

Résumé

Parmi la multitude de composés d'origine anthropique qui terminent leur course dans les écosystèmes aquatiques, les Polychlorobiphényles (PCB) connaissent un regain d'intérêt dû à la réévaluation de leur toxicité (perturbateur endocrinien, neurotoxicité) et à l'identification dans de nombreux écosystèmes aquatiques de composés aux propriétés similaires, comme les Polybromodiphényles éthers (PBDE). Dans cette étude des protocoles d'analyse simples, rapides et efficaces, permettant de traiter un grand nombre d'échantillons, ont été mis en place pour la quantification des PCB et PBDE dans les matrices complexes. Ces protocoles ont permis de réaliser des expérimentations en milieux contrôlés et un suivi environnemental de grande ampleur. Une étude en milieux contrôlés des phénomènes d'accumulation et de dépuration des PCB et des PBDE a donc été réalisée sur trois espèces sentinelles : une algue (*Isochrysis galbana*), un bivalve (*Mytilus edulis*) et un poisson (*Sparus aurata*). Les cinétiques d'accumulation ont été réalisées à deux concentrations sur des composés modèles (CB 77, CB 153, BDE 47, BDE 153, chrysène, benzo(a)pyrène, fluoranthène). Parallèlement à ces études en milieu contrôlé, un suivi environnemental des niveaux de contamination des organismes du réseau trophique pélagique de l'estuaire de la Gironde a été réalisé (phase dissoute, phase particulaire, copépodes, mysidacés, gammares, crevettes, anguilles, mullets, flets, soles, maigres). Afin de replacer les niveaux de contamination de l'estuaire de la Gironde dans un contexte plus global, une étude des niveaux de contamination de flets issus des différents estuaires français a également été réalisée. Les résultats montrent un niveau de contamination relativement important en PCB, et un niveau de contamination faible en PBDE.

Mots clefs: PCB, PBDE, Estuaire de la Gironde.

Abstract

Due to the recent re-evaluation of their toxic properties, the study of environmental distribution of Polychlorobiphenyls (PCBs) has regained a great interest. At the same time, concentration of similar compounds with similar properties, such as Polybromodiphenyl-ethers (PBDEs), seems to increase in environment. In order to understand transfer phenomenon of PCBs and PBDEs in aquatic ecosystems, fast and reliable analytical methods using ASE (Accelerated Solvent Extraction) and MAE (Microwave Extraction) have been developed. These protocols allow handling a lot of samples per day and managing environmental study and field experiment at large scale. Field experiments on different trophic status (algae (*Isochrysis galbana*), mussels (*Mytilus edulis*) and fishes (*Sparus aurata*)) were realised in order to understand the mechanisms of bioaccumulation or depuration of organic compounds (PCB 77, PCB 153, PBDE 47, PBDE 153, Bap, Fluoranthene, Chrysene). At the same time, Gironde estuary (South west of France) has been selected as a specific study area to study transfer of PCBs and PBDEs in aquatic ecosystems. The contamination of pelagic food web was evaluated by analysing water, particles, crustaceans (copepods, mysids, amphipods, shrimps) and fishes (eels, mullets, meagres, soles and flounders). To compare Gironde estuary contamination to other French Atlantic coast estuaries (Seine, Ster, Loire, Vilaine and Gironde), flounder was selected as a model specie and its levels of contamination were characterised. Results show a relatively low contamination of French estuaries by PBDEs, but PCB contamination is still important and could be problematic particularly if we consider level of contamination of eel in Gironde estuary.

Keywords: PCBs, PBDEs, Gironde Estuary.

Nathalie TAPIE

*Contamination des écosystèmes aquatiques par les PCB et les PBDE:
Application à l'estuaire de la Gironde*

2006

N° d'ordre : 3325

Université Bordeaux I

LPTC UMR 5472

Ecole Doctorale des Sciences Chimiques

Thèse pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE BORDEAUX I

Spécialité : Chimie Analytique et Environnement

**Contamination des écosystèmes aquatiques
par les PCB et PBDE :**

Application à l'estuaire de la Gironde

Présentée par

Nathalie TAPIE

Soutenu le 12 décembre 2006

Devant le jury composé de :

Gérard Blanchard, Professeur, CRELA, Univ. La Rochelle

Rapporteur

Michel Warnau, IAEA Research Scientist, LEM, Monaco

Rapporteur

Pierre Chardy, Professeur, EPOC, Univ. Bordeaux 1

Examineur

Benoît Sautour, Maître de conférence, EPOC, Univ. Bordeaux 1

Examineur

Hélène Budzinski, Directeur de Recherche CNRS, LPTC, Univ. Bordeaux 1

Directeur de thèse

Il suffit seulement parfois d'y croire...

Remerciements

Merci à Hélène Budzinski pour son soutien scientifique et moral. Merci pour ta patience, ta confiance, et pour les mille autres choses partagées au cours de cette thèse...

Merci aux membres du jury, B.Sautour, M.Warnau, G.Blanchard et P.Chardy d'avoir accepté d'évaluer ce travail.

Merci à tous les membres du laboratoire pour ces années partagées...

Merci à tous ceux qui m'ont aidé à réaliser ce travail :

Equipe CEFIC LRI

Merci à ceux qui ont participé aux triages de moules, aux séances d'anesthésie de poissons et autres réjouissances... Merci à Alexia Crespo pour son aide précieuse à la finalisation du projet. Merci à Rija Samsera, Sophie Lardy et Stéphane Relexans pour leur aide dans la gestion des aquariums et de ses habitants. Merci à Elena Alonso, Karyn Le Ménach, Laurent Peluhet, Matthieu Labuzan, Alexia Crespo, Isaline Darridan et Sylvain Fremy pour leur aide dans les séries d'analyses de moules et daurades.

Equipe Anguille

Merci à tous les gens impliqués dans le programme Anguille : Isaline Darridan, Sylvain Fremy, Laurent Peluhet, Pierre Elie, Paul Gonthier, Stéphanie Pasquaud, Françoise Daverat. Un merci particulier à Pierre Elie pour nos discussions sur la vie de l'anguille, la biologie de l'anguille n'a presque plus de secrets pour moi maintenant...

Equipe Plancton

Merci à Benoît Sautour et Valérie David pour m'avoir permis de me greffer sur les missions Retrogir, pour leur soutien scientifique sur la vie des petites bestioles qui nagent dans l'estuaire. Merci à toi Val, pour ces superbes missions sur l'estuaire. Merci Benoît pour nos longues discussions sur l'interprétation de mes résultats de contamination... Merci aussi à ceux qui ont eu la patience de m'accompagner durant les prélèvements à Pauillac, Sophie, Anne, Eric, Mario...

Equipe Poisson / Estuaire de la Gironde

Merci à Stéphanie Pasquaud, Françoise Daverat, Mario Lepage, Bernard Ballion, Jean-François Bigot pour les missions de prélèvements sur l'estuaire. Merci à toi Steph pour ton sourire, ta bonne humeur et tous les bouts de poissons que tu m'as donné...

Equipe Flets

Merci à Jean Laroche et Louis Quiniou pour m'avoir embarquée dans les missions de prélèvements de flets dans les différents estuaires français. Merci à toi, Jean pour nos discussions scientifiques à bord du Côte d'Aquitaine. Merci à toi, Louis pour les cours de biologie "au cul du chalut". Merci à Justine Marchand, compagne d'infortune lors de notre premier transit Gironde-Loire. Merci aussi à Christophe Minier et Jérôme Cachot pour les séances de dissection.

Merci aussi à l'équipe de l'URCOM qui m'a supportée durant la dernière phase de rédaction.

Merci à mes parents et ma soeur qui m'ont toujours supportée dans mes choix, malgré leurs inquiétudes. Mais si P'pa, je finirai bien par trouver quelqu'un qui me paye pour jouer avec des poissons. Merci Mum de m'avoir toujours pousser à croire en mes rêves.

