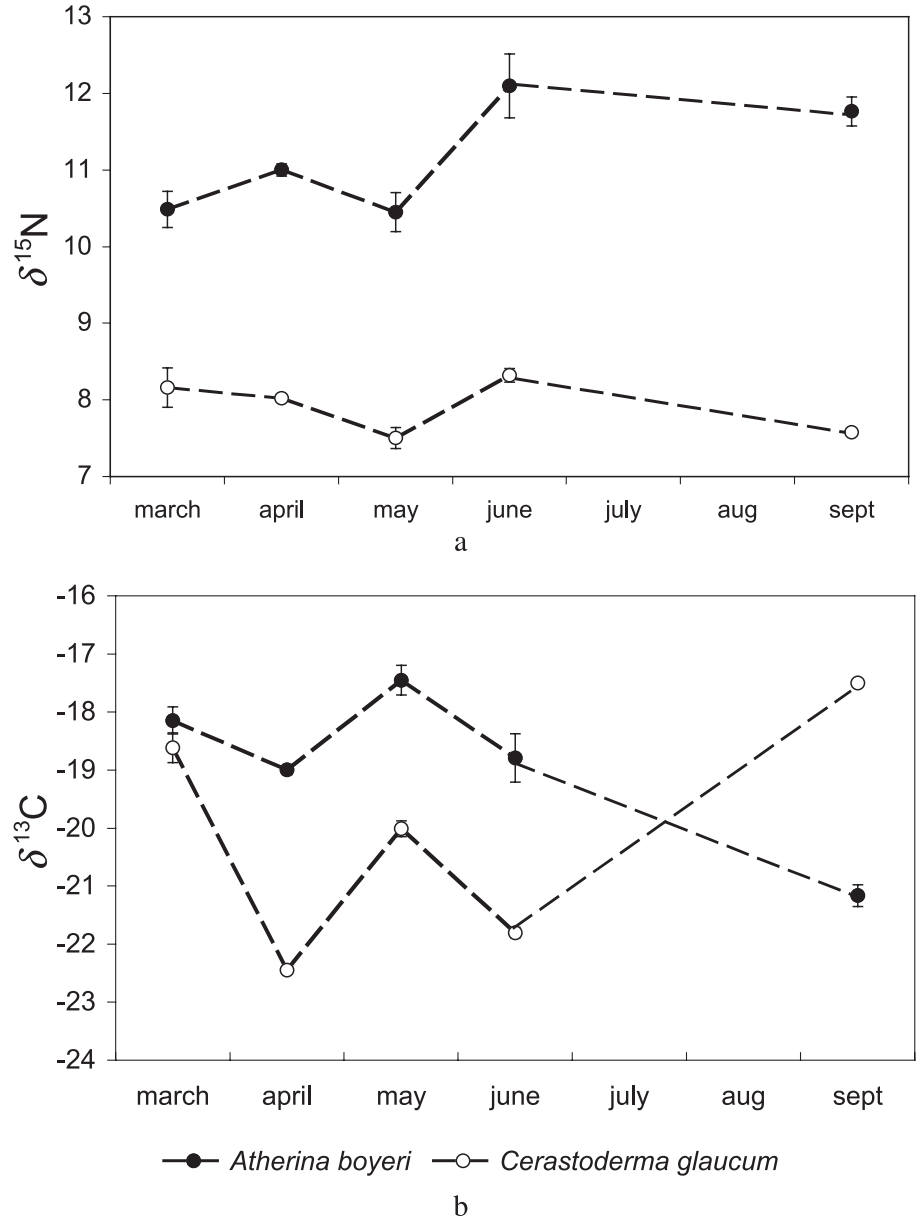


Fig. 6. Seasonal variations of (a) δ^{15}N and (b) δ^{13}C in the cockle (*C. glaucum*) and the sand smelt (*A. boyeri*) from the Vaccarès Lagoon during the year 2001.

by actively inflowing currents defined as selective tidal stream transport. In previous work we have also demonstrated the effects of anthropic factors on fish species in Camargue (Roche et al., 2002a,b, 2003). The present investigation involving the Vaccarès trophic web, addresses another ecological topic: consumer–prey relations between organisms living in this community.

