

**CAMPUS VÉTÉRINAIRE DE LYON**

Année 2021 - Thèse n° 014

**ETUDE DE LA CONTAMINATION PAR LES  
POLLUANTS TERRESTRES DES CETACES DU  
SANCTUAIRE PELAGOS (MEDITERRANEE)**

**THESE**

Présentée à l'Université Claude Bernard Lyon 1  
(Médecine – Pharmacie)

Et soutenue publiquement le 02 Juillet 2021  
Pour obtenir le grade de Docteur Vétérinaire

Par

BOYER Léonie



**CAMPUS VÉTÉRINAIRE DE LYON**

Année 2021 - Thèse n° 014

**ETUDE DE LA CONTAMINATION PAR LES  
POLLUANTS TERRESTRES DES CETACES DU  
SANCTUAIRE PELAGOS (MEDITERRANEE)**

**THESE**

Présentée à l'Université Claude Bernard Lyon 1  
(Médecine – Pharmacie)

Et soutenue publiquement le 02 Juillet 2021  
Pour obtenir le grade de Docteur Vétérinaire

Par

BOYER Léonie



## Liste des Enseignants du Campus Vétérinaire de Lyon (20-05-2021)

ABITBOL	Marie	DEPT-BASIC-SCIENCES	Professeur
ALVES-DE-OLIVEIRA	Laurent	DEPT-BASIC-SCIENCES	Maître de conférences
ARCANGIOLI	Marie-Anne	DEPT-ELEVAGE-SPV	Professeur
AYRAL	Florence	DEPT-ELEVAGE-SPV	Maître de conférences
BECKER	Claire	DEPT-ELEVAGE-SPV	Maître de conférences
BELLUCO	Sara	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Maître de conférences
BENAMOU-SMITH	Agnès	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Maître de conférences
BENOIT	Etienne	DEPT-BASIC-SCIENCES	Professeur
BERNY	Philippe	DEPT-BASIC-SCIENCES	Professeur
BONNET-GARIN	Jeanne-Marie	DEPT-BASIC-SCIENCES	Professeur
BOULOCHER	Caroline	DEPT-BASIC-SCIENCES	Maître de conférences
BOURDOISEAU	Gilles	DEPT-ELEVAGE-SPV	Professeur émérite
BOURGOIN	Gilles	DEPT-ELEVAGE-SPV	Maître de conférences
BRUYERE	Pierre	DEPT-BASIC-SCIENCES	Maître de conférences
BUFF	Samuel	DEPT-BASIC-SCIENCES	Professeur
BURONFOSSE	Thierry	DEPT-BASIC-SCIENCES	Professeur
CACHON	Thibaut	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Maître de conférences
CADORÉ	Jean-Luc	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Professeur
CALLAIT-CARDINAL	Marie-Pierre	DEPT-ELEVAGE-SPV	Maître de conférences
CAROZZO	Claude	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Maître de conférences
CHABANNE	Luc	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Professeur
CHALVET-MONFRAY	Karine	DEPT-BASIC-SCIENCES	Professeur
DE BOYER DES ROCHES	Alice	DEPT-ELEVAGE-SPV	Maître de conférences
DELIGNETTE-MULLER	Marie-Laure	DEPT-BASIC-SCIENCES	Professeur
DJELOUADJI	Zorée	DEPT-ELEVAGE-SPV	Maître de conférences
ESCRIOU	Catherine	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Maître de conférences
FRIKHA	Mohamed-Ridha	DEPT-ELEVAGE-SPV	Maître de conférences
GALIA	Wessam	DEPT-ELEVAGE-SPV	Maître de conférences
GILOT-FROMONT	Emmanuelle	DEPT-ELEVAGE-SPV	Professeur
GONTHIER	Alain	DEPT-ELEVAGE-SPV	Maître de conférences
GRANCHER	Denis	DEPT-BASIC-SCIENCES	Maître de conférences
GREZEL	Delphine	DEPT-BASIC-SCIENCES	Maître de conférences
HUGONNARD	Marine	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Maître de conférences
JUNOT	Stéphane	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Professeur
KODJO	Angeli	DEPT-ELEVAGE-SPV	Professeur
KRAFFT	Emilie	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Maître de conférences
LAABERKI	Maria-Halima	DEPT-ELEVAGE-SPV	Maître de conférences
LAMBERT	Véronique	DEPT-BASIC-SCIENCES	Maître de conférences
LE GRAND	Dominique	DEPT-ELEVAGE-SPV	Professeur
LEBLOND	Agnès	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Professeur
LEDoux	Dorothée	DEPT-ELEVAGE-SPV	Maître de conférences
LEFEBVRE	Sébastien	DEPT-BASIC-SCIENCES	Maître de conférences
LEFRANC-POHL	Anne-Cécile	DEPT-BASIC-SCIENCES	Maître de conférences
LEGROS	Vincent	DEPT-ELEVAGE-SPV	Maître de conférences
LEPAGE	Olivier	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Professeur
LOUZIER	Vanessa	DEPT-BASIC-SCIENCES	Professeur
MARCHAL	Thierry	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Professeur
MOISSONNIER	Pierre	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Professeur
MOSCA	Marion	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Maître de conférences
MOUNIER	Luc	DEPT-ELEVAGE-SPV	Professeur
PEPIN	Michel	DEPT-BASIC-SCIENCES	Professeur
PIN	Didier	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Professeur
PONCE	Frédérique	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Professeur
PORTIER	Karine	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Professeur
POUZOT-NEVORET	Céline	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Maître de conférences
PROUILLAC	Caroline	DEPT-BASIC-SCIENCES	Professeur
REMY	Denise	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Professeur
RENE MARTELLET	Magalie	DEPT-ELEVAGE-SPV	Maître de conférences
ROGER	Thierry	DEPT-BASIC-SCIENCES	Professeur
SAWAYA	Serge	DEPT-BASIC-SCIENCES	Maître de conférences
SCHRAMME	Michael	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Professeur
SERGENTET	Delphine	DEPT-ELEVAGE-SPV	Professeur
THIEBAULT	Jean-Jacques	DEPT-BASIC-SCIENCES	Maître de conférences
TORTEREAU	Antonin	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Maître de conférences
VIGUIER	Eric	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Professeur
ZENNER	Lionel	DEPT-ELEVAGE-SPV	Professeur



## **Remerciements aux Membres du Jury**

### **A Monsieur le Professeur Pierre COCHAT**

*Professeur en Pédiatrie, De l'Université Claude Bernard Lyon 1, Faculté de médecine de Lyon Sud,*

Pour m'avoir fait l'honneur d'accepter la présidence de ce jury de thèse,

Qu'il trouve ici l'expression de mes hommages respectueux et de mes sincères remerciements.

### **A Monsieur le Professeur Philippe BERNY**

*Professeur en Pharmacie – Toxicologie à VetAgro Sup – Campus Vétérinaire,*

Pour m'avoir encadrée et soutenue dans la réalisation de ce travail,

Qu'il trouve ici l'expression de ma gratitude et mes remerciements les plus sincères.

### **A Madame la Professeure Emmanuelle GILOT - FROMONT**

*Professeure en Epidémiologie à VetAgro Sup – Campus Vétérinaire,*

Pour avoir accepté de juger ce travail et pour sa bienveillance,

Qu'elle trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance.









## **Table des matières**

Table des Annexes .....	11
Table des Figures .....	13
Table des Tableaux .....	15
Liste des Abréviations .....	17
Introduction.....	19
I. Objectifs de l'étude .....	21
II. Eléments de contexte .....	23
A- Espèces d'intérêt .....	23
1. Ordre des Cétacés et le Sous-ordre des Odontocètes .....	23
2. Place des Cétacés dans la chaîne trophique.....	25
B. Substances d'intérêt.....	27
1. Généralités sur les pollutions chimiques en Méditerranée .....	27
2. Eléments traces métalliques.....	28
3. Organochlorés – OC.....	33
4. Polychlorobiphényles – PCB .....	34
5. Organophosphorés et Carbamates – OP et CM .....	36
6. Pyréthrinés et Pyréthrinoïdes.....	37
7. Pesticides : Herbicides et Fongicides.....	38
III. Matériel et Méthode .....	41
A. Echantillons animaux .....	41
1. Echantillonnage .....	41
2. Estimation de l'âge des individus .....	41
B. Méthodes d'analyse .....	42
1. Eléments trace métalliques .....	42
2. Organochlorés (dont PCB) .....	43
3. Organophosphorés .....	45
4. Pyréthrinoïdes .....	46
5. Pesticides .....	46
6. Traitement des données.....	47
IV. Présentation des résultats .....	49
A. Analyse générale .....	49
B. Analyse par toxiques .....	51

1. Mercure .....	51
2. Organochlorés et PCB.....	53
3. Comparaison des données par pays de découverte .....	56
V. Interprétation des résultats et discussion .....	57
A. Limites et critique des protocoles utilisés.....	57
1. Protocole d'échantillonnage .....	57
2. Protocoles d'analyse.....	59
B. Comparaison avec les valeurs en Méditerranée.....	60
1. Substances non détectées.....	60
2. Substances présentes .....	62
C. Discussion.....	67
Conclusion signée.....	71
Bibliographie .....	73
Annexes .....	79

## **Table des Annexes**

Annexe 1 - Liste rouge des espèces de Mammifères en France métropolitaine (UICN, 2021) .....	79
Annexe 2 - Protocole d'échantillonnage .....	85
Annexe 3 - Protocole d'analyse du plomb.....	86
Annexe 4 - Protocole d'analyse du mercure .....	90
Annexe 5 - Protocole d'analyse des organochlorés et PCB.....	94
Annexe 6 - Protocole d'analyse des organophosphorés.....	99
Annexe 7 - Protocole d'analyse des pyréthriinoïdes.....	102
Annexe 8 - Protocole d'analyse des pesticides .....	104



## **Table des Figures**

Figure 1 - Représentation des divers mécanismes de contamination des eaux par les polluants terrestres (Gouy et al., 2008) .....	19
Figure 2 - Le Sanctuaire Pelagos ("Site officiel du Sanctuaire Pelagos," 2021) .....	20
Figure 3 - Le Dauphin Bleu et Blanc ( <i>Stenella coeruleoalba</i> ) (Jefferson et al., 1993) .....	24
Figure 4 - Le Grand Dauphin ( <i>Tursiops truncatus</i> )(Jefferson et al., 1993) .....	25
Figure 5 - Exemple de chaine trophique en milieu marin .....	26
Figure 6 - Evolution des émissions de mercure de 1990 à 2019 en France métropolitaine (en tonnes) (CITEPA, 2020).....	31
Figure 7 - Structure du dichlorodiphényltrichloroéthane ou DDT (Gupta, 2018).....	33
Figure 8 - Structure générale des polychlorobiphényles (Gupta, 2018).....	34
Figure 9 - Structure générale des organophosphorés (à gauche) et des Carbamates (à droite) (Gupta, 2018) .....	36
Figure 10 - Structure d'un pyréthriinoïde de première génération (la Perméthrine) et de deuxième génération (la Fluméthrine) (Gupta, 2018) .....	37
Figure 11 - Structure du 2,4 - D (à gauche) et du paraquat (à droite) (PubChem, 2021) .....	39
Figure 12 - Evolution de l'utilisation mondiale des pesticides, herbicides et fongicides entre 1990 et 2018 ("FAOSTAT," 2021) .....	40
Figure 13 - Distribution des échouages sur les côtes du Sanctuaire Pelagos (en rouge : <i>Stenella coeruleoalba</i> , en vert : <i>Tursiops truncatus</i> ).....	49
Figure 14 - Valeur moyenne de Mercure par tranches d'âge .....	52
Figure 15 - Valeur moyenne de Mercure par espèce.....	52
Figure 16 - Valeurs moyennes de DDT et OC dans le lard par tranches d'âge.....	53
Figure 17 - Valeurs moyennes de DDT et OC dans le lard par espèce .....	54
Figure 18 - Valeur moyenne de PCB dans le lard par tranches d'âge .....	54
Figure 19 - Valeur moyenne de PCB dans le lard par espèce.....	55
Figure 20 - Valeurs moyennes de DDT, OC et PCB dans le lard par tranches d'âge .....	55
Figure 21 - Valeurs moyennes de mercure, DDT, OC et PCB entre fonction des pays .....	56
Figure 22 - Nombre cumulé d'échouages annuels entre 1969 et 2020 (CNRS, 2021).....	57
Figure 23 – Schéma des courants d'eau de surface en Méditerranée (Ifremer, 2021).....	58
Figure 24 - Evolution des teneurs moyennes en DDT dans le lard de dauphins de Méditerranée (en rouge : valeur mesurée dans cette étude) (Alzieu and Duguy, 1978; Capanni et al., 2020; Fossi et al., 2013, 2003; Marsili and Focardi, 1997).....	64
Figure 25 - Evolution des teneurs moyennes en PCB dans le lard de dauphins de Méditerranée (en rouge : valeur mesurée dans cette étude) (Alzieu and Duguy, 1978; Borrell and Aguilar, 2007; Castrillon et al., 2010; Fossi et al., 2013, 2003; Genov et al., 2018; Marsili and Focardi, 1997).....	66





## **Table des Tableaux**

Tableau I - Estimation de l'âge selon la taille des individus (Calzada et al., 1996, 2011; Pribanic et al., 2000; Read et al., 1993) .....	41
Tableau II - Protocole pour le dosage du plomb - Technique de Spectrométrie d'Absorption Atomique (mode four) .....	42
Tableau III - Protocole pour le dosage du mercure – Technique de Spectrométrie d'Absorption Atomique par génération d'hydrures .....	43
Tableau IV - Protocole de dosage des organochlorés - Technique de chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à capture d'électrons .....	44
Tableau V - Protocole de dosage des organophosphorés - Technique de chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse .....	45
Tableau VI - Protocole de dosage des pyréthriinoïdes - Technique de chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à capture d'électrons .....	46
Tableau VII - Protocole de dosage des pesticides – Technique de chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem après extraction par méthode QuEChERS.	47
Tableau VIII - Résultats d'analyses (valeurs en µg/g ww) .....	50



## Liste des Abréviations

2,4 – D	Acide 2,4 – dichlorophénoxyacétique
2,4,5 – T	Acide 2,4,5 – trichlorophénoxyacétique
A	Absorbance
AFSSA	Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments
AMAP	Arctic Monitoring and Assessment Programme
ANSES	Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail
ASPIM	Aire Spécialement Protégée d'Importance Méditerranéenne
C	Concentration
Cf	Confère
CM	Carbamates
CRDiMa	Centre de Référence National pour les investigations Diagnostiques sur les Mammifères marins échoués
DDE	Dichlorodiphényldichloroéthylène
DDT	Dichlorodiphényltrichloroéthane
DMV	Morbillivirus des Dauphins
dSPE	dispersive solid-phase extraction
EDC	Lampe de poche « Every Day Carry”
GECEM	Groupe d'Etude des Cétacés de Méditerranée
Hg	Mercure
I	Intensité
INRAE	Institut National de Recherche pour l'Agriculture, l'Alimentation et l'Environnement
LC-MS	Chromatographie en phase Liquide - Spectrométrie de Masse
LVD34	Laboratoire Vétérinaire Départemental de l'Hérault
lw	Fraction lipidique
OC	Organochlorés
OP	Organophosphorés
Pb	Plomb
PBT	Persistant, Bioaccumulatif, Toxique
PCB	Polychlorobiphényle
QuEChERS	Technique « Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe”
Spp	Espèces
TEQ	Equivalent Toxique
Tr	Temps de rétention
UICN	Union Internationale pour la Conservation de la Nature
WHO	Organisation Mondiale de la Santé
ww	Poids frais



## Introduction

Depuis les années 1960, suite à la première identification des effets dévastateurs des polluants terrestres sur la faune sauvage (Carson, 1962), les scientifiques se sont attachés à évaluer avec précision l'impact de ces molécules et leur évolution dans les écosystèmes et les organismes vivants. Ces polluants sont qualifiés de persistants en raison de leur forte résistance à la dégradation dans l'environnement et de leur accumulation tout au long des chaînes trophiques. Ils représentent une menace considérable pour la santé des hommes et de la faune sauvage (Jepson and Law, 2016).

Bien qu'utilisés dans un milieu terrestre en agriculture ou au quotidien par les populations humaines, par de nombreux phénomènes de ruissellement, d'écoulement et d'infiltration des nappes phréatiques, la plupart des polluants terrestres finissent leur chemin dans les cours d'eau puis dans les mers et les océans (Figure 1) (Gouy et al., 2008; INRAE, 2021; Ministère de la Transition écologique, 2021). Les Mammifères marins se situant en bout de la chaîne alimentaire, ayant une espérance de vie longue et une forte tendance à bioaccumuler les polluants terrestres (Genov et al., 2018), ce sont des espèces d'intérêt majeur, considérées comme sentinelles des écosystèmes marins et de la santé humaine (Bossart, 2011; Moore, 2008).

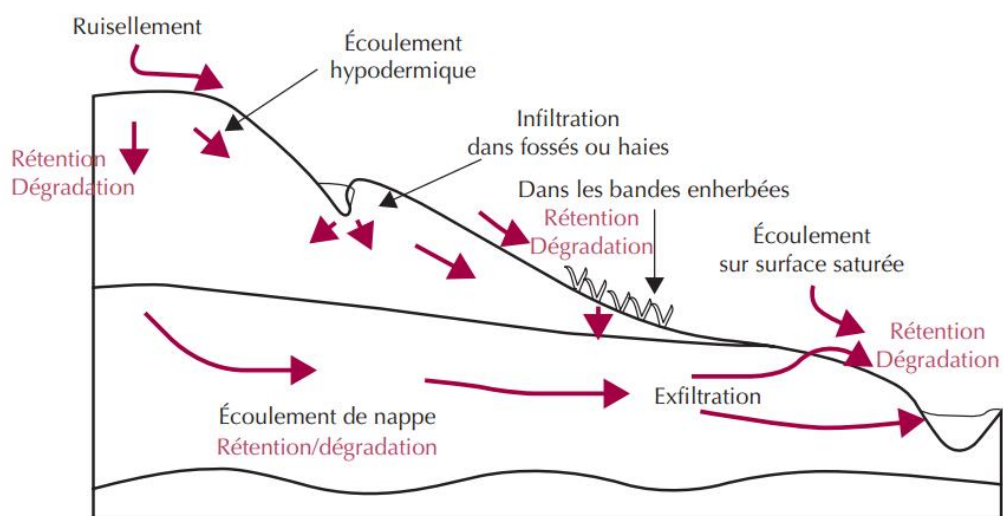


Figure 1 - Représentation des divers mécanismes de contamination des eaux par les polluants terrestres (Gouy et al., 2008)

Le Sanctuaire Pelagos est une aire maritime en Méditerranée de 87 500 km<sup>2</sup> formé suite à un accord entre la France, Monaco et l'Italie depuis le 25 novembre 1999 (Figure 2) après le constat d'une forte productivité primaire par la présence de nombreux phénomènes de fertilisation (phénomène d'*upwelling*, zones de convection hivernale, tourbillons (Ifremer,

2021)) et donc de l'attraction de nombreuses espèces marines ("Site officiel du Sanctuaire Pelagos," 2021). Cette région rassemble une grande diversité d'espèces de Mammifères marins mais aussi une forte activité humaine (trafic maritime, pêche, agriculture, tourisme, industries) avec près de 8 millions d'habitants sur ses côtes, ce qui constitue un site d'étude des populations depuis une vingtaine d'année. Malgré l'instauration au cours des quarante dernières années de nombreux textes de régulation et d'interdiction concernant l'utilisation des contaminants majeurs (organochlorés, polychlorobiphényles,...), cette aire marine protégée reste l'une des zones les plus polluées de la Méditerranée (Coll et al., 2012; Fossi et al., 2013).

C'est dans le cadre d'une surveillance des contaminants terrestres déversés dans l'environnement et de l'analyse de leurs impacts sur les populations de Cétacés et, à plus grande échelle, sur les populations humaines, que s'inscrit cette étude de la contamination par les polluants terrestres mesurée sur des individus échoués sur les côtes du Sanctuaire Pelagos.

Pour répondre à cet objectif, nous allons présenter :

- Les éléments d'études (Partie II) ;
- Les méthodes d'analyses (Partie III) ;
- Les résultats obtenus (Partie IV) ;
- L'analyse des résultats et la discussion (Partie V).



Figure 2 - Le Sanctuaire Pelagos ("Site officiel du Sanctuaire Pelagos," 2021)

## **I. Objectifs de l'étude**

Cette étude a pour but d'évaluer la contamination des Cétacés (espèces considérées comme sentinelles des écosystèmes) par des polluants terrestres sur le secteur du Sanctuaire Pelagos.

Les espèces d'étude ont été choisies en fonction de leur représentativité de la région d'étude : le Grand Dauphin et le Dauphin Bleu et Blanc sont des espèces évoluant dans un territoire relativement stable permettant de considérer que les teneurs en polluants seront représentatives du Sanctuaire Pelagos, et leur abondance permet un échantillonnage plus important. Les Mammifères marins sont considérés comme de très bons indicateurs régionaux avec une durée de vie longue permettant des phénomènes de bioconcentration et bioaccumulation, notamment car ces espèces sont très peu capables de métaboliser les molécules d'intérêt de cette étude (en particulier les organochlorés et le PCB) (Genov et al., 2018). Ainsi, les dauphins sont de très bons indicateurs de la pollution à long terme et pour la santé humaine.

Les polluants d'intérêts ont été choisis selon différents critères présentés précédemment (impact sur la santé, caractère bioaccumulatif, persistance dans l'environnement...). On peut les regrouper en 2 grandes catégories :

- **Molécules d'utilisation répandue** (organophosphorés, pesticides, pyréthrinoïdes...), reflet de l'activité humaine ;
- **Molécules aujourd'hui interdites ou d'utilisation réglementée** mais d'intérêt majeur en santé publique par leurs effets toxiques reconnus chez la plupart des espèces de Mammifères (organochlorés, PCB, mercure, plomb).

Les prélèvements dans le cadre de cette étude ont été ciblés dans une région de la Méditerranée reconnue pour un niveau de pollution particulièrement élevé : le Sanctuaire Pelagos. Notre objectif est ainsi d'évaluer le niveau de contamination de la région, et plus précisément, si une tendance à la baisse pour les molécules d'utilisation interdite s'installe et si les nouvelles molécules de grande utilisation ne représentent pas un enjeu écologique majeur comme les substances les ayant précédées.





## II. Éléments de contexte

### A- Espèces d'intérêt

#### 1. Ordre des Cétacés et le Sous-ordre des Odontocètes

Les **Cétacés** possèdent les caractéristiques générales des **Mammifères** (viviparité, **allaitement des petits, homéothermie**, respiration pulmonaire, squelette osseux) associées à une extrême adaptation physio-anatomique à leur mode de vie aquatique (Jefferson et al., 1993) :

- Séparation totale des voies digestives et respiratoires avec des narines au sommet du crâne ;
- Grandes aptitudes à la plongée (cage thoracique déformable, morphologie hydrodynamique et évolutions des membres thoraciques en nageoires et disparition des membres pelviens, quantité importante d'hémoglobine et de myoglobine...) ;
- Présence de **lard**, couche de graisse sous-cutanée stratifiée très développée, contenant 91% des graisses du corps et composée à 75% de lipides (Richard F. Shore, 2006) pour garantir l'homéothermie. Sa composition varie selon sa localisation sur le corps et le statut physiologique de l'animal (Samuel and Worthy, 2004).

Le sous-ordre des **Odontocètes** se compose des Cétacés dits « à dents », par opposition aux Mysticètes, ou Cétacés dit « à fanons ». Ce sont des espèces de petite taille à taille moyenne (à l'exception du grand cachalot *Physeter macrocephalus*), présentant un dimorphisme sexuel, un crâne asymétrique avec diverses structures impliquées dans l'écholocation (melon, système complexe de sacs nasaux...)(Jefferson et al., 1993). Les Odontocètes sont des prédateurs et se situent **en haut des chaînes alimentaires**.

#### a) Le Dauphin Bleu et Blanc – *Stenella coeruleoalba*

Le Dauphin Bleu et Blanc (Figure 3) peut atteindre 2,6 mètres de long pour 156 kg en moyenne et les mâles sont légèrement plus grands que les femelles. Son espérance de vie est de 40 ans. Sa distribution mondiale est large (50°N à 40°S) et principalement en **zones pélagiques**, bien que son observation près des côtes ne soit pas rare (Jefferson et al., 1993). Il vit en groupe de 100 à 500 individus et représente **l'espèce la plus abondante du sanctuaire** (entre 20 000 et 45 000 individus, estimation à 250 000 sur l'ensemble de la Méditerranée), et vit sur une région définie, bien que des déplacements saisonniers soient possibles afin de suivre ceux de ses proies. Elle est donc particulièrement représentée lors d'échouage et semble un bon indicateur de l'état des écosystèmes ("Site officiel du Sanctuaire Pelagos," 2021).

Ce dauphin se nourrit essentiellement de sardines et d'anchois mais s'adapte très bien en fonction de la région et de la saison, ce qui explique en partie le succès de sa distribution.

Les principales menaces auxquelles il est confronté sont les filets dérivants, la surpêche de ses proies, et la pollution anthropique de manière générale. Le Dauphin Bleu et Blanc est classé en « Préoccupation mineure » par l'Union Internationale pour la Conservation de la Nature (UICN, 2021), en raison de son abondance relative et de la stabilité de ses effectifs (Annexe 1).

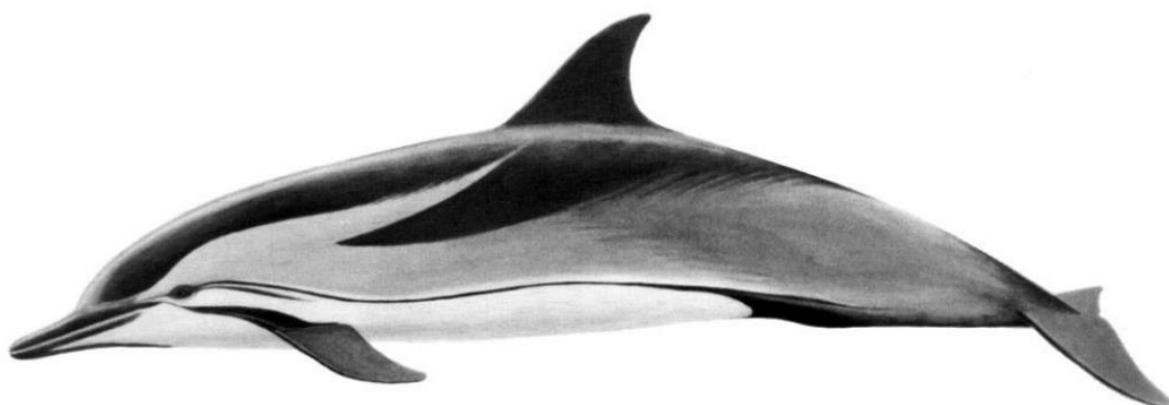


Figure 3 - Le Dauphin Bleu et Blanc (*Stenella coeruleoalba*) (Jefferson et al., 1993)

#### b) Le Grand Dauphin – *Tursiops truncatus*

Le Grand Dauphin (Figure 4) est le Cétacé le mieux connu car il est la seule espèce à avoir été étudiée en captivité. Il mesure entre 1,9 et 3,8 mètres de long pour 300 kg en moyenne et les mâles sont sensiblement plus grands que les femelles. Son espérance de vie est de 40 à 50 ans. On le retrouve principalement **proche des côtes** dans de nombreux océans et mers tempérées ou tropicales, en petits groupes de moins de 20 individus (Jefferson et al., 1993). Environ 1000 individus sont estimés dans le Sanctuaire Pelagos (Gnone et al., 2011). Sa sédentarité et sa proximité avec les côtes permettent d'émettre l'idée qu'il est fortement exposé aux polluants terrestres et représente une espèce sentinelle de choix.

Le Grand Dauphin est un opportuniste avec de grandes capacités d'adaptations. Son alimentation est très variée (poissons, crevettes, seiches, calmars).

Les principales menaces auxquelles il est confronté sont la surpêche de ses proies et la concurrence directe avec les pêcheurs, ainsi que la pollution anthropique ("Site officiel du Sanctuaire Pelagos," 2021). Le Grand Dauphin est cependant classé en « Préoccupation mineure » par l'Union Internationale pour la Conservation de la Nature (UICN, 2021) (Annexe 1).

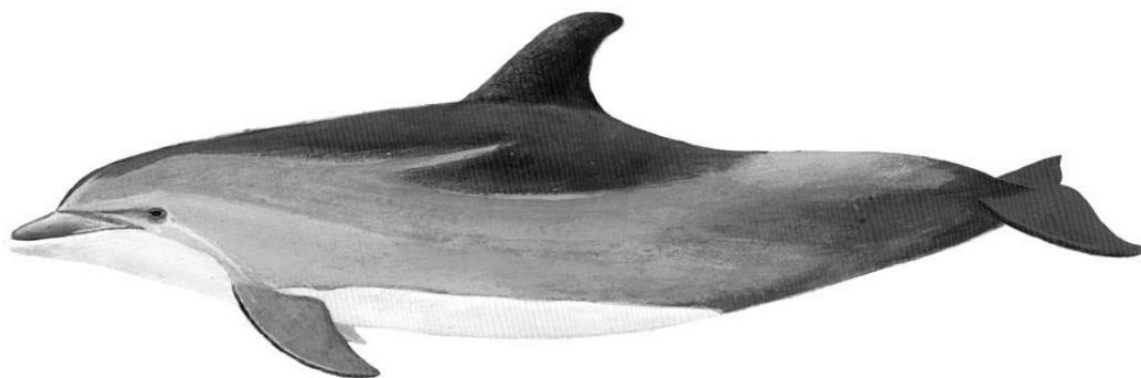


Figure 4 - Le Grand Dauphin (*Tursiops truncatus*)(Jefferson et al., 1993)

## 2. Place des Cétacés dans la chaîne trophique

Les Odontocètes sont des espèces **ichtyophages** (qui s'alimentent de poissons) et **teuthophages** (qui s'alimentent de céphalopodes). Ils sont qualifiés de « **super-prédateurs** » et se situent en **haut de chaîne alimentaire**, comme consommateurs tertiaires (Figure 5) (Bärlocher and Rennenberg, 2014). De ce fait, et par leur importante couche de lard, ils sont sujets à plusieurs phénomènes biologiques :

- **Bioaccumulation** : « Processus d'absorption par lequel les êtres vivants peuvent accumuler dans leur organisme des nutriments, tout autre substance présente naturellement dans son environnement ou encore un polluant organique de synthèse, **quelle que soit la voie de pénétration** dans l'organisme considéré. La bioaccumulation n'implique pas obligatoirement un accroissement de la concentration d'un polluant quand il passe du biotope dans l'organisme considéré » (Ramade, 2007).

Ainsi, on peut résumer le phénomène de bioaccumulation comme la différence entre l'intégration d'une substance dans l'organisme et son élimination.

Ce phénomène est favorisé principalement par le caractère hydrophile ou lipophile de cette substance. En effet, une molécule principalement hydrophile sera plus facilement excrétée tandis qu'une molécule hydrophobe sera non seulement difficile à métaboliser par l'organisme mais s'accumulera dans les graisses. Il existe ainsi une corrélation entre la bioaccumulation et la liposolubilité d'un polluant (Chojnacka and Mikulewicz, 2014).

De plus, afin de pouvoir s'intégrer un organisme, ces molécules doivent présenter un caractère persistant dans l'environnement, c'est-à-dire qu'elles peuvent subir un transfert entre les différents éléments abiotiques (eau, air, sol) et conserver leur potentiel toxique, et ne pas être dégradées dans l'environnement, pendant une période suffisamment prolongée pour qu'elles puissent être assimilées après avoir transité de leur site d'émission terrestre à la mer (Chojnacka and Mikulewicz, 2014).