Merci à mon homme qui m'a soutenue et supportée jour après jour...

Sommaire

INTRODUCTION GENERALE	1
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	9
I. LES POLYCHLOROBIPHENYLES (PCB)	11
I.1. STRUCTURE CHIMIQUE ET NOMENCLATURE	11
I.2. LES SOURCES	11
I.2.1. Procédés de fabrication	11
I.2.2. Utilisation	12
I.2.3. Volume produit	13
I.3. PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES	13
I.4. TOXICITE	14
I.4.1. Toxicité aigue	14
I.4.2. Toxicité chronique	14
I.5. CADRE LEGISLATIF	15
II. LES POLYBROMODIPHENYLES ETHERS (PBDE)	16
II.1. STRUCTURE CHIMIQUE ET NOMENCLATURE	16
II.2. LES SOURCES	17
II.2.1. Procédés de fabrication	17
II.2.2. Utilisation	18
II.2.3. Volume produit	18
II.3. PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES	18
II.4. TOXICITE	19
II.4.1. Toxicité aigue	19
II.4.2. Toxicité chronique	19
II.5. CADRE LEGISLATIF	20
III. DISTRIBUTION ET DEVENIR DES PCB ET PBDE DANS LES ECOSYSTEMES	20
III.1. CYCLES BIOGEOCHIMIQUES	21
III.1.1. Origine des PCB et PBDE dans l'environnement	21
III.1.2. Devenir des PCB et PBDE dans l'environnement	22
III.2. DISTRIBUTION ET DEVENIR DANS LES ORGANISMES ET LES RESEAUX TROPHIQUES	23
III.2.1. Notion de bioconcentration, bioaccumulation et bioamplification	24
III.2.2. Métabolisation des PCB et PBDE	27
III.2.2.1. Généralité sur la métabolisation des composés chimiques	27
III.2.2.2. Métabolisation des PCB	28
III.2.2.3. Métabolisation des PBDE	30
III.2.3. Niveau de contamination et tendance dans l'environnement	30
III.2.3.1. Niveau de contamination	30
III.2.3.2. Evolution de la concentration en PCB et PBDE au cours du temps	31
IV. BUTS DES TRAVAUX	33

I. EXPERIMENTATIONS EN MILIEU CONTROLE	39
I.1. LES ALGUES	39
I.1.1. Principe de l'expérimentation	39
I.1.2. Choix de l'organisme cible : <i>Isochrysis galbana</i>	40
I.1.3. Plan expérimental	40
I.1.4. Descriptif du dispositif expérimental	42
I.1.5. Stratégie de contamination	43
I.1.6. Prélèvement des échantillons	43
I.2. LES MOULES	43
I.2.1. Principe de l'expérimentation	43
I.2.2. Choix de l'organisme cible	44
I.2.3. Plan expérimental	45
I.2.4. Descriptif du dispositif expérimental	47
I.2.5. Préparation de la nourriture contaminée	47
I.2.6. Stratégie de contamination	48
I.2.7. Prélèvement des échantillons	49
I.2.7.1. Prélèvement des moules	49
I.2.7.2. Prélèvement de l'eau	49
I.3. LES DAURADES	50
I.3.1. Choix de l'organisme cible	50
I.3.2. Plan expérimental	51
I.3.3. Descriptif du dispositif expérimental	52
I.3.4. Préparation de la nourriture contaminée	53
I.3.5. Stratégie de contamination	54
I.3.6. Prélèvement des échantillons	54
I.3.6.1. Prélèvement des daurades	54
I.3.6.2. Prélèvement de l'eau	55
I.3.7. Correction mathématique des données de contamination	55
I.4. MODELISATION	56
I.4.1. Concept général	56
I.4.2. Détermination des constantes d'accumulation k_1 et d'élimination k_d	57
I.4.2.1. Estimation de la constante d'élimination k_d	57
I.4.2.2. Estimation de la constante d'accumulation k_1	57
I.4.3. Calibration du modèle de bioaccumulation	58
II. ETUDE EN MILIEU NATUREL	58
II.1. COMPARAISON INTER-ESTUAIRES DES NIVEAUX DE CONTAMINATION	58
II.1.1. Estuaires étudiés	58
II.1.2. Prélèvement des échantillons	59
II.2. L'ESTUAIRE DE LA GIRONDE	59
II.2.1. Présentation du milieu	59
II.2.2. Espèces étudiées	61
II.2.2.1. Les crustacés	61
II.2.2.1.a. <i>Les copépodes estuariens</i>	61
II.2.2.1.b. <i>Les mysidacés</i>	61
II.2.2.1.c. <i>Les gammares</i>	62
II.2.2.1.d. <i>La crevette blanche : Palaemon longirostris (Edwards, 1837)</i>	62
II.2.2.1.e. <i>La crevette grise : Crangon crangon (Linné, 1758)</i>	63
II.2.2.2. Les poissons	63
II.2.2.2.a. <i>L'anguille : Anguilla anguilla (Linné, 1758)</i>	63
II.2.2.2.b. <i>Le flet : Platichthys flesus (Linné, 1758)</i>	66
II.2.2.2.c. <i>Le maigre : Argyrosomus regius</i>	66
II.2.2.2.d. <i>Le mullet porc : Liza ramada (Linné, 1758)</i>	67
II.2.2.2.e. <i>La sole : Solea solea (Linné, 1758)</i>	67

II.2.3. Etude de la contamination des premiers maillons du réseau trophique estuarien	68
II.2.3.1. Suivi mensuel à Pauillac	68
II.2.3.2. Variation spatio-temporelle de la contamination : Mission Retrogir	69
II.2.4. Protocole d'étude de la contamination des poissons de la Gironde	71
II.2.4.1. Mission Retroph CEMAGREF	71
II.2.4.2. Echantillonnage SMIDDEST	71
III. ANALYSE DES CONTAMINANTS ORGANOHALOGENES	72
III.1. PREPARATION PREALABLE DES ECHANTILLONS	72
III.2. MODE DE QUANTIFICATION : ETALONNAGE INTERNE	73
III.2.1. Principe de l'étalonnage interne	73
III.2.2. Etalons internes utilisés, composés analysés	74
III.3. PROTOCOLE D'EXTRACTION	75
III.3.1. Protocole d'extraction des matrices liquides	75
III.3.1.1. Principe général de l'extraction	75
III.3.1.2. Protocole d'extraction liquide/liquide	75
III.3.2. Protocole d'extraction dans les matrices solides	75
III.3.2.1. Extraction sous champ micro-ondes (MAE Acide)	75
<i>III.3.2.1.a. Principe général</i>	75
<i>III.3.2.1.b. Protocole d'extraction sous champ micro-ondes des PCB et PBDE</i>	76
III.3.2.2. Extraction par fluide pressurisé (ASE Acide)	77
<i>III.3.2.2.a. Principe général</i>	77
<i>III.3.2.2.b. Protocole d'extraction par fluide pressurisé</i>	77
III.3.2.3. Etape de purification	78
<i>III.3.2.3.a. Principe de la purification sur colonne de silice acidifiée</i>	78
<i>III.3.2.3.b. Protocole de purification</i>	79
III.3.2.4. Protocoles de nettoyage du matériel utilisé	79
III.4. ANALYSE DES ORGANOHALOGENES ETUDIES PAR GC/ECD	80
III.4.1. Principe de l'analyse	80
III.4.2. Validation des protocoles utilisés	81
III.4.2.1. Validation des solutions de quantification pour l'étalonnage interne	81
III.4.2.2. Validation des protocoles d'extraction utilisés	82
III.4.2.3. Validation des analyses	85
<i>III.4.2.3.a. Témoin de contamination</i>	85
<i>III.4.2.3.b. Double étalonnage / rendement de manipulation</i>	85
<i>III.4.2.3.c. Carte de contrôle</i>	85
RESULTATS ET DISCUSSION	87
<hr/>	
I. EXPERIMENTATIONS EN MILIEU CONTROLE	89
I.1. LES ALGUES	89
I.1.1. Contamination initiale de l'eau	89
I.1.2. Cinétique d'accumulation des PCB par les algues, <i>Isochrysis galbana</i>	89
I.1.2.1. CB 77	89
I.1.2.2. CB 153	90
I.1.2.3. Pyralène	92
I.1.3. Cinétique d'accumulation des PBDE par les algues, <i>Isochrysis galbana</i>	93
I.1.3.1. BDE 153	93
I.1.3.2. BDE 47	94
I.1.4. Cinétique d'accumulation des HAP par les algues, <i>Isochrysis galbana</i>	96
I.1.4.1. Benzo(a)pyrène	96
I.1.4.2. Fluoranthène	97
I.1.4.3. Chrysène	98
I.1.5. Comparaison de l'accumulation des PCB PBDE et HAP chez <i>Isochrysis galbana</i>	99