The isotopic signatures of species assessed in the present work revealed a general increase of ^{15}N enrichment with trophic level. The lowest values were found for copepods (5.6‰) and the highest for the three 'superpredator' fishes (≈13‰) (*Stizostedion lucioperca*, *Anguilla anguilla* and *Lepomis gibbosus*). Conversely, this type of pattern was not seen for δ^{13}C. ^{13}C reflects carbon flow from organic matter to consumers (Gu et al., 1996) and consequently can vary intensely with food web elements (Hobson et al., 2002). The interspecific variations of δ^{15}N and δ^{13}C were associated with a large dispersion of individual data suggesting both intraspecific and intra-population disparities. Isotopic signatures are known to vary greatly within taxonomic groups. Hobson and Welch (1992), who studied an arctic marine ecosystem and Vizzini and Mazzola (2002), who studied a Mediterranean coastal area, have largely explained these differences by the type of habitat and feeding habits. Indeed these authors found a correlation between δ^{13}C and δ^{15}N in the pelagic species and a lower trophic enrichment of ^{13}C in the benthic species.

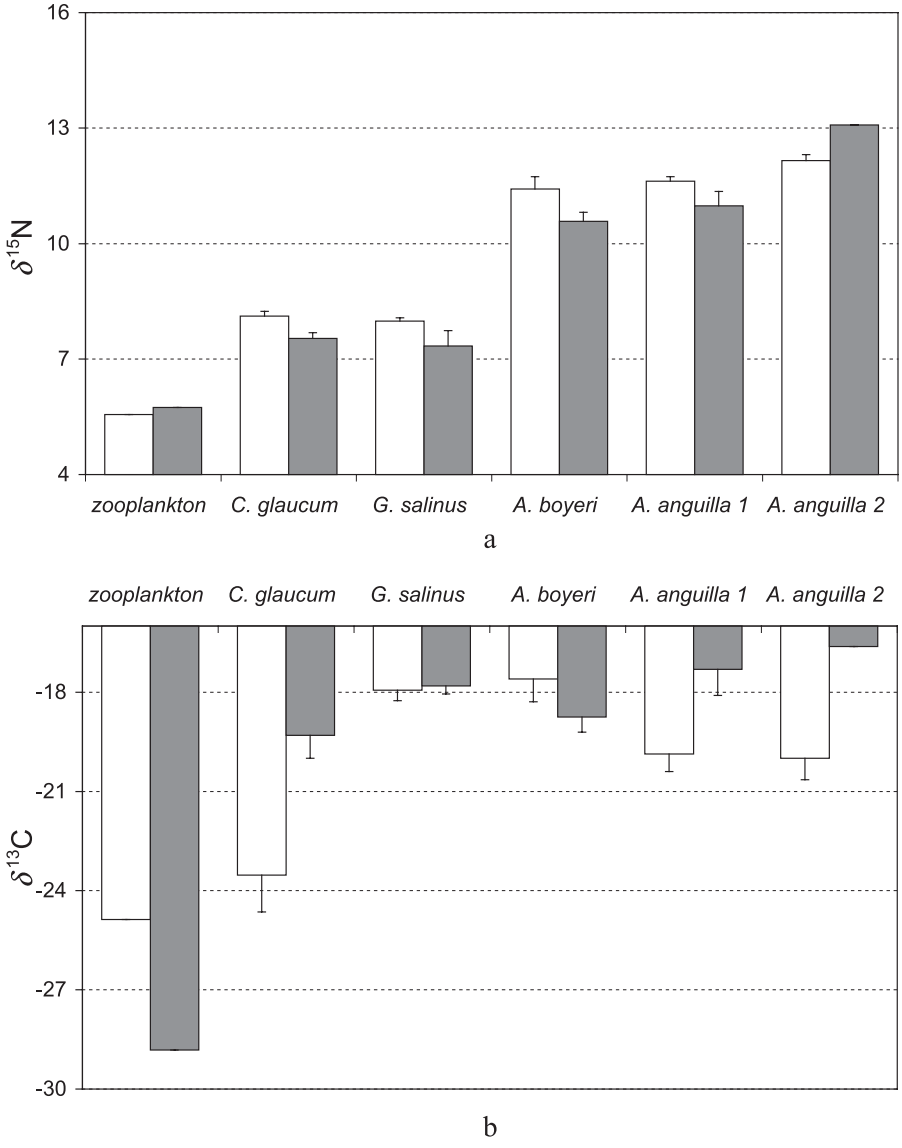


Fig. 7. Annual variations of (a) δ^{15}N and (b) δ^{13}C in depositivores: the cockle (*Cerastoderma glaucum*) and the gammarid (*Gammarus salinus*) and in small consumer fishes: the sand smelt (*Atherina boyeri*) and the juvenile eel (*Anguilla anguilla* 1) and in the yellow eel (*Anguilla anguilla* 2) from the Vaccarès Lagoon. The bars represent standard errors; □, spring 2001; ■, spring 2002.

In the Vaccarès Lagoon, it was not possible to demonstrate any correlation between δ^{13}C and δ^{15}N, whether within the total community of the ecosystem or in the pelagic group. Hecky and Hesslein (1995) showed that the use of stable C isotope ratios increases N isotope trophic position evidence and provides a means of discrimination between benthic