On distingue deux cas particuliers :

- **Bioconcentration** : « Processus par lequel une substance **prélevée dans un biotope** par un être vivant va se rencontrer dans l'organisme de ce dernier à des concentrations supérieures à celles auxquelles elle se trouve dans l'eau [...] quel que soit le niveau trophique de l'organisme considéré » (Ramade, 2007).
- **Bioamplification** : « Avec les polluants xénobiotiques persistants peu ou pas biodégradables, il se produit assez souvent une bioconcentration de ces derniers **dans toute la chaîne trophique** le long de laquelle la concentration du toxique dans les êtres vivants s'élèvera à chaque niveau trophique, de sorte que, dans tous les cas, ce seront les super-prédateurs, situés au sommet de la pyramide trophique, qui présenteront les taux de contamination les plus élevés » (Ramade, 2007).

Les molécules étudiées dans cette étude sont souvent regroupées sous le terme PBT ou « Persistent, Bioaccumulative and Toxic ». On y dénombre 4 entités :

- Les dioxines ou apparentés aux dioxines ;
- Les composés à base de plomb ;
- Les composés à base de mercure ;
- Les hydrocarbures aromatiques polycycliques.

Il a également été démontré que plus une espèce présente un niveau d'organisation élevé, plus il existe de mécanismes de protection efficaces contre une bioaccumulation excessive. Ainsi, la recherche de biomarqueurs d'exposition tels que les métallothionéines permettent d'évaluer le niveau de bioaccumulation au niveau des tissus d'un organisme (Chojnacka and Mikulewicz, 2014; Fossi et al., 2013).

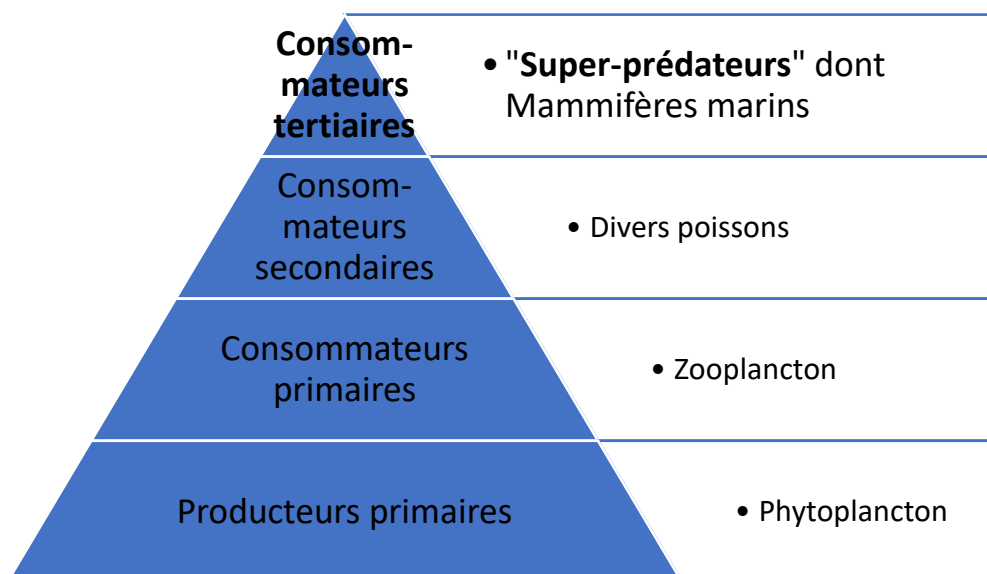


Figure 5 - Exemple de chaîne trophique en milieu marin

## B. Substances d'intérêt

### 1. Généralités sur les pollutions chimiques en Méditerranée

La Méditerranée, par sa forte densité de populations et ses nombreuses activités industrielles et agricoles, est considérée comme un « *hot spot* » pour les contaminations chimiques. Le Sanctuaire Pelagos, malgré son statut d'Aire Spécialement Protégée d'Importance Méditerranéenne (ASPIM), est particulièrement concerné : par exemple, les concentrations en organochlorés chez les Cétacés de cette région sont 1,5 à 1,7 fois supérieures à celles retrouvées chez les individus de mer Ionienne ou du Détroit de Gibraltar respectivement (Fossi et al., 2013).

Malgré des études fréquentes et un intérêt international d'évaluer la contamination du milieu marin pour la santé humaine à travers des mesures des contaminants terrestres chez les Mammifères marins, il est important de noter que peu d'informations précises existent sur les effets toxiques de ces molécules chez ces espèces. En effet, les moyens nécessaires pour la mise en œuvre d'expérimentations, la rareté des individus en captivité ainsi que l'intérêt public pour les Cétacés, ont rendu impossible la détermination d'une dose toxique précise et des effets associés pour ces espèces. L'expérimentation n'étant pas possible en milieu naturel, c'est donc par extrapolation à partir des espèces de Mammifères terrestres étudiées le plus souvent, parfois à partir d'espèces de Pinnipèdes, et avec les **connaissances développées depuis près de 70 ans en écotoxicologie marine** que l'on évalue la dangerosité de ces composés pour les Cétacés. De plus, les Mammifères marins sont exposés à un grand nombre de contaminants dans leur environnement, ce qui rend d'autant plus difficile d'associer un effet toxique à un contaminant en particulier. Les effets toxiques décrits par la suite sont donc les effets constatés chez les espèces terrestres de laboratoire (Richard F. Shore, 2006).

Le choix des molécules à analyser est basé sur **l'importance de leur utilisation** en Europe de nos jours ou sur **l'importance écotoxicologique** de substances aujourd'hui interdites d'utilisation mais qui ont largement été utilisées dans le passé et qui sont connues pour leur persistance dans l'environnement. Ne seront présentées ici que les substances qui ont fait l'objet du suivi chez les Cétacés échoués.

## 2. Éléments traces métalliques

Les éléments traces métalliques sont naturellement présents dans les sols et le développement de l'ère industrielle est associé à une augmentation considérable de leur consommation (300%) et de leur relargage (multiplié par 3) (Rollin and Quiot, 2006). Le plomb (Pb) et le mercure (Hg) sont classés comme « substances dangereuses prioritaires » dans la Décision 2455/2001/CE du Conseil Européen et dans la liste des 10 composés chimiques d'intérêt majeur en santé publique de l'Organisation Mondiale de la Santé (WHO, 2021), ce qui implique un objectif de « rejet zéro » de ces substances provenant de l'activité humaine dans l'environnement.

### a) Le plomb

#### (1) Généralités

Le plomb (Pb) est l'un des premiers toxiques identifiés par l'Homme et reste le premier élément trace métallique responsable d'intoxication malgré les restrictions d'utilisation (Gidlow, 2015) : il serait responsable au niveau mondial de 63,2% des déficiences du développement intellectuel idiopathique, de 10,3% des cardiopathies hypertensives, de 5,6% des cardiopathie ischémiques et de 6,2% des accidents vasculaires cérébraux chez les humains (WHO, 2021).

Le plomb est un élément qui se trouve naturellement dans la croûte terrestre à une concentration moyenne de 1,6 g/100 kg de sol. On retrouve ainsi plusieurs gisements de plombs en France, qui ne sont plus aujourd'hui exploités, en particulier sur le pourtour Méditerranéen (Fénelon, 1955). Le plomb est utilisé depuis l'Antiquité dans les canalisations, les vaisselles, les monnaies, et plus récemment, depuis la révolution industrielle, dans les peintures et les carburants (Ministère des Solidarités et de la Santé, 2020). Ses principales utilisations aujourd'hui sont les batteries (86%), les produits laminés et extrudés (7%) et des composés chimiques (oxydes, sels) et munitions (7%) (RNCAN, 2021).

La production mondiale du plomb en 2019 atteignait les 4,9 millions de tonnes, et l'Europe représente moins de 20% de la production mondiale (RNCAN, 2021).

Par cette grande diversité d'utilisation à travers les époques et son exploitation toujours très importante à l'heure actuelle, le plomb est présent dans tous les milieux environnementaux (air, eau, sols...). La concentration en plomb dans les eaux est aujourd'hui estimée à 2,6 fois supérieures à sa valeur avant la révolution industrielle et ces concentrations sont d'autant plus importantes que l'on se trouve dans une région d'exploitation intense du plomb. On le retrouve essentiellement en forte concentration dans les algues et les organismes benthiques et seulement en faible concentration chez les prédateurs tels que les Cétacés (Richard F. Shore, 2006) car il ne subit pas de bioconcentration dans les chaînes alimentaires.

Le plomb est le plus souvent ingéré et son absorption par l'intestin grêle est favorisée par une alimentation riche en graisses. L'absorption est la plus optimale chez les jeunes individus (jusqu'à 90% de la quantité ingérée), ce qui les rend particulièrement sensibles aux effets toxiques. Le plomb diffuse ensuite dans l'organisme pour être stocké principalement dans le cerveau, le foie, les reins et les os, et il peut être mobilisé depuis les os lors d'une gestation ou lactation et contaminer le fœtus puis le nouveau-né (WHO, 2021).

## (2) Toxicité

Les intoxications au plomb chez la faune sauvage sont essentiellement la conséquence d'une exposition chronique, et les effets toxiques sont très variables car le plomb interagit dans de nombreuses réactions dans l'organisme et passe les barrières hémato-encéphalique et placentaire.

Les effets les plus souvent observés lors d'une intoxication au plomb sont (Richard F. Shore, 2006):

- Une **atteinte hématologique** (anémie par défaut de synthèse de l'hème) ;
- Une **atteinte digestive** avec diarrhée, anorexie, inconfort abdominal ;
- Une **atteinte nerveuse** avec un faible poids cérébral et des lésions (nécrose du cortex cérébral, œdème) se traduisant par une dépression, des convulsions, des troubles moteurs, des difficultés d'apprentissage ;
- Des **troubles reproducteurs** (baisse de fertilité et mortalité fœtales augmentée notamment) ;
- Une **atteinte de la micro-vascularisation** associée à des hémorragies.

Des symptômes ont été observés et corrélés avec une intoxication au plomb chez le Grand Dauphin (Núñez-Nogueira et al., 2019) :

- Une **concentration de 84 mg/kg dans le foie** et **0,66 mg/kg dans le sang** sont associées à une hémossidérose hépatocellulaire, une hyperplasie et une hypertrophie du foie, une insuffisance rénale et une carence en calcium ;
- Une **exposition à 50 mg/L de plomb dans le sang** induirait une baisse de la prolifération lymphatique.

## b) Le mercure

### (1) Généralités

Le mercure est un toxique d'intérêt majeur en santé publique, notamment par l'impact reprotoxique chez l'Homme non négligeable. L'exposition quotidienne des êtres humains par l'alimentation est estimée à 50 ng/kg/jour (Dose Journalière Acceptable selon l'OMS = 2 µg/kg/jour), avec la source alimentaire la plus riche en mercure étant les produits de la mer (WHO, 2021).

La principale source de mercure dans l'environnement est l'activité humaine avec la combustion d'énergie fossile, les incinérateurs, les mines, les manufactures de ciment mais on le retrouve également dans certains produits spécifiques tels que les fongicides, les laxatifs, les antiparasitaires internes, les antiseptiques et les désinfectants. La plupart de ces usages sont désormais interdits. Les activités humaines auraient augmenté le taux de mercure dans les sols de près de 200 000 fois la valeur naturelle (Gupta, 2018). Bien qu'il existe peu de mines de mercure en Europe, la plus grande et la plus ancienne mine de mercure au monde est la mine d'Almadén (Espagne) qui a fonctionné plus de 2000 ans, depuis sa première exploitation par l'Empire Romain au 3<sup>ème</sup> siècle avant Jésus-Christ et fermée en 2003. La production de cette mine est estimée entre 250 000 et 300 000 tonnes, soit près d'un tiers du mercure produit dans le monde (APIC, 2021). Son implication dans la contamination de la Méditerranée n'est pas à négliger.

Les intoxications sont aujourd'hui relativement rares suite à une réglementation de plus en plus stricte exigeant un rejet minimal depuis la découverte des effets cancérigènes et la mise en place des circulaires indiquant des valeurs limites pour la concentration des substances dangereuses dans l'atmosphère du travail à partir de 1982, suivi de l'application du Protocole d'Aarhus (adopté en 1998, mis en œuvre en 2003) (INRS, 2003). En effet, on peut constater une baisse significative des émissions de mercure dans l'environnement en France métropolitaine de 88% entre 1990 et 2018 (Figure 6) (CITEPA, 2020).



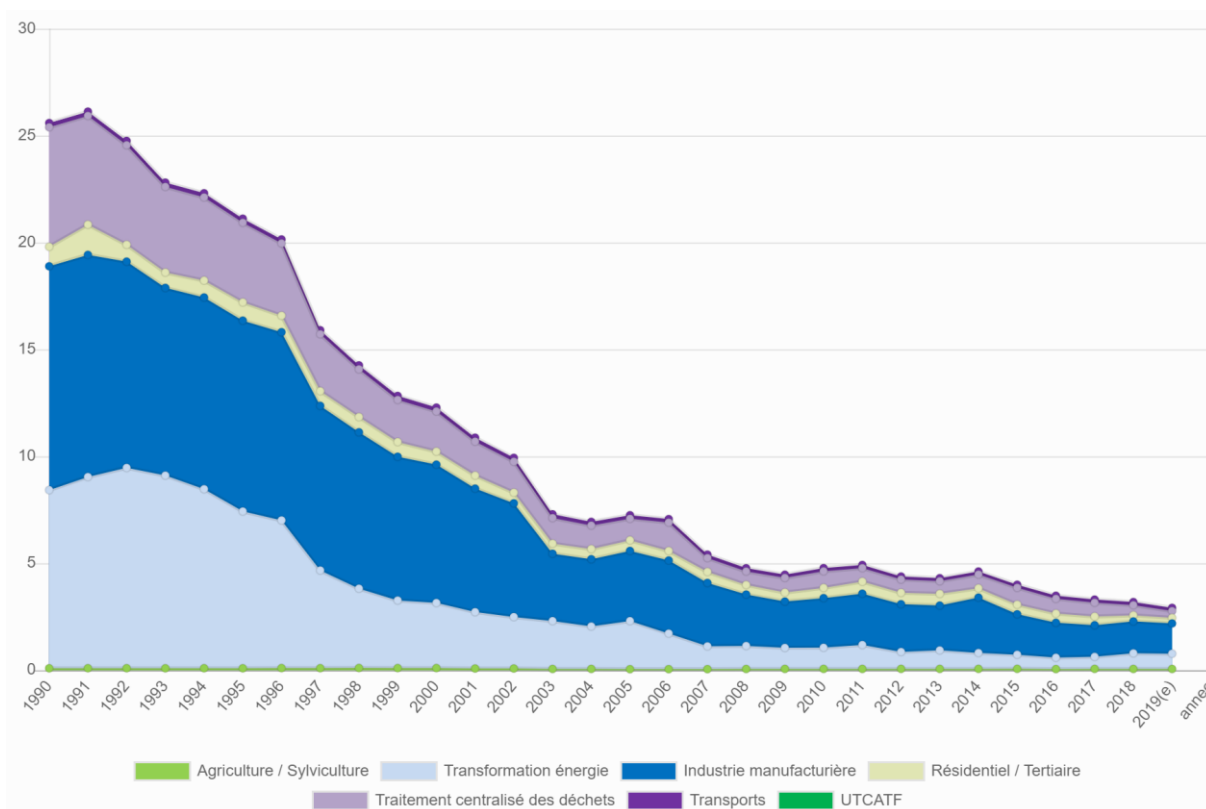


Figure 6 - Evolution des émissions de mercure de 1990 à 2019 en France métropolitaine (en tonnes) (CITEPA, 2020)

Dans l'environnement, le mercure est principalement rencontré sous forme métallique (à 80%, forme liquide à température ambiante ou gazeuse) avant de se transformer en mercure organique (ou méthylmercure, forme directement absorbée depuis l'alimentation (Núñez-Nogueira et al., 2019)) et, dans une moindre mesure, sous forme inorganique ou « sels de mercure » (cette forme n'est pas bioaccumulative). Le méthylmercure possède des propriétés de bioaccumulation et bioamplification chez les Mammifères marins qui présentent des concentrations bien supérieures aux eaux environnantes. Les plus fortes concentrations de mercure sont liées à un régime ichthyophage (Richard F. Shore, 2006).

Le mercure métallique est absorbé à 80% par les poumons et le méthylmercure est absorbé jusqu'à 95% par le système gastrointestinal. La répartition du mercure est similaire quelle que soit la forme avec une distribution dans tous les organes vitaux par liaison aux globules rouges. Chez les Mammifères marins et autres prédateurs marins, la plus forte concentration en mercure est au niveau des nœuds lymphatiques mésentériques puis dans le foie et enfin dans le rein, laissant supposer que le système lymphatique possède un rôle important dans le transport du mercure (Gupta, 2018).

## (2) Toxicité

Les principales expressions cliniques d'une intoxication au mercure sont (Gupta, 2018; Richard F. Shore, 2006) :

- Une **atteinte neurologique** dès une exposition à de faibles doses ou lors d'une exposition *in utero* avec des signes s'aggravant avec l'âge (même en cas d'arrêt d'exposition) se traduisant par une ataxie, des tremblements, une dysfonction du système sensitif (notamment une altération de la vision), des parésies voire paralysies, un changement de comportement et une léthargie.  
Cependant, contrairement aux autres espèces de Mammifères tels que les humains ou les rongeurs, il semblerait qu'il n'y ait pas de passage transplacentaire ni mammaire chez les Cétacés. Cela n'exclut pas la possibilité de lésions cérébrales majeures chez les jeunes individus étant donné que le cerveau est un organe qui se développe sur plusieurs mois voire années après la naissance (López-Berenguer et al., 2020).
- Une **atteinte rénale** dont la sévérité dépend de la dose ingérée allant d'une dégénérescence cellulaire modérée à une destruction tissulaire avec nécrose étendue ;
- Une **atteinte cardiovasculaire** avec une diminution de la fréquence cardiaque et une augmentation de la pression artérielle pouvant persister longtemps après l'arrêt de l'exposition (au moins 9 mois chez les rats de laboratoires) ;
- Une **atteinte gastrointestinale** liée à l'irritation des tissus lors de l'ingestion avec une inflammation et une nécrose gastrique, des ulcères lors d'expositions prolongées pouvant entraîner des modifications hématologiques (anémie) ;
- De nombreux autres effets (infraclinique pour la plupart) sont répertoriés tels qu'une génotoxicité, une immunotoxicité, des perturbations endocriniennes et reproductrices, des effets carcinogènes. Ces effets peuvent directement diminuer la survie des animaux ou favoriser le développement de maladies autres (comme des infections) à l'origine d'une diminution de l'espérance de vie.

Un seuil de toxicité subclinique du mercure chez les Mammifères Marins a été proposé par l'Arctic Monitoring and Assessment Programme (ou AMAP) à **16,5 mg/kg de poids frais** (ou wet weight) **dans le foie** (AMAP, 2021). Il a également été constaté certains signes cliniques imputables à une intoxication au mercure entre 61 et 443 mg/kg de poids frais de foie dont une nécrose hépatique, une obstruction intestinale et des lésions rénales (Núñez-Nogueira et al., 2019).

Il est cependant rare d'observer les effets toxiques du mercure chez les Mammifères marins malgré des concentrations supérieures aux seuils proposés : il existerait des capacités métaboliques à se protéger contre ces effets toxiques (Richard F. Shore, 2006).

### 3. Organochlorés – OC

#### a) Généralités

Les organochlorés ont été utilisés comme composés diélectriques ou retardateurs de flamme avant la découverte de leur action insecticide en 1939 qui a engendré une utilisation bien plus massive dans l'agriculture, les forêts et en utilisation domestique.

Leur forte persistance dans l'environnement avec une demi-vie de l'ordre des années voire dizaines d'années, leur bioconcentration dans les organismes aquatiques ainsi qu'une bioamplification majeure (concentration de dix fois à cent fois supérieure d'un maillon trophique à un autre selon les espèces) ont motivé une interdiction de l'utilisation d'une partie des molécules de cette famille dès 1972 aux Etats-Unis, décision rapidement suivie par la France dans l'année qui suit, et à un niveau plus global en 2001 lors de la signature de la Convention de Stockholm concernant les Polluants Organiques Persistants (Jepson et al., 2016). Les organochlorés représentent aujourd'hui une faible part des pesticides utilisés mais leur persistance dans l'environnement est toujours une préoccupation sanitaire majeure, aussi bien chez les animaux que chez l'Homme (Gupta, 2018).

Il existe de nombreux composés appartenant à la famille des organochlorés mais le dichlorodiphényltrichloroéthane ou DDT (Figure 7) reste le plus représenté lors des analyses toxicologiques par sa forte persistance dans l'environnement et sa toxicité, avec les PCB (abordés séparément dans la partie suivante).

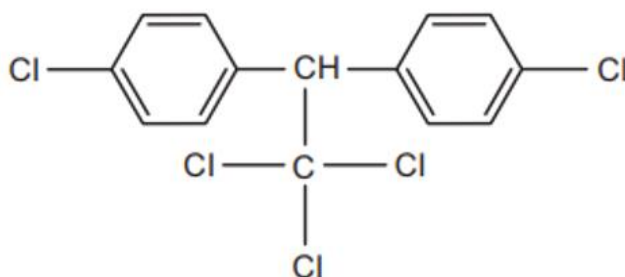


Figure 7 - Structure du dichlorodiphényltrichloroéthane ou DDT (Gupta, 2018)

Les organochlorés sont le plus souvent absorbés par voie digestive chez les Mammifères marins. Ce sont des molécules lipophiles, leur absorption est donc rapide et améliorée lors d'un repas riche en lipides. Elles sont ensuite distribuées essentiellement vers le foie où elles sont métabolisées puis vers les reins, le cerveau et les tissus adipeux. Il existe un passage transplacentaire et mammaire de ces molécules vers le jeune (Barbosa et al., 2018).

### b) Toxicité

Les effets toxiques des organochlorés ont pu être observés à la fois lors de contamination aiguë suite à des accidents industriels (catastrophe de Seveso en 1976) et lors de contaminations chroniques, le plus souvent. Parmi les symptômes que l'on peut observer, se trouvent (Jayaraj et al., 2016) :

- **Effets neurotoxiques** : convulsions, dépressions ou hyperexcitabilité , tremblements, incoordination, troubles de l'apprentissage ;
- **Effets reprotoxiques** : un passage de la barrière placentaire est observé avec ces molécules ainsi qu'une altération de la fertilité, des malformations congénitales, une corrélation négative entre le taux de testostérone dans le sang et la concentration de DDT et ses métabolites dans le lard a été mise en évidence chez les Mammifères marins (Richard F. Shore, 2006) ;
- **Effets cancérigènes** notamment au niveau du foie ;
- **Effets immunologiques** : leucopénie, altération de la réponse immunitaire humorale et cellulaire causant une sensibilité accrue aux infections.

## 4. Polychlorobiphényles – PCB

### a) Généralités

Les polychlorobiphényles ou PCB ont été utilisés dans de nombreux domaines : les transformateurs électriques, les systèmes hydrauliques, les peintures, les lubrifiants, les retardateurs de flamme, les huiles à immersion, divers pesticides... Il existe 209 congénères théoriques possibles mais seuls 100 à 150 congénères sont utilisés et retrouvés dans l'environnement (Figure 8) (Richard F. Shore, 2006).

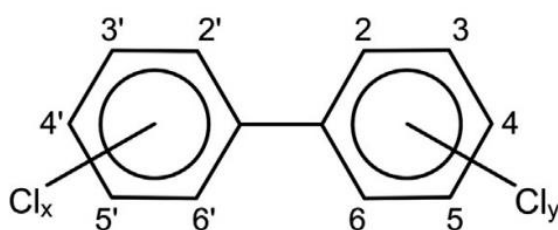


Figure 8 - Structure générale des polychlorobiphényles (Gupta, 2018)

Le début de production commerciale de ces molécules date de 1929. La réalisation de leurs effets toxiques, leurs capacités de bioaccumulation et bioamplification et leur forte persistance dans l'environnement ont motivé l'interdiction de leur production à partir de 1979 aux Etats Unis d'Amérique puis en 1987 en Europe. Durant cette période, 1,2 millions de tonnes de PCB ont été produits. Il est aujourd'hui estimé que 31% de cette production (soit 370 000 tonnes) ont été déversés dans l'environnement suite à des fuites ou des éliminations

incorrectes, et environ 780 000 tonnes serait toujours présentes dans des équipements électriques et des produits présents dans les décharges et les stocks (Gupta, 2018).

De même que le reste des organochlorés, les PCB sont des molécules lipophiles rapidement absorbées par voie digestive et en grande quantité, avant d'être distribuées vers le foie où a lieu une métabolisation et vers les graisses. Un passage de la barrière placentaire est observé chez les femelles gestantes ainsi qu'une excrétion dans le lait (Barbosa et al., 2018).

### *b) Toxicité*

Au sein des Mammifères terrestres, les sensibilités aux PCB sont extrêmement variables. Les Mammifères marins présentent des taux de PCB largement supérieurs aux taux estimés toxiques chez les autres espèces de Mammifères sans preuve formelle d'effets toxiques (Gupta, 2018; Richard F. Shore, 2006). Il faut toutefois relativiser ce dernier point, en raison de l'absence d'études permettant d'évaluer la toxicité directement sur les Mammifères marins.

- **Effets reprotoxiques :**
  - Chez le mâle : altération de l'âge de la puberté, diminution du poids des organes reproducteurs et du nombre de cellules de Leydig avec un faible nombre de spermatozoïdes et une viabilité altérée ;
  - Chez la femelle : altération du cycle reproducteur et de la réceptivité de l'endomètre, baisse de fertilité, gestation prolongée, retard du développement mammaire ;
  - Chez le fœtus : mort fœtale, hypoplasie thymique, baisse de croissance fœtale, suite au passage de la barrière placentaire.
- **Effets neuroendocrines** : altération des neurotransmetteurs et interférence avec les récepteurs aux hormones stéroïdiennes et thyroïdiennes entraînant des modifications dans les biosynthèses et le métabolisme ;
- **Effets neurocomportementaux** : ces effets sont très espèce-dépendant et comprennent une altération du comportement tel que de l'hyperactivité, des difficultés d'apprentissage, et une altération des capacités motrices fines ;
- **Effets immunologiques** : les Cétacés retrouvés échoués avec des signes mettant en évidence du parasitisme, des infections bactériennes, ou une infection par le Morbillivirus des Cétacés ont tous présenté de forts taux de contamination par les PCB, ce qui laisse supposer un effet immunosuppresseur et une forte sensibilité aux infections (Aguilar and Borrell, 1994; Genov et al., 2018).

Deux seuils de toxicité ont été évalués pour les PCB chez le Phoque annelé (*Phoca hispida*) et souvent utilisés comme référence chez la plupart des Mammifères Marins (Helle et al., 1976) :

- Un seuil bas correspondant à un début d'impact physiologique ou une toxicité subclinique à **9 mg/kg en fraction lipidique** ;
- Un seuil haut associé à un déficit reproductif important à **41 mg/kg en fraction lipidique**.

## 5. Organophosphorés et Carbamates – OP et CM

### a) Généralités

Les organophosphorés (Figure 9) constituent une grande famille de molécules dont plus de 200 sont très couramment utilisées en agriculture en tant que pesticide, dans l'industrie comme retardateurs de flamme ou plastifiants, en utilisation domestique mais également en médecine vétérinaire. Ce sont des inhibiteurs des cholinestérases qui possèdent un effet toxique non négligeable et non spécifique et certaines molécules sont aujourd'hui interdites du fait de leur toxicité très importante telles que l'aldicarbe et les gaz toxiques, notamment le gaz sarin, pouvant constituer des armes chimiques de destruction massive (Gupta, 2018).

Aujourd'hui, les carbamates sont préférés car ils présentent une toxicité plus faible et un impact environnemental moindre (Figure 9).

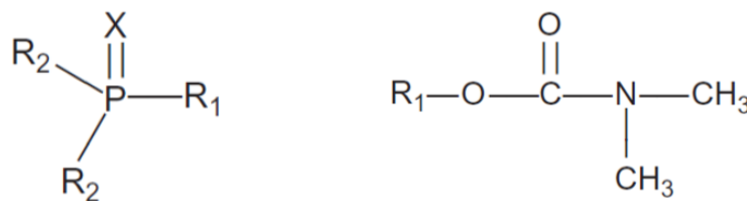


Figure 9 - Structure générale des organophosphorés (à gauche) et des Carbamates (à droite) (Gupta, 2018)

La contamination par les organophosphorés se fait principalement par voie orale chez nos espèces d'intérêt. Ce sont des molécules liposolubles qui se concentrent principalement dans les tissus adipeux et le cerveau. Il existe un métabolisme hépatique permettant soit l'activation de l'effet toxique (ou « synthèse létale ») ou, au contraire, la détoxification de la molécule (Gupta, 2018).

## b) Toxicité

Les intoxications aux organophosphorés sont principalement observées dans des cas de contamination aiguë chez les Mammifères terrestres avec des symptômes neurologiques divers et une gravité variable. Cette expression clinique n'est quasiment pas observée en faune sauvage, et peu de rapports de toxicité chronique sont décrits.

Il existe des **effets neurotoxiques** retardés observés entre 10 à 15 jours post-exposition chez des poules, caractérisés par une dégénérescence des axones moteurs et sensitifs des nerfs spinaux et périphériques. Cet effet est limité à quelques substances de la famille seulement.

Un **effet immunotoxique** est également fortement suspecté aujourd'hui, notamment chez l'Homme, associé à une plus forte sensibilité aux infections suite à un stress oxydatif prolongé altérant la réponse immunitaire (Rajak et al., 2021).

## 6. Pyréthrines et Pyréthrinoïdes

### a) Généralités

Les pyréthrines sont des molécules extraites de la plante *Tanacetum cinerariaefolium* ou « Pyrèthre de Dalmatie » dont la première utilisation est rapportée en Perse en 400 avant JC. Les pyréthrinoïdes sont des analogues de synthèse des pyréthrines synthétisés pour la première fois à la fin des années 1940. Cette première génération de molécules (Figure 10) est plutôt sélective contre les insectes, les poissons y sont également sensibles, et peu toxique pour les Mammifères (2250 fois moins sensibles que les insectes (Aznar-Alemany et al., 2017)), mais leur photosensibilité (dégradation en un à deux jours) a vite motivé leur remplacement par des molécules plus puissantes telles que les organophosphorés et les organochlorés.

Cependant, la prise de conscience écologique liée à l'utilisation de molécules toxiques a favorisé le développement d'une deuxième génération de pyréthrinoïdes (Figure 10), plus stables de l'environnement (persistance de l'ordre des semaines) et plus efficaces, tout en restant *a priori* peu toxiques pour la faune sauvage, ce qui justifie l'augmentation de leur utilisation depuis les années 1970 (Richard F. Shore, 2006). Aujourd'hui, les pyréthrinoïdes représentent 25% des insecticides utilisés dans le monde.

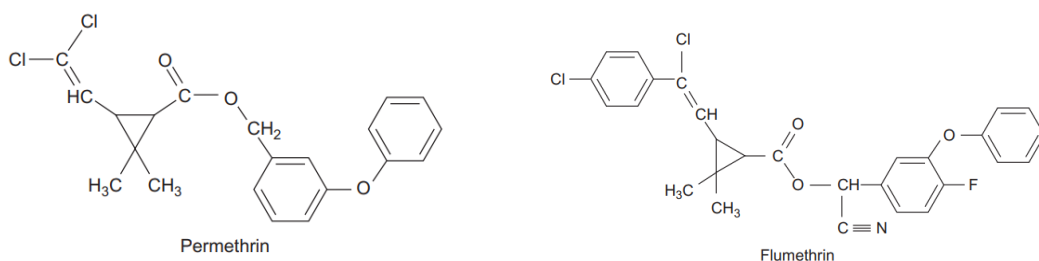


Figure 10 - Structure d'un pyréthrinoïde de première génération (la Perméthrine) et de deuxième génération (la Fluméthrine) (Gupta, 2018)

Les pyréthriinoïdes sont des substances lipophiles dont l'absorption digestive est de 40% à 60% de la quantité ingérée et dont la distribution se concentre vers les tissus adipeux, les tissus nerveux mais aussi le foie, les reins et, dans une moindre mesure, les muscles. Il existe un passage transplacentaire et mammaire de ces molécules (Alonso et al., 2012; Gupta, 2018).