I.2. LES MOULES	102
I.2.1. Contamination réelle de la nourriture	102
I.2.2. Contamination de l'eau	102
I.2.3. Paramètres biométriques des moules	103
I.2.4. Niveau de contamination des moules des aquariums témoins	104
I.2.5. Contamination par les PCB	105
I.2.5.1. CB 77	105
I.2.5.1.a. CB 77 5 µg	105
I.2.5.1.b. CB 77 100 µg	106
I.2.5.2. CB 153	108
I.2.5.2.a. CB 153, 5 µg	108
I.2.5.2.b. CB 153, 100 µg	109
I.2.5.3. Le pyralène	110
I.2.6. Contamination par les PBDE	113
I.2.6.1. BDE 47	113
I.2.6.1.a. BDE 47, 5 µg	113
I.2.6.1.b. BDE 47, 100 µg	113
I.2.6.2. BDE 153	115
I.2.6.2.a. BDE 153, 5 µg	115
I.2.6.2.b. BDE 153, 100 µg	115
I.2.7. Contamination par les HAP	116
I.2.7.1. Benzo(a)pyrène	116
I.2.7.1.a. Benzo(a)pyrène, 5 µg	116
I.2.7.1.b. Benzo(a)pyrène, 100 µg	117
I.2.7.2. Chrysène	118
I.2.7.2.a. Chrysène, 5 µg	118
I.2.7.2.b. Chrysène, 100 µg	119
I.2.7.3. Fluoranthène	120
I.2.7.3.a. Fluoranthène, 5 µg	120
I.2.7.3.b. Fluoranthène, 100 µg	121
I.2.8. Comparaison de l'accumulation des PCB, des PBDE et des HAP chez la moule.	122
I.2.8.1. Rapport d'incorporation des composés étudiés	122
I.2.8.2. Paramètres toxicocinétiques	125
I.2.8.3. Modélisation	127
I.3. LES DAURADES	130
I.3.1. Contamination réelle de la nourriture	130
I.3.2. Contamination de l'eau	130
I.3.3. Paramètres biométriques des daurades	131
I.3.4. Niveau de contamination des daurades témoins	132
I.3.5. Contamination par les PCB	132
I.3.5.1. CB 77	132
I.3.5.1.a. CB 77, 5 µg	132
I.3.5.1.b. CB 77, 100 µg	134
I.3.5.2. CB 153	134
I.3.5.2.a. CB 153, 5 µg	134
I.3.5.2.b. CB 153, 100 µg	135
I.3.5.3. Pyralène	136
I.3.6. Contamination par les PBDE	138
I.3.6.1. BDE 47	138
I.3.6.1.a. BDE 47, 5 µg	138
I.3.6.1.b. BDE 47, 100 µg	139
I.3.6.2. BDE 153	140
I.3.6.2.a. BDE 153, 5 µg	140
I.3.6.2.b. BDE 153, 100 µg	140
I.3.7. Contamination par les HAP	141
I.3.7.1. Benzo(a)pyrène	141
I.3.7.2. Chrysène	142

I.3.8. Comparaison de l'accumulation des PCB, des PBDE et des HAP chez la daurade	143
I.3.8.1. Rapport d'incorporation des composés étudiés	143
I.3.8.2. Paramètres toxicocinétiques	145
I.3.8.3. Modélisation	146
I.4. DISCUSSION SUR LA CAPACITE D'ACCUMULATION DES COMPOSES ETUDIES	148
II. ETUDE EN MILIEU NATUREL	150
II.1. COMPARAISON INTER-ESTUAIRES DES NIVEAUX DE CONTAMINATION	150
II.1.1. Contamination globale	150
II.1.2. Détail de la contamination par estuaire	152
II.1.2.1. La Seine	152
II.1.2.2. Le Ster	153
II.1.2.3. La Vilaine	154
II.1.2.4. La Loire	155
II.1.2.5. La Gironde	156
II.1.3. Discussion sur la contamination du flet dans les grands estuaires français	157
II.2. L'ESTUAIRE DE LA GIRONDE	158
II.2.1. Etude de la contamination des premiers maillons du réseau trophique estuarien	158
II.2.1.1. Variation temporelle de la contamination : suivi mensuel à Pauillac	158
II.2.1.1.a. Données physico-chimiques	158
II.2.1.1.b. Contamination du compartiment abiotique de l'estuaire de la Gironde	161
II.2.1.1.c. Contamination des premiers maillons trophiques de l'estuaire de la Gironde	163
II.2.1.1.d. Empreinte de la contamination en PCB et PBDE	170
II.2.1.1.e. Synthèse des données obtenues au niveau de Pauillac	171
II.2.1.2. Variation spatio-temporelle de la contamination : Mission Retrogir	173
II.2.1.2.a. Données physico-chimiques	173
II.2.1.2.b. Contamination du compartiment abiotique	174
II.2.1.2.c. Contamination des premiers niveaux trophiques	176
II.2.1.3. Synthèse sur la contamination de la base du réseau trophique	185
II.2.2. Etude de la contamination des poissons du réseau trophique estuarien	189
II.2.2.1. Niveaux de contamination de quelques espèces cibles	189
II.2.2.2. Cas particulier de l'anguille européenne	192
II.2.2.2.a. Description des anguilles prélevées	192
II.2.2.2.b. Données biométriques et teneurs lipidiques	193
II.2.2.2.c. Niveau de contamination global des muscles d'anguilles	195
II.2.2.2.d. Niveau de contamination par classes de taille	197
II.2.2.2.e. Niveau de contamination par zone	201
II.2.2.2.f. Niveaux de contamination exprimée en ng.g^{-1} de lipides	203
II.2.2.2.g. Profil de composés analysés	204
II.2.2.2.h. Conclusion sur la contamination de l'anguille européenne	208
CONCLUSION	215
BIBLIOGRAPHIE	221
ANNEXES	235
Annexe 1: Publication 1. Fast and efficient extraction methods for the analysis of persistent organohalogenated pollutants in biological matrices	237
Annexe 2: Publication 2. A Model for Estimating the Potential Biomagnification of Chemicals in a Generic Food Web: Preliminary Development	251
Annexe 3: Publication 3. Polychlorinated biphenyls in Fish from the Gironde estuary (France)	265