and pelagic sources of production. Benthic species become more enriched in ^{13}C than pelagic species. In the present work the lack of concordance with proposed models (Hobson et al., 2002) is undoubtedly due to the isotopic variability linked to the dietary activities of the majority of the studied species. In such brackish ecosystems, the trophic web structure depends on environmental and seasonal factors; consequently many opportunistic feeders are periodically present. Nevertheless analysis of the relationship between δ^{13}C and δ^{15}N provided a good distinction between the trophic compartments: depositivores; zooplanktivores (planktonic or nektonic microphagous predators); medium size macrophagous predators; and large top-predators.

The use of δ^{13}C was limited in the determination of trophic positions, and δ^{15}N enrichment was used to calculate the trophic levels (TL). Indeed, known feeding modes and habitat preferences were associated with individual ^{15}N values, demonstrating a regular enrichment of 3.2‰ from one level to another. The δ^{15}N value in copepod pools was about 5.5‰ suggesting that in most cases, herbivorous zooplankton had been collected. Level 2 was consequently attributed, empirically, to the zooplankton group. This enabled calculation of the TL of each consumer sample by taking into account

Table 3
Significant correlations between stable isotopes values and body parameters (weight, size and condition index) in fishes from the Vaccarès Lagoon (Pearson coefficient, p-value < 0.05)

	δ^{15}N vs			δ^{13}C vs		
	Weight	Length	Relative condition index	Weight	Length	Relative condition index
Pipefish (10)						
Stickleback (20)			−0.515 $p = 0.019$	0.555 $p = 0.009$	0.606 $p = 0.004$	
Juvenile mullet (6)				0.876 $p = 0.019$	0.979 $p < 0.0001$	
Sand goby (16)						
Black goby (4)						
Sand smelt (41)				0.608 $p < 0.0001$	0.641 $p < 0.0001$	
Eel (35)	0.41 $p = 0.026$	0.485 $p = 0.007$				