### *b) Toxicité*

Les effets toxiques sont le plus souvent observés chez nos animaux de compagnie suite à une exposition cutanée avec un traitement antiparasitaire. La distribution systémique de la molécule et leurs **symptômes neurologiques** peu spécifiques sont facilement confondus avec une intoxication par d'autres pesticides, notamment les organophosphorés et les organochlorés (Gupta, 2018). Des **destructions tissulaires** peuvent également avoir lieu lors d'une exposition prolongée à forte dose chez des rats (Al-Omar et al., 2020).

Il existe encore peu de données disponibles concernant les effets toxiques chroniques des pyréthriinoïdes, mais il semblerait que plusieurs effets soient suspectés ou décrits (Aznar-Aleman et al., 2017) :

- **Toxicité sur le système nerveux** (effet constaté chez l'Homme) : dysfonctionnement cérébral, polyneuropathie, troubles locomoteurs ;
- **Toxicité sur le système immunitaire** : immunosuppression ;
- **Toxicité sur le système reproducteur** décrit chez les rats ;
- **Potentiel carcinogène**, notamment la perméthrine.

Ces molécules semblent également avoir une capacité de bioaccumulation chez les Mammifères marins, en particulier étudiée chez les Dauphin Bleu et Blanc, et la fréquence et les concentrations retrouvées chez cette espèce remettraient en question l'innocuité environnementale de ces substances (Aznar-Aleman et al., 2017), et posent, en tout cas, la problématique de leur persistance et leur transfert dans les réseaux trophiques.

## 7. Pesticides : Herbicides et Fongicides

### *a) Généralités*

Les herbicides représentent la plus grande part des pesticides utilisés aujourd'hui dans le monde. On note une forte croissance de leur utilisation avec l'extension des monocultures et de la mécanisation du travail agricole : en 1995, 2 millions de tonnes sont vendues dans le monde (Richard F. Shore, 2006), en 2018, 1,21 millions de tonnes d'herbicides sont utilisés ("FAOSTAT," 2021). Il existe un grand nombre de molécules dans cette famille des herbicides et les plus récentes sont de plus en plus spécifiques des plantes ciblées et présentent une faible toxicité chez les Mammifères. Il existe peu de problèmes décrits liés à ces molécules, la



plupart des cas d'intoxication sont secondaires à une utilisation incorrecte ou à une élimination inadaptée. L'inquiétude principale concerne leur dissémination par les eaux de pluies et les inondations et la possibilité de les retrouver dans les eaux de boisson. Les principales familles d'herbicides utilisées à ce jour sont les herbicides auxiniques dont l'acide 2,4 – dichlorophénoxyacétique (ou 2,4 – D) et le groupe des bipyridines, comprenant le paraquat, bien que plus toxiques et leur utilisation en déclin (Figure 11) (Gupta, 2018).

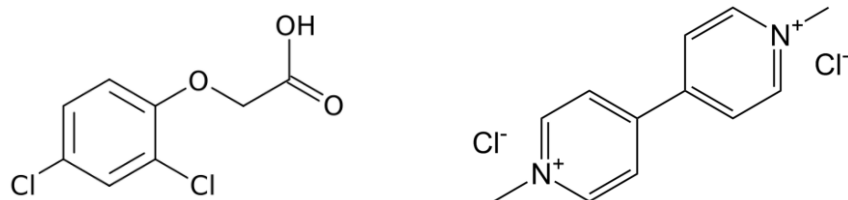


Figure 11 - Structure du 2,4 - D (à gauche) et du paraquat (à droite) (PubChem, 2021)

Historiquement, les fongicides étaient des matériaux inorganiques tels que le soufre, la chaux, le cuivre et le mercure. Aujourd'hui, les molécules organiques de synthèse représentent 90% des fongicides utilisés et il existe une grande diversité de substances et de structures chimiques appartenant à cette famille, et une généralisation de leurs impacts environnementaux est difficile. Les fongicides doivent respecter un certain nombre de propriétés afin d'être commercialisés :

- Effet protecteur, curatif ou éradicateur vis-à-vis des espèces cibles ;
- Faible toxicité pour les plantes et les animaux, faible écotoxicité ;
- Activité directe ou secondaire à une métabolisation par la plante ;
- Capacité à intégrer les différents stades du cycle de développement des fungi ;
- Résistance aux variations météorologiques, dépôt persistant sur la plante.

La majorité des nouvelles molécules mises sur le marché respectent ces exigences, notamment concernant la toxicité contre les Mammifères. Cependant, les molécules les plus récentes telles que les imidazolés ne représentent que 10% des molécules utilisées (Gupta, 2018) bien qu'il soit connu que les molécules plus anciennes sont également plus toxiques, moins spécifiques et plus persistantes dans l'environnement (Richard F. Shore, 2006). De même que les herbicides, leur utilisation augmente depuis les années 1990, bien que de façon moins importante, avec une consommation en 2018 estimée à 530 000 tonnes (Figure 12) ("FAOSTAT," 2021).

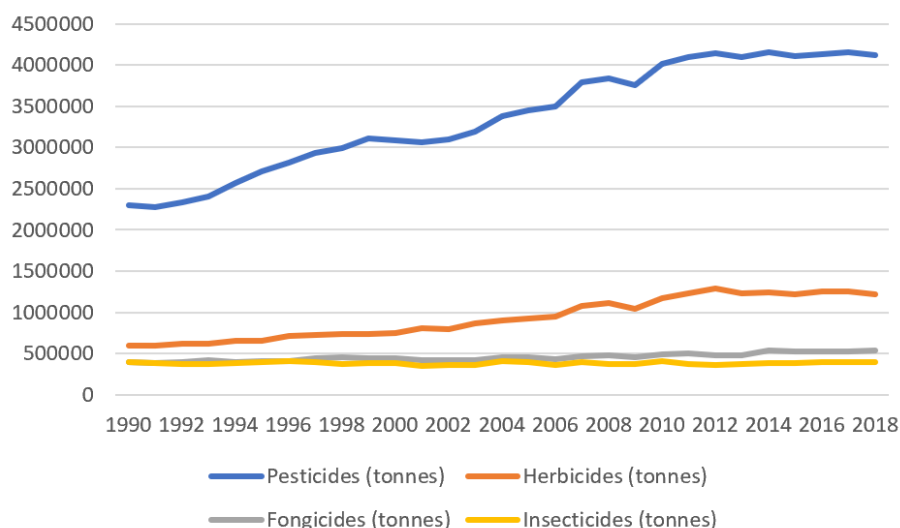


Figure 12 - Evolution de l'utilisation mondiale des pesticides, herbicides et fongicides entre 1990 et 2018 ("FAOSTAT," 2021)

Par leur forte importance d'utilisation, les pesticides sont des marqueurs forts de l'activité humaine.

En général, cette classe de molécules est rapidement absorbée par ingestion et distribuée au foie, premier site de biotransformation, que ce soit une activation ou une détoxification, mais également aux reins et au cerveau. Certaines de ces molécules ont aussi la capacité de passer la barrière placentaire et d'être excrétées dans le lait.

### b) Toxicité

Comme présenté précédemment, la grande diversité des molécules appartenant à ces familles de pesticides fait qu'il est difficile de généraliser un impact environnemental et toxique, et les molécules les plus récentes sont moins toxiques. Cependant, la préoccupation majeure autour de ces molécules sont les **perturbations endocriniennes** pouvant altérer tous les niveaux de la cascade hormonale : perturbation de la reproduction, du développement et de la différenciation sexuelle lors d'une exposition *in utero*, altération de la synthèse d'œstrogène et de testostérone (notamment dans le cas du glyphosate aux doses faibles non toxiques) chez les adultes.

Parmi les herbicides, 8 molécules sont identifiées précisément comme perturbateurs endocriniens : le 2,4 - D, le 2,4,5 - T, l'alachlore, l'amtrole, l'atrazine, la métribuzine, la trifluraline et le nitrofène. Parmi les fongicides, les imidazolés sembleraient le plus altérer la synthèse des hormones sexuelles.

Un grand nombre d'autres effets toxiques peuvent être observés avec l'utilisation de ces molécules, dont des atteintes gastrointestinales, neurologiques, respiratoires, rénales, oculaires ou cutanées (Gupta, 2018).

### III. Matériel et Méthode

#### A. Echantillons animaux

##### 1. Echantillonnage

Les échantillons sont prélevés sur des animaux retrouvés échoués sur les côtes françaises et italiennes du Sanctuaire Pelagos (Mer Méditerranée) par les organismes CReDiMa pour la partie italienne, et GECEM/LVD34 pour la partie française entre Novembre 2017 et Mars 2020. Tous les animaux échoués retrouvés à cette période n'ont pas été prélevés en fonction de leur état de conservation. Pour chaque individu, des échantillons d'environ 50 grammes de foie et de lard, de préférence en une seule pièce, ont été récupérés et placés dans un film aluminium avant identification puis congelés entre – 20°C et – 80°C pendant au moins 24 heures avant acheminement puis analyse au laboratoire de toxicologie de Vetagro Sup (pour les contaminants) (Annexe 2).

##### 2. Estimation de l'âge des individus

L'estimation de l'âge des individus se fait sur la mesure de la longueur total du corps. Les travaux de Calzada et al. (1996, 2011) permettent une estimation de l'âge chez le Dauphin Bleu et Blanc (*Stenella coeruleoalba*) et les travaux de Read et al. (1993) et Pribanic et al. (2000) renseignent sur l'évaluation de l'âge chez le Grand Dauphin (*Tursiops truncatus*). Les valeurs renseignées dans le Tableau I ci-dessous sont basées sur l'étude de la fonction de Gompertz à partir de mesures de terrain.

Tableau I - Estimation de l'âge selon la taille des individus (Calzada et al., 1996, 2011; Pribanic et al., 2000; Read et al., 1993)

<b>Tranche d'âge</b>	<b><i>Stenella coeruleoalba</i></b>	<b><i>Tursiops truncatus</i></b>
<i>Nouveau-né</i>	< 90 cm	97 cm
<i>Veaux</i>	90 – 128 cm	125 – 175 cm
<i>Juveniles</i>	137 – 184 cm	200 – 260 cm
<i>Adultes</i>	197 – 231 cm	280 cm

## B. Méthodes d'analyse

### 1. Éléments trace métalliques

#### a) Plomb

Le plomb est mesuré par une technique de spectrométrie d'absorption atomique présentée dans le Tableau II ci-dessous (Annexe 3).

Tableau II - Protocole pour le dosage du plomb - Technique de Spectrométrie d'Absorption Atomique (mode four)

<i>Echantillons</i>	Foie (ou rein)
<i>Phase de Digestion</i>	<p>Mouliner l'échantillon jusqu'à obtenir d'un produit liquide.</p> <p>→ Obtention d'un moulinât</p> <p>Prélever 0,5 g du moulinât et ajouter :</p> <ul style="list-style-type: none"><li>- 5 mL d'acide nitrique ;</li><li>- 1,5 mL de peroxyde d'oxygène ;</li><li>- 2 mL d'eau distillée.</li></ul> <p>Pour les échantillons supplémentés, 0,5 mL d'une solution de plomb est ajoutée afin d'obtenir une concentration de 10 ng/mL en plomb.</p> <p>→ Obtention d'un digestât</p> <p>Ajouter 25 mL d'eau distillée au digestat et homogénéiser.</p>
<i>Phase d'Analyse</i>	<p><b>Spectrométrie d'Absorption Atomique (mode four)</b></p> <p>Injecter 20 µL de la préparation dans les cuves, à 60°C.</p> <p>Passage successif par 4 paliers de températures entre 130 et 2500°C et exposition de l'échantillon à un faisceau lumineux, sur une durée totale de 37,2 secondes.</p> <p>→ Obtention d'un <b>spectre d'absorption <math>A = f(C)</math></b> pour une longueur d'onde <math>\lambda = 217</math> nm, valeur caractéristique du plomb.</p> <p>La concentration en plomb de l'échantillon est déterminée selon la loi de Beer-Lambert : <math>A = \epsilon l C</math> avec <math>A</math> pour l'absorbance de l'échantillon, <math>\epsilon</math> l'absorptivité spécifique du plomb, <math>l</math> la longueur de la cuve et <math>C</math> la concentration en plomb de l'échantillon.</p> <p>Plusieurs contrôles sont à réaliser avant chaque nouvelle analyse :</p> <ul style="list-style-type: none"><li>- Températures de décomposition et d'atomisation ;</li><li>- Positionnement du capillaire ;</li><li>- Courbe d'étalonnage en 5 points de 2 à 20 ng/mL.</li></ul>
<i>Valeurs limites</i>	100 à 1500 µg/kg

## b) Mercure

Le dosage du mercure se fait selon la méthode AFSSA, référencée par l'ANSES ("Anses", 2020), par la technique de Spectrométrie d'Absorption Atomique après génération d'hydrures, présentée dans le Tableau III (Annexe 4).

Tableau III - Protocole pour le dosage du mercure – Technique de Spectrométrie d'Absorption Atomique par génération d'hydrures

<i>Echantillons</i>	Foie, (muscle ou rein)
<i>Phase de Digestion</i>	Prélever 0,5 à 1 g d'échantillon et mixer avec : <ul style="list-style-type: none"><li>- 8 mL d'acide nitrique ;</li><li>- 2 mL de peroxyde d'oxygène ;</li><li>- 1 mL d'eau distillée.</li></ul> → Obtention d'un minéralisât vert. Ajouter du permanganate de potassium jusqu'à obtention d'une solution violette, et ajuster jusqu'à 50 mL avec de l'eau distillée. → Obtention de l'échantillon essai
<i>Phase d'Analyse</i>	<b>Spectrométrie d'Absorption Atomique par génération d'hydrures</b> L'échantillon est aspiré automatiquement et soumis à un faisceau lumineux à partir d'une lampe EDL à un courant de 180 mA. Obtention d'une <b>droite d'absorption <math>A = f(C)</math></b> pour une longueur d'onde $\lambda = 193,7$ nm, caractéristique du mercure. La concentration en mercure de l'échantillon est déterminée selon la loi de Beer-Lambert : $A = \epsilon lc$ .  Un étalonnage est réalisé pour chaque série d'analyses.
<i>Valeurs limite</i>	0,01 mg/kg

## 2. Organochlorés (dont PCB)

Les organochlorés sont évalués par chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à capture d'électrons après extraction et purification acide et basique, comme présenté dans le Tableau IV (Annexe 5). Cette technique est très sensible et très spécifique des dérivés halogénés (Liu et al., 2015).

Tableau IV - Protocole de dosage des organochlorés - Technique de chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à capture d'électrons

<i>Echantillons</i>	Foie, lard (ou appât, sang, lait ou contenu gastrique)	
<i>Phase de Digestion</i>	<p>Broyer 1 g de foie dans 30 mL d'un mélange hexane/acétone et centrifuger pendant 10 min. Répéter cette opération sur le produit de filtration.</p> <p>→ Récupérer le filtrat.</p> <p>Faire évaporer à sec à 60°C puis ajouter 10 mL d'hexane avant de passer le tout aux ultrasons.</p> <p>→ Obtention de l'extrait à étudier.</p>	
	<u>Organochlorés</u>	<u>PCB</u>
	<p>Ajouter 2 mL d'un mélange d'acide sulfurique et acide chlorhydrique à 5 mL de l'extrait et centrifuger.</p> <p>→ Récupérer le surnageant.</p>	<p>Ajouter 1 mL de potasse alcoolique à 2% à 1 mL de l'extrait et agiter 30 min à 50°C. Ajouter 2 mL d'eau distillée et centrifuger.</p> <p>Ajouter 0,5 mL du mélange d'acide et centrifuger de nouveau.</p> <p>→ Récupérer le surnageant.</p>
<i>Phase d'Analyse</i>	<p><b>Chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à capture d'électrons</b></p>	
	<p>Injecter 2 µL du produit obtenu entraîné par un courant d'hélium à travers un four, présentant un gradient de température de 100 à 260°C pour les organochlorés ou 120 à 280°C pour les PCB, jusqu'au détecteur à capture d'électrons.</p> <p>Durée totale de l'analyse : 17 min pour les organochlorés, 36,5 min pour les PCB :</p> <p>→ Obtention d'un <b>chromatogramme</b> <math>I = f(Tr)</math>, avec I l'intensité et Tr le temps de rétention.</p> <p>Un étalonnage spécifique pour les organochlorés ou pour les PCB doit être réalisé avant chaque analyse.</p> <p>Cette technique permet d'identifier 20 composés organochlorés et 15 congénères de la famille des PCB.</p>	
<i>Valeurs limite</i>	0,01 mg/kg	

Les résultats sont exprimés sous la forme de la somme des organochlorés hors PCB ou ΣOC. Parmi les organochlorés, la somme des DDT est présentée à part étant donnée l'importance de cette molécule, indiquée sous le signe « ΣDDT ».

### 3. Organophosphorés

La chromatographie en phase gazeuse couplée à une spectrométrie de masse est la technique utilisée pour le dosage des organophosphorés dans nos échantillons, décrite dans le Tableau V ci-dessous (Annexe 6).

Tableau V - Protocole de dosage des organophosphorés - Technique de chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse

<i>Echantillons</i>	Foie (appât ou contenu stomacal)
<i>Phase de Digestion</i>	<p>Broyer 2 g de foie avec 20 mL de dichlorométhane puis centrifuger et filtrer le surnageant.</p> <p>→ Récupérer le culot d'extraction.</p> <p>Ajouter 20 mL d'hexane et filtrer de nouveau puis faire évaporer à sec, sous vide à 40°C.</p> <p>→ Récupérer le résidu.</p> <p>Ajouter 2 mL d'éthanol et centrifuger.</p> <p>→ Récupérer le surnageant.</p>
<i>Phase d'Analyse</i>	<p><b>Chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse</b></p> <p>Injecter 2 µL de la préparation entraînée par un courant d'hélium à travers un four présentant un gradient de température de 100 à 300°C jusqu'au spectromètre de masse.</p> <p>→ Obtention d'un <b>spectre de masse</b> Abondance = f(masse/charge)</p> <p>Durée totale de l'analyse : 16,7 min</p> <p>A chaque utilisation, des échantillons blancs et supplémentés sont utilisés pour témoigner du fonctionnement de l'analyse.</p> <p>Cette technique permet d'identifier 11 composés organophosphorés.</p>
<i>Valeurs limite</i>	0,025 mg/kg

#### 4. Pyréthrinoïdes

Le dosage des pyréthrinoïdes repose sur la même technique que le dosage des organochlorés, c'est-à-dire une chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à capture d'électrons (Meneghini et al., 2014), décrite dans le Tableau VI (Annexe 7).

Tableau VI - Protocole de dosage des pyréthrinoïdes - Technique de chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à capture d'électrons

<i>Echantillons</i>	Foie (appâts)
<i>Phase de Digestion</i>	Prélever 2 g de foie et ajouter 5 g de sulfate de sodium anhydre puis 30 mL d'éthanol et centrifuger le tout. → Récupérer le filtrat. Faire évaporer à sec à 80°C et ajouter 2 mL de méthanol au résidu. → Obtention de l'échantillon essai.
<i>Phase d'Analyse</i>	<b>Chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à capture d'électrons</b> Injecter 2 µL du produit obtenu entraîné par un courant d'hélium dans la colonne de chromatographie à travers un four, présentant un gradient de température de 120 à 250°C, jusqu'au détecteur à capture d'électron à 320°C. Durée totale de l'analyse : 24,2 min → Obtention d'un <b>chromatogramme</b> $I = f(Tr)$  A chaque utilisation, des échantillons blancs et supplémentés sont utilisés pour témoigner du fonctionnement de l'analyse. Cette technique permet d'identifier 8 molécules parmi les pyréthrinoïdes.
<i>Valeurs limite</i>	0,01 mg/kg

#### 5. Pesticides

Les pesticides sont analysés par dosage en chromatographie liquide couplé à la spectrométrie de masse en tandem (ou LC-MS) après extraction par méthode QuEChERS (Tableau VII) (Feo et al., 2011; Song et al., 2019). Cette technique est actuellement la plus spécifique et la plus sensible disponible (Annexe 8). Une trentaine de substances sont analysées par cette méthode au laboratoire de Vetagro Sup et des échantillons ont été analysés en sous-traitance pour compléter les résultats avec plus de 150 substances.



Tableau VII - Protocole de dosage des pesticides – Technique de chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem après extraction par méthode QuEChERS

<i>Echantillons</i>	Foie
<i>Phase de Digestion</i>	<p>Prélever 1 g de foie et mixer avec 5 mL d'acétonitrile pour LC-MS puis mélanger dans un tube contenant les QuEChERS (préparation pour analyse multi-résidus de divers pesticides) et centrifuger pendant 5 min.</p> <p>→ Prélever le surnageant.</p> <p>L'ajouter dans un tube dSPE 15 mL et homogénéiser avant de centrifuger pendant 5 min de nouveau puis filtrer.</p> <p>→ Récupérer le filtrat.</p>
<i>Phase d'Analyse</i>	<p><b>Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem</b></p> <p>Injecter 5 µL du filtrat obtenu se répartissant dans 2 voies :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Voie A : eau à 5 mM de formiate d'ammonium + 0,1% d'acide formique ;</li> <li>- Voie B : Méthanol pour LC-MS à 5 mM de formiate d'ammonium + 0,1% d'acide formique.</li> </ul> <p>Durée totale de l'analyse : 20 min.</p> <p>→ Obtention d'un <b>chromatogramme</b>.</p> <p>Pour chaque série d'analyse, un blanc et un essai supplémenté à la limite de quantification sont à intégrer dans la série d'échantillons.</p>
<i>Valeurs limite</i>	0,01 mg/kg

## 6. Traitement des données

Les concentrations sont présentées en **µg/g de produit frais** (ou wet weight).

Les résultats sont représentés graphiquement par le logiciel Excel et l'analyse statistique est réalisée à partir du logiciel RStudio version 1.4.1717 (RStudio, 2021). Le test non paramétrique de Kruskal Wallis a été utilisé pour évaluer les différences selon l'âge et le test non paramétrique de Mann-Whitney-Wilcoxon permet l'analyse des données selon l'espèce et selon le pays où sont retrouvés les individus.

Dans le cadre de cette étude, une partie des individus prélevés ont également été analysés pour des éléments biologiques (Berio et al., 2020) :

- Une recherche bactériologique de *Salmonella spp.*, *Listeria spp.*, *E. coli* et *E. rhusiopathiae*, ainsi que les antibiogrammes associés ;
- Une recherche parasitaire de *T. gondii* et *S. neurona* ;
- Une recherche virale du Morbillivirus des Dauphins (DMV).

Les résultats de ces analyses font partie d'une autre étude et ne seront pas présentés dans cette thèse (Berio et al., 2020).

## IV. Présentation des résultats

### A. Analyse générale

Des échantillons de foie et de lard ont été prélevés sur 31 animaux (Figure 1) :

- 14 sur les côtes italiennes :
  - o 4 Grands Dauphins ;
  - o 10 Dauphins Bleus et Blancs ;
- 17 sur les côtes françaises :
  - o 1 Grand Dauphin ;
  - o 16 Dauphins Bleus et Blancs.

Parmi les animaux prélevés se trouvent 2 nouveaux nés, 5 veaux, 7 juvéniles et 16 adultes.



Figure 13 - Distribution des échouages sur les côtes du Sanctuaire Pelagos (en rouge : *Stenella coeruleoalba*, en vert : *Tursiops truncatus*)

Les résultats sont présentés dans le tableau VIII ci-dessous et exprimés en poids frais (wet weight ou ww). Il est précisé la localisation et l'âge de chaque individu.

Les contaminants analysés dans cette étude sont essentiellement des composés lipophiles. Il est donc nécessaire d'évaluer la proportion lipidique des échantillons. La proportion lipidique du lard de nos échantillons est de 75%, elle correspond aux valeurs retrouvées chez la plupart des espèces de Mammifères Marins. La proportion lipidique moyenne du foie de nos échantillons est de 26%.

Tableau VIII - Résultats d'analyses (valeurs en µg/g ww)

Identification	Espèce	Age	Lieu	Hg	Pb	ΣDDT		ΣOC	OP	Pyréthriinoïdes	Pesticides	PCB
				Foie	Foie	Lard	Foie	Lard	Foie	Foie	Foie	Lard
IDVETAGRO_75722/18	Sc	Nouveau né	Varazze	6.23	<0,1	0.15	<0.01	0.29	<0.1	<0.01	<0.01	
IDVETAGRO_87558/18	Sc	Veau	Arenzano	9.96	<0,1	1.30	<0.01	1.46	<0.1	<0.01	<0.01	
IDVETAGRO_619/19	Sc	Adulte	Alassio	>10	<0,1	2.49	0.07	3.09	<0.1	<0.01	<0.01	
IDVETAGRO_4561/19	Sc	Adulte	Pegli	>10	<0,1	0.01	<0.01	0.04	<0.1	<0.01	<0.01	1.32
IDVETAGRO_18013/19	Tt	Veau	Diano Marina	0.98	<0,1	0.55	<0.01	2.38	<0.1	<0.01	<0.01	
IDVETAGRO_21724/19	Sc	Adulte	Savona	>10	<0,1	0.36	<0.01	0.56	<0.1	<0.01	<0.01	11.23
IDVETAGRO_33212/19	Sc	Juvenile	Savona	3.5	<0,1	0.79	<0.01	0.99	<0.1	<0.01	<0.01	45.69
IDVETAGRO_42472/19	Tt	Juvenile	Isola Palmaria	>10	<0,1	1.24	<0.01	2.04	<0.1	<0.01	<0.01	
IDVETAGRO_44599/19	Tt	Adulte	Sestri Levante	>10	<0,1	0.45	<0.01	0.56	<0.1	<0.01	<0.01	
IDVETAGRO_59260/19	Tt	Adulte	Genova	>10	<0,1	0.11	<0.01	0.16	<0.1	<0.01	<0.01	84.2
IDVETAGRO_62877/19	Sc	Adulte	Andora	>10	<0,1	0.02	<0.01	0.06	<0.1	<0.01	<0.01	
IDVETAGRO_63558/19	Sc	Veau	Bordighera	5.02	<0,1	0.16	<0.01	0.22	<0.1	<0.01	<0.01	
IDVETAGRO_81694/19	Sc	Juvenile	Imperia	9.96	<0,1	0.44	<0.01	0.63	<0.1	<0.01	<0.01	
IDVETAGRO_11557/20	Sc	Juvenile	Celle Ligure	>10	<0,1	0.21	<0.01	0.27	<0.1	<0.01	<0.01	30.83
IDVETAGRO_P2017 5048	Sc	Veau	St Jean Cap Ferrat	7.34	<0,1	0.89	<0.01	1.06	<0.1	<0.01	<0.01	16.59
IDVETAGRO_P2018 75	Sc	Juvenile	Cagnes sur Mer	10.56	<0,1	1.53	<0.01	1.73	<0.1	<0.01	<0.01	56.55
IDVETAGRO_P2018 74	Sc	Adulte	St Jean Cap Ferrat	>10	<0,1	4.84	0.26	6.39	<0.1	<0.01	<0.01	42.11
IDVETAGRO_P2018 1843	Sc	Juvenile	St Jean Cap Ferrat	5.99	<0,1	0.53	<0.01	0.71	<0.1	<0.01	<0.01	23.33
IDVETAGRO_SCGC06	Sc	Adulte	St Cyr sur Mer	>10	<0,1	3.31	<0.01	4.49	<0.1	<0.01	<0.01	
IDVETAGRO_P2018 3704	Sc	Nouveau né	St Laurent du Var	4.66	<0,1	0.25	<0.01	0.32	<0.1	<0.01	<0.01	
IDVETAGRO_SCGC05	Sc	Adulte	Menton	>10	<0,1	0.34	<0.01	0.40	<0.1	<0.01	<0.01	
IDVETAGRO_SCGC01	Sc	Adulte	Hyères	31.85	<0,1	4.27	0.14	5.01	<0.1	<0.01	<0.01	62.23
IDVETAGRO_SCGC12	Tt	Adulte	St Raphaël	>10	<0,1	0.08	<0.01	0.31	<0.1	<0.01	<0.01	
IDVETAGRO_SCGC11	Sc	Adulte	Cap d'Ail	>10	<0,1	0.07	<0.01	0.11	<0.1	<0.01	<0.01	16.64
IDVETAGRO_SCGC08	Sc	Adulte	Bormes les Mimosas	>10	<0,1	0.16	<0.01	0.24	<0.1	<0.01	<0.01	
IDVETAGRO_SCGC02	Sc	Veau	Ramatuelle	5.48	<0,1	0.16	<0.01	0.21	<0.1	<0.01	<0.01	
IDVETAGRO_SCGC03	Sc	Adulte	Marseille	>10	<0,1	0.27	<0.01	0.61	<0.1	<0.01	<0.01	16.39
IDVETAGRO_SCGC09	Sc	Veau	Fréjus	5.03	<0,1	0.43	<0.01	0.54	<0.1	<0.01	<0.01	
IDVETAGRO_SCGC10	Sc	Juvenile	Ste Maxime	6.72	<0,1	2.24	<0.01	3.46	<0.1	<0.01	<0.01	
IDVETAGRO_SCGC04	Sc	Adulte	Le Lavandou	>10	<0,1	0.44	<0.01	0.68	<0.1	<0.01	<0.01	13.53
IDVETAGRO_SCGC13	Sc	Adulte	Hyères	>10	<0,1	0.42	<0.01	0.68	<0.1	<0.01	<0.01	29.36

Sc = *Stenella coeruleoalba*, Tt = *Tursiops truncatus*, en bleu clair : échantillons prélevés en Italie, en bleu foncé : échantillons prélevés en France

## B. Analyse par toxiques

Les pesticides récents et d'utilisation actuelle importante, tels que les fongicides et herbicides, mais également les insecticides organophosphorés et les pyréthrinoïdes, ne sont présents qu'à des doses inférieures aux seuils de détection des analyses, chez tous les individus étudiés. Parmi les éléments traces métalliques, le plomb est également inférieur à la valeur seuil de l'analyse mise en œuvre, quelques soient les individus.

Cependant, tous les individus analysés sont positifs pour les organochlorés, et notamment le DDT et les PCB dans le lard et le mercure dans le foie.

### 1. Mercure

Le mercure est retrouvé dans le foie de tous les individus testés. La plupart des valeurs étaient supérieures à la valeur limite de l'analyse. Les teneurs trop élevées ayant nécessité des dilutions trop importantes présentent une très forte incertitude de mesure et sont donc présentés sous la forme « > 10 » dans le tableau VIII. La **médiane des concentrations en mercure est supérieure 10 µg/g ww** dans le foie des individus analysés.

Les valeurs augmentent progressivement avec l'âge de l'animal avec une concentration chez les adultes supérieure à 10 µg/g ww dans 100% des échantillons, tandis que tous les nouveau-nés et veaux présentent des valeurs inférieures à 10 (concentration moyenne de 5,45 µg/g ww et 5,64 µg/g ww respectivement) (Figure 14). Les individus juvéniles présentent des teneurs très variables entre 3,5 et > 10 µg/g ww.

Afin de pouvoir interpréter les données obtenues, une valeur arbitraire de 20 µg/g ww a été attribuée à tous les individus présentant une valeur non chiffrée supérieure à 10 µg/g ww. Le test statistique de Kruskal Wallis met en évidence qu'il existe effectivement une **différence significative des concentrations en mercure entre les différentes tranches d'âge** (p-value = 0,016) (Figure 14).