Introduction générale

Depuis le début du 20^{ème} siècle, l'industrialisation a conduit à la production de milliers de substances chimiques. Entre 1930 et 2000, la production mondiale de produits chimiques est passée d'un million de tonnes à quatre cent millions de tonnes. Au quotidien, un nombre croissant de produits chimiques est utilisé dans des applications diverses et variées, des pesticides aux cosmétiques en passant par les biberons et le matériel informatique. A tous les stades de leur vie, de la production à l'utilisation, jusqu'à leur retraitement, ces substances chimiques peuvent être libérées dans l'environnement. Jusqu'à présent, ces substances chimiques ont été mises sur le marché et utilisées sans réelles études quant à leur impact à long terme sur l'environnement ou les organismes vivants. Aujourd'hui, la législation européenne REACH (Registration, Evaluation et Autorisation of Chemicals), s'est fixée comme but d'enregistrer les substances chimiques produites (en fonction de leur volume de production), d'évaluer le danger de ces substances pour l'environnement ou la santé. Le texte législatif a été présenté en première lecture au parlement européen le 17 novembre 2006, l'adoption finale du texte est prévue pour fin 2006 et son entrée en vigueur est planifiée pour avril 2007. La législation REACH se concentre sur trois types de substances :

- CMR : Substances cancérigènes, mutagènes et toxiques pour la reproduction
- PBT : Substances persistantes, bioaccumulables et toxiques
- vPvB : Substances très persistantes et très bioaccumulables

Dans le passé, de nombreux composés organiques présentant ce type de propriétés (bioaccumulables, persistants, reprotoxiques...) ont déjà été utilisés sans ces contrôles préalables calibrés, et se sont dispersés dans l'environnement. Parmi cette multitude de substances chimiques, les polluants organiques persistants (POP) connaissent un regain d'intérêt à cause de la récente réévaluation de leur toxicité (neurotoxiques, perturbateurs endocriniens), ces substances sont chimiques stables, faiblement biodégradables, lipophiles, ce qui leur confère un fort potentiel de bioaccumulation par les organismes. Parmi les POP, les polychlorobiphényles (PCB) sont sans doute les molécules les plus connues. Jensen (1966) a détecté pour la première fois des PCB (Polychlorobiphényles) dans des pygargues à queue blanche en Suède. Ces molécules ont été utilisées notamment comme fluide caloporteur dans les transformateurs électriques et en tant qu'additifs pour de nombreuses applications (plastique, encre, peinture...). Elles sont aujourd'hui interdites à la production depuis plus de vingt ans dans la plupart des pays d'Europe, ainsi qu'aux Etats-Unis, mais elles sont encore très présentes dans les écosystèmes aquatiques. L'étude des PCB, au-delà du fait qu'ils peuvent être considérés comme composés modèles, retrouve aujourd'hui un regain d'intérêt du fait de leurs propriétés neurotoxiques récemment mises en évidence, et de leur action en

tant que perturbateurs endocriniens. Ces composés sont de très bons marqueurs des phénomènes de bioaccumulation. Les 7 PCB prioritaires définis par l'Europe (CB 28, CB 52, CB 101, CB118, CB 138, CB 153 et CB 180) sont utilisés comme traceurs des mécanismes de bioaccumulation dans les réseaux trophiques ; ce sont les composés les plus accumulables dans les organismes et à ce titre les plus présents dans l'environnement. Ces PCB dits "globulaires" à cause de leur structure chimique (à l'exception du CB 118) ne présentent pas le même type de toxicité que les PCB dits "dioxine like" (possédant une toxicité similaire aux dioxines), mais permettent de comprendre les mécanismes mis en jeu dans la contamination de l'environnement, et d'appréhender le devenir des substances chimiques dans l'environnement. Ils font également l'objet d'un avis sanitaire de l'AFSSA (Avis 8/04/2003).

Plus récemment, une autre classe de composés a été produite, présentant des propriétés similaires aux PCB (stabilité, rémanence, bioaccumulation...) : les retardateurs de flammes polybromés, les plus utilisés étant les PBDE (PolyBromoDiphényles-Ethers). Ces composés sont utilisés comme additifs ignifugeants dans de nombreux plastiques et textiles pour une multitude d'applications (électronique, aéronautique, ameublement...). Ils ont été détectés pour la première fois dans des échantillons de poissons issus de la rivière Viskan en Suède au début des années 80 (Andersson et Blomkvist, 1981). Ces composés sont en cours de réglementation à l'échelle européenne ; l'utilisation d'une partie de ces composés (mélange industriel penta- et hexa bromé) est désormais interdite (directives 2003/11/CE). En effet, certains composés de cette famille (notamment le BDE 47) présentent des capacités de bioaccumulation et de rémanence similaires à celles observées pour les PCB, et ils sont également considérés comme des perturbateurs endocriniens, ils perturbent la fonction de reproduction et la fonction thyroïdienne.

Malgré de nombreuses études sur le sujet (Lang, 1992 ; Muir *et al.*, 2003 ; Johansson *et al.*, 2004 ; Braune *et al.*, 2005), les mécanismes de transfert des PCB et des PBDE dans les écosystèmes aquatiques ne sont pas encore totalement élucidés. Au niveau français, peu d'études recensent les niveaux de contamination en PCB et PBDE des organismes, seules les données du RNO (Réseau National d'Observation, IFREMER) offrent une vision globale de la contamination du littoral français à travers l'analyse des métaux, PCB et HAP (Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques) accumulés par 2 organismes modèles, l'huître creuse (*Crassostrea gigas*) et la moule (*Mytilus sp.*). Il existe également des données ponctuelles de contamination des écosystèmes aquatiques français par les PCB et les PBDE obtenues sur des espèces ou des milieux particuliers (Pierard, 1995 ; Roche *et al.*, 2002 ; Bodin, 2005 ; Bragigand, 2005).

Dans ce contexte, ce travail vise à mieux appréhender les mécanismes d'accumulation, de dépuraction et de transfert des PCB et des PBDE au sein des écosystèmes aquatiques et à documenter la contamination d'un écosystème sensible, l'estuaire de la Gironde. Le manuscrit s'articule selon la structure suivante. Le premier chapitre est une synthèse bibliographique présentant les deux classes de composés étudiés, PCB et PBDE, et une vision globale des connaissances actuelles sur les mécanismes de transfert et de bioaccumulation de ces composés dans les réseaux trophiques aquatiques. Ensuite un chapitre "matériels et méthodes" présente les techniques mises en œuvre dans les travaux, il est suivi d'un chapitre "résultats-discussion" présentant les résultats. Les travaux ont été développés en trois phases.

La première phase a eu pour but de développer une technique d'analyse simple, rapide et efficace des PCB et des PBDE dans les matrices biologiques complexes. Ce protocole d'analyse est un pré-requis obligatoire pour l'étude des mécanismes de transfert et d'accumulation de ces composés, car il a permis d'augmenter considérablement le nombre d'échantillons traités par jour et par manipulateur (de 6 échantillons à plus de 24 échantillons) et de diminuer les quantités de solvants utilisées. L'augmentation du nombre d'échantillons traités permet d'aboutir à une meilleure documentation des niveaux de contamination des systèmes étudiés et donc de mieux appréhender les phénomènes de transfert et d'accumulation des POP dans l'environnement aquatique. Pour chaque classe de composés étudiés, des composés individuels particuliers ont été ciblés. Pour les PCB, les composés suivis sont les 7 PCB prioritaires (CB 28, CB 52, CB 101, CB 118, CB 138, CB 153 et CB 180). Ces PCB dits "globulaires" (à l'exception du CB 118) sont les PCB les plus présents dans l'environnement et sont considérés comme des marqueurs des phénomènes de transfert et d'accumulation dans les réseaux trophiques aquatiques. De plus, ils font l'objet d'un avis sanitaire de l'AFSSA (Avis 8/04/2003). Pour les PBDE, les composés suivis sont le BDE 47, BDE 99, BDE 119, BDE 153 et BDE 190, ils font partie des PBDE les plus présents dans l'environnement (De Wit, 2002).