the constancy of δ^{15}N enrichment among trophic levels of the aquatic food web, an approach previously employed by Hobson et al. (2002). TL was less than 3 for depositivorous species and ranged from 3 to 4 for the group of consumers composed of shellfishes plus non-piscivorous fishes. For top-predator fishes, TL was greater than 4. The trophic web structure drawn up from this isotope evidence validated the assumed feeding habits and revealed other previously unknown feeding relationships. The 'feeding map' presented in Fig. 4 highlights the central position of mysids as often described in brackish waters of Western Europe (Sondergaard et al., 2000; Vizzini and Mazzola, 2002). Mysids feed on diverse particulate organic matter, phytoplankton and smaller zooplankton and are consumed by other carnivorous zooplanktons, fishes and birds (Mulkins et al., 2002). Mysids are constantly present in lagoons of Camargue despite salinity fluctuations, but the abundance of the population exhibits strong seasonal variations with an 'explosion' in the summer months. Like Mysids, the Gammarids stand as a prevalent prey of small-sized fish species, sand smelt, various gobies species and three-spined stickleback. Their isotopic signature confirms their function as essential elements of the trophic web. The population of the shrimp *Crangon crangon* exhibits large seasonal variations. Gelin et al. (2000, 2001) considered that the brown shrimp population is annual in the Vaccarès Lagoon. Indeed juveniles enter the lagoon in summer where they reach sexual maturity before returning to the sea. The cockle *Cerastoderma glaucum*, which assimilates organic matter, microphytobenthos and deposits (and will be considered as the sentinel organism in our current ecotoxicological studies) has only one potential predator, the carp bream (TL 4). The carp bream is a freshwater fish that occurs occasionally in the Vaccarès Lagoon. Small-sized species such as pelagic *Atherina boyeri* and benthic Gobiidae sp. dominate the ichtyofauna. For the benthic population, the recent increase in salinity since 1998 has led to predominance of the common goby (Pampoulie et al., 2001). The sedentary behavior of these species (Bouchereau et al., 1991; Rosecchi et al., 1995) is questioned by the recent work of Bardin and Pont (2002) who demonstrated that large numbers of *A. boyeri* and *Potamoschistus microps* enter the Camargue Lagoons during spring. Nevertheless these small-sized fishes occupied trophic levels ranging from 3.4 to 3.8, together with the pipefish, the juveniles of eels and mullet, and the three-spined stickleback. The mullet occupies a particular position in the Vaccarès trophic web because of its omnivorous habits (periphyton and microinvertebrates). The top consumers exhibited a TL above 4. The pike-perch and the sunfish occupied the highest trophic position, 4.3 and 4.4, respectively, and the yellow eel (TL 4.1) considered traditionally as omnivorous (invertebrate consumer), was here occasionally piscivorous due to a predictable relationship between the yellow eel and the sand smelt.

The seasonal variations in δ^{15}N values of two different components of the Vaccarès trophic web—the sand smelt and the cockle—were characterized by an accentuated increase in June. More likely than a change in trophic level, this seasonal pattern probably reflects the effects of other associated natural variations (increase in food abundance, climatic and salinity variations). Spring and summer in the Camargue Biosphere Reserve are characterized by the highest annual temperatures leading to increased evaporation and salinity, and therefore the highest salinity induces the additional fractionation, implicated in adaptative mechanisms of euryhaline species, favoring the heavier isotope of nitrogen and leading to an increase in δ^{15}N values. Moreover as suggested by Dufour and Gerdeaux (2001) seasonal variations in δ^{15}N that occur at the primary producer level may be reflected in δ^{15}N values at higher tropic levels.

The seasonal δ^{13}C profiles of the sand smelt and the cockle were quite different, probably reflecting changes

in carbon allocation during respiratory metabolism (or other metabolic processes) as well as the composition of phytoplankton species as suggested by Fisk et al. (2001). The most pronounced interspecies distortion occurred in September: decreased $\delta^{13}C$ for fish and increased $\delta^{13}C$ for the bivalve. This might be explained by the fact that *Atherina boyeri* and *Cerastoderma glaucum*, although both part of the same food web, do not depend on the same primary producers since they inhabit different ecological niches (the cockle living buried in sand and the sand smelt being a fish which crosses the water column and feeds on both benthic and pelagic zones (Focant et al., 1999) participating in two trophic chains).