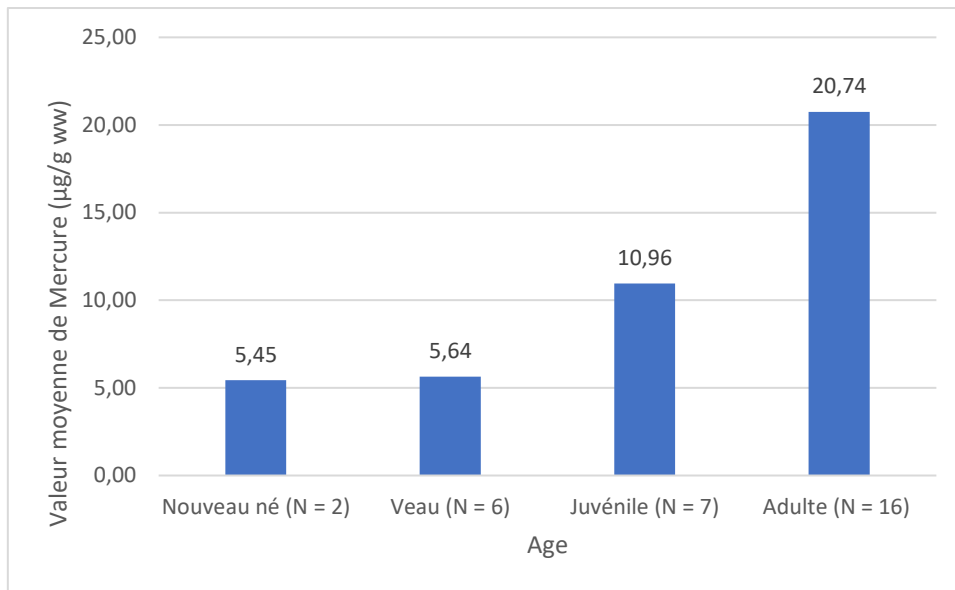


Figure 14 - Valeur moyenne de Mercure par tranches d'âge

Il n'existe cependant pas de différence significative de la contamination en fonction des espèces (p-value = 0,84) (Figure 15).

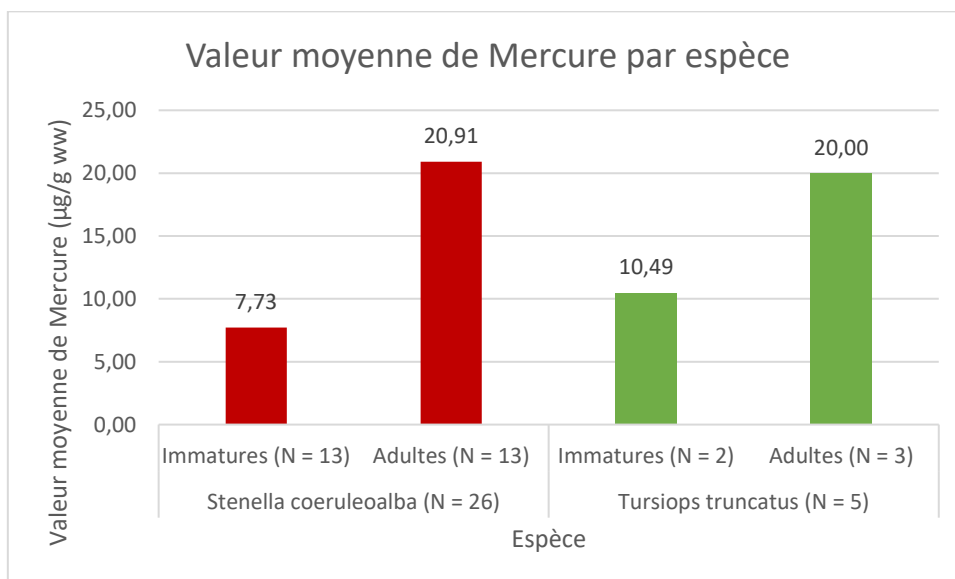


Figure 15 - Valeur moyenne de Mercure par espèce

## 2. Organochlorés et PCB

Les molécules de la famille des organochlorés ont été identifiées dans 100% des échantillons de lard, et les métabolites du DDT n'ont été observés que dans 10% des échantillons de foie (soit 3 individus).

En moyenne, la somme des organochlorés (hors PCB) dans le lard est de  $1,28 \mu\text{g/g ww} \pm 1,61$  (valeurs comprises entre 0,04 et  $6,39 \mu\text{g/g ww}$ ) avec une **moyenne totale de DDT à  $1,25 \mu\text{g/g ww} \pm 0,05$**  (concentrations entre 0,01 et  $4,84 \mu\text{g/g ww}$ ).

Au sein de la famille du DDT, seul le DDE, métabolite stable du DDT, a été identifié dans le lard, avec un rapport DDT/DDE = 0,2.

D'après la Figure 16, il semblerait que la concentration en organochlorés augmente avec l'âge, mais cette différence n'est pas significative (p-value de 0,56 pour les DDT et 0,36 pour la somme des organochlorés).

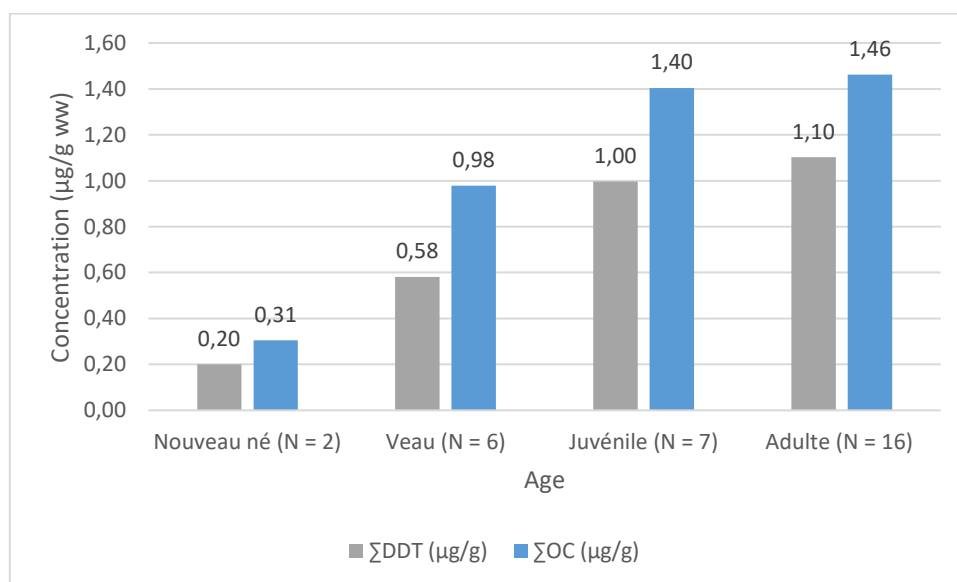


Figure 16 - Valeurs moyennes de DDT et OC dans le lard par tranches d'âge

Il semblerait que les individus immatures parmi les Grands Dauphins soient plus fortement exposés aux organochlorés que les Dauphins Bleu et Blanc (respectivement  $2,21 \mu\text{g/g ww} \pm 0,2$  et  $0,91 \mu\text{g/g ww} \pm 0,9$ ). Au contraire, la tendance semble s'inverser à l'âge adulte avec des Dauphins Bleu et Blanc plus fortement contaminés que les Grands Dauphins (respectivement  $1,72 \mu\text{g/g ww} \pm 2,22$  et  $0,34 \mu\text{g/g ww} \pm 0,2$ ) (Figure 17). Les tests statistiques ne mettent en évidence aucune différence significative en fonction de l'espèce.

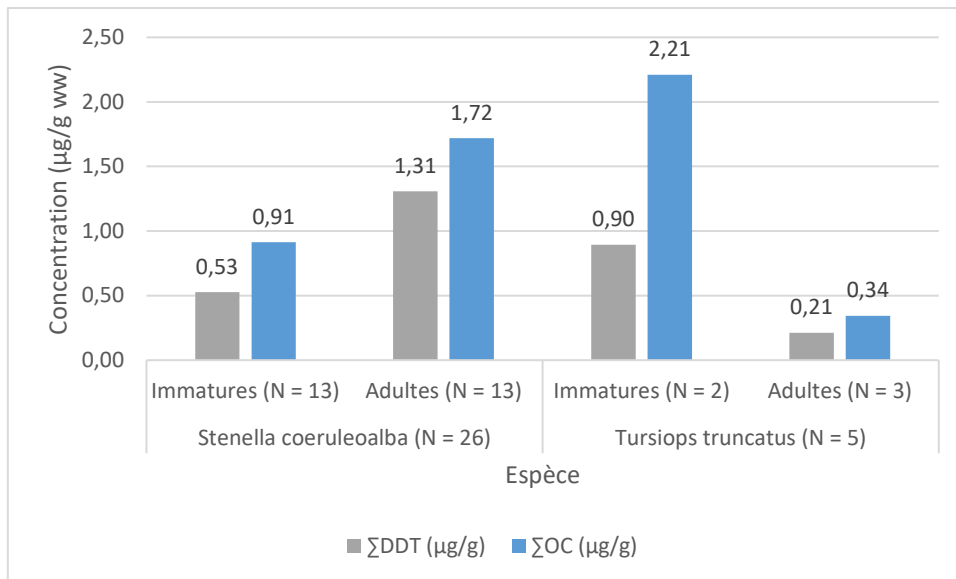


Figure 17 - Valeurs moyennes de DDT et OC dans le lard par espèce

Les PCB n'ont été mesurés que sur 14 échantillons de lard, parmi lesquels 100% des échantillons sont positifs. La **concentration moyenne en PCB dans les échantillons est de 32 µg/g ww ± 23,3** avec des valeurs comprises entre 1,32 et 84,2 µg/g ww.

Les juvéniles et les adultes semblent plus fortement contaminés que les veaux avec des concentrations jusqu'à 1,9 fois supérieures, mais il n'existe pas de différence significative selon les différentes tranches d'âge (p-value = 0,45) (Figure 18).

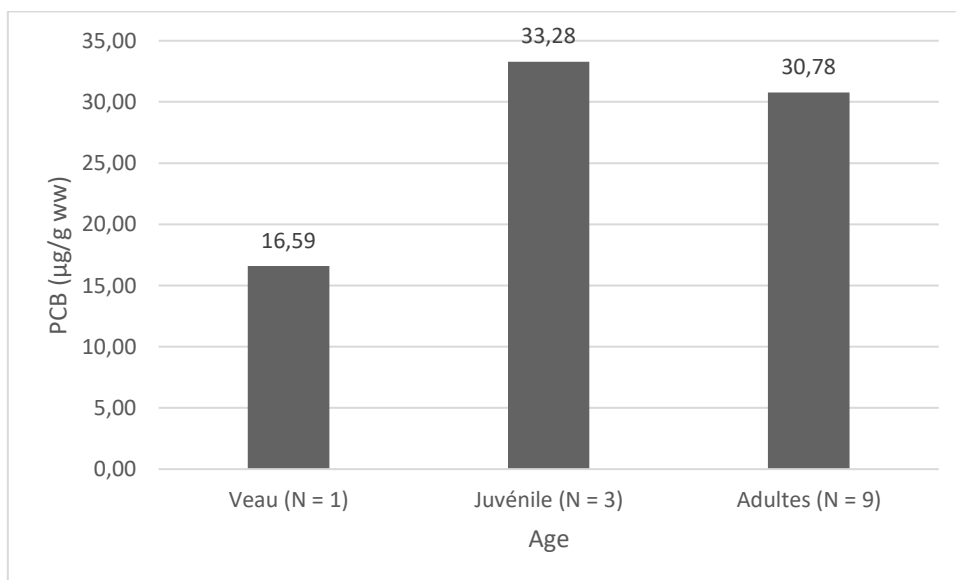


Figure 18 - Valeur moyenne de PCB dans le lard par tranches d'âge



L'échantillonnage ne permettant l'étude que d'un seul individu de l'espèce *Tursiops truncatus*, une analyse statistique n'est pas possible sur cette évaluation et les résultats ne sont pas représentatifs de la population des Grands Dauphins retrouvés échoués (Figure 19).

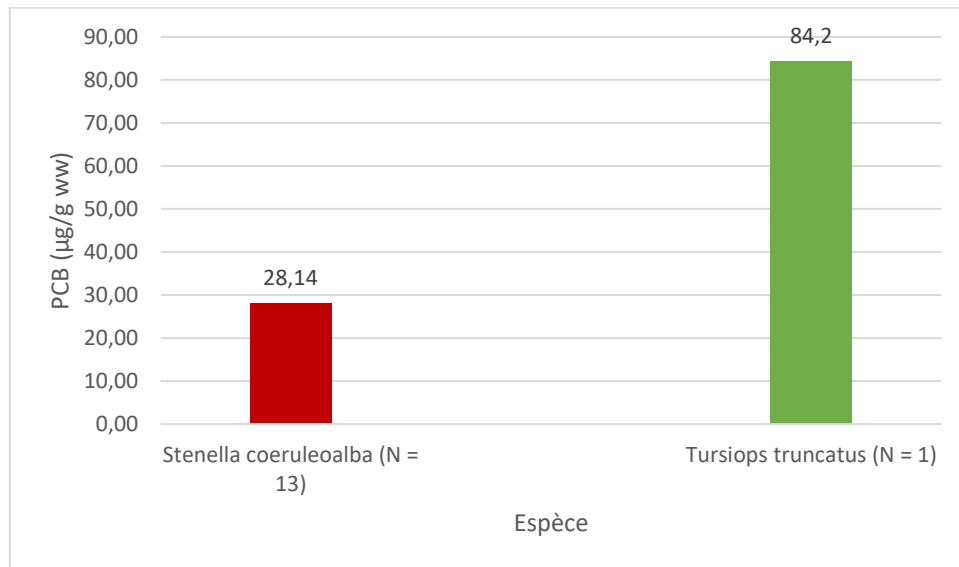


Figure 19 - Valeur moyenne de PCB dans le lard par espèce

Bien que les PCB fassent partie de la famille des organochlorés au sens large, il n'y a pas de corrélation entre la charge en PCB et la charge en organochlorés (coefficient de corrélation = 0,37) (Figure 20).

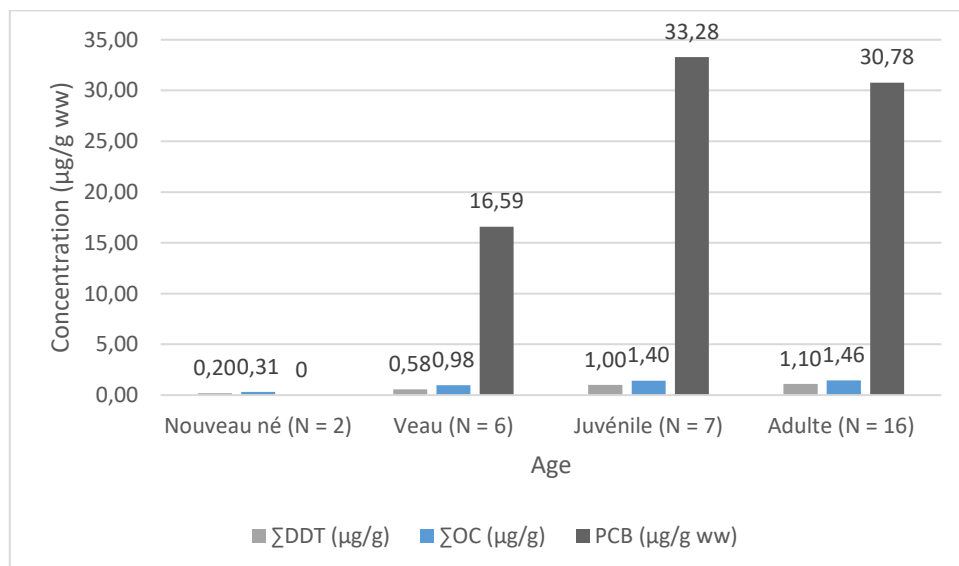


Figure 20 - Valeurs moyennes de DDT, OC et PCB dans le lard par tranches d'âge

### 3. Comparaison des données par pays de découverte

Une analyse statistique de chaque polluant en fonction du pays où les individus ont été retrouvés n'a révélé aucune différence significative quel que soit le contaminant considéré (p-value entre 0,30 et 0,95) (Figure 21).

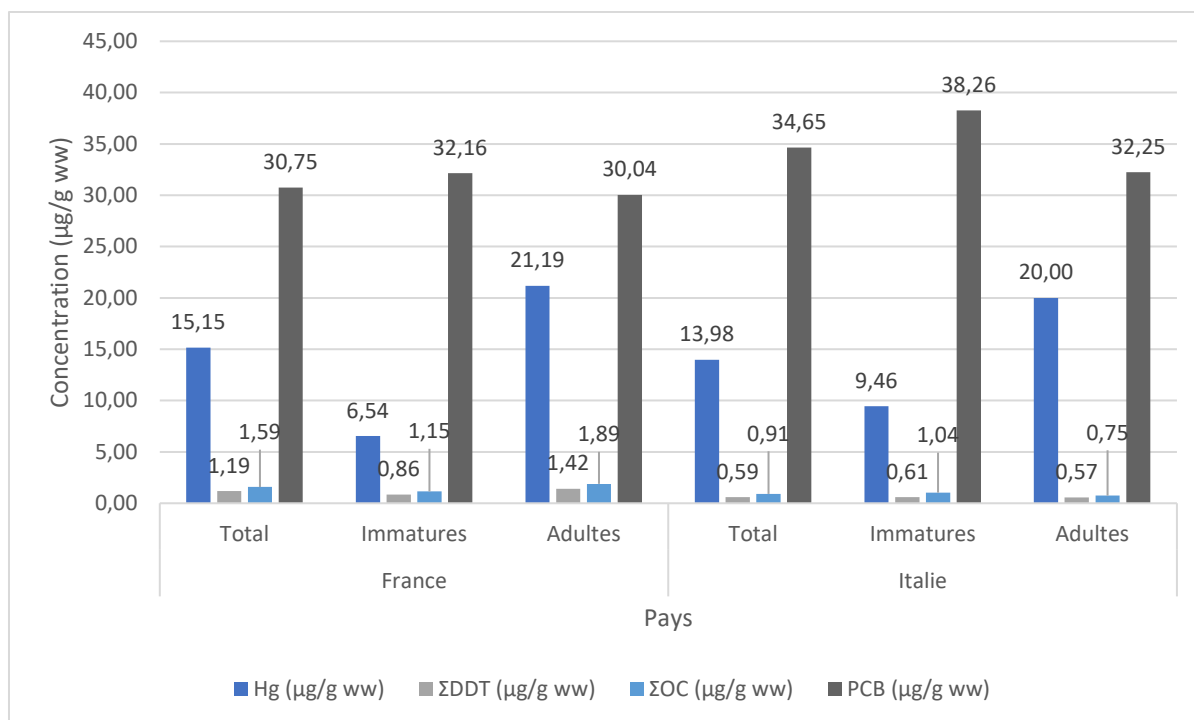


Figure 21 - Valeurs moyennes de mercure, DDT, OC et PCB entre fonction des pays

## V. Interprétation des résultats et discussion

### A. Limites et critique des protocoles utilisés

Toute étude comporte des limites dont il faut être conscient pour une interprétation adéquate des valeurs obtenues.

#### 1. Protocole d'échantillonnage

Nos échantillons ont été prélevés sur un **faible nombre d'animaux** qui ont été retrouvés échoués, ce qui engendre quelques biais dans l'échantillonnage et limite les interprétations possibles :

- Le prélèvement des échantillons se fait sur des **individus retrouvés échoués**, il s'agit donc d'une collecte opportuniste des individus et non d'un échantillonnage d'une population de dauphins. Nos résultats sont donc une représentation de la population des individus échoués sur les côtes du Sanctuaire Pelagos mais ne sont pas représentatifs des populations de Grands Dauphins et Dauphins Bleu et Blanc de la région.
- Seulement 31 individus, dont 26 Dauphins Bleu et Blanc et 5 Grands Dauphins ont été prélevés pour cette étude, ce qui ne permet pas de faire des déductions pour une population très vaste. Cependant, les moyennes annuelles des échouages sur l'ensemble de la côte Méditerranéenne française entre 1969 et 2020 pour *Stenella coeruleoalba* et *Tursiops truncatus* sont respectivement de 32,6 et 6 individus, ce qui est compatible avec la taille de notre échantillon (Figure 22) (CNRS, 2021).

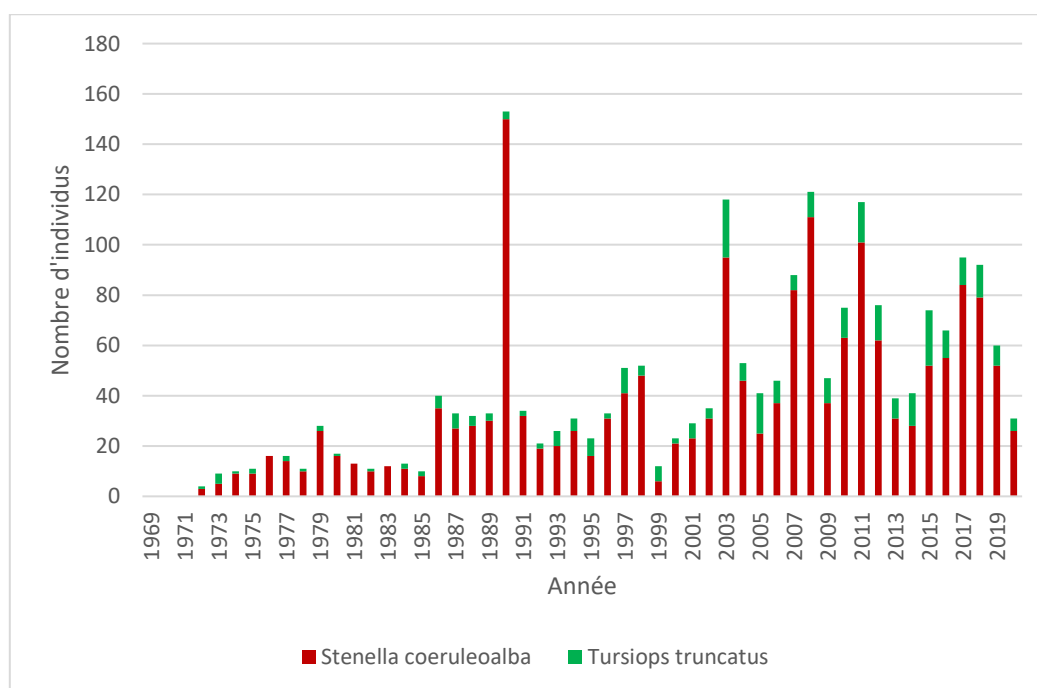


Figure 22 - Nombre cumulé d'échouages annuels entre 1969 et 2020 (CNRS, 2021)

- **L'origine des animaux est incertaine** car les courants marins ont pu transporter les cadavres sur de grandes distances. La circulation des eaux de surface pourrait également justifier la plus forte importance des échouages rapportés sur les côtes orientée Est (Figure 23) (Ifremer, 2021). Ces couloirs de circulation d'eau justifient également qu'il n'existe aucune différence significative de concentrations des substances étudiées en fonction du pays où sont retrouvés les animaux.

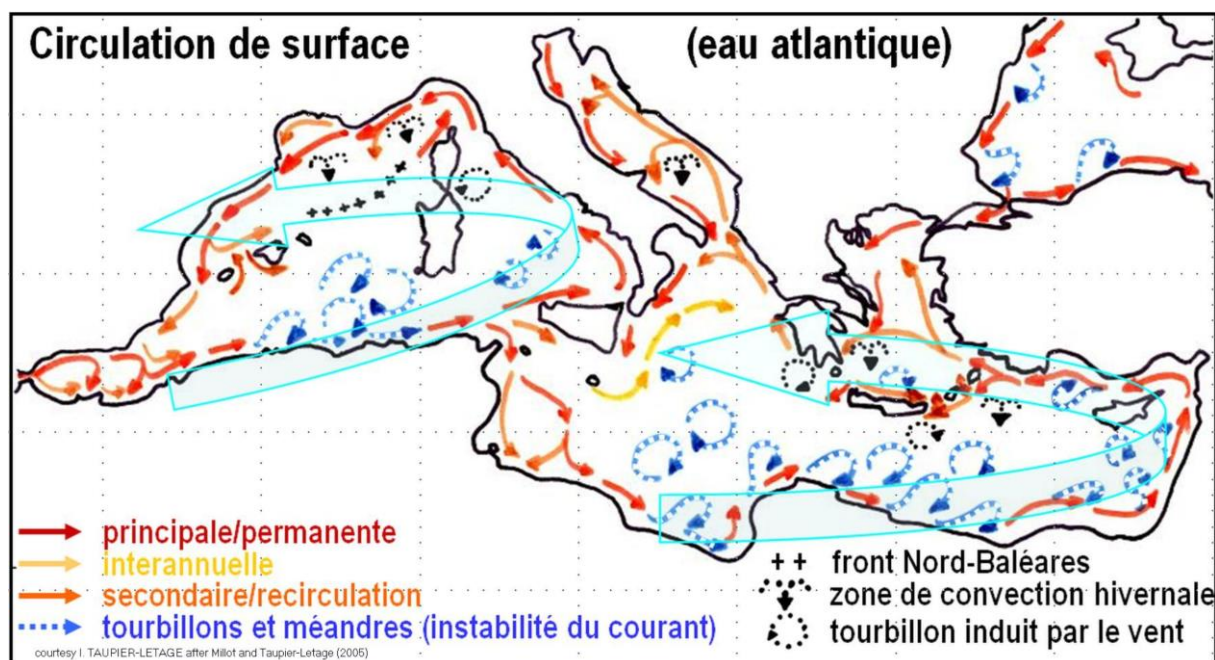


Figure 23 – Schéma des courants d'eau de surface en Méditerranée (Ifremer, 2021)

- **Un état de conservation aléatoire** ne permettant pas toujours de réaliser des prélèvements : seuls 31 individus ont pu être prélevés et analysés sur un total de 41 individus rapportés à CReDiMa et au GECeM, ce qui diminue la fiabilité des interprétations des données (Genov et al., 2018) ;
- Certaines maladies peuvent également altérer le métabolisme, l'excrétion des toxiques, ou la mobilisation lipidique pouvant impliquer les contaminants, or tous les paramètres permettant d'identifier ces conditions ne sont pas étudiés pour chaque individu, ce qui ne nous permet pas d'interpréter certaines valeurs extrêmes individuelles (Capanni et al., 2020; Genov et al., 2018).

Pour diminuer ces biais, des biopsies sur animaux vivants pourraient être effectuées mais pour cela des moyens importants d'identification des individus devraient être mis en œuvre, et il existe également certaines contraintes à respecter telles que ne pas prélever les mères suitées au risque de blesser gravement le veau ni les jeunes individus, ce qui ne permet pas d'avoir une représentation complète de la population. De plus, le lard ne possède pas la même composition sur toute la surface de l'animal, ni sur toute son épaisseur (Samuel and Worthy, 2004), ce qui implique une moins bonne répétabilité de cette technique de prélèvement (Genov et al., 2018).

Un **élément manquant** dans cette étude est **le sexe des individus** prélevés qui n'a pas été associé aux échantillons. Effectivement, il existe de nombreux paramètres influencés par le sexe et l'absence de cette information limite l'interprétation des résultats obtenus (Barbosa et al., 2018).

## 2. Protocoles d'analyse

Les protocoles d'analyse utilisés dans cette étude sont des **protocoles très spécifiques** et **utilisés à grande échelle**, notamment dans les évaluations des contaminations des Mammifères marins. De plus, ces techniques ont été développées afin d'avoir une très bonne répétabilité entre chaque analyse, augmentant la fiabilité des résultats.

La principale limite des protocoles d'analyse du plomb, des organophosphorés, des pyréthriinoïdes et des pesticides semble être le seuil de détection. Cependant, les autres études sur les pyréthriinoïdes dans la Méditerranée présentent des résultats bien supérieurs à limite de 0,01 µg/g ww (Aznar-Aleman et al., 2017). La limite de détection pour le plomb est également similaire à celle de la plupart des études réalisées en Méditerranée.

Les insecticides organophosphorés et les pesticides n'ont jamais été évalués chez les Mammifères marins avant cette étude. Les seuils des protocoles sont cependant compatibles avec les seuils de détection de ces molécules dans des échantillons d'eau de surface en Méditerranée (Brumovský et al., 2017). De plus, leur caractère lipophile laisse supposer une bioaccumulation de ces molécules le long de la chaîne trophique et des concentrations chez les Cétacés supérieures aux valeurs dans l'eau.

## B. Comparaison avec les valeurs en Méditerranée

### 1. Substances non détectées

#### a) *Le plomb*

Le plomb est un **élément trace de forte importance écotoxicologique** qui est souvent recherché lors d'évaluation de la contamination chimique des Cétacés. Tous les échantillons de foie se sont avérés avoir des concentrations en plomb inférieures au seuil de détection de 1 µg/g ww. Ce résultat est compatible avec la plupart des résultats recueillis en Méditerranée depuis les trente dernières années (Cardellicchio et al., 2000; Leonzio et al., 1992; Martínez-López et al., 2019). Cependant, le foie ne semble pas le meilleur échantillon à analyser pour évaluer l'impact du plomb sur l'organisme. En effet, le plomb est un compétiteur du calcium, et des études chez des baleines ont mis en évidence que le foie ne serait qu'un premier organe de transition avant de se concentrer principalement dans les os (Núñez-Nogueira et al., 2019).

Il faut également retenir que le plomb est un élément qui **n'est pas bioaccumulable** et qui se concentre essentiellement dans les végétaux. Ainsi, les concentrations en plomb chez les « super-prédateurs » tels que les dauphins seront plus faibles que chez les Mammifères marins végétariens tels que les Siréniens ou les Mysticètes (Núñez-Nogueira et al., 2019). Il est tout de même intéressant de garder le plomb dans les panels d'étude de contamination des Cétacés car sa présence lors des analyses permettrait le constat d'une contamination de grande ampleur de l'écosystème aquatique.

#### b) *Les organophosphorés*

Il existe plusieurs études évaluant la concentration des organophosphorés utilisés comme retardateurs de flamme et plastifiants, qui semblent être présents en grandes quantités chez les Mammifères marins et dans 100% des échantillons étudiés dans différentes régions de Méditerranée chez les Dauphins Bleu et Blanc (267 ng/g lw dans le lard et 5811 ng/g lw dans les muscles) sauf dans les échantillons de foie où les valeurs mesurées sont inférieures à la valeur limite de notre protocole (66 ng/g lw dans le foie) (Aznar-Alemany et al., 2021; Sala et al., 2019). Un changement de matrice d'analyse serait intéressant pour les prochaines études.

*A contrario*, il n'existe qu'une étude évaluant la concentration des insecticides organophosphorés chez des Dauphin de la Plata (*Pontoporia blainvillei*), chez lesquels la teneur en organophosphorés était également inférieure aux limites de détection (Romero et al., 2018). La principale hypothèse évoquée pour cette différence entre les deux types d'organophosphorés serait que les insecticides présentent une plus faible persistance dans l'environnement et/ou seraient plus facilement métabolisés par les organismes quand, à l'inverse, les retardateurs de flammes et plastifiants sont développés pour assurer une certaine stabilité aux produits auxquels ils sont ajoutés. Les organophosphorés semblent donc

être de bons indicateurs de la pollution plastique (Sala et al., 2019), mais, aujourd'hui, **leur présence en tant qu'insecticides est faible.**

#### *c) Les pyréthriinoïdes*

Les pyréthriinoïdes sont des molécules d'utilisation récente et ont longtemps été considérées comme peu dangereuses car elles sont métabolisées rapidement chez les Mammifères. Il existe donc encore peu de données dans la bibliographie permettant de connaître une tendance de contamination des Mammifères marins. C'est dans ce but que les pyréthriinoïdes ont été recherchées dans cette étude. **Aucun échantillon n'a été détecté positif pour les pyréthriinoïdes.** Les pyréthriinoïdes sont reconnus comme étant des molécules rapidement métabolisées et inactivées par les organismes des Mammifères. Il est difficile à partir de cette étude de déterminer si l'absence de pyréthriinoïdes dans le foie des individus étudiés est liée à une métabolisation efficace ou une absence de contamination.

Une étude réalisée sur des Dauphins Bleu et Blanc échoués sur la côte espagnole de la mer d'Alboran (Andalousie) met en évidence que 87% des individus prélevés présentaient une teneur en pyréthriinoïdes supérieure aux valeurs seuils, avec une moyenne des concentrations dans le foie de  $300 \text{ ng/g lw} \pm 932$  (Aznar-Aleman et al., 2017). Cependant, d'après Alonso et al. (2012), il semblerait que, pour des populations de Cétacés de territoire limité, il existe une différence significative entre différentes régions marines relativement proches. Il a également été constaté que **la contamination des Cétacés était plus importante proche des villes que des zones agricoles**, ce qui permet d'avancer l'hypothèse que l'utilisation des pyréthriinoïdes comme moyen de lutte contre les arthropodes vecteurs de maladies est celle qui a le plus d'impact sur les écosystèmes. Cela pourrait aussi expliquer que les Dauphins analysés en Andalousie, où les maladies vectorielles sont plus importantes, aient une plus forte charge en pyréthriinoïdes que ceux prélevés sur les côtes du Sanctuaire Pelagos.