La deuxième phase est une étude en milieu contrôlé des mécanismes d'accumulation et de dépuraction des PCB et des PBDE. Cette étude a mis en œuvre des cinétiques d'accumulation et de dépuraction en milieux contrôlés de quelques composés modèles (CB 77, CB 153, BDE 47, BDE 153, chrysène, benzo(a)pyrène, fluoranthène). Trois espèces modèles, une algue unicellulaire (*Isochrysis galbana*), un bivalve filtreur (*Mytilus edulis*) et un poisson (*Sparus aurata*), ont été choisies pour ces expositions. Ces expérimentations ont été conduites dans le cadre d'un programme européen financé par le CEFIC LRI (European Chemical Industry Council, Long-Range Research Initiative) (ECO-1AINIA-1100 Environnement : persistence, bioaccumulation and toxicity). Ce projet a eu pour but de comparer les cinétiques

d'accumulation et de dépuration des PCB (CB 77, CB 153) et des PBDE (BDE 47, BDE 153) étudiés, de les comparer entre eux mais également avec une autre classe de composés, les HAP (Hydrocarbures aromatiques polycycliques) à travers trois molécules modèles (chrysène, benzo(a)pyrène, fluoranthène). Ainsi l'influence de la structure chimique (PCB coplanaire ou non, degré de substitution, substitution Cl/Br, différence structurale...), de la lipophilie (coefficient de partage octanol/eau) et de l'espèce biologique considérée a été étudiée. Le jeu de données généré a également servi à calibrer un modèle de bioaccumulation développé par E. Alonso et R. S. J. Tarazona (Laboratoire d'écotoxicologie, INIA, Institut pour l'agriculture et la recherche agroalimentaire, Madrid).

La troisième phase est l'étude en milieu naturel des mécanismes de transfert des PCB et des PBDE dans les réseaux trophiques aquatiques. Les niveaux de contamination des estuaires français ont été évalués à travers l'analyse d'un organisme modèle, le flet (*Platichthys flesus*). Des flets ont été prélevés sur différents estuaires (Seine, Vilaine, Loire, Gironde) mais aussi sur un site de référence le Ster, afin de définir leur niveau de contamination en PCB et de PBDE et de les comparer. L'estuaire de la Gironde s'est révélé être l'estuaire le plus contaminé, après l'estuaire de Seine. Historiquement, l'estuaire de la Gironde apparaît comme modérément contaminé en PCB si l'on considère le niveau de contamination du compartiment abiotique, notamment les teneurs mesurées dans les sédiments (Piérard, 1995). Cependant une étude préliminaire réalisée en 2001, dans le cadre de la première phase du programme GIS-ECOBAG sur la contamination de différentes espèces de poissons, avait déjà mis en évidence une forte disparité des niveaux de contamination entre les différentes espèces étudiées avec, en particulier, des concentrations très élevées mesurées dans le muscle de certaines espèces comme l'anguille européenne (*Anguilla anguilla*) (resp. plus de 800 ng/g ps sur la base des 7 PCB prioritaires suivis comme indicateurs). Les premières conclusions tirées à partir de ces données préliminaires couplées à la comparaison inter-estuaires réalisée grâce au suivi de contamination des flets, ont laissé présager des phénomènes de bioamplification importants au sein du réseau trophique de la Gironde, c'est pourquoi l'estuaire de la Gironde a été choisi comme site naturel d'étude pour la compréhension des mécanismes de transfert et d'accumulation des POP dans les réseaux trophiques aquatiques.

Les niveaux de contamination en PCB (CB 28, CB 52, CB 101, CB 118, CB 138, CB 153 et CB 180) et en PBDE (BDE 47, 99, 119, 153) des différents niveaux du réseau trophique ont été caractérisés. Un suivi mensuel de la contamination en PCB et PBDE durant une période de deux ans du compartiment abiotique (phase dissoute et phase particulaire), plancton (copépodes et mysidacés), crevettes et gammarés a été réalisé et a permis, couplé à

une étude plus poussée de ces niveaux de contamination pendant la période de production, de caractériser la contamination de la base du niveau trophique. La contamination de quelques prédateurs (maigre, mullet, sole et anguille) a été également étudiée, mais les travaux se sont focalisés sur l'étude de la contamination des anguilles par les POP en tant que super prédateur se nourrissant sur la petite faune vagile de l'estuaire. Ainsi les niveaux de contamination des anguilles issues de différentes zones du système fluvio-estuarien de la Gironde, mais aussi de différentes classes de tailles, ont été caractérisés afin de définir les mécanismes de contamination et les paramètres les influençant.

Synthèse bibliographique

formation de tous les congénères. Dans les faits, seulement 130 à 150 congénères sont réellement synthétisés (Schulz *et al.*, 1989 ; Larsen *et al.*, 1993).

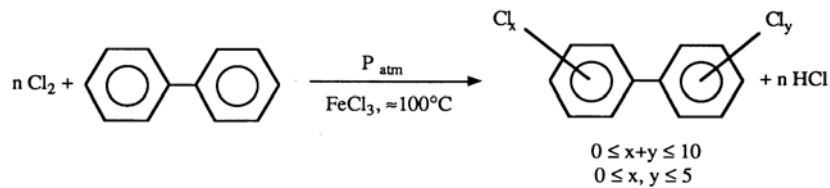


Figure 2 : Synthèse des PCB.

Cette synthèse aboutit ainsi à la formation de mélanges techniques de PCB dont le degré moyen de chloration dépend de la durée de la réaction. Cependant ces mélanges ne sont jamais totalement purs, et parmi les impuretés formées, il y a toujours une petite proportion de PCDD (Polychlorodibenzodioxines), PCDF (Polychlorodibenzofuranes) mêlée aux PCB. Ces mélanges techniques de PCB se présentent sous la forme de liquides plus ou moins visqueux ou de produits résineux. Selon les pays d'origine, les formulations commerciales de PCB portent des noms et des degrés de chloration différents : Arochlor (USA), Pyralène, Phénochlor (France), Clophen (Allemagne), Pyrochlor (Grande Bretagne), Fenchlor (Italie)...

I.2.2. Utilisation

Du fait de leur très grande stabilité et de leurs propriétés physico-chimiques, les PCB ont trouvé de nombreuses applications dans le milieu industriel. Ils sont utilisés dans trois grands types de systèmes (OCDE, 1973) :

➤ Utilisation en systèmes clos contrôlables :

Les PCB sont en systèmes clos, ils ne risquent pas de s'écouler dans l'environnement et sont récupérables pour un retraitement après utilisation.

- Fluides diélectriques dans les transformateurs et condensateurs de grande taille.
- Fluides caloporteurs dans certaines installations thermiques.

➤ Utilisation en systèmes clos non contrôlables :

Les PCB sont en systèmes clos, mais il existe un risque d'écoulement dans l'environnement, et ils sont difficilement récupérables pour un retraitement.

- Fluides diélectriques dans les transformateurs et condensateurs de petite taille.
- Fluides caloporteurs dans certaines installations thermiques.

➤ Utilisation en systèmes ouverts non contrôlables :

Les PCB sont en contact direct avec l'environnement.

- Fluides industriels hydrauliques et lubrifiants
- Additifs dans les formulations d'insecticides et de bactéricides
- Additifs stabilisants ou ignifugeants dans les peintures, encres, plastiques...

Les PCB ont été produits en masse et très utilisés durant les années 1950 à 1970. Cependant, suite aux problèmes toxicologiques et environnementaux posés par ces molécules, leur usage a été interdit en France en tant qu'additifs dès 1975 et restreint aux usages en systèmes clos. Depuis 1987, la réglementation française a décrété l'arrêt total de la production des PCB. Les USA ont interdit leur production en 1985. La tendance est à l'élimination des PCB encore utilisés dans les transformateurs et condensateurs (Mhiri *et al.*, 1997). Malgré l'arrêt de la production, la présence des PCB dans l'environnement reste un vrai problème de par leur rémanence, leur toxicité et leur fort potentiel à être bioaccumulés par les organismes.