The relative trophic positions of the components of the Vaccarès aquatic community exhibit a surprising annual stability. Since the populations of some species are strictly annual (i.e. *Crangon crangon* Gelin et al., 2001; *Gasterosteus aculeatus* Poizat et al., 2002), we assessed the inter-annual variations (Spring 2001 vs Spring 2002) of stable isotopes in organisms from 'multi-generation' populations: two detritivores (*Cerastoderma glaucum* and *Gammarus salinus*) and two secondary consumer fishes (*Atherina boyeri* and juvenile *Anguilla anguilla*). $\delta^{15}N$ values were lower in 2002 compared with 2001 in all the tested organisms. In the same way, the $\delta^{13}C$ variations, when significant, showed a decrease in organisms caught in 2002. This may suggest that these inter-annual variations reflect the capacity of such species to adapt to 'the local environmental resources and their trophic plasticity' as demonstrated by Vizzini and Mazzola (2002) for *A. boyeri*.

The stability of a linear food chain depends on energetic demand and the predator–prey body size ratio (Jonsson and Ebenman, 1998). The potential correlations between stable isotope contents and fish body size were therefore investigated. The absence of a systematic isotopic variation with fish size and growth can be attributed to weak predator size–prey size relationships as proposed by Fry et al. (1999). Nevertheless the positive relationship between $\delta^{15}N$ and body size in the eel population confirmed the intra-population trophic variations. As described above, the trophic position of the juvenile *Anguilla anguilla* (TL 3.8) was always lower than 4 whereas the opportunely generalist feeding yellow eel (TL 4) almost reached the trophic level of the top-predator and thus may be considered as a top-consumer. This is not an unexpected finding since variable species morphology is not uncommon in the top-predator community; eels for instance are typically serpentiform. In a quite different ecosystem, the lakes of the Boreal Plain of Canada, Beaudoin et al. (2002) observed that all the top predators occupy similar trophic positions despite large differences in body size and trophic morphology. According to the observation of Van der Zanden et al. (1998) in smallmouth bass, the positive relationship between $\delta^{13}C$ and body size in the sand smelt population indicated a change in feeding habits from benthic to pelagic preys as a function of age.

5. Conclusion

Stable isotope analysis, coupled with literature data, provide an excellent tool in determining and quantifying trophic relations between aquatic organisms even in particularly dynamic systems such as the Vaccarès Lagoon. In this study a constant 3.2‰ $\delta^{15}N$ enrichment between two successive trophic levels has been shown. Since a brackish ecosystem requires specific adaptations, the isotopic approach offers a sensitive indicator of natural or inadvertent environmental changes. Therefore, despite the hydrological seasonal balance, which leads to variations of feeding strategies and species composition, the Mysids and Gammarids exhibit a constant dominant position in communities of brackish waters of Camargue. They may be considered as the major prey of secondary consumer fishes. Conversely the pike-perch and the sunfish occupy the highest trophic positions, above the European yellow eel, a common euryhaline fish in Camargue lagoons.

Acknowledgements

We thank the staff of the National Nature Reserve of Camargue, especially François Lescuyer, for his technical field assistance during biota sampling and Eric Coulet for biological information and valuable advices. We are also grateful to Caroline Lelarge for stable isotopes measurements.

References

Bardin, O., Pont, D., 2002. Environmental factors controlling the spring immigration of two estuarine fishes *Atherina boyeri* and *Pomatoschistus* spp. into a Mediterranean lagoon. Journal of Fish Biology 61, 560–578.

Beaudoin, C.P., Prepas, E.E., Tonn, W.M., Wassenaar, L.I., Kotak, B.G., 2002. A stable carbon and nitrogen isotope study of lake food webs in Canada's Boreal Plain. Freshwater Biology 46, 465–477.

Bouchereau, J.L., Quignard, J.P., Joyeux, J.C., Tomsini, J.A., 1991. Stratégies et tactiques de reproduction de *Pomatoschistus microps* (Kroyer, 1838) et de *Pomatoschistus minutus* (Pallas, 1770) (Pisces, Gobiidae) dans le golfe du lion (France). Nids, déterminismes de la sédentarité et de la migration. Cybium 15, 315–346.