Dans un contexte de changement climatique et d'augmentation de l'aire de répartition des arthropodes vecteurs, il est important de mettre en place une surveillance régulière de ces molécules chez les Mammifères marins (Ministère des Solidarités et de la Santé, 2020), car leur présence en Andalousie démontre leur capacité bioaccumulative.

#### *d) Les pesticides*

Concernant les pesticides autres que les organochlorés, il n'existe, à ce jour, pas d'études évaluant la concentration de ces molécules dans les organes des Mammifères marins. Ces pesticides sont des molécules aujourd'hui couramment utilisées depuis des dizaines d'années, mais, bien qu'il existe quelques données évaluant leur présence dans les eaux douces, très peu d'informations sur leur présence dans les mers et les océans sont disponibles. Brumovský et al. (2017) ont étudié leur présence dans les eaux de surface de

Méditerranée : la terbuthylazine est prédominante et présente dans tous les échantillons à des concentrations entre 0,1 et 0,26 ng/L d'eau, suivie du tébuconazole présent dans seulement 40% des échantillons avec des valeurs entre 0,1 et 0,16 ng/L. Leur très faible concentration dans l'eau et leur absence dans les échantillons de dauphin laissent supposer soit un très faible écoulement depuis leur utilisation terrestre, soit une très faible persistance dans l'environnement marin de ces molécules et une absence probable de bioaccumulation. Il ne faut pas pour autant considérer cette absence de résidus comme une absence d'effets toxiques. De plus, une étude en Polynésie Française met en évidence que, malgré une faible présence de ces molécules chez divers poissons consommés par les populations humaines locales, une forte contamination des végétaux aquatiques peut mettre en péril les récifs coralliens et l'impact de ces molécules sur les écosystèmes dans leur globalité ne doit pas être négligé (Salvat et al., 2016).

Ces résultats, inférieurs aux valeurs seuils, sont une bonne nouvelle pour l'environnement Méditerranéen et les populations marines car cela laisse supposer que les mesures mises en place pour le contrôle du plomb sont efficaces et que les pesticides d'utilisation courante, marqueurs de l'activité et de la présence humaine, tels que les organophosphorés, les pyréthriinoïdes et un panel d'environ 160 herbicides et fongicides sont peu persistants dans l'environnement et/ou ne s'accumulent pas à fortes concentrations en haut de la chaîne alimentaire chez les Odoncètes étudiés. Il n'est pas possible à travers cette étude de connaître quel mécanisme prédomine.

## 2. Substances présentes

### a) Le mercure

Les concentrations en mercure dans le foie des individus adultes étant toutes supérieures à 10 µg/g ww, il est raisonnable de supposer que la plupart de ces individus excèdent le seuil de toxicité du mercure chez les Mammifères marins de 16,5 µg/g ww (AMAP, 2021), bien que, cette valeur étant générale aux Mammifères marins, elle ne soit pas spécifique des espèces étudiées. En effet, les Cétacés de Méditerranée semblent présenter de fortes concentrations en mercure depuis de nombreuses années avec une médiane de 81,1 µg/g ww et une valeur maximale de 1100 µg/g ww pour *Stenella coeruleoalba* et une médiane de 67,5 µg/g ww avec une valeur maximale de 3288 µg/g ww pour *Tursiops truncatus* sur toutes les tranches d'âge (Leonzio et al., 1992). Plus récemment, (Martínez-López et al., 2019) ont également trouvé de fortes concentrations en mercure sur les côtes sud de l'Espagne, avec des concentrations moyennes de 27,15 µg/g ww ± 32,34 pour les Dauphins Bleu et Blancs



immatures et  $241,41 \mu\text{g/g ww} \pm 158,2$  pour les adultes, mais il semble y avoir une baisse des teneurs en mercure sur les dernières années.

Bien que les teneurs en mercure soient supérieures aux valeurs seuil référencées, il ne semble pas y avoir de changement dans les mortalités rapportées de ces espèces (Ifremer, 2021). Plusieurs mécanismes de défense contre la toxicité du mercure ont été identifiés à ce jour, avec l'action de métallothionéines fixant le mercure ou la formation de complexes mercure – sélénium inhibant l'effet pathogène du mercure dans les tissus (Durante et al., 2019; Martínez-López et al., 2019). Il peut être intéressant, dans une prochaine étude, d'évaluer ces biomarqueurs pour connaître l'impact du mercure dans l'organisme.

La tendance à l'accumulation du mercure avec l'âge est aussi un paramètre fréquemment observé et peut s'expliquer en observant la courbe de croissance et le changement alimentaire (Martínez-López et al., 2019) :

- Les jeunes individus se contaminent initialement par le transfert placentaire et mammaire, mais leur forte croissance permet un phénomène de « dilution » des teneurs en mercure ;
- La contamination des juvéniles se fait par l'ingestion de proies telles que les poissons ou céphalopodes, riches en méthylmercure directement assimilable (Núñez-Nogueira et al., 2019). Ces individus présentent une croissance plus lente, ce qui permet une accumulation progressive du mercure ;
- Enfin, les adultes ingèrent de fortes quantités de mercure par leurs proies, et l'absence de croissance de ces individus ne permet plus un effet de dilution.

Une étude réalisée en Amérique du Sud met également en évidence qu'il existe une différence significative entre les valeurs de mercure chez des espèces vivant en hautes eaux qui semblent plus contaminées ( $170 \mu\text{g/g ww}$ ) que les espèces vivant proche des côtes ( $15 \mu\text{g/g ww}$ ) (Dhaouadi et al., 2020). Dans notre étude, aucune différence n'est observée entre les Grands Dauphins qui vivent proches de côtes, et les Dauphins Bleu et Blanc principalement retrouvés en zone pélagique. Cela peut s'expliquer par le fait qu'une partie de leurs niches écologiques se chevauchent, les Dauphins Bleu et Blanc étant souvent observés proches des côtes.

**Les teneurs en mercure observée dans cette étude, bien que plus faible que les valeurs trouvées il y a 30 ans, restent supérieures à un seuil de toxicité probable.** Ainsi, il est important de surveiller les populations de Cétacés du Sanctuaire Pelagos et il pourrait être intéressant d'évaluer également les biomarqueurs d'exposition/d'effet des individus au mercure et, dans le cas de prélèvements sur des individus échoués, de noter les lésions observées lors des autopsies tels que des nécroses hépatiques ou des lésions digestives ou rénales (Núñez-Nogueira et al., 2019).

### b) Les organochlorés et les PCB

Concernant les organochlorés, il n'est pas surprenant d'observer leur présence dans 100% des échantillons de lard. Ce constat a été fait dans toutes les études sur les organochlorés chez les Mammifères marins depuis les années 1970, malgré l'interdiction de leur utilisation (Alzieu and Duguy, 1978). Il est cependant important de noter que **les concentrations mesurées chez les dauphins de cette étude ont fortement diminuées depuis l'application de l'interdiction** (Figure 24).

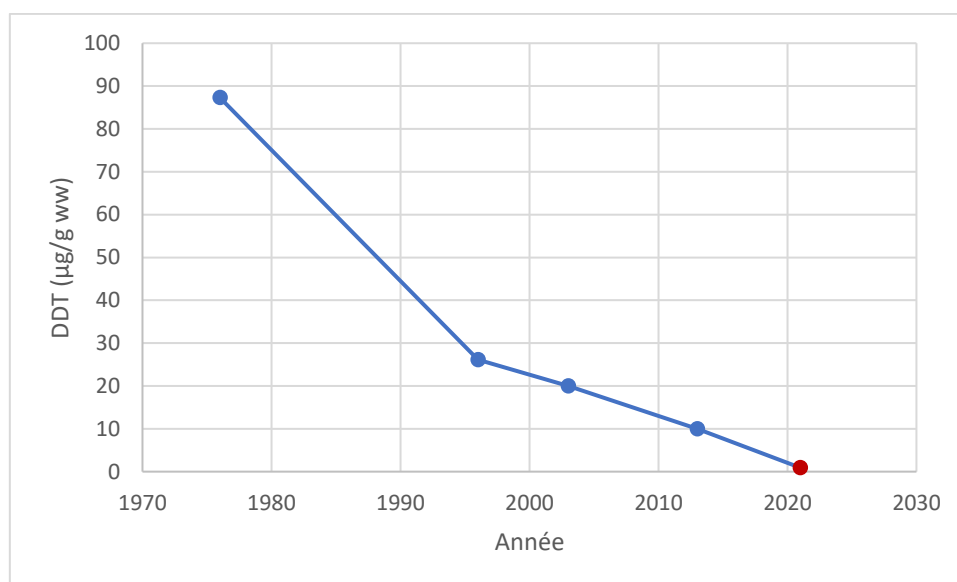


Figure 24 - Evolution des teneurs moyennes en DDT dans le lard de dauphins de Méditerranée (en rouge : valeur mesurée dans cette étude) (Alzieu and Duguy, 1978; Capanni et al., 2020; Fossi et al., 2013, 2003; Marsili and Focardi, 1997)

Le rapport DDT/DDE = 0,2 et l'absence quasi-totale de DDT dans le foie nous permettent également d'avancer que les contaminations des Cétacés étudiés aujourd'hui sont anciennes et qu'il n'existe presque plus de nouveaux rejets d'organochlorés, et notamment de DDT, dans l'environnement Méditerranéen. Il existe plusieurs hypothèses pour expliquer que trois individus présentent une concentration supérieure aux valeurs de détection dans le foie malgré l'absence de DDT depuis plusieurs années :

- L'état des individus n'est pas renseigné dans cette étude, or il est possible que les réserves graisseuses soient mobilisées pour diverses raisons (saison, maladie, statut reproducteur) (Samuel and Worthy, 2004). Les composés lipophiles tels que le DDT peuvent être mobilisés avec ces graisses, et un nouveau passage hépatique serait observé ;
- Il existe encore quelques pays, notamment sur le continent africain, qui ont l'autorisation d'utiliser ces molécules dans le but de contrôler les maladies vectorielles, comme la malaria (WHO, 2021). Ne connaissant pas l'origine des individus et en considérant leurs capacités à parcourir de grandes distances pour un environnement

plus favorable (Jefferson et al., 1993), l'hypothèse d'une contamination proche d'une région où l'utilisation du DDT est encore tolérée ne peut être exclue ;

- Le métabolisme des molécules organochlorées dépend de différentes familles de cytochrome p450 selon les espèces de Mammifères, et les Cétacés seraient particulièrement mauvais pour métaboliser ces molécules (Boon et al., 1997). Une anomalie de ces protéines rendant encore plus laborieuse la dégradation du DDT ne peut donc pas être exclue.

L'absence de différence significative entre les différentes tranches d'âge est également cohérente avec plusieurs études. Alzieu and Duguy (1978) mettent en évidence que les jeunes individus se contaminent dès la naissance par transfert maternel, à travers le placenta (10% du transfert) durant le développement fœtal puis le lait (90% du transfert) (Barbosa et al., 2018).

La large distribution des valeurs de DDT chez les individus adultes dans cette étude (de 0,01 à 4,84  $\mu\text{g/g ww}$ ) s'explique par l'absence de précision du sexe des individus. En effet, les femelles immatures semblent plus fortement accumuler les substances lipophiles telles que les organochlorés que les mâles immatures, mais les femelles adultes présentent de plus faibles concentrations en DDT que les mâles adultes et que les femelles immatures. Cela s'explique par la décharge toxique réalisée lors de chaque gestation et élevage des jeunes (Barbosa et al., 2018).

Bien que les PCB fassent partie de la famille des organochlorés au sens large, l'absence de corrélation entre ces deux groupes de substances montre que l'exposition des Cétacés à chacun de ces groupes diffère, et l'utilisation de ces molécules n'est également pas la même. Cela met également en évidence que, même au sein d'une famille de molécules, chaque substance possède des caractéristiques physico-chimiques propres qui vont influencer son comportement dans l'environnement (persistance, bioaccumulation, bioamplification) (Gupta, 2018). Pour autant, l'absence de corrélation entre les différentes tranches d'âge peut s'expliquer de la même manière que pour les organochlorés (Alzieu and Duguy, 1978; Barbosa et al., 2018).

La plupart des études présentent leurs résultats sur la base lipidique de leurs échantillons, car les PCB sont des molécules lipophiles. Les valeurs de cette étude ont donc été transcrites en base lipidique (ou lipide weight, lw) pour une meilleure comparaison avec les études précédentes.

Dans cette étude, 93% des individus testés pour les PCB présentent une concentration dans le lard supérieure au seuil de toxicité de 9 mg/kg lw associé aux premiers effets physiologiques mais également supérieure au seuil de toxicité de 41 mg/kg lw associé à une altération de la fonction de reproduction observés chez des Phoques annelés (*Pusa hispida*) (Helle et al., 1976). Bien que ces seuils de toxicité soient extrapolés du Phoque vers les Cétacés, **les valeurs sont suffisamment élevées pour supposer un impact sur les populations et semblent être en augmentation** par rapport aux études publiées sur les 20 dernières années (Figure 25) (Castrillon et al., 2010; Fossi et al., 2013, 2003; Genov et al., 2018).

Les PCB ont été très largement utilisés jusqu'aux années 1970 dans la construction de bâtiments, en vitrerie, dans les équipements hydrauliques, les peintures, les isolations thermiques, les adhésifs, l'asphalte, les encres ou encore le traitement du bois. Leur interdiction a permis l'arrêt de la fabrication de matériaux avec des PCB, mais l'utilisation des matériaux produits antérieurement est toujours autorisée (Jepson et al., 2016). La tendance récente à l'augmentation des concentrations en PCB dans le lard des dauphins de Méditerranée (Figure 25) pourrait être associée à une augmentation du changement des éléments contenant des PCB. Les capacités de bioaccumulation des PCB par les Cétacés étant très faibles (Boon et al., 1997) et les PCB très persistants (Jepson et al., 2016), une légère augmentation de leur rejet dans l'environnement pourrait provoquer une augmentation importante de la concentration en PCB dans le lard des dauphins qui se trouvent en bout de chaîne alimentaire, mais cela reste peu probable depuis leur interdiction totale. Il serait intéressant d'évaluer les biomarqueurs d'exposition aux PCB dans les tissus des animaux analysés afin de pouvoir évaluer plus précisément l'effet perturbateur endocrinien chez ces espèces (Fossi et al., 2013).

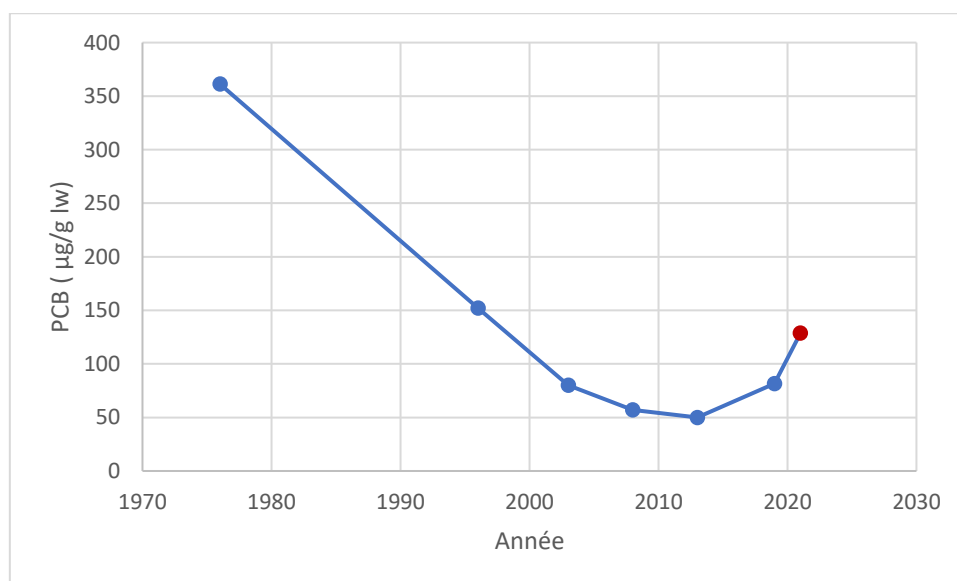


Figure 25 - Evolution des teneurs moyennes en PCB dans le lard de dauphins de Méditerranée (en rouge : valeur mesurée dans cette étude) (Alzieu and Duguy, 1978; Borrell and Aguilar, 2007; Castrillon et al., 2010; Fossi et al., 2013, 2003; Genov et al., 2018; Marsili and Focardi, 1997)

Une analyse statistique ne peut être réalisée concernant les concentrations en PCB selon les espèces. Cependant, (Borrell and Aguilar, 2005) ont observé une différence d'accumulation entre les Dauphins communs (*Delphinus delphis*) et *Stenella coeruleoalba*. Le Dauphin commun est une espèce vivant principalement proche des côtes et qui se nourrit essentiellement de poissons. Il semble accumuler principalement des congénères de PCB avec un faible nombre d'atomes de chlore. L'inverse est observé chez les Dauphins Bleu et Blanc. Ils avancent l'hypothèse d'une alimentation différente bien que leurs niches écologiques se chevauchent en grande partie, ou d'une sensibilité différente. Dans l'analyse réalisée à Vetagro Sup, il y a plus de congénères de PCB faiblement chlorés que de congénères fortement chlorés. Cela pourrait expliquer la valeur particulièrement élevée retrouvée chez le Grand Dauphin (84,2 µg/g ww), qui se rapproche du comportement du Dauphin commun, tout en gardant à l'esprit qu'une unique valeur n'est pas représentative d'une population.

Des études sur d'autres espèces de Méditerranée (Bartalini et al., 2019; Jepson et al., 2016) et dans d'autres régions du monde (Barbosa et al., 2018) mettent en évidence que, malgré les interdictions à l'échelle globale suite à la Convention de Stockholm, les PCB restent une menace pour les populations marines en étant présents à de fortes concentrations.

### C. Discussion

Le Sanctuaire Pelagos est un sujet d'étude pour un grand nombre de scientifiques depuis une vingtaine d'années. En effet, la coexistence d'une forte densité de population sur ses côtes, d'une activité agricole importante et d'une zone de productivité primaire attirant un grand nombre d'espèces marines en fait un lieu de conservation et de pollution (aussi bien chimique que sonore) considérables (Fossi et al., 2013). Bien que la pêche et les trafics maritimes soient aujourd'hui réglementés, les contaminations par divers polluants terrestres ne sont pas encore maîtrisées. Cette étude a pu mettre en évidence que les contaminations actuelles de l'environnement marin en plomb, organophosphorés, pyréthrinoïdes, pesticides sont soit faibles, soit les Cétacés étudiés présentent des capacités de métabolisation empêchant la bioaccumulation excessive de ces molécules.

Concernant le mercure, les résultats obtenus semblent cohérents avec les autres résultats obtenus en Méditerranée, malgré des concentrations supérieures au seuil de toxicité estimé. Les organochlorés, notamment le DDT, semblent continuer la tendance présente sur les dernières dizaines d'années avec une diminution progressive de leurs valeurs. Malgré de nombreuses études sur ces composés, il ne semble pas y avoir un seuil de toxicité proposé, mais il est raisonnable de penser que les concentrations actuelles, plus faibles que les mesures précédentes, présentent relativement peu d'effets toxiques, même à long terme.

Au contraire, les PCB semblent être de plus en plus présents sur les échantillons évalués au cours des dernières années, avec la plupart des individus dépassant le seuil de toxicité le plus haut, auquel sont associés des troubles de la reproduction. Cette information est inquiétante et conduit à se demander si les seuils de toxicité utilisés sont corrects pour nos espèces d'intérêt ou si le succès reproducteur des populations de Cétacés est fortement impacté et un impact au long terme serait à craindre. Seul un suivi régulier de la présence de PCB dans le lard des Cétacés permettrait de confirmer si cette augmentation n'est qu'une fluctuation aléatoire parmi la population des dauphins échoués ou si cette tendance s'installe plus durablement dans le temps.

Une surveillance de ces substances est donc essentielle pour être capable de prendre des mesures de contrôle suffisamment précocement pour garantir la santé des populations de Cétacés en Méditerranée.

La présence en quantité supposée toxique du mercure et des PCB montre que, malgré la création d'une Aire Maritime Protégée, **le Sanctuaire Pelagos n'est pas protégé face à la pollution chimique d'origine terrestre.**

Connaitre la cause de la mort des individus permet d'évaluer un potentiel impact des molécules recherchées. Dans le rapport sur les analyses biologiques de cette étude (Berio et al., 2020), environ 40% des individus sont décédés à la suite d'une cause infectieuse (Morbillivirus des Dauphins ou *DMV*, infections bactériennes systémiques) ou parasitaire (*T. gondii*) suspectée ou avérée. Cette valeur est légèrement inférieure à la dernière évaluation globale des causes de la mort des Cétacés retrouvés échoués qui s'élevait à 59% (Giorda et al., 2017). La principale interrogation dans cette étude portait sur l'importance des perturbateurs endocriniens sur l'immunité chez ces individus. Bien que le nombre restreint d'individus dans notre étude ne permette pas d'affirmer une réelle tendance, un test statistique de Kruskal Wallis ne met en évidence aucune différence significative entre les taux de contamination et les causes infectieuses de la mort. Cette information corrobore les constats de Castrillon et al. (2010) qui ne mettent en évidence aucun lien entre les individus victimes de la dernière épizootie de Morbillivirus et les teneurs en PCB. Cette conclusion diffère cependant des études menées lors de l'épizootie de DMV de 1990 durant laquelle les individus ayant succombé à la maladie présentaient des teneurs en PCB et en DDT significativement plus élevées à ceux ayant survécu, suggérant l'effet immunosuppresseur associé aux lésions hépatiques sévères causés par ces substances (Aguilar and Borrell, 1994). La nouvelle souche virale pourrait ne pas présenter la même virulence que la souche de 1990, et les organochlorés, en plus faible quantité, induisent une moins forte immunosuppression. Dans la difficulté de mise en œuvre d'une approche expérimentale ciblée sur les Cétacés, le développement d'outils *in vitro* (mesure de la réponse des lymphocytes ou autres tests de la

fonction immunitaire) serait une approche indispensable pour permettre de mieux comprendre les effets des substances polluantes sur ces animaux.

Il est important de suivre les concentrations de divers polluants terrestres chez les Mammifères marins car ces espèces sont en bout de chaîne alimentaire. Elles peuvent servir de modèle de bioaccumulation et d'impacts toxiques de ces molécules appliqué aux populations humaines ayant une alimentation riche en produits de la mer (Bossart, 2011). Bien que les concentrations soient particulièrement élevées chez les Cétacés par leur régime ichtyophage et teutophage et leur métabolisme des organochlorés faible (Boon et al., 1997), les poissons en Méditerranée présentent une concentration inférieure au facteur d'équivalence toxique pour les PCB (WHO-TEQ) proposé par l'Organisation Mondiale de la Santé de 75 ng/g ww (Bartalini et al., 2020; WHO, 2021). Un changement de tendance dans les concentrations chez ces espèces sentinelles permet d'alerter les autorités d'un potentiel toxique dans l'environnement et de prendre des mesures appropriées pour éviter des impacts majeurs en santé humaine.

Un dernier élément à prendre en compte dans le suivi des populations marines est le changement climatique se traduisant par une augmentation des températures entraînant une modification de la productivité benthique et favorisant ainsi un changement des habitudes de migration des Cétacés (Moore, 2008). Il a également été mis en évidence que le changement climatique et la pression humaine sur les populations de poissons ont induit un changement de l'alimentation chez le Dauphin à bosse du Pacifique (*Sousa chinensis*). Les poissons de plus grand gabarit étant les plus consommés par l'Homme, les poissons qui restent dans les estuaires sont de plus petit gabarit et moins contaminés. Une diminution des paramètres hépatiques associés à l'exposition aux contaminants de type PCB a été constatée en parallèle chez les dauphins (Ning et al., 2020). Ainsi, une étude de l'évolution de l'alimentation des espèces d'intérêt pourrait expliquer certaines tendances à l'accumulation d'un toxique.

De plus, les pyréthrinoïdes ont été observés dans plusieurs pays dans lesquels de nombreuses maladies vectorielles sont présentes. Dans le cadre du changement climatique (augmentation des températures), plusieurs arthropodes vecteurs voient leur aire de répartition s'étendre vers le Nord du territoire français. L'augmentation des risques pour les maladies vectorielles étant corrélée avec cet agrandissement de leur territoire, une augmentation de l'utilisation des insecticides est également à prévoir et, par conséquent, le risque d'une exposition accrue des Cétacés.

Plusieurs mesures de diminution des pollutions terrestres peuvent être mises en place afin de diminuer le niveau de contamination du Sanctuaire Pelagos :

- Le mercure est principalement issu des processus de combustion, tels que l'utilisation du charbon au niveau industriel ou domestique, les processus industriels, l'incinération des déchets, mais également dans les mines de mercure, d'or ou autres métaux. Le développement des énergies renouvelables associé à un traitement adéquat des produits contenant du mercure (batteries, équipements électriques, certaines ampoules, divers produits cosmétiques et médicaux...) est un des premiers points d'action à mettre en place pour diminuer le rejet du mercure dans les eaux méditerranéenne.
- Les PCB ont déjà été interdits à la production depuis une quarantaine d'années, cependant leur présence est toujours importante chez les populations marines de Méditerranée. Si leur production est interdite, leur utilisation à travers des éléments produits avant les années 1970 est autorisée et un écoulement de PCB peut se faire dans l'eau avec l'usure. Pour maîtriser ce risque, une gestion appropriée des déchets contenant des PCB est essentielle et des aides à la rénovation des bâtiments anciens construits avec des matériaux contenant ces substances peuvent être intéressantes pour éviter un apport, certes minime mais continu, de PCB dans la Méditerranée.
- Les divers pesticides étudiés, dont les organophosphorés et les pyréthriinoïdes, ne semblent pas être une préoccupation à ce jour, mais une évolution de leur importance dans l'environnement ne peut être exclue. Parmi les organophosphorés, les contaminants impliqués dans la production de plastique et dans les retardateurs de flamme sont cependant fortement présents dans d'autres analyses réalisées en Méditerranée (Aznar-Aleman et al., 2021; Sala et al., 2019) et une gestion des émissions de plastique et de leur recyclage permettrait une meilleure maîtrise de cette pollution dans la Méditerranée.



## Conclusion signée

### CONCLUSION

Le Sanctuaire Pelagos est une aire maritime de Méditerranée créée en 1999 dans une optique de conservation d'une zone marine de forte biodiversité menacée par une activité humaine croissante. Les Cétacés résidant dans cette région font l'objet d'études régulières depuis une vingtaine d'années par leur importance comme espèces sentinelles de la santé humaine et des écosystèmes.

Si le Sanctuaire Pelagos est aujourd'hui une zone de pêche et de trafic maritime réglementés, il n'en est pas autant du contrôle de la pollution par les contaminants chimiques : le Sanctuaire Pelagos est l'une des zones les plus fortement contaminées de la Méditerranée.

Cette étude a donc pour objectif d'évaluer le niveau de contamination de la Méditerranée au travers des Cétacés retrouvés échoués sur les côtes du Sanctuaire Pelagos. Un total de 32 individus a pu être analysé sur la période 2018/2020.

A travers cette étude, nous avons pu mettre en évidence que les contaminants émergents étudiés, soit les insecticides organophosphorés, les pyréthriinoïdes et un panel de 160 pesticides regroupant divers herbicides et fongicides, sont présents en quantité inférieure au seuil de détection des analyses. De même, le plomb n'a été retrouvé chez aucun des individus analysés. Ces résultats, même sur un nombre limité d'individus, suggèrent une faible contamination par ces polluants « récents ».

*A contrario*, les organochlorés ont été identifiés dans 100% des individus testés. Les teneurs en DDT chez les dauphins semblent diminuer mais les teneurs en PCB restent élevées, supérieures aux seuils toxicologiques et similaires aux études réalisées précédemment, malgré l'interdiction de leur utilisation il y a plus de quarante ans. Le mercure a également été retrouvé à des concentrations pouvant laisser supposer un impact neurologique ou hématologique, qui reste à démontrer.

L'impact de ces polluants sur la santé des populations de Cétacés ne pouvant être négligé et compte tenu de l'importance du rôle de sentinelles pour la santé environnementale et humaine des espèces intégrées dans l'étude, il est nécessaire de continuer à évaluer régulièrement les contaminations des individus du Sanctuaire Pelagos, autant pour les polluants émergents que pour les polluants aujourd'hui interdits mais toujours présents dans l'environnement, afin de pouvoir adapter nos réglementations et nos gestions de ces molécules.



## **Bibliographie**

- Aguilar, A., Borrell, A., 1994. Abnormally high polychlorinated biphenyl levels in striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*) affected by the 1990-1992 Mediterranean epizootic. *Sci Total Environ* 154, 237–247.
- Al-Omar, M.S., Naz, M., Mohammed, S.A.A., Mansha, M., Ansari, M.N., Rehman, N.U., Kamal, M., Mohammed, H.A., Yusuf, M., Hamad, A.M., Akhtar, N., Khan, R.A., 2020. Pyrethroid-Induced Organ Toxicity and Anti-Oxidant-Supplemented Amelioration of Toxicity and Organ Damage: The Protective Roles of Ascorbic Acid and  $\alpha$ -Tocopherol. *Int J Environ Res Public Health* 17.
- Alonso, M.B., Feo, M.L., Corcellas, C., Vidal, L.G., Bertozzi, C.P., Marigo, J., Secchi, E.R., Bassoi, M., Azevedo, A.F., Dorneles, P.R., Torres, J.P.M., Lailson-Brito, J., Malm, O., Eljarrat, E., Barceló, D., 2012. Pyrethroids: A new threat to marine mammals? *Environment International* 47, 99–106.
- Alzieu, C., Duguay, R., 1978. Contamination du dauphin bleu et blanc de Méditerranée *Stenella coeruleoalba* par les composés organochlorés. Presented at the IVes journées d'études sur les pollutions.
- AMAP, 2021. Arctic Monitoring and Assessment Programme | AMAP [WWW Document]. URL <https://www.amap.no/>.
- Anses - Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail [WWW Document], n.d. URL <https://www.anses.fr/fr>.
- APIC, 2021. Almadén, la plus grande mine de mercure du monde. Patrimoine Industriel de Champagne-Ardenne Grand-Est. URL <https://patrimoineindustriel-apic.org/nos-dossiers/espagne-un-pays-de-mines/almaden/>.
- Aznar-Alemany, Ò., Giménez, J., de Stephanis, R., Eljarrat, E., Barceló, D., 2017. Insecticide pyrethroids in liver of striped dolphin from the Mediterranean Sea. *Environmental Pollution* 225, 346–353.
- Aznar-Alemany, Ò., Sala, B., Jobst, K.J., Reiner, E.J., Borrell, A., Aguilar, À., Eljarrat, E., 2021. Temporal trends of halogenated and organophosphate contaminants in striped dolphins from the Mediterranean Sea. *Science of The Total Environment* 753, 142205.
- Barbosa, A.P.M., Méndez-Fernandez, P., Dias, P.S., Santos, M.C.O., Taniguchi, S., Montone, R.C., 2018. Transplacental transfer of persistent organic pollutants in La Plata dolphins (*Pontoporia blainvillei*; Cetartiodactyla, Pontoporiidae). *Science of The Total Environment* 631–632, 239–245.
- Bärlocher, F., Rennenberg, H., 2014. Food Chains and Nutrient Cycles, in: *Ecological Biochemistry*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 92–122.
- Bartalini, A., Muñoz-Arnanz, J., Bains, M., Panti, C., Galli, M., Giani, D., Fossi, M.C., Jiménez, B., 2020. Relevance of current PCB concentrations in edible fish species from the Mediterranean Sea. *Sci Total Environ* 737, 139520.