I.2.3. Volume produit

La production totale de mélanges industriels produits est estimée entre 1,2 et 1,5 millions de tonnes (Tanabe et Tatsukawa, 1986). Le degré de chloration moyen des mélanges est évalué à 42,5 %. A titre d'exemple de production nationale, entre 1974 et 1983, l'Allemagne, alors au maximum de sa production, produisait de 2449 à 4355 tonnes par an (Cravedi et Narbonne, 2002).

I.3. Propriétés physico-chimiques

Les 209 PCB, de par leur structure chimique semblable, présentent des propriétés physico-chimiques communes. Ce sont des molécules stables, non hydrolysables qui ne réagissent pas avec les acides et les bases. Ils présentent une grande stabilité thermique, jusqu'à 1300°C, et ils sont classés parmi les composés semi-volatils selon l'échelle définie par Mackay (1980). Cependant, les propriétés individuelles de chaque congénère varient en fonction de leur degré de chloration et des positions des chlores. La masse moléculaire des PCB va de 188 uma pour un monoCB à 494 uma pour le décaCB. Les principales propriétés physico-chimiques sont listées dans le Tableau 2.

Congénères	Température de fusion (°C)	Température d'ébullition (°C)	Pression de vapeur à 25°C	Solubilité dans l'eau (g/m ³)	Log Kow
Biphényl	71	256	4,9	9,3	4,3
MonoCB	25-78	285	1,1	4	4,7
DiCB	24-149	312	0,2	1,6	5,1
TriCB	28-87	337	0,05	0,6	5,5
TetraCB	47-180	360	0,012	0,3	5,9
PentaCB	76-124	381	2,6 10 ⁻³	0,1	6,3
HexaCB	77-150	400	5,8 10 ⁻⁴	0,04	6,7
HeptaCB	122-149	417	1,3 10 ⁻⁴	0,01	7,1
OctaCB	159-162	432	2,8 10 ⁻⁵	5,5 10 ⁻³	7,5
NonaCB	182-206	445	6,3 10 ⁻⁶	2,0 10 ⁻³	7,9
DecaCB	306	456	1,4 10 ⁻⁶	7,6 10 ⁻⁴	8,3

Tableau 2 : Quelques propriétés physico chimique des PCB d'après Erickson (1997).

Il est important de noter la faible solubilité des PCB dans l'eau, et leurs coefficients de partage octanol/eau (log Kow) élevés qui dénotent de leur forte lipophilie. Ces propriétés sont des facteurs importants pour la compréhension de leur devenir dans l'environnement.

I.4. Toxicité

L'exposition des organismes vivants aux PCB peut entraîner un certain nombre d'effets toxiques. Ces effets peuvent se révéler après une exposition aiguë lorsque l'organisme a subi une exposition unique à une forte concentration en xénobiotiques, ou après une exposition chronique où l'organisme a été en contacts répétés à de faibles doses de polluants.

I.4.1. Toxicité aiguë

Les PCB présentent une toxicité aiguë faible. Les doses létales pour 50 % des individus exposés (DL 50) dépassent souvent plusieurs grammes de PCB par kilogramme de poids corporel mais varient cependant selon les espèces et les voies d'assimilation (Rodriguez-Grau *et al.*, 1989 ; Lang, 1992). Il faut tout de même noter que de fortes concentrations d'exposition entraînent des troubles cutanés (chloracnée, spécifique des composés chlorés) et des dysfonctionnements rénaux et hépatiques. Ces symptômes ont été mis en évidence lors d'expositions professionnelles et décrits également lors de l'accident de Yusho en 1968 au Japon (Umeda *et al.*, 1978 ; Aoki, 2001 ; Furue *et al.*, 2005). Toutefois les concentrations déterminées dans l'environnement restent très éloignées des valeurs de toxicité aiguë.

I.4.2. Toxicité chronique

Les PCB présentent une structure et des propriétés toxiques similaires, mais il faut garder à l'esprit qu'elles diffèrent en fonction de la position et du nombre d'atomes de chlore. Sur ce principe, les PCB peuvent être divisés en deux groupes qui expriment des toxicités sensiblement différentes : les PCB dits "globulaires" qui présentent deux atomes de chlore ou plus en position ortho, et les congénères dit "coplanaires" qui ne possèdent aucun ou un seul chlore en position ortho. Ces derniers, comme le 77, 126 et le 169, sont considérés comme des PCB "dioxine like". Ces composés présentent une toxicité équivalente aux dioxines et sont donc parmi les plus toxiques (Kannan *et al.*, 1988 ; Monosson et Stegeman, 1991). Pour évaluer la toxicité d'un mélange de PCB "dioxine like" et d'autres composés comme les dioxines et les furannes, un système d'équivalence toxique a été développé (Sawyer et Safe, 1982 ; Kannan *et al.*, 1988). Ce modèle se base sur la toxicité de la 2,3,7,8 tétrachlorobibenzo-p-dioxine (2,3,7,8 TCDD), à laquelle on attribue un facteur d'équivalence

toxique (TEF) de 1. Les toxicités des autres composés sont évaluées par comparaison de leur capacité d'induction enzymatique à celle de cette TCDD. Ceci permet donc d'établir les valeurs de TEF. Ce système est surtout valable pour les composés coplanaires.

D'une façon plus générale, les PCB sont parmi les premiers composés classés en tant que perturbateurs endocriniens, ils sont susceptibles d'agir sur la synthèse, le transport, l'excrétion des hormones ou sur leur fixation aux récepteurs correspondants (Safe, 2001; Yang *et al.*, 2005). Ils perturbent ainsi la fonction thyroïdienne et sexuelle (Iwasaki *et al.*, 2002). De façon simplifiée, les PCB globulaires induisent une activité œstrogénique (Mckinney et Waller, 1994), il est actuellement fortement suspecté que ce sont les métabolites hydroxylés qui expriment cette activité oestrogénique (Cravedi et Narbonne, 2002). De leur côté, les composés coplanaires, comme le CB 77, semblent plutôt présenter un effet anti-œstrogénique (Navas et Segner, 1998). Une toxicité au niveau cérébral a été récemment mise en évidence. Les PCB troubleraient, à faibles doses, le développement cérébral chez l'embryon, entraînant des effets irréversibles chez l'adulte, comme des troubles psychomoteurs et des retards cognitifs (Schantz, 1998 ; Aoki, 2001 ; Sharma, 2002). Ces composés peuvent entraîner une immunodéficience (Ville *et al.*, 1995) et sont considérés comme des molécules probablement cancérogènes pour l'homme par l'EPA (Environmental Protection Agency, USA). L'exposition chronique des organismes à de faibles concentrations est préjudiciable à la santé des individus et au maintien des populations (Sager *et al.*, 1991 ; Tillit *et al.*, 1992 ; De Voogt *et al.*, 1993). Cependant, il faut garder à l'esprit que la plupart des tests de toxicité ont été réalisés avec des mélanges de PCB qui contiennent toujours une infime partie de PCDD (Polychlorodibenzodioxines) et de PCDF (Polychlorodibenzofuranes) qui pourraient jouer un rôle synergique sur les mécanismes de toxicité (Uenotsuchi *et al.*, 2005 ; Masuda *et al.*, 1998).

I.5. Cadre législatif

La mise en évidence de PCB dans l'environnement par Jensen (1966) et la mise en évidence de leurs propriétés toxiques par l'accident de Yusho en 1968 au Japon, ont alerté les décideurs. Cette prise de conscience s'est traduite en France par l'arrêté du 8 juillet 1975 qui dans un premier temps limite l'utilisation des PCB au système clos. Puis en 1987, la France interdit la production et l'utilisation des PCB pour tous les usages, à l'exception des appareils (transformateurs, condensateurs) mis en service avant cette date (Décret n 87-59 du 2 février 1987). Le décret du 18 janvier 2001, qui donne suite à la directive 96/99/CE stipule que l'ensemble des appareils contenant des PCB doivent être détruits de manière contrôlée par des entreprises agréés d'ici 2010.