Crivelli, A.J., 1981. Les peuplements de poissons de la Camargue. Revue d' Ecologie La terre et la vie 35, 617–671.

De Niro, M.J., Epstein, S., 1978. Influence of diet on the distribution of carbon isotopes in animals. Geochimica et Cosmochimica Acta 42, 495–506.

Dufour, E., Gerdeaux, D., 2001. Apports des isotopes stables ($^{13}C/^{12}C$, $^{15}N/^{14}N$, $^{18}O/^{16}O$, $^{36}S/^{34}S$, $^{87}Sr/^{86}Sr$) aux études écologiques sur les poisons. Cybium 25, 369–382.

Fisk, A.T., Hobson, K.A., Norstrom, R.J., 2001. Influence of chemical and biological factors on trophic transfer of persistent organic pollutants in the Northwater Polynya marine food web. Environmental Science and Technology 35, 732–738.

Focant, B., Rosecchi, E., Crivelli, A.J., 1999. Attempt of biochemical characterization of sand smelt *Atherina boyeri* Risso, 1810 (Pisces *Atherinidae*) populations from the Camargue (Rhône delta, France). Comparative Biochemistry and Physiology B 122, 261–267.

Fry, B., Mumford, P.L., Tam, F., Fox, D.D., Warren, G.L., Havens, K.E., Steinman, A.D., 1999. Trophic position and individual feeding histories of fish from Lake Okeechobee, Florida. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 56, 590–600.

Gelin, A., Crivelli, A.J., Rosecchi, E., Kerambrun, P., 2001. Can salinity changes affect reproductive success in the brown shrimp *Crangon crangon*? Journal of Crustacean Biology 2, 905–911.

Gelin, A., Crivelli, A.J., Rosecchi, E., Kerambrun, P., 2000. Is the brown shrimp *Crangon crangon* (L.) population of the Vaccarès lagoon (Camargue, France, Rhone delta) an annual population. Comptes-rendus de l'Académie des Sciences III Life Sciences 323, 741–748.

Gu, B., Schelske, C.L., Hoyer, M.V., 1996. Stable isotopes of carbon and nitrogen as indicators of diet and trophic structure of the fish community in a shallow hypereutrophic lake. Journal of Fish Biology 49, 1233–1243.

Guiguer, K.R.R.A., Reist, J.D., Power, M., Babaluk, J.A., 2002. Using stable isotopes to confirm the trophic ecology of Arctic charr morphotypes from Lake Hazen, Nunavut, Canada. Journal of Fish Biology 60, 348–362.

Hecky, R.E., Hesslein, R.H., 1995. Contributions of benthic algae to lake food webs as revealed by stable isotope analysis. Journal of the North American Benthological Society 14, 631–653.

Hobson, K.A., Welch, H.E., 1992. Determination of trophic relationships within a high Arctic marine food web using $\delta^{13}C$ and $\delta^{15}N$ analysis. Marine Ecology Progress Series 84, 9–18.

Hobson, K.A., Fisk, A., Karnovsky, N., Holst, M., Gagnon, J.M., Fortier, M., 2002. A stable isotope ($\delta^{13}C$, $\delta^{15}N$) model for the North Water food web: implications for evaluating trophodynamics and the flow of energy and contaminants. Deep-Sea Research II 49, 5131–5150.

Jonsson, T., Ebenman, B., 1998. Effects of predator–prey body size ratios on the stability of food chains. Journal of Theoretical Biology 193, 407–417.

Mulkins, L.M., Jelinskia, D.E., Karagatzides, J.D., Carra, A., 2002. Carbon isotope composition of mysids at a terrestrial–marine ecotone, Clayoquot Sound, British Columbia, Canada. Estuarine, Coastal and Shelf Science 54, 669–675.

Pampoulie, C., Chauvelon, P., Rosecchi, E., Bouchereau, J.L., Crivelli, A.J., 2001. Environmental factors influencing the gobiid assemblage of a Mediterranean Lagoon: empirical evidence from a long-term study. Hydrobiologia 445, 175–181.