- Bartalini, A., Muñoz-Arnanz, J., Marsili, L., Mazzariol, S., Fossi, M.C., Jiménez, B., 2019. Evaluation of PCDD/Fs, dioxin-like PCBs and PBDEs in sperm whales from the Mediterranean Sea. *Sci Total Environ* 653, 1417–1425.
- Berio, E., Grattarola, C., Berny, P., Keck, N., Jourdan, J., Labach, H., 2020. Biological and toxicological contamination of cetaceans in the Pelagos Sanctuary: assessment, origin, monitoring and mitigation. *Pelagos Secretariat Convention* 31.
- Boon, J.P., van der Meer, J., Allchin, C.R., Law, R.J., Klungsøyr, J., Leonards, P.E., Spliid, H., Storr-Hansen, E., Mckenzie, C., Wells, D.E., 1997. Concentration-dependent changes of PCB patterns in fish-eating mammals: structural evidence for induction of cytochrome P450. *Arch Environ Contam Toxicol* 33, 298–311.
- Borrell, A., Aguilar, A., 2007. Organochlorine concentrations declined during 1987–2002 in western Mediterranean bottlenose dolphins, a coastal top predator. *Chemosphere* 66, 347–352.
- Borrell, A., Aguilar, A., 2005. Differences in DDT and PCB residues between common and striped dolphins from the southwestern Mediterranean. *Arch Environ Contam Toxicol* 48, 501–508.
- Bossart, G.D., 2011. Marine Mammals as Sentinel Species for Oceans and Human Health. *Vet Pathol* 48, 676–690.
- Brumovský, M., Bečanová, J., Kohoutek, J., Borghini, M., Nizzetto, L., 2017. Contaminants of emerging concern in the open sea waters of the Western Mediterranean. *Environmental Pollution* 229, 976–983.
- Calzada, N., Aguilar, A., Grau, E., Lockyer, C., 2011. Patterns of growth and physical maturity in the western Mediterranean striped dolphin, *Stenella coeruleoalba* (Cetacea: Odontoceti). *Canadian Journal of Zoology*.
- Calzada, N., Aguilar, A., Sørensen, T.B., Lockyer, C., 1996. Reproductive biology of female striped dolphin (*Stenella coeruleoalba*) from the western Mediterranean. *Journal of Zoology* 240, 581–591.
- Capanni, F., Muñoz-Arnanz, J., Marsili, L., Fossi, M.C., Jiménez, B., 2020. Assessment of PCDD/Fs, dioxin-like PCBs and PBDEs in Mediterranean striped dolphins. *Marine Pollution Bulletin* 156, 111207.
- Cardellicchio, N., Giandomenico, S., Ragone, P., Di Leo, A., 2000. Tissue distribution of metals in striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*) from the Apulian coasts, Southern Italy. *Marine Environmental Research* 49, 55–66.
- Carson, R., 1962. *Printemps silencieux*, Wildproject Editions. ed.
- Castrillon, J., Gomez-Campos, E., Aguilar, A., Berdié, L., Borrell, A., 2010. PCB and DDT levels do not appear to have enhanced the mortality of striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*) in the 2007 Mediterranean epizootic. *Chemosphere* 81, 459–463.

- Chojnacka, K., Mikulewicz, M., 2014. Bioaccumulation, in: Wexler, P. (Ed.), *Encyclopedia of Toxicology (Third Edition)*. Academic Press, Oxford, pp. 456–460.
- CITEPA, 2020. CITEPA [WWW Document]. Citepa. URL <https://www.citepa.org/fr/2020-hg/>.
- CNRS, 2021. PELAGIS [WWW Document]. URL <https://www.observatoire-pelagis.cnrs.fr/>.
- Coll, M., Piroddi, C., Albouy, C., Lasram, F., Cheung, W., Christensen, V., Karpouzi, V., Guilhaumon, F., Mouillot, D., Paleczny, M., Palomares, M.L.D., Steenbeek, J., Trujillo, P., Watson, R., Pauly, D., 2012. The Mediterranean Sea under siege: Spatial overlap between marine biodiversity, cumulative threats and marine reserves. *Global Ecology and Biogeography* 21, 465–480.
- Dhaouadi, R., Tarhouni, D., Louati, A., Bouhalfaya, R., Oussama Elhafi, M., 2020. Impacts du Mercure (Metal Trace) sur le Milieu Marin et les Etres Vivants. Ecole Nationale de Médecine Vétérinaire de Sidi Thabet, Tunisie.
- Durante, C., Manhães, B., Azevedo, A., Crespo, E., Lailson Brito, J., 2019. Trace elements in trophic webs from South Atlantic: The use of cetaceans as sentinels. *Marine Pollution Bulletin* 150.
- FAOSTAT [WWW Document], 2021. URL <http://www.fao.org/faostat/fr/#data/RP>.
- Fénelon, P., 1955. Les mines françaises de plomb et de zinc.
- Feo, M.L., Eljarrat, E., Barceló, D., 2011. Performance of gas chromatography/tandem mass spectrometry in the analysis of pyrethroid insecticides in environmental and food samples. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 25, 869–876.
- Fossi, M.C., Marsili, L., Neri, G., Natoli, A., Politi, E., Panigada, S., 2003. The use of a non-lethal tool for evaluating toxicological hazard of organochlorine contaminants in Mediterranean cetaceans: new data 10 years after the first paper published in MPB. *Mar Pollut Bull* 46, 972–982.
- Fossi, M.C., Panti, C., Marsili, L., Maltese, S., Spinsanti, G., Casini, S., Caliani, I., Gaspari, S., Muñoz-Arnanz, J., Jimenez, B., Finoia, M.G., 2013. The Pelagos Sanctuary for Mediterranean marine mammals: Marine Protected Area (MPA) or marine polluted area? The case study of the striped dolphin (*Stenella coeruleoalba*). *Mar Pollut Bull* 70, 64–72.
- Genov, T., Jepson, P., Barber, J., Hace, A., Gaspari, S., Centrih, T., Lesjak, J., Kotnjek, P., 2018. Linking organochlorine contaminants with demographic parameters in free-ranging common bottlenose dolphins from the northern Adriatic Sea. *Science of The Total Environment* 657.
- Gidlow, D.A., 2015. Lead toxicity. *OCCMED* 65, 348–356.

- Giorda, F., Ballardini, M., Di Guardo, G., Pintore, M.D., Grattarola, C., Iulini, B., Mignone, W., Gorla, M., Serracca, L., Varello, K., Dondo, A., Acutis, P.L., Garibaldi, F., Scaglione, F.E., Gustinelli, A., Mazzariol, S., Di Francesco, C.E., Tittarelli, C., Casalone, C., Pautasso, A., 2017. Postmortem Findings in Cetaceans Found Stranded in the Pelagos Sanctuary, Italy, 2007-14. *J Wildl Dis* 53, 795–803.
- Gnone, G., Bellingeri, M., Dhermain, F., Dupraz, F., Nuti, S., Bedocchi, D., Moulins, A., Rosso, M., Alessi, J., McCrea, R.S., Azzellino, A., Airoidi, S., Portunato, N., Laran, S., David, L., Di Meglio, N., Bonelli, P., Montesi, G., Trucchi, R., Fossa, F., Wurtz, M., 2011. Distribution, abundance, and movements of the bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) in the Pelagos Sanctuary MPA (north-west Mediterranean Sea). *Aquatic Conserv: Mar. Freshw. Ecosyst.* 21, 372–388.
- Gouy, V., Gril, J.-J., Lacas, J.-G., 2008. Contamination des eaux de surface par les pesticides et rôle des zones tampons pour en limiter le transfert : état des connaissances et conséquences pour l'action 15.
- Gupta, R.C., 2018. *Veterinary Toxicology - Basic and Clinical Principles - Third Edition*. Elsevier.
- Helle, E., Olsson, M., Jensen, S., 1976. PCB levels correlated with pathological changes in seal uteri [ringed seal, *Pusa hispida*, grey seal, *Halichoerus grypus*, harbor seal, *Phoca vitulina*, from the Baltic and the Swedish west coast, polychlorinated biphenyls]. *Ambio*.
- Ifremer, 2021. Ifremer [WWW Document]. Ifremer. URL <https://www.ifremer.fr/>.
- INRAE, 2021. Accueil | INRAE INSTIT [WWW Document]. URL <https://www.inrae.fr/>.
- INRS, 2003. Le Mercure - Prévention de l'hydrargyrisme (No. ED 546). INRS, Condé-sur-Noireau.
- Jayaraj, R., Megha, P., Sreedev, P., 2016. Organochlorine pesticides, their toxic effects on living organisms and their fate in the environment. *Interdiscip Toxicol* 9, 90–100.
- Jefferson, T.A., Webber, M.A., Pitman, R.L. (Eds.), 1993. *Marine Mammals of the World*, in: *Marine Mammals of the World (Second Edition)*. Academic Press, San Diego, pp. i–iii.
- Jepson, P., Deaville, R., Barber, J., Aguilar, A., 2016. PCB pollution continues to impact populations of orcas and other dolphins in European waters. *ResearchGate*.
- Jepson, P., Law, R., 2016. Persistent pollutants, persistent threats. *Science* 352, 1388–1389.
- Leonzio, C., Focardi, S., Fossi, C., 1992. Heavy metals and selenium in stranded dolphins of the northern Tyrrhenian (NW Mediterranean). *Sci Total Environ* 119, 77–84.
- Liu, Y., Fu, X., Tao, S., Liu, L., Li, W., Meng, B., 2015. Comparison and analysis of organochlorine pesticides and hexabromobiphenyls in environmental samples by gas chromatography-electron capture detector and gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr Sci* 53, 197–203.

- López-Berenguer, G., Peñalver, J., Martínez-López, E., 2020. A critical review about neurotoxic effects in marine mammals of mercury and other trace elements. *Chemosphere* 246, 125688.
- Marsili, L., Focardi, S., 1997. Chlorinated Hydrocarbon (HCB, DDTs and PCBs Levels In Cetaceans Stranded Along The Italian Coasts : An Overview. *Environ Monit Assess* 45, 129–180.
- Martínez-López, E., Peñalver, J., Escriña, A., Lara, L., Gens, M.J., María Dolores, E., Alcaraz, A., García-Fernández, A.J., 2019. Trace metals in striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*) stranded along the Murcia coastline, Mediterranean Sea, during the period 2009-2015. *Chemosphere* 229, 580–588.
- Meneghini, L.Z., Rübensam, G., Bica, V.C., Ceccon, A., Barreto, F., Ferrão, M.F., Bergold, A.M., 2014. Multivariate optimization for extraction of pyrethroids in milk and validation for GC-ECD and CG-MS/MS analysis. *Int J Environ Res Public Health* 11, 11421–11437.
- Ministère de la Transition écologique, 2021. Ministère de la Transition écologique [WWW Document]. URL <https://www.ecologie.gouv.fr/>.
- Ministère des Solidarités et de la Santé, 2020. Ministère des Solidarités et de la Santé - [WWW Document]. Ministère des Solidarités et de la Santé. URL <http://solidarites-sante.gouv.fr/>.
- Moore, S., 2008. Marine Mammals as Ecosystem Sentinels. *Journal of Mammalogy - J MAMMAL* 89, 534–540.
- Ning, X., Gui, D., He, X., Wu, Y., 2020. Diet Shifts Explain Temporal Trends of Pollutant Levels in Indo-Pacific Humpback Dolphins (*Sousa chinensis*) from the Pearl River Estuary, China. *Environ Sci Technol* 54, 13110–13120.
- Núñez-Nogueira, G., Pérez-López, A., Santos-Córdova, J.M., 2019. As, Cr, Hg, Pb, and Cd Concentrations and Bioaccumulation in the Dugong *Dugong dugon* and Manatee *Trichechus manatus*: A Review of Body Burdens and Distribution. *Int J Environ Res Public Health* 16.
- Pribanic, S., Miokovic, D., Kovacic, D., 2000. Preliminary Growth Rate and Body Lengths of the Bottlenose Dolphins *Tursiops truncatus* (Montagu, 1821) From the Adriatic Sea. *Nat. Croat.* 9, 179–188.
- PubChem, n.d. PubChem [WWW Document]. URL <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>.
- Rajak, P., Ganguly, A., Sarkar, S., Mandi, M., Dutta, M., Podder, S., Khatun, S., Roy, S., 2021. Immunotoxic role of organophosphates: An unseen risk escalating SARS-CoV-2 pathogenicity. *Food Chem Toxicol* 149, 112007.
- Ramade, F., 2007. Introduction à l'écotoxicologie : Fondements et applications, TECHNIQUE&DOCUMENTATION. ed. Lavoisier.

- Read, A., Wells, R., Hohn, A., Scott, M., 1993. Patterns of growth in wild bottlenose dolphins, *Tursiops truncatus*. *Journal of Zoology* 231, 107–123.
- Richard F. Shore, B.A.R. (Ed.), 2006. *Ecotoxicology of Wild Mammals*. John Wiley and Sons Ltd 34, 427–480.
- RNCan, 2021. Faits sur le plomb [WWW Document]. Gouvernement du Canada. URL <https://www.rncan.gc.ca/nos-ressources-naturelles/mines-materiaux/faits-mineraux-metaux/faits-sur-le-plomb/20598>.
- Rollin, Quiot, 2006. *Éléments traces métalliques - Guide méthodologique : Recommandations pour la modélisation des transferts des éléments traces métalliques dans les sols et les eaux souterraines (Rapport d'étude No. INERIS-DRC-06-66246/DESP-R01a)*. INERIS.
- Romero, M.B., Polizzi, P., Chiodi, L., Medici, S., Blando, M., Gerpe, M., 2018. Preliminary Assessment of Legacy and Current-Use Pesticides in Franciscana Dolphins from Argentina. *Bull Environ Contam Toxicol* 101, 14–19.
- RStudio, 2021. RStudio | Open source & professional software for data science teams [WWW Document]. URL <https://rstudio.com/>.
- Sala, B., Giménez, J., de Stephanis, R., Barceló, D., Eljarrat, E., 2019. First determination of high levels of organophosphorus flame retardants and plasticizers in dolphins from Southern European waters. *Environ Res* 172, 289–295.
- Salvat, B., Roche, H., Ramade, F., 2016. On the occurrence of a widespread contamination by herbicides of coral reef biota in French Polynesia. *Environ Sci Pollut Res* 23, 49–60.
- Samuel, A., Worthy, G., 2004. Variability in fatty acid composition of bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) blubber as a function of body site, season, and reproductive state. *Canadian Journal of Zoology* 82, 1933–1942.
- Site officiel du Sanctuaire Pelagos [WWW Document], 2021. URL <https://www.sanctuaire-pelagos.org/fr/>.
- Song, N.-E., Lee, J.Y., Mansur, A.R., Jang, H.W., Lim, M.-C., Lee, Y., Yoo, M., Nam, T.G., 2019. Determination of 60 pesticides in hen eggs using the QuEChERS procedure followed by LC-MS/MS and GC-MS/MS. *Food Chem* 298, 125050.
- UICN, 2021. UICN France [WWW Document]. URL <https://uicn.fr/>.
- WHO, 2021. World Health Organisation [WWW Document]. URL <https://www.who.int>.



## Annexes

Annexe 1 - Liste rouge des espèces de Mammifères en France métropolitaine (UICN, 2021)



En partenariat avec :



## La Liste rouge des espèces menacées en France

### Mammifères de France métropolitaine

Novembre 2017

#### Mammifères terrestres

Ordre	Nom scientifique	Nom commun	Catégorie Liste rouge France	Critères	Tendance	Catégorie Liste rouge mondiale
Carnivora	<i>Mustela lutreola</i>	Vison d'Europe	CR	A4c C2a(i)	↘	CR
Carnivora	<i>Ursus arctos</i>	Ours brun	CR	D	↗	LC
Chiroptera	<i>Rhinolophus mehelyi</i>	Rhinolophe de Méhely	CR*	D	?	VU
Carnivora	<i>Lynx lynx</i>	Lynx boréal	EN	D	→	LC
Cetartiodactyla	<i>Capra pyrenaica</i>	Bouquetin ibérique	EN	D	↗	LC
Chiroptera	<i>Myotis dasycneme</i>	Murin des marais	EN	B(1+2)ab(iii) D	?	NT
Rodentia	<i>Cricetus cricetus</i>	Grand Hamster	EN	B(1+2)ab(ii,iii)	→	LC
Carnivora	<i>Canis lupus</i>	Loup gris	VU	EN (D) (-1)	↗	LC
Cetartiodactyla	<i>Ovis gmelinii</i>	Mouflon d'Arménie	VU	B(1+2)ab(iii)	→	VU
Chiroptera	<i>Miniopterus schreibersii</i>	Minioptère de Schreibers	VU	A2a	?	NT
Chiroptera	<i>Myotis escaleraei</i>	Murin d'Escalera	VU	D2	?	NE
Chiroptera	<i>Myotis punicus</i>	Murin du Maghreb	VU	B(1+2)ab(iii,v) C1+2a(i)	↘	DD
Chiroptera	<i>Nyctalus lasiopterus</i>	Grande Noctule	VU	B2ab(iii)	?	VU
Chiroptera	<i>Nyctalus noctula</i>	Noctule commune	VU	A2b+3c+4bc	↘	LC
Chiroptera	<i>Plecotus macrobullaris</i>	Oreillard montagnard	VU	D1	?	LC
Soricomorpha	<i>Galemys pyrenaicus</i>	Desman des Pyrénées	VU	A2c B(1+2)ab(i,ii,iii,iv,v)	↘	VU
Carnivora	<i>Mustela putorius</i>	Putois d'Europe	NT	pr. A4ac	↘	LC
Cetartiodactyla	<i>Capra ibex</i>	Bouquetin des Alpes	NT	pr. B1a C	↗	LC
Chiroptera	<i>Tadarida teniotis</i>	Molosse de Cestoni	NT	pr. A3c	?	LC
Chiroptera	<i>Eptesicus serotinus</i>	Sérotine commune	NT	pr. A3c	?	LC
Chiroptera	<i>Myotis bechsteinii</i>	Murin de Bechstein	NT	pr. A3c	?	NT
Chiroptera	<i>Myotis blythii</i>	Petit Murin	NT	pr. A3c	?	LC
Chiroptera	<i>Myotis capaccinii</i>	Murin de Capaccini	NT	pr. A3c	?	VU
Chiroptera	<i>Nyctalus leisleri</i>	Noctule de Leisler	NT	pr. A3c+4bc	↘	LC
Chiroptera	<i>Pipistrellus nathusii</i>	Pipistrelle de Nathusius	NT	pr. A3c	?	LC
Chiroptera	<i>Pipistrellus pipistrellus</i>	Pipistrelle commune	NT	pr. A3c+4bc	↘	LC
Lagomorpha	<i>Lepus corsicanus</i>	Lièvre de Corse	NT	pr. B(1+2)a	↗	VU
Lagomorpha	<i>Lepus timidus</i>	Lièvre variable	NT	pr. B1b(ii,iii,v)	↘	LC
Lagomorpha	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	Lapin de garenne	NT	pr. A2bd+4bd	↘	NT
Rodentia	<i>Arvicola sapidus</i>	Campagnol amphibie	NT	pr. B2ab(ii,iii,iv,v) C1	↘	VU
Rodentia	<i>Arvicola terrestris</i>	Campagnol terrestre	NT	pr. B2ab(ii,iii,iv,v)	↘	LC
Soricomorpha	<i>Crocidura leucodon</i>	Crocidure leucode	NT	pr. A4c	↘	LC
Soricomorpha	<i>Crocidura suaveolens</i>	Crocidure des jardins	NT	pr. A4c	↘	LC
Soricomorpha	<i>Talpa caeca</i>	Taupe aveugle	NT	pr. B(1+2)a	?	LC

Ordre	Nom scientifique	Nom commun	Catégorie Liste rouge France	Critères	Tendance	Catégorie Liste rouge mondiale
Camivora	<i>Vulpes vulpes</i>	Renard roux	LC		→	LC
Camivora	<i>Felis silvestris</i>	Chat forestier	LC		↗	LC
Camivora	<i>Lutra lutra</i>	Loutre d'Europe	LC		↗	NT
Camivora	<i>Martes foina</i>	Fouine	LC		?	LC
Camivora	<i>Martes martes</i>	Marte des pins	LC		→	LC
Camivora	<i>Meles meles</i>	Blaireau européen	LC		→	LC
Camivora	<i>Mustela erminea</i>	Hermine	LC		?	LC
Camivora	<i>Mustela nivalis</i>	Belette d'Europe	LC		?	LC
Camivora	<i>Genetta genetta</i>	Genette commune	LC		↗	LC
Cetartiodactyla	<i>Rupicapra pyrenaica</i>	Isard	LC		→	LC
Cetartiodactyla	<i>Rupicapra rupicapra</i>	Chamois	LC		↗	LC
Cetartiodactyla	<i>Capreolus capreolus</i>	Chevreuril européen	LC		↗	LC
Cetartiodactyla	<i>Cervus elaphus</i>	Cerf élaphe	LC		↗	LC
Cetartiodactyla	<i>Sus scrofa</i>	Sanglier	LC		↗	LC
Chiroptera	<i>Rhinolophus euryale</i>	Rhinolophe euryale	LC		?	NT
Chiroptera	<i>Rhinolophus ferrumequinum</i>	Grand Rhinolophe	LC		↗	LC
Chiroptera	<i>Rhinolophus hipposideros</i>	Petit Rhinolophe	LC		↗	LC
Chiroptera	<i>Barbastella barbastellus</i>	Barbastelle d'Europe	LC		?	NT
Chiroptera	<i>Hypsugo savii</i>	Vespère de Savi	LC		?	LC
Chiroptera	<i>Myotis alcathoe</i>	Murin d'Alcathoe	LC		?	DD
Chiroptera	<i>Myotis brandtii</i>	Murin de Brandt	LC		?	LC
Chiroptera	<i>Myotis daubentonii</i>	Murin de Daubenton	LC		?	LC
Chiroptera	<i>Myotis emarginatus</i>	Murin à oreilles échanquées	LC		↗	LC
Chiroptera	<i>Myotis myotis</i>	Grand Murin	LC		↗	LC
Chiroptera	<i>Myotis mystacinus</i>	Murin à moustaches	LC		↗	LC
Chiroptera	<i>Myotis nattereri</i>	Murin de Natterer	LC		?	LC
Chiroptera	<i>Pipistrellus kuhlii</i>	Pipistrelle de Kuhl	LC		↗	LC
Chiroptera	<i>Pipistrellus pygmaeus</i>	Pipistrelle pygmée	LC		?	LC
Chiroptera	<i>Plecotus auritus</i>	Oreillard roux	LC		?	LC
Chiroptera	<i>Plecotus austriacus</i>	Oreillard gris	LC		?	LC
Erinaceomorpha	<i>Erinaceus europaeus</i>	Hérisson d'Europe	LC		?	LC
Lagomorpha	<i>Lepus europaeus</i>	Lièvre d'Europe	LC		?	LC
Rodentia	<i>Castor fiber</i>	Castor d'Eurasie	LC		↗	LC
Rodentia	<i>Arvicola scherman</i>	Campagnol fousseur	LC		→	LC
Rodentia	<i>Chionomys nivalis</i>	Campagnol des neiges	LC		→	LC
Rodentia	<i>Microtus agrestis</i>	Campagnol agreste	LC		→	LC
Rodentia	<i>Microtus arvalis</i>	Campagnol des champs	LC		↗	LC
Rodentia	<i>Microtus duodecimcostatus</i>	Campagnol provençal	LC		→	LC
Rodentia	<i>Microtus lusitanicus</i>	Campagnol basque	LC		?	LC
Rodentia	<i>Microtus multiplex</i>	Campagnol de Fatio	LC		→	LC
Rodentia	<i>Microtus pyrenaicus</i>	Campagnol des Pyrénées	LC		→	LC
Rodentia	<i>Microtus savii</i>	Campagnol de Savi	LC	NT (pr. B(1+2)a) (-1)	?	LC
Rodentia	<i>Microtus subterraneus</i>	Campagnol souterrain	LC		→	LC
Rodentia	<i>Eliomys quercinus</i>	Lérot	LC		?	NT
Rodentia	<i>Glis glis</i>	Loir gris	LC		→	LC
Rodentia	<i>Muscardinus avellanarius</i>	Muscardin	LC		?	LC
Rodentia	<i>Apodemus flavicollis</i>	Mulot à collier	LC		?	LC
Rodentia	<i>Apodemus sylvaticus</i>	Mulot sylvestre	LC		→	LC
Rodentia	<i>Clethrionomys glareolus</i>	Campagnol roussâtre	LC		→	LC
Rodentia	<i>Micromys minutus</i>	Rat des moissons	LC		?	LC
Rodentia	<i>Mus musculus</i>	Souris grise	LC		→	LC
Rodentia	<i>Mus spretus</i>	Souris d'Afrique du Nord	LC		↗	LC
Rodentia	<i>Rattus rattus</i>	Rat noir	LC		↘	LC
Rodentia	<i>Marmota marmota</i>	Marmotte des Alpes	LC		↗	LC

Ordre	Nom scientifique	Nom commun	Catégorie Liste rouge France	Critères	Tendance	Catégorie Liste rouge mondiale
Rodentia	<i>Sciurus vulgaris</i>	Ecureuil roux	LC		?	LC
Soricomorpha	<i>Crocidura russula</i>	Crocidure musette	LC		↗	LC
Soricomorpha	<i>Neomys anomalus</i>	Crossope de Miller	LC		?	LC
Soricomorpha	<i>Neomys fodiens</i>	Crossope aquatique	LC		↘	LC
Soricomorpha	<i>Sorex coronatus</i>	Musaraigne couronnée	LC		→	LC
Soricomorpha	<i>Sorex minutus</i>	Musaraigne pygmée	LC		→	LC
Soricomorpha	<i>Suncus etruscus</i>	Pachyure étrusque	LC		→	LC
Soricomorpha	<i>Talpa aquitania</i>	Taupe d'Aquitaine	LC		→	NE
Soricomorpha	<i>Talpa europaea</i>	Taupe d'Europe	LC		→	LC
Chiroptera	<i>Eptesicus nilssonii</i>	Sérotine de Nilsson	DD		?	LC
Chiroptera	<i>Vespertilio murinus</i>	Vespertillon bicolore	DD		?	LC
Rodentia	<i>Apodemus alpicola</i>	Mulot alpestre	DD		?	LC
Soricomorpha	<i>Sorex alpinus</i>	Musaraigne alpine	DD		?	NT
Soricomorpha	<i>Sorex antinorii</i>	Musaraigne du Valais	DD		?	DD
Soricomorpha	<i>Sorex araneus</i>	Musaraigne carrelet	DD		?	LC

#### Liste des sous-espèces et populations de mammifères terrestres ayant fait l'objet d'une évaluation particulière

Ordre	Nom scientifique	Sous-espèce ou population	Nom commun	Catégorie Liste rouge France	Critères	Tendance	Catégorie Liste rouge mondiale
Cetartiodactyla	<i>Capra pyrenaica</i>	Ssp. <i>pyrenaica</i>	Bouquetin des Pyrénées	EX			EX
Cetartiodactyla	<i>Rupicapra rupicapra</i>	Ssp. <i>cartusiana</i>	Chamois de la Chartreuse	VU	D1	?	VU
Cetartiodactyla	<i>Cervus elaphus</i>	Ssp. <i>corsicanus</i>	Cerf de Corse	VU	D1	↗	NE
Chiroptera	<i>Myotis nattereri</i>	Pop. corse	Murin de Natterer	VU	D1	?	NE
Carnivora	<i>Felis silvestris</i>	Ssp. <i>lybica</i>	Chat ganté	DD		?	NE

#### Liste des espèces terrestres présentes en France métropolitaine non soumises à l'évaluation

Ordre	Nom scientifique	Nom commun	Catégorie Liste rouge France	Catégorie Liste rouge mondiale
Carnivora	<i>Nyctereutes procyonoides</i>	Chien viverrin	NA <sup>a</sup>	LC
Carnivora	<i>Mustela vison</i>	Vison d'Amérique	NA <sup>a</sup>	LC
Carnivora	<i>Procyon lotor</i>	Raton laveur	NA <sup>a</sup>	LC
Cetartiodactyla	<i>Ammotragus lervia</i>	Mouflon à manchettes	NA <sup>a</sup>	VU
Cetartiodactyla	<i>Cervus nippon</i>	Cerf sika	NA <sup>a</sup>	LC
Cetartiodactyla	<i>Dama dama</i>	Daim européen	NA <sup>a</sup>	LC
Diprotodontia	<i>Macropus rufogriseus</i>	Wallaby de Bennett	NA <sup>a</sup>	LC
Lagomorpha	<i>Lepus granatensis</i>	Lièvre ibérique	NA <sup>a</sup>	LC
Rodentia	<i>Ondatra zibethicus</i>	Rat musqué	NA <sup>a</sup>	LC
Rodentia	<i>Rattus norvegicus</i>	Rat surmulot	NA <sup>a</sup>	LC
Rodentia	<i>Myocastor coypus</i>	Ragondin	NA <sup>a</sup>	LC
Rodentia	<i>Callosciurus erythraeus</i>	Ecureuil à ventre rouge	NA <sup>a</sup>	LC
Rodentia	<i>Tamias sibiricus</i>	Tamias de Sibérie	NA <sup>a</sup>	LC

(a) Espèce introduite en France métropolitaine dans la période récente (après l'année 1500).

## Mammifères marins

Ordre	Nom scientifique	Nom commun	Statut de présence*	Catégorie Liste rouge France	Critères	Tendance	Catégorie Liste rouge mondiale
Carnivora	<i>Monachus monachus</i>	Phoque moine de Méditerranée	R	RE			EN
Cetartiodactyla	<i>Eubalaena glacialis</i>	Baleine franche de l'Atlantique Nord	V	RE			EN
Cetartiodactyla	<i>Physeter macrocephalus</i>	Cachalot	R	VU	D1	?	VU
Carnivora	<i>Halichoerus grypus</i>	Phoque gris	R	NT	VU (D1) (-1)	↗	LC
Carnivora	<i>Phoca vitulina</i>	Phoque veau-marin	R	NT	VU (D1) (-1)	↗	LC
Cetartiodactyla	<i>Balaenoptera physalus</i>	Rorqual commun	R	NT	pr. C2	?	EN
Cetartiodactyla	<i>Grampus griseus</i>	Dauphin de Risso	R	NT	pr. C2	?	LC
Cetartiodactyla	<i>Lagenorhynchus albirostris</i>	Lagénorhynque à bec blanc	V	NT	VU (D1) (-1)	?	LC
Cetartiodactyla	<i>Phocoena phocoena</i>	Marsouin commun	R	NT	pr. C2	?	LC
Cetartiodactyla	<i>Balaenoptera acutorostrata</i>	Petit Rorqual	V <sup>(R?)</sup>	LC		?	LC
Cetartiodactyla	<i>Delphinus delphis</i>	Dauphin commun	R	LC		→	LC
Cetartiodactyla	<i>Globicephala melas</i>	Globicéphale noir	R	LC		?	DD
Cetartiodactyla	<i>Stenella coeruleoalba</i>	Dauphin bleu et blanc	R	LC		?	LC
Cetartiodactyla	<i>Tursiops truncatus</i>	Grand Dauphin	R	LC		?	LC
Cetartiodactyla	<i>Balaenoptera borealis</i>	Rorqual boréal	V	DD		?	EN
Cetartiodactyla	<i>Megaptera novaeangliae</i>	Baleine à bosse	V	DD		?	LC
Cetartiodactyla	<i>Lagenorhynchus acutus</i>	Lagénorhynque à flancs blancs de l'Atlantique	V	DD		?	LC
Cetartiodactyla	<i>Orcinus orca</i>	Orque	V	DD		?	DD
Cetartiodactyla	<i>Kogia breviceps</i>	Cachalot pygmée	V	DD		?	DD
Cetartiodactyla	<i>Hyperoodon ampullatus</i>	Hypérodon boréal	V	DD		?	DD
Cetartiodactyla	<i>Mesoplodon bidens</i>	Mésoplodon de Sowerby	V	DD		?	DD
Cetartiodactyla	<i>Ziphius cavirostris</i>	Baleine à bec de Cuvier	R	DD		?	LC

(\*) R : espèce reproductrice ; V : espèce visiteuse ; V<sup>(R?)</sup> : espèce visiteuse et reproductrice probable.