Parallèlement à ces décisions concernant l'interdiction d'utilisation des PCB, le législateur s'est intéressé au problème de la teneur en PCB dans les produits d'alimentation. En 1998, l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) inclut les PCB dits "dioxine-like" (CB 77, 81, 105, 114, 118, 123, 126, 156, 157, 167, 169, 189) dans la Dose Journalière Admissible (DJA) définie pour les dioxines et les furanes qui est fixée à 1-4 pg TEQ/kg p.c./j. En 2002, l'OMS propose une DJA pour les PCB totaux de 0,02 µg/kg p.c./j en équivalent arochlor 1254. En France, l'AFSSA (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments) lui emboîte le pas, en proposant une DJA de 0,01 µg/kg p.c./j pour la somme des 7 PCB indicateurs (CB 28, 52, 101, 118, 138, 153, 180) (AFSSA, 2003).

A la suite de cette prise de conscience collective et de ces restrictions légales, les concentrations de PCB dans l'environnement et dans les organismes vivants sont globalement en baisse. Cependant certains écosystèmes particulièrement impactés ou présentant un fonctionnement particulier peuvent encore poser des problèmes. Il est aussi intéressant de noter que les PCB de part leur rémanence sont de bons traceurs des mécanismes de bioaccumulation et permettent d'appréhender le fonctionnement des écosystèmes aquatiques.

II. Les Polybromodiphényles éthers (PBDE)

En remplacement des PCB aujourd'hui interdits, d'autres classes de molécules ont été développées. Parmi ces molécules, des molécules bromées utilisées comme retardateurs de flammes posent problème comme le tétrabromobisphénol A (TBBPA), l'hexabromocyclodécane (HBCD), les polybromobiphényles (PBB) et les polybromodiphényles éthers (PBDE). Dans ce travail, un intérêt particulier a été porté aux PBDE, qui présentent des niveaux élevés en Amérique du Nord où ils sont beaucoup utilisés.

II.1. Structure chimique et nomenclature

Les PBDE sont des molécules synthétisées par l'homme pour un usage industriel sur une même structure générique (Figure 3). Ils sont constitués d'un noyau biphenyle éther comportant jusqu'à cinq atomes de brome substitués par cycle phényle.

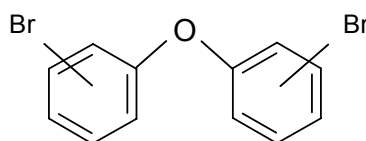


Figure 3 : Structure générique des PBDE.

Comme pour les PCB, le degré de substitution et la position des atomes de brome permettent de définir une nomenclature régissant l'appellation des composés. Cette nomenclature de l'IUPAC est décrite en détail dans le Tableau 1 (Ballschmitter et Zell, 1980). Elle permet d'attribuer un chiffre de 1 à 209 en fonction de la numérotation des atomes de carbone substitués par les bromes et de nommer les différents congénères de PBDE.

II.2. Les sources

Il n'existe pas à proprement parler de sources de PBDE naturelles, mais il a été observé des diphenyle-éthers polybromés méthoxylés dans des échantillons biologiques provenant d'une baleine à bec (*Mesoplodon mirus*) probablement accumulés par son alimentation. De plus, des éponges de l'océan indien (*Dysidea herbacea*, *Dysidea chlorea* et *Phyllospongia foliascens*) semblent contenir à "l'état naturel" ces composés (Carté et Faulkner, 1981, Handayani *et al.*, 1997). En dehors de ces quelques exemples, l'origine des PBDE est exclusivement anthropique, résultant de procédés industriels.

II.2.1. Procédés de fabrication

Les retardateurs de flamme sont utilisés depuis l'antiquité de façon empirique mais leur production commerciale n'a réellement débuté qu'en 1970 aux Etats Unis (De Wit, 2002). Les PBDE sont synthétisés par bromination d'un radical diphenyle-éther en présence d'un catalyseur (Rahman *et al.*, 2001).

Cette synthèse aboutit comme dans le cas de PCB à des mélanges techniques dont le degré de bromation varie en fonction des paramètres de la réaction de synthèse. On différencie ainsi trois types de mélanges techniques produits :

➤ Mélange commercial dit "Pentabromodiphényléther" (ComPeBDE) :

Ce mélange est composé essentiellement des congénères tétra, penta et hexabromés et de quelques traces d'octabromés. Ce mélange se présente sous forme d'un liquide visqueux ou semi solide.

➤ Mélange commercial dit "Octabromodiphényléther" (ComOctaBDE) :

Ce mélange de congénères présente des degrés de bromation supérieurs, avec la présence de congénères hexa, hepta et octabromés. Des traces de composés nonabromés et de décabromés peuvent être présentes dans ce mélange. Il se présente sous la forme de poudre ou de flocons

➤ Mélange commercial dit "Décabromodiphényléther" (ComDécaBDE) :

Ce mélange est constitué quasi exclusivement de composés décabromés, avec des traces de composés nonabromés et se présente sous la forme d'une poudre cristalline.

II.2.2. Utilisation

Les PBDE appartiennent à la grande famille des retardateurs de flammes parmi d'autres composés comme les polybromobiphényles (PBB), l'hexabromocyclododécane (HBCD) et les bisphénols bromés. Tous ces produits sont utilisés en tant qu'additifs ignifugeants dans une large gamme de produits industriels ou de consommation courante (Rahman *et al.*, 2001 ; De Wit, 2002) :

- Equipements électroniques : circuits imprimés d'ordinateurs, de téléviseurs...
- Construction : polystyrène, polyuréthane, peinture, mastic, éclairage, plastiques.
- Industries : fibres synthétiques, polymères, résines, colles, polyuréthane, câbles...
- Transport : partie électrique et revêtement textile des avions, bateaux et voitures.
- Textiles : ameublement, aménagement intérieur, habillement...
- Traitement du bois.

II.2.3. Volume produit

Aujourd'hui, la production de Com DécaBDE représente plus de 80% de la demande mondiale (De Wit, 2002). Ceci s'explique par la mise en place d'une réglementation européenne visant à interdire l'utilisation des mélanges les moins bromés (directive 2003/11/CE) à compter du 15 août 2004. A titre d'exemple, le BSEF (Bromine Science Environmental Forum) a estimé la demande commerciale mondiale en retardateur de flammes en 2001 (Tableau 3). Le mélange technique le plus utilisé au niveau mondial est le ComDécaBDE (56150 tonnes). Les Etats-Unis, suivis de près par l'Asie, sont les plus grands utilisateurs de PBDE, respectivement 33100 et 24650 tonnes de mélanges commerciaux de PBDE (ComPBDE). L'Europe utilise pour sa part 3 fois moins de PBDE que les Etats-Unis soit 8360 tonnes de ComPBDE en 2001.

Mélange industriel	Amériques ¹ (tonnes)	Europe ² (tonnes)	Asie ³ (tonnes)	Autres ⁴ (tonnes)	Total (tonnes)
PentaBDE	7100	150	150	100	7500
OctaBDE	1500	610	1500	180	3790
DécaBDE	24500	7600	23000	1050	56150

Tableau 3 : Demande commerciale de PBDE en 2001 (BSEF.org).

¹ Pays d'Amérique du nord, d'Amérique du sud et d'Amérique centrale; ² Pays d'Europe orientale et occidentale; ³ Australie; Nouvelle Zélande et sous continent indien; ⁴ Pays du reste du monde)

II.3. Propriétés physico-chimiques

Les PBDE, de par leur structure chimique commune, présentent des propriétés physico-chimiques semblables. Ils sont stables, non hydrolysables, qui ne réagissent pas avec les acides et les bases (De Wit, 2002). Cependant les propriétés individuelles de chaque congénère varient en fonction de leur degré de substitution et de la position des bromes.