Poizat, G., Rosecchi, E., Crivelli, A.J., 2002. Life-history variation within a three-spined stickleback population in the Camargue. Journal of Fish Biology 60, 1296–1307.

Ramade, F., 1998. Dictionnaire Encyclopédique des Sciences de l'Eau. Ediscience International, Paris, 800 pp.

Ramade, F., 2002. Dictionnaire encyclopédique de l' écologie et des sciences de l'environnement. Dunod Sciences ed, Paris, 1085 pp.

Rau, G.H., Mearns, A.J., Young, D.R., Olson, R.J., Schafer, H.A., Kaplan, I.R., 1983. Animal $^{13}C/^{12}C$ correlates with trophic level in pelagic food webs. Ecology 64, 1314–1318.

Roche, H., Buet, A., Ramade, F., 2002a. Relationship between persistent organic chemicals residues and biochemical constituents in fishes from a protected area, the French National Nature Reserve of Camargue. Comparative Biochemistry and Physiology C 133, 393–410.

Roche, H., Buet, A., Ramade, F., 2002b. Accumulation of lipophilic micro-contaminants and biochemical responses in eels from the Biosphere Reserve of Camargue. Ecotoxicology 11, 9–18.

Roche, H., Buet, A., Tidou, A., Ramade, F., 2003. Contamination du peuplement de poissons d'un Étang de la Réserve Naturelle Nationale de Camargue, le Vaccarès, par des polluants organiques persistants. Revue d'Ecologie La terre et la vie 58, 77–102.

Renones, O., Polunin, N.V.C., Goni, R., 2002. Size related dietary shifts of *Epinephelus marginatus* in a western Mediterranean littoral ecosystem: an isotope and stomach content analysis. Journal of Fish Biology 61, 122–137.

Richter, H., Focken, U., Becker, K., 1999. A review of the fish feeding model MAXIMS. Ecological Modelling 120, 47–64.

Rosecchi, E., Crivelli, A.J., Balvay, G., 1995. Sand smelt (*Atherina boyeri*) migration within the water system of the Camargue, southern France. Hydrobiologia 300–301, 289–298.

Sondergaard, M., Jeppesen, E., Aaser, H.F., 2000. *Neomysis integer* in a shallow hypertrophic brackish lake: distribution and predation by three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*). Hydrobiologia 428, 151–159.

Van der Zanden, M.J., Cabana, G., Rasmussen, J.B., 1997. Comparing the trophic position of littoral fish estimated using stable nitrogen isotopes ($\delta^{15}N$) and diergol data. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 54, 1142–1158.

Van der Zanden, M.J., Hulshof, M., Ridgway, M.S., Rasmussen, J.B., 1998. Application of stable isotope techniques to trophic studies of age-0 smallmouth bass. Transactions of the American Fisheries Society 127, 729–739.

Vizzini, S., Sara, G., Michener, R.H., Mazzola, A., 2002. The role and contribution of the seagrass *Posidonia oceanica* (L.) Delile organic matter for secondary consumers as revealed by carbon and nitrogen stable isotope analysis. Acta Oecologica 23, 277–285.

Vizzini, S., Mazzola, A., 2002. Stable carbon and nitrogen ratios in the sand smelt from a Mediterranean coastal area: feeding habits and effect of season and size. Journal of Fish Biology 60, 1498–1510.

Wada, E., Terazaki, M., Kabaya, Y., Nemoto, T., 1987. ^{15}N and ^{13}C abundances in the Antarctic Ocean with emphasis on the biogeochemical structure of the food web. Deep-Sea Research 34, 829–841.

RESUME

L'évaluation et la prédiction des effets des polluants organiques persistants (POPs) dans les écosystèmes aquatiques représentent un enjeu primordial pour le développement durable à l'échelle mondiale. Associée à une enquête de surveillance de la qualité de milieux aquatiques, cette étude a comme objectifs la détermination du degré et des modalités de contamination par des POPs d'origine agricole (pesticides organochlorés) et industrielle (polychlorobiphényles) des réseaux trophiques aquatiques d'une aire protégée, la Réserve de Biosphère de Camargue.