## Liste des populations marines ayant fait l'objet d'une évaluation particulière

Ordre	Nom scientifique	Population	Nom commun	Statut de présence*	Catégorie Liste rouge France	Critères	Tendance	Catégorie Liste rouge mondiale
Cetartiodactyla	<i>Globicephala melas</i>	Pop. Méditerranée	Globicéphale noir	R	VU	D1	?	NE
Cetartiodactyla	<i>Grampus griseus</i>	Pop. Méditerranée	Dauphin de Risso	R	VU	D1	?	NE
Cetartiodactyla	<i>Physeter macrocephalus</i>	Pop. Atlantique Nord-Est	Cachalot	V	VU	D1	?	NE
Cetartiodactyla	<i>Physeter macrocephalus</i>	Pop. Méditerranée	Cachalot	R	VU	D1	?	NE
Cetartiodactyla	<i>Balaenoptera physalus</i>	Pop. Atlantique Nord-Est	Rorqual commun	V	NT	pr. C2a(ii) D1	?	NE
Cetartiodactyla	<i>Balaenoptera physalus</i>	Pop. Méditerranée	Rorqual commun	R	NT	pr. C2a(ii)	?	NE
Cetartiodactyla	<i>Grampus griseus</i>	Pop. Atlantique Nord-Est	Dauphin de Risso	R	NT	pr. C2	?	NE
Cetartiodactyla	<i>Tursiops truncatus</i>	Pop. Méditerranée	Grand Dauphin	R	NT	pr. C2a(ii)	?	NE
Cetartiodactyla	<i>Delphinus delphis</i>	Pop. Atlantique Nord-Est	Dauphin commun	R	LC		→	NE
Cetartiodactyla	<i>Globicephala melas</i>	Pop. Atlantique Nord-Est	Globicéphale noir	R	LC		?	NE
Cetartiodactyla	<i>Tursiops truncatus</i>	Pop. Atlantique Nord-Est	Grand Dauphin	R	LC		?	NE
Cetartiodactyla	<i>Delphinus delphis</i>	Pop. Méditerranée	Dauphin commun	R	DD		?	NE

(\*) R : population reproductrice ; V : population visiteuse.

**Liste des espèces marines présentes en France métropolitaine  
non soumises à l'évaluation**

Ordre	Nom scientifique	Nom commun	Catégorie Liste rouge France	Catégorie Liste rouge mondiale
Carnivora	<i>Odobenus rosmarus</i>	Morse	NA <sup>b</sup>	VU
Carnivora	<i>Cystophora cristata</i>	Phoque à capuchon	NA <sup>b</sup>	VU
Carnivora	<i>Erignathus barbatus</i>	Phoque barbu	NA <sup>b</sup>	LC
Carnivora	<i>Pagophilus groenlandicus</i>	Phoque du Groenland	NA <sup>b</sup>	LC
Carnivora	<i>Pusa hispida</i>	Phoque annelé	NA <sup>b</sup>	LC
Cetartiodactyla	<i>Balaena mysticetus</i>	Baleine du Groenland	NA <sup>b</sup>	LC
Cetartiodactyla	<i>Balaenoptera musculus</i>	Baleine bleue	NA <sup>b</sup>	EN
Cetartiodactyla	<i>Feresa attenuata</i>	Orque pygmée	NA <sup>b</sup>	DD
Cetartiodactyla	<i>Globicephala macrorhynchus</i>	Globicéphale tropical	NA <sup>b</sup>	DD
Cetartiodactyla	<i>Lagenodelphis hosei</i>	Dauphin de Fraser	NA <sup>b</sup>	LC
Cetartiodactyla	<i>Peponocephala electra</i>	Péponocéphale	NA <sup>b</sup>	LC
Cetartiodactyla	<i>Pseudorca crassidens</i>	Pseudorque	NA <sup>b</sup>	DD
Cetartiodactyla	<i>Stenella frontalis</i>	Dauphin tacheté de l'Atlantique	NA <sup>b</sup>	DD
Cetartiodactyla	<i>Steno bredanensis</i>	Sténo	NA <sup>b</sup>	LC
Cetartiodactyla	<i>Kogia sima</i>	Cachalot nain	NA <sup>b</sup>	DD
Cetartiodactyla	<i>Mesoplodon densirostris</i>	Mésoplodon de Blainville	NA <sup>b</sup>	DD
Cetartiodactyla	<i>Mesoplodon europaeus</i>	Mésoplodon de Gervais	NA <sup>b</sup>	DD
Cetartiodactyla	<i>Mesoplodon mirus</i>	Mésoplodon de True	NA <sup>b</sup>	DD

(b) Espèce présente en France métropolitaine de manière occasionnelle ou marginale.

## La Liste rouge des espèces menacées en France

Etablie conformément aux critères de l'UICN, la Liste rouge des espèces menacées en France vise à dresser un bilan objectif du degré de menace pesant sur les espèces de la faune et de la flore à l'échelle du territoire national. Cet inventaire de référence, fondé sur une solide base scientifique et réalisé à partir des meilleures connaissances disponibles, contribue à mesurer l'ampleur des enjeux, les progrès accomplis et les défis à relever pour la France, en métropole et en outre-mer.

Tous les résultats sont disponibles sur : [www.uicn.fr/liste-rouge-france](http://www.uicn.fr/liste-rouge-france) et <http://inpn.mnhn.fr>

## Chapitre Mammifères de France métropolitaine

**Coordination** - Sébastien Moncorps (directeur UICN France) et Jean-Philippe Sibley (directeur UMS Patrinat / MNHN)

**Mise en œuvre** - Hélène Colas (UICN France), Guillaume Gigot (UMS Patrinat / MNHN), Arzhvaël Jéusset (UMS Patrinat / MNHN), Florian Kirchner (UICN France)

**Compilation des données, pré-évaluation et consolidation**

Nathalie de Lacoste, Patrick Haffner, Arzhvaël Jéusset, Elodie Legrand et Julie Marmet (MNHN)

**Comité d'évaluation**

Experts pour les mammifères terrestres non volants : Stéphane Aulagnier (SFPEM), Guillaume Body (ONCFS), François Le Boulenger (SFPEM), François Moutou (SFPEM), Pierre Rigaux (SFPEM), Sandrine Ruelle (ONCFS)

Experts pour les chauves-souris : Stéphane Aulagnier (SFPEM), Jean-François Julien (CNRS), Michèle Lemaire (Muséum de Bourges)

Experts pour les mammifères marins : Sami Hassani (Océanopolis), Hélène Labach (GIS3M), Vincent Ridoux (SFPEM)

Évaluateurs Liste rouge : Guillaume Gigot (MNHN), Florian Kirchner (UICN France)

**Contributeurs**

Laurent Arthur (Muséum de Bourges), Pierre Benedetti (ONCFS), Grégory Beuneux (GCC), Frédéric Blanc (CEN Midi-Pyrénées), Christophe Borel (CPEPESC Lorraine), Michel Bouche (PN Écrins), Yoann Bressan (ONCFS), Jérôme Cavallès (PN Vanoise), Jean-Louis Chapuis (MNHN), Fabrice Darinot (RNN Marais de Lavours), Marie-Odile Durand (Myotis), Julien Eidenschienck (ONCFS), Pascal Erba (PNR Massif des Bauges), Mathieu Garel (ONCFS), Philippe Gibert (ONCFS), Georges Gonzalez (INRA), Jean-Sébastien Guitton (ONCFS), Rachel Khun (SFPEM), François Léger (ONCFS), Éric Marboutin (ONCFS), Stéphane Marchandeau (ONCFS), Jacques Michallet (ONCFS), Stevan Mondoloni (PNR Corse), Marc Montadert (ONCFS), Mélanie Némouz (CEN Midi-Pyrénées), Christian Pietri (FDC Corse), Françoise Poitevin (EPHE), Sébastien Puechmaile (Univ. Greifswald), Jean-Pierre Quéré (indépendant), Sébastien Roué (SFPEM), Manuel Ruedi (MHNG), Christine Saint-Andrieux (ONCFS), Frédéric Sanchis (ONCFS), Julien Steinmetz (ONCFS), Laurent Tillon (ONF), Olivier Van Canneyt (Univ. La Rochelle), Cécile Vanpé (ONCFS), Cécile Vincent (Univ. La Rochelle) et les membres de la Coordination chiroptères nationale de la SFPEM.

**Réalisation du document** - Hélène Colas (UICN France)

### Les catégories de l'UICN pour la Liste rouge

**EX** : Espèce éteinte au niveau mondial

**RE** : Espèce disparue de France métropolitaine

**Espèces menacées de disparition en France métropolitaine :**

<b>CR</b>	En danger critique
<b>EN</b>	En danger
<b>VU</b>	Vulnérable

L'indication CR\* signale une espèce probablement disparue

**Autres catégories :**

**NT** : Quasi menacée (espèce proche du seuil des espèces menacées ou qui pourrait être menacée si des mesures de conservation spécifiques n'étaient pas prises)

**LC** : Préoccupation mineure (espèce pour laquelle le risque de disparition de France métropolitaine est faible)

**DD** : Données insuffisantes (espèce pour laquelle l'évaluation n'a pas pu être réalisée faute de données suffisantes)

**NA** : Non applicable (espèce non soumise à évaluation car (a) introduite après l'année 1500 ou (b) présente en France métropolitaine de manière occasionnelle ou marginale)

**NE** : Non évaluée (espèce non confrontée aux critères de la Liste rouge mondiale)

### Méthodologie

La méthodologie utilisée pour l'évaluation est celle de l'UICN, décrite dans les deux guides :

- Catégories et critères de l'UICN pour la Liste rouge : Version 3.1 (2012)

- Lignes directrices pour l'application, au niveau régional, des critères de l'UICN pour la Liste rouge : Version 4.0 (2012)

Tous deux sont disponibles en téléchargement à l'adresse : [www.uicn.fr/liste-rouge-mondiale](http://www.uicn.fr/liste-rouge-mondiale)

### Notation des critères de classement

- Pour les espèces menacées, le classement dans l'une des catégories CR, EN ou VU est justifié par les critères (A à E) et sous-critères (1, 2, 3... ; a, b, c... ; i, ii, iii...) dont les seuils sont remplis.

Ex. le Vison d'Europe → Catégorie : CR ; Critères : A4c C2a(i)

- Pour les espèces classées en catégorie NT, les critères ayant conduit à considérer l'espèce proche de la catégorie VU sont précisés à la suite du préfixe « pr. ».

Ex. le Murin de Bechstein → Catégorie : NT ; Critère : pr. A3c

- Pour les espèces dont l'évaluation en métropole a nécessité un ajustement en raison de l'influence de populations extérieures, la catégorie initiale avant ajustement est mentionnée avec ses critères justificatifs, suivie du nombre de degrés dont cette catégorie a été déclassée (-1, -2...) ou surclassée (+1, +2...) dans la seconde étape de l'évaluation pour obtenir la catégorie finale.

Ex. le Phoque gris → Catégorie : NT ; Critère : VU (D1) (-1)

### Tendance d'évolution des populations

↗ : En augmentation   ↘ : En diminution   → : Stable   ? : Inconnue

**Citation des résultats** : UICN France, MNHN, SFPEM & ONCFS (2017). La Liste rouge des espèces menacées en France – Chapitre Mammifères de France métropolitaine. Paris, France.



Ministère de l'Alimentation, de l'Agriculture et de la Pêche  
Institut d'enseignement supérieur et de recherche  
en alimentation, santé animale, sciences agronomiques et de l'environnement

### Sample collection and preparation for toxicological analyses

#### Material :

- Single use surgical blades or cisors
- Plastic containers for sample collection (screw-cap)
- Plastic bags (ziploc® or equivalent)
- Aluminium foil
- Stickers
- Pencils / pens (non erasable, water resistant)
- Pliers
- Scale (0.1g precision)
- Dry ice (preferably) or freeze pack

#### Sampling :

Organs and tissues of interest :

- Liver
- Blubber
- Brain

#### Procedure :

For each organ sampled, a portion (ca 50.0g) should be taken with single use surgical blades. One single piece preferably but several pieces of the same organ for a total weight of 50.0g are acceptable

Place in aluminium foil and then in plastic bags or screw-cap containers


Place stickers and label with individual number or identification code and mention of the organ/tissue (brain, liver, blubber).

Freeze at -20°C (-80°C if possible) as soon as possible after sample collection for at least 24h.

Samples should be sent using rapid transport (24h) using dry ice (preferably) or freeze packs for preservation.



cliquez sur l'image pour accéder au site web : <http://www2.vetagro-sup.fr/ens/toxico/>

 VetAgro Sup Campus Vétérinaire de Lyon	Mode Opérateur Laboratoire de Toxicologie	Code du document : <b>MQ05-MO-PBCD-FO/RE</b> Indice de révision : <b>Version 2</b>
	<b>Dosage du plomb et cadmium</b> Technique AAS-four (Foie et rein)	<u>Lieu de consultation :</u> Laboratoire de Toxicologie

## 1 – Objet

Cette procédure définit la méthodologie à appliquer dans le cadre de l'analyse du Plomb et du Cadmium dans le foie et le rein. L'échantillon est minéralisée à 700°C en présence d'acide sulfurique afin d'éviter les pertes en Pb et Cd. Les cendres sont dissoutes dans une solution d'acide nitrique. La mesure s'effectue par absorption atomique en four avec une cuvette plateforme.

Cette technique permet, dans les conditions citées, le dosage de teneurs comprises en moyenne entre :

- 100 et 1500 µg/kg pour le Plomb
- 25 et 500 µg/kg pour le Cadmium

Pour les échantillons concentrés, se rapporter au paragraphe

**NOTE IMPORTANTE :** l'utilisation de produits dangereux tels que les acides forts doit être effectué sous hotte ventilée avec gants et lunettes.

Chaque changement de cuvette nécessite parfois le contrôle des températures de décomposition et d'atomisation. Le positionnement du capillaire d'injection doit être contrôlé quotidiennement à l'aide de la caméra.

## 2 – Domaine d'application

Cette procédure s'applique à tout le personnel intervenant dans le laboratoire de Toxicologie.


## 3 – Préparation de la vaisselle

La verrerie et les capsules préalablement nettoyées sont trempées dans un bain d'acide nitrique (1) à 10% pendant au moins 6 heures, puis rincée à l'eau pure (utiliser des bains séparés). Toute la vaisselle à usage unique est rincée à l'eau pure avant utilisation afin d'éviter les risques importants de pollution.

## 4 – Matériel et réactifs

- Verrerie de Laboratoire
- Balance analytique (de préférence sensibilité de 0,1 mg)
- Pipettes automatiques avec embout jetables
- Tubes gradués en polypropylène de 10, 30 et 50 mL à usage unique
- Spectromètre d'absorption atomique avec passeur d'échantillon comprenant des godets jetables
- Moulinette pour prélèvements
- (1) Acide nitrique – HNO<sub>3</sub> à 65% pour analyses réf Merck : 1.00452.1000
- (2) Acide nitrique – HNO<sub>3</sub> à 65% suprapur Réf Merck: 1.452.2500
- (3) Acide Sulfurique – H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> à 96% suprapur réf Merck : 1.00714
- (4) Solution étalon de nitrate de Plomb 1000µg/ml–N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>Pb réf Merck : 1.19776
- (5) Solution étalon de cadmium sulfate 1000µg/ml–CdSO<sub>4</sub> réf Merck : 1.19777
- (6) Eau dé ionisée Milli Q+
- (7) Peroxyde d'oxygène 35% réf Merck : 1.08600.1000



 <p>VetAgro Sup Campus Vétérinaire de Lyon</p>	<p>Mode Opérateur Laboratoire de Toxicologie</p>	<p>Code du document : <b>MQ05-MO-PBCD-FO/RE</b> Indice de révision : <b>Version 2</b></p>
	<p><b>Dosage du plomb et cadmium</b> Technique AAS-four (Foie et rein)</p>	<p><u>Lieu de consultation :</u> Laboratoire de Toxicologie</p>

## 5 – Préparation des solutions

- Acide sulfurique dilué au ½ (v/v) à partir du réactif (3)
- Acide nitrique dilué au ½ (v/v) à partir du réactif (2)
- Acide nitrique 10% (v/v) à partir du réactif (2)
- Acide nitrique à 0,5% (v/v) à partir du réactif (2)

## 6 – Préparation des solutions étalons

6.1 – Solution fille de plomb à 20 µg/ml et de Cadmium à 5 µg/ml :  
Introduire dans un tube en polypropylène, à l'aide d'une pipette (vérifiée et étalonnée) 1 mL de solution mère de plomb (4.4) et 0,5 mL de solution mère de Cadmium (4.5) et compléter à 50 ml avec de l'acide nitrique à 0,5%.

6.2 – Solution fille de plomb à 500 ng/ml et de Cadmium à 125 ng/ml :  
Introduire dans un tube en polypropylène, à l'aide d'une pipette (vérifiée et étalonnée) 1 mL de solution fille de Plomb et de Cadmium (6.1) et compléter à 40 ml avec de l'acide nitrique à 0,5%.

6.3 – Solution fille de plomb à 20 ng/ml et de Cadmium à 5 ng/ml :  
Introduire dans un tube en polypropylène, à l'aide d'une pipette (vérifiée et étalonnée) 1 mL de solution fille de Plomb et de Cadmium (6.2) et compléter à 25 ml avec de l'acide nitrique à 0,5%.


## 7 – Préparation des échantillons

Les foies et reins sont moulinsés. (le moulinage doit être presque liquide)  
Peser 0,5 g de prélèvement et les mettre dans un matras

7-1 Minéralisation des échantillons  
Introduire dans chaque matras

	Blanc	Supplémenté	essais
Acide nitrique 65%(2) (ml)	5	5	5
Péroxyde d'oxygène 35% (7) (ml)	1,5	1,5	1,5
eau dé ionisée (6) (ml)	2	1.5	2
Echantillon (g) Foie témoin ou échantillon à doser	0,5	0,5	0,5
Solution 500/125ng/ml (ml) (5.2) 6.2	/	0.5	/

Concentration finale de 10 ng/ml en plomb et 2.5 ng/ml en cadmium pour l'essai supplémenté.

 VetAgro Sup Campus Vétérinaire de Lyon	Mode Opérateur Laboratoire de Toxicologie	Code du document : <b>MQ05-MO-PBCD-FO/RE</b> Indice de révision : <b>Version 2</b>
	<b>Dosage du plomb et cadmium</b> Technique AAS-four (Foie et rein)	<u>Lieu de consultation :</u> Laboratoire de Toxicologie

### 7-2 Préparation des essais

Le digestat est transféré dans les tubes en polypropylène, rincer le matras avec de l'eau déionisée et transférer dans le tube. Compléter à 25 ml avec de l'eau déionisée et agiter au vortex

### 8 – Gamme d'étalonnage

Placer sur le passeur d'échantillon en position R2 et R3 et dans le flacon « WASH » de l'acide nitrique à 0,5% (cf §5).

Placer la solution étalon à 20 et 5ng/ml de Plomb et de Cadmium en position R1.

Sélectionner la touche « étalons partagés » au niveau du logiciel.

Effectuer au minimum 2 mesures sur chaque point.

Sélectionner dans le programme la cuvette : plateforme

Utiliser la méthode d'ajustement quadratures des moindres carrés.

#### 8.1 – Le Plomb

La courbe d'étalonnage est constituée de 5 points avec des concentrations allant de 2 à 20 ng/ml.

#### 8.2 – Le Cadmium

La courbe d'étalonnage est constituée de 5 points avec des concentrations allant de 0,5 à 5ng/ml.

### 9 – Conditions analytiques

#### 9.1 – Le Plomb

Longueur d'onde : 217,0 nm

Correction de fond : Zeeman – lampe à 90%

Signal : aire transitoire (calcul effectué sur les surfaces)

Température d'injection : 60°C

Le volume d'injection est fixe pour chaque échantillon et représente 20µL

Phase	Temp. (°C)	Palier (sec)	Montée (°C/sec)	Débit de gaz	Commandes
1	130	20	20	0,3 l/min	
2	500	5	100	0,3 l/min	
3	2000	2	0	Arrêt	LE CT
4	2500	3	0	0,3 l/min	CT

LE : Lecture

CT : Contrôle de la température

Temps d'analyse : 37,2 sec

#### 9.2 – Le Cadmium


Longueur d'onde : 228,8 nm

Correction de fond : Zeeman – lampe à 80%

Signal : aire transitoire

Température d'injection : 60°C

Le volume d'injection est fixe pour chaque échantillon et représente 20µL

 <b>VetAgro Sup</b> Campus Vétérinaire de Lyon	Mode Opérateur Laboratoire de Toxicologie	Code du document : <b>MQ05-MO-PBCD-FO/RE</b> Indice de révision : <b>Version 2</b>
	<b>Dosage du plomb et cadmium</b> Technique AAS-four (Foie et rein)	<u>Lieu de consultation :</u> Laboratoire de Toxicologie

Phase	Temp. (°C)	Palier (sec)	Montée (°C/sec)	Débit de gaz	Commandes
1	110	10	10	0,2 l/min	
2	300	10	10	0,3 l/min	
3	1500	3	0	Arrêt	LE CT
4	2100	3	0	0,3 l/min	CT

LE : Lecture

CT : Contrôle de la température

Temps d'analyse : 50 sec

### 10 – Analyse des essais

Les échantillons sont placés dans des positions de 1 à 60.

Le volume d'injection est de 20 µl.


Utiliser la dilution intelligente pour els essais trop concentrés.

Ne pas descendre en dessous de 2 µL injecté.

Procéder à la dilution des essais si nécessaire dans des tubes en polypropylène avec de l'acide nitrique à 0,5% (cf §5).

Noter la valeur de l'étalon et de l'essai supplémenté sur la fiche de contrôle

<b>Rédigé par :</b>	<b>Revue par :</b>	<b>Approuvé par :</b>
<b>Danièle VEY</b>	<b>Fonction : Responsable Technique</b> <b>Nom : ESPANA Bernadette</b> <b>Date :</b> <b>Visa :</b>	<b>Nom : Philippe BERNY</b> <b>Fonction : Directeur</b> <b>Date :</b> <b>Visa :</b>

	<p>Mode Opérateur Laboratoire de Toxicologie</p>	<p>Code du document : <b>MQ05-MO-HG-FO/RE</b> Indice de révision : <b>Version 2</b></p>
	<p><b>Dosage du mercure</b> Technique AAS-Hydrures (Foie, muscle, rein)</p>	<p>Lieu de consultation : Laboratoire de Toxicologie</p>

### 1 – Objet

Cette procédure définit la méthodologie à appliquer dans le cadre de la détermination du mercure dans le foie, muscle et le rein par spectrométrie d'absorption atomique après minéralisation humide par micro-ondes.

La méthode est basée sur la méthode AFSSA Met.01

**NOTE IMPORTANTE :** Port de gants et lunettes lors de manipulations sur le passeur et du dosage dans le spectromètre.

Attention à bien mettre les lunettes et les gants lors des manipulations de la soude et du borohydrure, la soude a une action très forte sur les muqueuses.

### 2 – Domaine d'application

Cette procédure s'applique à tout le personnel intervenant dans le laboratoire de Toxicologie.

### 3 – Préparation de la vaisselle

La vaisselle doit être nettoyée selon les instructions INAA0701 à INAA0706

### 4 – Matériel et réactifs

- Minéralisateur à micro-ondes Ethos plus
- Réacteurs pour Ethos plus
- Agitateur magnétique
- Pipettes automatiques avec embout jetables
- Spectromètre d'absorption atomique équipé d'une lampe de mercure EDL alimentée par un système modulateur de fréquence.
- FIAS Perkin Elmer
- Cellule pour le mercure
- Balance analytique
- Pipette automatique avec embout jetable
- Eau MilliQ
- Papier filtre sans cendres Wattman 541 Réf Prolabo: 00 659 062
- Acide nitrique à 65% pro analyse réf Merck : 1.00452.1000
- Acide Nitrique à 65% suprapur Réf Merck: 1.452.2500
- Acide chlorhydrique fumant à 30% réf Merck: 1.05043.0250
- Permanganate de potassium réf Fluka : 60458
- Borohydrure de Sodium réf Merck : 6371.0100
- Péroxyde d'hydrogène à 35% pour analyse réf Merck : 1.08600.1000
- Solution étalon de mercure à 1000mg/L Merck


### 5 – Préparation des solutions

5.1 – Solution stock d'Arsenic à 10 mg/L (conservé au frigo pendant un mois)

Dans une fiole jaugée de 100mL, introduire 1mL de la solution étalon d'Hg, ajouter 5mL d' $\text{HNO}_3$  à 65% et ajuster à 100mL avec de l'eau MilliQ.

5.2 – Solution d'ajout à 500  $\mu\text{g/L}$  d'Hg (conservé au frigo pendant une semaine)

Dans une fiole jaugée de 100mL, introduire 5mL de la solution stock d'Hg à 10mg/L (5.1), ajouter 5mL d' $\text{HNO}_3$  à 65% et ajuster à 100 mL avec de l'eau MilliQ.

 <b>VetAgro Sup</b> Campus Vétérinaire de Lyon	Mode Opératoire Laboratoire de Toxicologie	Code du document : <b>MQ05-MO-HG-FO/RE</b> Indice de révision : <b>Version 2</b>
	<b>Dosage du mercure</b> Technique AAS-Hydrures (Foie, muscle, rein)	Lieu de consultation : Laboratoire de Toxicologie

5.3 – Solution de permanganate de potassium à 64% (se conserve pendant un mois au noir)  
 Peser 6,4 gde permanganate de potassium et ajuster dans une fiole de 100 ml avec de l'eau milli.

5.4 – Solution de peroxyde d'hydrogène à 0,05%  
 Dans une fiole jaugée de 1000mL, mettre de l'eau MilliQ puis introduire 1,56mL de Soude à 32% et compléter à 1000mL avec l'eau MilliQ.

5.5 – Solution de borohydrure à 0,2%  
 Peser 2g de borohydrure et le dissoudre dans un bécher avec une solution de soude à 0,05% sur un agitateur magnétique. Verser le contenu du bécher dans la fiole de 1000mL contenant de la Soude (Filtrer sur papier Wattman).  
 Cette solution peut être préparée et conservée au frigo pendant 3 jours.

5.6 – Solution d'acide chlorhydrique dilué à 5%  
 Dans une fiole de 1000mL, introduire 50mL de la solution de HCl à 30%. Compléter et ajuster avec de l'eau MilliQ.

5.7 – Solution d'acide nitrique dilué à 10%  
 Dans une fiole de 1000mL, introduire 100mL de la solution de HNO<sub>3</sub> à 65%. Compléter et ajuster avec de l'eau MilliQ


## 6 – Solutions d'étalonnage

Concentration	Solution à 500 µg/l (5-2)	Permanganate (5-3)	HNO <sub>3</sub> à 65% suprapur dilué à 10% (5-7)	Eau MilliQ
Blanc St0	0 ml	2 ou 3 gouttes	10 ml	q.s.p. 100 ml
St1 5µg/L	1 ml	2 ou 3 gouttes	10 ml	q.s.p. 100 ml
St2 10µg/L	2 ml	2 ou 3 gouttes	10 ml	q.s.p. 100 ml
St3 15µg/L	3 ml	2 ou 3 gouttes	10 ml	q.s.p. 100 ml
St4 20µg/L	4 ml	2 ou 3 gouttes	10 ml	q.s.p. 100 ml

## 7 – Préparation des échantillons

N° matras	Zéro	essais	SUP
Prise d'essai	0	P	P
Sol Ajouts à 500 µg/l (5-2)	0	0	1mL
Eau milli	1ml	0	0 ml
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 0.05 % (5-4)	1,5 ml	1,5 ml	1,5 ml
HNO <sub>3</sub> 10 % (5-7)	6 ml	6 ml	6 ml

Mixer les prélèvements

 <p>VetAgro Sup Campus Vétérinaire de Lyon</p>	<p>Mode Opérateur Laboratoire de Toxicologie</p>	<p>Code du document : <b>MQ05-MO-HG-FO/RE</b> Indice de révision : <b>Version 2</b></p>
	<p><b>Dosage du mercure</b> Technique AAS-Hydrures (Foie, muscle, rein)</p>	<p>Lieu de consultation : Laboratoire de Toxicologie</p>

Pour les produits gras (poissons, foie, muscle) = pesée 1 g dans le matras de minéralisation

Lait 1 ml  
Fromage ou lait en poudre 1g + 1 ml eau milli

Peser un échantillon en triple pour pouvoir faire un ajout

Faire un ajout par série de minéralisation et un blanc.

Si la récupération du minéralisât est de 50 ml ajouter 1 ml de la solution à 500 µg/l. pour les volumes inférieur de volume faire une règle de trois pour toujours obtenir 10 ng/ml au final. Sinon noter la valeur.

Pour les produits laitiers récupérer dans 15 ml.

Rq : La masse la plus importante doit se trouver dans le réacteur 0 qui porte la sonde car il sera le plus réactif.

Pour les produits gras (poissons par exemple) : 0,5 ou 1g dans le matras

8 ml d'HNO<sub>3</sub>  
2 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>  
1 ml d'eau milli

### 8 – Reprise des échantillons

A la fin de la minéralisation, après l'oxydation avec l'eau oxygénée, il n'y a plus de résidu et le minéralisât est vert.

Sortir les réacteurs de l'Ethos plus. Après refroidissement, transvaser le contenu des matras dans des tubes Falcon gradués de 50 ml, sans rincer. Placer les tubes bouchés dans le congélateur.

Le jour de l'analyse, mettre suffisamment tôt de l'eau milli au congélateur. Quand elle est froide, la sortir ainsi que les tubes du congélateur pour reprendre le minéralisât.

Ajouter du permanganate (5-3) jusqu'à l'obtention d'une solution violette.

Ajuster à 50 ml avec de l'eau milli préalablement mise au congélateur. Laisser couler l'eau doucement le long de la paroi du tube penché.

Boucher les tubes et agiter par retournement.

Filter sur papier-filtre Wattman sans cendres, dans d'autres tubes Falcon.

### 9 – Dosage au spectrophotomètre

Spectrophotomètre Perkin Analyst, équipé d'un passeur FIAS :

Régler l'intensité de la lampe EDL à 180 mA avec la modulation. (Lumière verte).

Laisser chauffer au moins 1 heure la lampe.

Fente 0,7


Longueur d'onde : 193,7 nm

Changer les tuyaux et la cellule du FIAS si ils ont été utilisés pour doser le mercure la fois précédente.


Changer le passeur de la façon suivante :

- Etalonnage
- Eau MilliQ
- Echantillons
- Eau milli
- Ajout
- Standard 4
- Standard 0
- (recommencer à partir du blanc s'il y a d'autres fours)

Les résultats sont imprimés sur le logiciel de l'imprimante.

 <b>VetAgro Sup</b> Campus Vétérinaire de Lyon	Mode Opérateur Laboratoire de Toxicologie	Code du document : <b>MQ05-MO-HG-FO/RE</b> Indice de révision : <b>Version 2</b>
	<b>Dosage du mercure</b> Technique AAS-Hydrures (Foie, muscle, rein)	<u>Lieu de consultation :</u> Laboratoire de Toxicologie

<b>Rédigé par :</b>	<b>Revue par :</b>	<b>Approuvé par :</b>
<b>Danièle VEY</b>	<b>Fonction : Responsable Technique</b> <b>Nom : ESPANA Bernadette</b> <b>Date :</b> <b>Visa :</b>	<b>Nom : Philippe BERNY</b> <b>Fonction : Directeur</b> <b>Date :</b> <b>Visa :</b>

 VetAgro Sup Campus Vétérinaire de Lyon	Mode Opérateur Laboratoire de Toxicologie	Code du document : <b>MQ05-MO-OC/PCB</b> Indice de révision : <b>Version 1</b>
	<b>Dosage des organochlorés et PCB</b> (appât, foie, sang, lait, contenu gastrique)	<u>Lieu de consultation :</u> Laboratoire de Toxicologie

### 1 – Objet

Cette procédure définit la méthodologie à appliquer dans le cadre de l'analyse des organochlorés et PCB par GC-ECD dans des matrices telles que l'appât et le foie.

### 2 – Domaine d'application

Cette procédure s'applique à tout le personnel intervenant dans le laboratoire de Toxicologie.