Les résultats des analyses des isotopes stables du carbone et de l'azote, chez 16 espèces dominantes d'animaux aquatiques, ont confirmé le haut niveau de complexité des relations alimentaires, mais aussi leur stabilité, liée aux contraintes posées par les fluctuations environnementales naturelles et anthropiques. Les données isotopiques fournissent un très bon outil dans l'analyse des réseaux trophiques, cependant leur interprétation est limitée par la carence de connaissances sur les éventuelles variations de l'allocation des isotopes lourds dans les différents organes, voire dans les tissus, chez les organismes aquatiques.

Après avoir détecté la présence des contaminants à tous les niveaux trophiques, les travaux se sont orientés vers l'analyse des modalités de contamination par les POPs. A l'aide de la méthode isotopique, une bioamplification a été mise en évidence pour les polluants les plus persistants (dieldrine, HCB) mais aussi pour l'α endosulfan, dont le transfert trophique dépend de l'intensité de la contamination résultant de la biodisponibilité de la substance, elle-même liée à la saison. Pour les autres composés analysés, la voie d'accumulation directe à partir du milieu et notamment de l'eau, semble être la voie dominante en raison, entre autres, des caractéristiques particulières (faible profondeur, brassage fréquent) de l'étang de Vaccarès.

A ces principaux objectifs s'ajoute la validation *in situ* de biomarqueurs en relation avec l'emplacement trophique et la structure du réseau. Les indicateurs biochimiques évalués ont montré l'incohérence du principe d'un « biomarqueur unique et universel ». Un paramètre biologique synthétique des capacités métaboliques de l'organisme représenterait un atout considérable cette validation. L'influence d'une perturbation chimique ou physique sur l'allocation métabolique du ^{13}C et du ^{15}N, présumée stable dans des conditions données, pourrait être une approche prometteuse.

MOTS CLES : aire protégée, réseaux tropiques, POPs, isotopes stables, bioamplification

ABSTRACT

In a context of sustainable development, the evaluation and the prediction of the impact of persistent organic pollutants (POPs) on aquatic ecosystems represents one of the main challenges. As a part of a national biomonitoring investigation, the principal objective of this study was the determination of bioaccumulation patterns of POPs from agricultural (organochlorinated pesticides) and industrial (polychlorobiphenyls) sources within aquatic food webs of a protected area, the Camargue Biosphere Reserve.

The stable carbon and nitrogen isotope analysis were performed on 16 dominant animal species, confirmed a high level of complexity of food relations, but also their stability determined by constraints related to the natural and anthropic environmental fluctuations. The isotopic data provide a very good tool in food web analysis, however their interpretation is limited by the lack of data concerning possible variations in allocation of heavy isotopes in different organs and/or tissues of the aquatic organisms.

After the detection of all the investigated POPs in all trophic levels, the possible bioaccumulation patterns of the contaminants were analysed. By using the isotopic method, biomagnification process was highlighted for the most persistent pollutants (dieldrin, HCB) but also for α endosulfan, whose trophic transfer depends on the intensity of the contamination resulting from the biodisponibility of the substance, itself related to the season. For all the other analyzed substances, the bioconcentration directly from water seems to be the main and dominant way of contamination in a shallow aquatic ecosystem such as the Vaccarès lagoon.

Additionally, some biomarkers were validated *in situ* in relation to the trophic level and the food web structure. The evaluated biochemical indicators failed to demonstrate the existence of a hypothetical "universal biomarker". A synthetic biological parameter of metabolic capacities would represent a considerable asset for such validation. The influence of a chemical or physical disturbance on metabolic allocation of ^{13}C and ^{15}N, supposed stable under given conditions, could be a promising approach.

Key words : ecotoxicology, protected area, food webs, POPs, stable isotopes, biomagnification