### 3 – Matériel et réactifs

- Verrerie de Laboratoire
- Filtre 1 PS
- Hexane
- Acétone
- Acide sulfurique fumant
- Acide chlorhydrique fumant 37 %
- Eau déminéralisée
- Potasse (KOH)
- Vials

### 4-Préparation des solutions


- Mélange d'acides : mélanger 650 ml d'acide sulfurique fumant et 350 ml d'acide chlorhydrique fumant
- Solvant d'extraction : 750 ml d'hexane et 250 ml d'acétone (à adapter selon le nombre d'essai)
- Potasse Alcoolique : pesée 2 g de KOH et dissoudre dans 100 ml d'Ethanol

### 5 – Préparation des échantillons :

#### 5-1 cg, appât et foie : extrait 1

- 1) Peser 1 g de prélèvement dans un tube falcon
- 2) Ajouter 30 ml du mélange hexane/acétone (75/25)
- 3) Broyer
- 4) Centrifuger à 3000 tr/min pendant 10 minutes
- 5) Filtrer sur un filtre 1PS et récupérer le filtrat dans un ballon de 100 ml
- 6) Ajouter de nouveau 30 ml du mélange hexane/acétone (75/25)
- 7) Broyer
- 8) Centrifuger à 3000 tr/min pendant 10 minutes
- 9) Récupérer le filtrat comme précédemment
- 10) Evaporer à sec le ballon (60°)
- 11) Reprendre le résidu sec avec 10 ml d'hexane
- 12) Passer le ballon à l'ultra son pendant 5 minutes
- 13) Prélever 5 ml d'hexane dans un tube vissé
- 14) faire la ou les purifications sur cet extrait 1



 VetAgro Sup Campus Vétérinaire de Lyon	Mode Opérateur Laboratoire de Toxicologie	Code du document : <b>MQ05-MO-OC/PCB</b> Indice de révision : <b>Version 1</b>
	<b>Dosage des organochlorés et PCB</b> (appât, foie, sang, lait, contenu gastrique)	Lieu de consultation : Laboratoire de Toxicologie

#### 5-2 sang et lait : extrait 2

- 1) 1 ml de prélèvement dans un tube visé
- 2) Ajouter 5 ml du mélange hexane/acétone (75/25)
- 3) Agiter
- 4) Centrifuger à 3000 tr/min pendant 10 minutes
- 5) Récupérer le surnageant dans un ballon de 50 ml
- 6) Ajouter de nouveau 5 ml du mélange hexane/acétone (75/25)
- 7) Agiter au vortex
- 8) Centrifuger à 3000 tr/min pendant 10 minutes
- 9) Récupérer le filtrat comme précédemment
- 10) Evaporer à sec le ballon (60°)
- 11) reprendre le ballon par 10 ml d'hexane
- 12) Passer le ballon à l'ultra son pendant 5 minutes
- 13) prélever 5 ml d'hexane dans un tube vissé
- 14) Faire la ou les purifications sur cet extrait 2

#### 5-3 Graisse : extrait 3

- 1) Faire fondre un morceau de graisse sur une plaque chauffante
- 2) Recueillir 200 µl de graisse dans un tube vissé
- 3) ajouter 5 ml d'hexane
- 4) Faire la ou les purifications sur cet extrait 3


### 6- Purifications

#### 6-1 purification pour les OC

- A partir de 5 ml d'extrait 1, 2 ou 3
- 1) Ajouter 2 ml du mélange d'acide dans le tube vissé
  - 2) Agiter au vortex
  - 3) Centrifuger à 4000 tr/min pendant 10 minutes
  - 4) Récupérer la phase hexane (surnageant) dans un tube à essai
  - 5) Prendre 1 ml et mettre en vial
  - 6) Passer en chromatographie phase gazeuse, méthode OC1

#### 6-2 purification pour les PCB : Hydrolyse alcaline

- A partir de 1 ml d'extrait 1, 2 ou 3
- 1) Ajouter 1 ml de potasse alcoolique à 2%
  - 2) revisser le tube immédiatement
  - 3) Agiter pendant ½ heures dans un bain marie à 50°C
  - 4) Après refroidissement du tube, ajouter 2 ml d'eau distillée lavée à l'hexane
  - 5) Agiter vigoureusement pendant 2 minutes au vortex
  - 6) Centrifuger à 3000 tr/min pendant 10 minutes
  - 7) Le surnageant (phase hexane) est transvasé dans un tube vissé
  - 8) Purifier avec 0,5 ml de mélange d'acide
  - 9) Agiter au vortex
  - 10) Centrifuger à 4000 tr/min pendant 10 minutes
  - 11) Récupérer le surnageant et le mettre dans un vial muni d'un insert
  - 12) Passer en chromatographie phase gazeuse, méthode PCB

 VetAgro Sup Campus Vétérinaire de Lyon	Mode Opérateur Laboratoire de Toxicologie	Code du document : <b>MQ05-MO-OC/PCB</b> Indice de révision : <b>Version 1</b>
	<b>Dosage des organochlorés et PCB</b> (appât, foie, sang, lait, contenu gastrique)	<u>Lieu de consultation :</u> Laboratoire de Toxicologie

### 7- Préparation des étalons

A partir des solutions commerciales à 10 µg/ml dans le cyclohexane

#### Organochlorés à 0,01 ppm (OC1)

Dans une fiole de 10 ml, introduire 10 µl de chaque solution mère commerciales à 10 µg/ml dans le cyclohexane : lindane, Heptachlore, Heptachlore Hépoxyde, Aldrine, Endosulfan Alpha, Endosulfan Beta, Endosulfan Sulfate et ajuster au trait de jauge avec de l'hexane

#### Organochlorés à 0,01 ppm (OC2)

Dans une fiole de 10 ml, introduire 10 µl de chaque solution mère de : DDD 2,4', DDE 2,4', DDT 2,4' et ajuster au trait de jauge avec de l'hexane

#### Organochlorés à 0,01 ppm (OC3)

Dans une fiole de 10 ml, introduire 10 µl de chaque solution mère de : DDD 4,4', DDE 4,4', DDT 4,4' et ajuster au trait de jauge avec de l'hexane

#### Organochlorés à 0,01 ppm (OC4) sauf dicofol à 0.2 ppm

Dans une fiole de 10 ml, introduire 10 µl de chaque solution mère commerciales à 10 µg/ml dans le cyclohexane : endrin, diendrin, Alpha HCH, trans chlordane, cis chlordane, oxy chlordane et 200 µl de dicofol ajuster au trait de jauge avec de l'hexane

#### PCB à 0,01 ppm

Dans une fiole de 10 ml, introduire 10 µl de solution MIX 20 commerciale à 10 µg/ml dans le cyclohexane et ajuster au trait de jauge avec de l'hexane

Solutions stables maximum 24 h.

### 8 – Dosage en CPG

#### Analyse quantitative pour le OC

- Appareil : GC-ECD 6850 Série Agilent Technologie
- Colonne : HP1 Agilent Technologie 30m-0,320mm-0,25µm
- Insert : HP simple restreint 5183- Débit d'hélium : 2 ml/min
- Injecteur t° 230 °C : splitless 1 min
- Détecteur ECD : 300°C make up : 60 ml/min


Gradient de température pour les Organochlorés : méthode OC1

	°C/min	Next °C	Hold min
		100	2,00
Ramp 1	20,00	220	5
Ramp 2	20,00	260	0,0
Post run		200	2,00

Injection d'hexane entre chaque essai : 2 µl

Volume injecté : 2 µl pour les essais et les étalons

Durée de l'analyse : 17 min

 VetAgro Sup Campus Vétérinaire de Lyon	<b>Mode Opérateur</b> <b>Laboratoire de Toxicologie</b>	Code du document : <b>MQ05-MO-OC/PCB</b> Indice de révision : <b>Version 1</b>
	<b>Dosage des organochlorés et PCB</b> (appât, foie, sang, lait, contenu gastrique)	Lieu de consultation : Laboratoire de Toxicologie

Composés	Tr en min	mélange
gamma HexaChloroCycloHexane (lindane)	7.208	OC1
Heptachlor	7.627	OC1
Aldrine	8.514	OC1
exo epoxyde cis heptachlor	8.956	OC1
alpha Endosulfan	9.423	OC1
béta Endosulfan	10.009	OC1
Endosulfan sulfate	10.927	OC1
2,4'-DDD	9.857	OC2
2,4'-DDE	10.538	OC2
2,4'-DDT	11.421	OC2
4,4 DDD	10.428	OC3
4,4'-DDE	11.251	OC3
4,4'-DDT	12.325	OC3
alpha HexaChloroCycloHexane	7.310	OC4
Dicofol	9.019	OC4
oxy Chlordane	9.483	OC4
trans Chlordane	9.776	OC4
cis Chlordane	10.058	OC4
dieldrin	10.475	OC4
endrin	10.856	OC4

Béta HCH donne 2 pics qui traînent et interfèrent avec l'heptachlore.  
Le trans-nonachlor interfère avec le cis chlordane et ne sera donc pas utilisé comme EI.


#### Gradient de température pour les PCB

- Appareil : GC-ECD 6850 Série Agilent Technologie
- Colonne : HP1 Agilent Technologie 30m-0,320mm-0,25µm
- Insert : HP simple restreint 5183- Débit d'hélium : 1 ml/min
- Injecteur t° 230 °C : splitless 1 min
- Détecteur ECD : 300°C make up : 60 ml/min

	°C/min	Next °C	Hold min
		120	1,00
Ramp 1	8,00	270	15,00
Ramp 2	20,00	285	1,00

Injection d'hexane entre chaque essai : 2 µl  
Volume injecté : 2 µl pour les essais et les étalons


Durée de l'analyse : 36.5 min

 VetAgro Sup Campus Vétérinaire de Lyon	Mode Opérateur Laboratoire de Toxicologie	Code du document : <b>MQ05-MO-OC/PCB</b> Indice de révision : <b>Version 1</b>
	<b>Dosage des organochlorés et PCB</b> (appât, foie, sang, lait, contenu gastrique)	Lieu de consultation : Laboratoire de Toxicologie

Composition mix 20

Composés	TR en min
PCB No. 28	12.609
PCB No. 31	12.609
PCB No. 52	13.312
PCB No 77	14.665
PCB No. 101	15.324
PCB No. 105	16.203
PCB No. 118	16.716
PCB No. 126	17.222
PCB No. 128	17.222
PCB No 138	17.222
PCB No. 153	17.753
PCB No. 156	18.011
PCB No. 169	18.276
PCB No. 170	18.853
PCB No. 180	19.234

<b>Rédigé par :</b>	<b>Revue par :</b>	<b>Approuvé par :</b>
<b>B. ESPANA</b>	<b>Fonction : Responsable Technique</b> <b>Nom : ESPANA Bernadette</b> <b>Date :</b> <b>Visa :</b>	<b>Nom : Philippe BERNY</b> <b>Fonction : Directeur</b> <b>Date :</b> <b>Visa :</b>

 VetAgro Sup Campus Vétérinaire de Lyon	Mode Opérateur Laboratoire de Toxicologie	Code du document : <b>MQ05-MO-OP</b> Indice de révision : <b>Version 2</b>
	<b>Dosage des organophosphorés</b> (appât, contenu stomacal)	<u>Lieu de consultation :</u> Laboratoire de Toxicologie

### 1 – Objet

Cette procédure définit la méthodologie à appliquer dans le cadre de l'analyse des organophosphorés par GC-MS dans des matrices telles que l'appât, le contenu stomacal.

### 2 – Domaine d'application

Cette procédure s'applique à tout le personnel intervenant dans le laboratoire de Toxicologie.

### Note importante

**Travailler sous la hotte et le port des gants et de la blouse sont obligatoires.**

### 3 – Matériel et réactifs

- Verrerie de Laboratoire
- Tube Falcon de 50 ml
- Tube à essai
- Filtre 1 PS
- Pipette à répétition
- Pointes de distribution
- Dichlorométhane, hexane et méthanol
- Vial
- Insert
- Bouchons
- Appareil d'extraction sous vide

### 4 – Préparation des échantillons :

- 1) Peser 2g de prélèvement dans un tube Falcon + ou – 0,1g et le noter sur la fiche
- 2) Ajouter 20 ml de dichlorométhane au distributeur automatique
- 3) Agiter à l'agitateur rotatif multifonction 10 min
- 3') en cas d'analyse sur du foie passer l'essai au turrax
- 4) Centrifuger à 3000trs/min pendant 10 min
- 5) Filtrer le surnageant sur un filtre 1PS dans un ballon de 100 ml
- 6) Ajouter 20 ml d'hexane sur le culot d'extraction
- 7) Agiter à l'agitateur rotatif multifonction et verser sur le même filtre 1PS
- 8) Evaporer à sec, sous vide et à 40°C + ou – 5°C
- 9) Reprendre le ballon avec ? ml de méthanol avec une pipette automatique
- 10) récupérer dans un tube à essai de 10 ml
- 11) centrifuger 3000trs/min pendant 10 min
- 12) mettre le surnageant en vial et analyser en GC-MS

 VetAgro Sup Campus Vétérinaire de Lyon	Mode Opérateur Laboratoire de Toxicologie	Code du document : <b>MQ05-MO-OP</b> Indice de révision : <b>Version 2</b>
	<b>Dosage des organophosphorés</b> (appât, contenu stomacal)	Lieu de consultation : Laboratoire de Toxicologie

### 5- Préparation des solutions étalons et de contrôle

Solutions commerciales (Dr Ehrenstorfen) d'organophosphorés :  
10 µg/ml dans le cyclohexane

composés	N°	Mélange à 2µg/ml	q.s.p. 20 ml d'hexane
Chlorpyrifos éthyl	OP1	4 ml	8 ml d'hexane
Chlorpyrifos-méthyl		4 ml	
dichlorvos		4 ml	
Diazinon	OP2	4 ml	4 ml d'hexane
Méthiocarb		4 ml	
Carbofuran		4 ml	
Parathion-ethyl		4 ml	
Malathion	OP3	4 ml	
Cis-Mévinphos		4 ml	
Pirimiphos-éthyl		4 ml	
Terbufos		4 ml	
Benfuracarb		4 ml	


#### Essais blanc et supplémentés de contrôle :

Pour chaque série d'échantillons préparer un essai blanc et un essai supplémenté à 2 µg/ml final pour le contrôle de l'extraction et de la méthode. Alternier les mélanges pour effectuer les supplémentés.

Ajouter 1.5 ml de solution à 2 µg/ml à 2 g d'essai blanc.

### 6- Passage en GC-MS : Méthode ORGANOP pour l'analyse


- Appareil : Agilent technologie 6890 N
- Colonne HP-5MS-30m-250µm-0,25µm : référence 19091S-433
- Insert : simple retreint 5183-4693
- Injecteur 250°C
- Splitless 0.5 min gaz : hélium 40 ml/min
- Détecteur MSD : 280 °C
- Débit : 2,0 ml
- Volume injecté : 2 µl
- Injection d'hexane entre chaque analyse
- Durée de l'analyse : 16.7 min
- Gradient de température :
  - 100°C pendant 2 min
  - 50°C/min jusqu'à 190°C pendant 6min
  - 50°C/min jusqu'à 220°C pendant 3min
  - 60°C/min jusqu'à 300°C pendant 2min

 <b>VetAgro Sup</b> Campus Vétérinaire de Lyon	<b>Mode Opérateur</b> <b>Laboratoire de Toxicologie</b>	Code du document : <b>MQ05-MO-OP</b> Indice de révision : <b>Version 2</b>
	<b>Dosage des organophosphorés</b> (appât, contenu stomacal)	<u>Lieu de consultation :</u> Laboratoire de Toxicologie

composés	Tr	lons	Méthode de traitement des données
dichlorvos	3.66 min	109-185-220	OrganoP1
Chlorpyrifos-méthyl	8.3 min	286-288-290	
Chlorpyrifos éthyl	10.04 min	197-199-97-314	
<b>Carbofuran</b>	<b>3.94 min</b>	<b>149-164-131-122</b>	OrganoP2
<b>Méthiocarb</b>	<b>5.16 min</b>	<b>168-153-109-91</b>	
<b>Diazinon</b>	<b>7.01 min</b>	<b>137-179-199-304</b>	
<b>Parathion-ethyl</b>	<b>8.53 min</b>	<b>97-109-291-139</b>	
<b>Cis-Mévinphos</b>	<b>4.41 min</b>	<b>127-97-192-164</b>	organoP3
Terbufos	6.77 min	231-153-186-288	
Malathion	9.62 min	125-173-127-158	
Pirimiphos-éthyl	10.55 min	290-276-305	

Analyser chaque essai avec les 3 techniques de traitement des données pour vérifier la présence d'un composé.

<b>Rédigé par :</b> B. ESPANA	<b>Revu par :</b> Nom : Bernadette ESPANA Date : 5/09/17 Visa :	<b>Approuvé par :</b> Nom : Philippe BERNY Fonction : Directeur Date : Visa :
----------------------------------	--	---

 <p>VetAgro Sup Campus Vétérinaire de Lyon</p>	Mode Opérateur Laboratoire de Toxicologie	Code du document : <b>MQ05-MO-PYRE</b> Indice de révision : <b>Version 2</b>
	<b>Dosage des pyréthrinoïdes</b> (appât, foie)	<u>Lieu de consultation :</u> Laboratoire de Toxicologie

### 1 – Objet

Cette procédure définit la méthodologie à appliquer dans le cadre de l'analyse des pyréthrinoïdes dans des matrices telles que l'appât et le foie par GC-ECD.

### 2 – Domaine d'application

Cette procédure s'applique à tout le personnel intervenant dans le laboratoire de Toxicologie.

### 3 – Matériel et réactifs

- Verrerie de Laboratoire
- Sulfate de Sodium anhydre
- Filtre PS
- Méthanol et éthanol
- Vials

### 4 – Extraction

- 1) Peser 2g de prélèvement dans un falcon contenant 5g de sulfate de sodium anhydre
- 2) Ajouter 30 mL d'éthanol
- 3) Agiter à l'agitateur rotatif multifonction pendant 10 min
- 4) Centrifuger à 3000 tours/minutes pendant 10 min
- 5) Filtrer sur un filtre 1PS et récupérer le filtrat dans un ballon d'évaporation
- 6) Evaporer à sec 80°
- 7) Reprendre le résidu sec avec 2 ml de méthanol
- 8) Centrifuger l'échantillon si nécessaire
- 9) Mettre en vial pour l'analyse en CPG

### 5 – Solutions mères d'étalons commerciales à 10 µg/ml dans le cyclohexane

Conserver ces solutions 1 an à -20 °C

### 6-Préparation des étalons en mélanges


#### 6-1 Mélange 1 à 0.1 et 0.5ppm

Téfluthrine : 50 µl soit 0.1 ppm  
Deltaméthrine : 250 µl soit 0.5 ppm  
Cyperméthrine : 250 µl soit 0.5 ppm  
compléter à 5 ml avec du méthanol.

#### 6-2 Mélange 2 à 0.5 ppm

Bioallethrin : 250 µl soit 0.5 ppm  
Fenvalerate : 250 µl soit 0.5 ppm  
Cyfluthrine : 250 µl soit 0.5 ppm  
Perméthrine (cis et trans) : 250 µl soit 0.5 ppm  
Cyhalothrine : 250 µl soit 0.5 ppm  
compléter à 5 ml avec du méthanol



 <b>VetAgro Sup</b> Campus Vétérinaire de Lyon	Mode Opérateur Laboratoire de Toxicologie	Code du document : <b>MQ05-MO-PYRE</b> Indice de révision : <b>Version 2</b>
	<b>Dosage des pyréthrinoïdes</b> (appât, foie)	<u>Lieu de consultation :</u> Laboratoire de Toxicologie

Essais blanc et supplémentés de contrôle :

Pour chaque série d'échantillons préparer un essai blanc et un essai supplémenté à 0.5 µg/ml final pour le contrôle de l'extraction et de la méthode.

Ajouter 2 ml de solution mélange 1 ou 2 à 2 g d'essai blanc pour les appâts et contenu

**7- Analyse quantitative en GC-ECD**

**Méthode PYRETHRE**



- Appareil : GC-ECD 6850 série *Agilent technologies*
- Colonne : HP-1 *Agilent technologies* – 30m, 0,320, 0,25 µm
- Insert : HP simple retreint 5183-4683 avec laine de verre.
- Injecteur 190° - Détecteur : 320°
- Débit : 2 ml/min - Volume injection 2 µl
- Durée de l'analyse : 24.2 min
- Injection d'hexane entre chaque analyse
- gradient température :

Oven ramp	°C/min	Next °C	Hold
initial		120	1min
Ramp 1	25,00	250	18min

composés	Tr en min	C en ppm	LOQ	Rdt %
Téfluthrin	5.41	0.1	0.01	79
Cyperméthrin	11.56	0.5	0.05	88
	11.75		0.05	114
	11.91		0.1	76
	11.99		0.1	92
Deltaméthrin	14.99	0.5	0.02	103
	15.66		0.03	88
bioallethrin	6.36	0.5		
cyhalothrin	9.02	0.5		
	9.24			
Trans perméthrin	9.89	0.5		
Cis perméthrin	10.04			
cyfluthrin	11.02	0.5		
	11.17			
	11.33			
	11.41			
fenvalerate	13.54	0.5		
	14.10			

Certains composés présentent d'autres pics minoritaires non cités dans ce tableau  
 Attention certains pics disparaissent lorsque le liner est saturé. Le changer régulièrement et encadrer chaque série d'analyse d'injection d'étalons.

<b>Rédigé par :</b> <b>Danièle VEY</b>	<b>Revu par :</b> <b>Nom : Bernadette ESPANA</b> <b>Date : 11/09/17</b> <b>Visa :</b>	<b>Approuvé par :</b> <b>Nom : Philippe BERNY</b> <b>Fonction : Directeur</b> <b>Date :</b> <b>Visa :</b>
---	--	---

 	Mode Opérateur Laboratoire de Toxicologie	Code du document : <b>TOX-MO018-E05</b> Indice de révision : <b>Version 1</b>
	<b>Dosage des pesticides par LC-MS/MS</b> Foie	Lieu de consultation : Laboratoire de Toxicologie

## Objet

Cette procédure définit la méthodologie à appliquer dans le cadre de l'analyse quantitative des pesticides dans le foie (**PEST 5**).

### 1. Domaine d'application

Cette procédure s'applique à tout le personnel intervenant dans le laboratoire de toxicologie.

**Note importante** : Travailler sous la hotte - Le port des gants, des lunettes de protection et de la blouse sont obligatoires.

### 2. Matériel et réactifs



- Spatule
- Multipipette automatique + combitips
- Vials, insert et bouchons
- Tubes Ultra Turrax (ref. DT-20 IKA)
- Seringues et filtres (ref. RC membrane 0,2 µm, 4 mm syringe filters)
- MeOH LC-MS grade Hipersolv Chromanorm for HPLC – Ultra LC-MS VWR (réf. 85800.320)
- Acétonitrile for HPLC LC-MS grade VWR (réf. 83640.320P)
- Eau MilliQ
- Acide formique > 98% Sigma-Aldrich (ref. 33015-1L-M)
- Formiate d'ammonium (ref. IU655417 VWR)
- Sels QuEChERS : Extraction kit 4g MgSO<sub>4</sub> / 1 g NaCl Original 50 mL Interchim réf : JO3920
- Tubes dSPE : Custom QuEChERS 900 mg Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> / 150 mg C18 / 50 mg PSA 15 mL réf : AYPMT0
- Balance de précision Mettler AE 160
- Mix PEST 5 Agilent (réf. 5190-0551-5)

### 3. Préparation des solutions étalons et gamme d'étalonnage

#### Solution fille multi-élémentaire de pesticides

A partir du mélange Pest 5 Agilent à C<sub>i</sub> = 100 ppm, on prélève 250 µL de cette solution que l'on introduit dans une fiole jaugée de 25 mL. On ajoute ainsi l'Acétonitrile jusqu'au trait de jauge pour obtenir une solution à 1 ppm.

Cette solution est à conserver au réfrigérateur (+4°C).

 	Mode Opérateur Laboratoire de Toxicologie	Code du document : <b>TOX-MO018-E05</b> Indice de révision : <b>Version 1</b>
	<b>Dosage des pesticides par LC-MS/MS</b> Foie	Lieu de consultation : Laboratoire de Toxicologie

#### Préparation de la gamme d'étalonnage

La gamme d'étalonnage est préparée comme indiqué dans le tableau ci-dessous, à partir de la solution Pest 5 à 1 ppm.

Point de gamme	Concentration (ppb)	Solution PEST (1ppm)	Volume MeOH
PEST 10	10	10 µL	990 µL
PEST 15	15	15 µL	985 µL
PEST 20	20	20 µL	980 µL
PEST 25	25	25 µL	975 µL
PEST 30	30	30 µL	970 µL
PEST 40	40	40 µL	960 µL
PEST 50	50	50 µL	950 µL

#### **4. Préparation des phases mobiles**



Peser environ 0,1577 g de formiate d'ammonium solide et les introduire dans une fiole de 500 mL, compléter jusqu'au trait de jauge avec H<sub>2</sub>O ou MeOH. Dans le flacon de phase mobile, ajouter enfin 500 µL d'acide formique.

#### **5. Préparation des échantillons : foie**

- 1) Peser 1g ± 0,1 g de foie et le mettre dans un tube Ultra Turrax de 20mL
- 2) Ajouter 5 mL d'ACN LC-MS Grade
- 3) Mixer pendant 1 min
- 4) Introduire dans le tube contenant les QuEChERS
- 5) Agiter mécaniquement pendant 3 minutes
- 6) Centrifuger pendant 5 minutes à température ambiante à 3000 trs/min
- 7) Prélever le surnageant et l'ajouter dans un tube dSPE de 15 mL
- 8) Vortexer pendant 1 minute
- 9) Centrifuger pendant 5 minutes à température ambiante à 3000 trs/min
- 10) Filtrer sur un filtre PTFE de 0,45 µm et introduire dans un vial

#### **6. Contrôle qualité et actions correctives**

Pour chaque série d'échantillons, préparer un blanc et un essai supplémenté à la limite de quantification ie. valeur cible 10 ppb.  
Cet essai supplémenté ou blanc supplémenté permet de vérifier la qualité de la préparation

 	Mode Opérateur Laboratoire de Toxicologie	Code du document : <b>TOX-MO018-E05</b> Indice de révision : <b>Version 1</b>
	<b>Dosage des pesticides par LC-MS/MS</b> Foie	Lieu de consultation : Laboratoire de Toxicologie

d'échantillon. Pour ce faire, ajouter 50 µL de la solution à 1 ppm à 1g de foie et extraire de la même manière qu'un échantillon réel. (ajout 4950 µL ACN).

Une série d'échantillons se présente de cette façon :

ET – Blanc – Blanc Sup – QC1 et QC2 – 10 échantillons – QC1 et QC2 – 10 échantillons ...

Lorsque l'essai supplémenté n'est pas valide (valeur nominale +/- 20%), la validité des réactifs, de la matrice, etc. doivent être vérifiés. Si nécessaires, de nouveaux lots de réactifs, matrices, etc. seront utilisés à la préparation d'un nouveau blanc supplémenté. Les échantillons seront préparés et analysés également préparés et analysés une seconde fois.

En complément, deux contrôles qualités étalon (QC) à deux concentrations, basse 25 ppb et haute 50 ppb, seront injectés tous les 10 échantillons afin de s'assurer de la validité de la calibration. Dans le cas où les deux QC ne sont pas corrects (ie. valeur nominale +/- 20%), réaliser une nouvelle gamme d'étalonnage et ré-analyser les échantillons précédant le couple de QC incorrects.

QC 25 : 125 µL mix 1 + 4875 µL ACN

QC 50 : 250 µL mix 1 + 4750 µL ACN

Les essais blancs, les essais supplémentés ainsi que les QC étalon de chaque série sont suivis à l'aide des cartes de contrôles présentes en annexe de ce document. Pour plus de clarté, de nouvelles cartes de contrôle sont générées chaque début de mois. Les précédentes cartes de contrôles sont conservées dans le classeur dédié à la méthode.

## 7. Conditions analytiques

1260 Infinity II LC-MS QQQ 6470 Agilent Technologies

Colonne : Force Biphényl Restek 5µm 150 x 4,6 mm (ref. 9629505)

Méthode : « Toxicologie » - « Pesticides » - « PEST 5 » - « Pest 5 dMRM »

Phases mobiles : H<sub>2</sub>O 5 mM formiate d'ammonium + 0,1% acide formique (voie A) / MeOH LC-MS grade 5 mM formiate d'ammonium 0,1% acide formique (voie B)

Temps de run = 20 min

Débit = 0,8 mL/min

Volume injection = 5 µL

### Gradient de la méthode

0 min : 70% A – 30% B

14 min : 0% A – 100% B

17 min : 0% A – 100% B

17,10 min : 70% A – 30% B

### Paramètres dMRM



**Mode Opérateur**  
**Laboratoire de Toxicologie**

**Dosage des pesticides par LC-MS/MS**  
Foie

Code du document :  
**TOX-MO018-E05**  
Indice de révision :  
**Version 1**

Lieu de consultation :  
Laboratoire de Toxicologie

The screenshot displays the TOXLAB software interface. At the top, there are control panels for 'Sourcemètres' (Gas Temp, Gas Flow, Nebulizer, Health Gas Temp, Health Gas Flow, Carrier, Needle Voltage) and 'Pompes' (Cap, Paste). Below these are several data tables for 'Scan segments' and 'Optimiser Paramètres'. The tables list various parameters such as Component Name, MS1 Res, MS2 Res, Production, MS2 Res, Ret Time, and others. The 'Optimiser Paramètres' section includes checkboxes for 'Tagged' and 'Peptide'.

<b>Rédaction</b>  <b>Valentin Bondoux</b> Responsable Technique Date  Visa	<b>Vérification</b>  <b>Nom</b> Fonction Date  Visa	<b>Approbation</b>  <b>Philippe BERNY</b> Directeur du laboratoire Date  Visa
Date de mise en application : Date		
Date de révision : Date		





# ETUDE DE LA CONTAMINATION PAR LES POLLUANTS TERRESTRES DES CETACES DU SANCTUAIRE PELAGOS (MEDITERRANEE)

---

Auteur

---

BOYER Léonie

Résumé

---

Le Sanctuaire Pelagos (Méditerranée) est une aire maritime protégée étudiée depuis une vingtaine d'année et considérée comme zone de forte pollution anthropique, notamment chimique.

Les Cétacés (Grand Dauphin et Dauphin Bleu et Blanc) sont des espèces en haut de chaîne alimentaire et sont considérées comme des espèces sentinelles des écosystèmes et de la santé humaine. Des prélèvements sur des individus échoués ont été réalisés entre 2018 et 2020. Les molécules étudiées sont choisies selon leur importance d'utilisation (mercure, plomb, organophosphorés, pyréthriinoïdes, un panel de 160 pesticides) ou leur impact environnemental (organochlorés et PCB interdits depuis les années 1970).

Les résultats de l'étude ont mis en évidence que les pesticides d'utilisation récente, ainsi que le plomb, sont absents de tous les échantillons prélevés. Ceci traduit soit une faible exposition des Cétacés à ces molécules, soit une capacité de métabolisation importante. Leur absence dans les prélèvements ne traduit cependant pas une innocuité de ses substances.

Les organochlorés sont toujours présents dans 100% des échantillons, bien que les concentrations identifiées semblent suivre une tendance à la baisse, comme les études précédentes l'ont montré.

Au contraire, les PCB et le mercure présentent des valeurs supérieures aux seuils de toxicité supposés chez les espèces étudiées. Les PCB semblent même présenter des concentrations supérieures aux études précédentes malgré leur interdiction.

Ainsi, le Sanctuaire Pelagos est une zone de forte activité humaine et, de ce fait, exposée aux contaminations chimiques. Il est essentiel de poursuivre la surveillance de ces substances chez les Cétacés afin de pouvoir adapter les réglementations et la gestion de ces molécules.

Mots-clés

---

Cétacés, Pollution, Contamination, Sanctuaire Pelagos, Plomb, Mercure, Organochlorés, DDT, PCB, Organophosphorés, Pyréthriinoïdes, Pesticides

Jury

---

Président du jury : Pr **COCHAT Pierre**  
Directeur de thèse : Pr **BERNY Philippe**  
Assesseur : Pr **GILOT – FROMONT Emmanuelle**