La masse moléculaire des PBDE principalement étudiés va de 486 uma pour les composés tétrabromés à 960 uma pour le décabromé. Les principales propriétés physico-chimiques sont listées dans le Tableau 4.

Congénères	Température de fusion (°c)	Pression de vapeur à 25°c (°c)	Solubilité dans l'eau g.m ⁻³	Log Kow
TétraBDE	79-82	2,6-3,3 10 ⁻⁴	0,0109	5,9-6,2
PentaBDE	92-98	2,9-7,3 10 ⁻⁵	0,0024	6,5-7,0
HéxaBDE	-	4,2-9,4 10 ⁻⁶	0,0010	6,9-7,9
OctaBDE	75-220	1,2-2,2 10 ⁻⁷	0,0005	8,4-8,9
DécaBDE	290-306	<10 ⁻⁴	<0,0001	10

Tableau 4 : Propriétés physico-chimiques des PBDE (Watanabe et Tatsukawa, 1989; De Wit, 2002).

II.4. Toxicité

Tout comme les PCB, les PBDE peuvent entraîner des effets toxiques sur les organismes, principalement en terme d'exposition chronique.

II.4.1. Toxicité aiguë

Les PBDE présentent, au même titre que les PCB, une toxicité aiguë faible, avec des DL 50 pour les mélanges commerciaux supérieurs à 1g/kg pc (De Boer, 2000 ; De Wit, 2002). La toxicité aiguë des congénères individuels est du même ordre de grandeur (De Wit, 2002).

II.4.2. Toxicité chronique

Les PBDE sont considérés comme des perturbateurs endocriniens (Legler et Brouwer, 2003). Ils perturbent la fonction de reproduction et la fonction thyroïdienne (Darnerud, 2003). En effet, les structures chimiques des PBDE, et *a fortiori* de leur métabolites, sont proches de la structure des hormones thyroïdiennes ; cette ressemblance contribuerait à altérer les niveaux d'hormones thyroïdiennes. Les ouvriers travaillant à la production de mélanges commerciaux comme le ComDécaBDE ont plus de risques de développer une hypothyroïdie que le reste de la population (Bahn *et al.*, 1980). La perturbation de la fonction de reproduction a également été mise en évidence chez le poisson par Holm *et al.* (1993), qui constatent une diminution du succès de reproduction après une exposition au Bromkal 70 5DE (mélange technique de tétra BDE, penta BDE et d'hexa BDE). Les PBDE présenteraient aussi des propriétés immunotoxiques, notamment mises en évidence en laboratoire chez la souris (De Wit, 2002). Ils perturbent également le développement neuronal et peuvent induire des effets neurologiques permanents (Eriksson *et al.*, 1999). Ces composés possèdent un faible pouvoir cancérogène ; le décaBDE n'est pas classé cancérogène par IARC (International Agency for Research on Cancer), mais *a contrario*, le PBDE 47 peut induire un cancer par un mécanisme

non mutagène selon le même mode d'action que les PCB (De Wit, 2002). Ce sont des puissants inducteurs des cytochromes P450 (CYP), en particulier les CYP 1A1 et CYP1A2, mais contrairement aux PCB, les PBDE ne sont pas de puissants inducteurs de l'activité "aryl hydrocarbon hydrolase receptor" (AHR).

II.5. Cadre législatif

Devant les concentrations de PBDE retrouvées dans l'environnement et leur éventuel impact sur la santé des populations, l'utilisation de ces composés a été réglementée. Les premières mesures sont appliquées en Europe par la Directive 2002/95/CE du parlement européen. A compter du 1 juillet 2006, les nouveaux équipements électroniques ne doivent plus contenir ni PBB et ni PBDE. L'arrêté du 25/11/05 précise que le décaBDE peut malgré tout toujours être utilisé dans des applications polymérisées. La position du Conseil européen s'est durcie, il a prononcé l'interdiction de la production et de l'emploi, dans toutes les applications du marché européen, des mélanges techniques ComPentaBDE et ComOctaBDE depuis 2004 (directive 2003/11/CE). En Europe, il n'existe pas de norme régissant une dose journalière admissible pour l'homme, alors que le Canada a défini une dose maximale admissible de 0,8 mg/kg pc/j.

III. Distribution et devenir des PCB et PBDE dans les écosystèmes

Les polluants organiques persistants font partie du cortège des principaux contaminants préoccupants, classiquement retrouvés dans les milieux naturels. Ces substances sont chimiquement stables, faiblement biodégradables et lipophiles, ce qui leur confère un fort potentiel de bioaccumulation par les organismes.

La première identification de PCB dans l'environnement a été réalisée par Jensen en 1966 (Jensen, 1966) dans le cadre de travaux de recherche sur le DDT (dichlorodiphényltrichloroéthane). Il a détecté des molécules inconnues dans des échantillons de muscles de pygargues à queue blanche de Suède. Après deux ans de recherches, il a démontré que ces composés inconnus extrêmement résistants à la dégradation et aux acides étaient des PCB. Il a montré également des concentrations élevées de ces composés dans l'ensemble du réseau trophique de la mer Baltique (Jensen *et al.*, 1969). Les PBDE produits plus tardivement (dans le courant des années 1970) ont été mis en évidence pour la première fois dans des échantillons de poissons issus de la rivière Viskan, également en Suède, au début des années 80 (Andersson et Blomkvist, 1981). Depuis cette date comme les PCB, les PBDE ont été identifiés dans tous les compartiments de l'environnement (De Wit, 2002 ; Law *et al.*, 2003 ; Riget *et al.*, 2004 ; Braune, 2005).

III.1. Cycles biogéochimiques

Au cours de leurs diverses utilisations, les PCB et les PBDE vont peu à peu se diffuser dans l'environnement. Une fois dans le milieu naturel, en fonction de leurs propriétés physico-chimiques et des conditions rencontrées, ces composés vont se déplacer, se dégrader et s'accumuler dans les compartiments abiotiques et biotiques.

III.1.1. Origine des PCB et PBDE dans l'environnement

Les PCB et les PBDE sont des composés ubiquistes, ils sont présents dans tous les compartiments de l'environnement. Ils peuvent être introduits dans l'environnement par différentes voies. La première voie d'introduction est la diffusion directe chronique. Dans le cas des PCB, ils ont été majoritairement introduits dans l'environnement par relargage à partir des systèmes clos non contrôlables et de systèmes ouverts définis par l'OCDE (Organisation de Coopération et de Développement Economiques) (1973). Ces voies d'introduction ne sont *a priori* plus d'actualité aujourd'hui en Europe et Amérique du nord, grâce aux interdictions d'usage. Les PBDE peuvent être introduits dans l'environnement pendant la phase de fabrication et de traitement des polymères (Watanabe et Sakai, 2003). Ils sont ensuite relargués pendant la durée d'utilisation des produits traités par les PBDE et au cours de leur élimination. L'élimination des appareils électriques contenant des retardateurs de flamme posent encore aujourd'hui problème. Cependant la directive RoHS (Reduction of Hazardous Substances) (Directive 2002/95/CE) interdit l'usage des PBDE dans les matériels électriques produits à compter du 1 juillet 2006. L'arrêté du 25/11/05 précise que le décaBDE peut malgré tout toujours être utilisé dans des applications polymérisées.

La seconde voie d'introduction est accidentelle. L'exemple le plus connu concernant les PCB est l'accident de "Yusho" qui a eu lieu au Japon en 1968. Cet accident a conduit à l'empoisonnement de plus de 1600 personnes par ingestion accidentelle d'huile de riz contaminée aux PCB, PCDF (Polychlorodibenzofuranes), PCP (Pentachlorophénol) et PCDD (Polychlorodibenzo-para-dioxine) pendant le procédé de fabrication. A ce jour il n'est pas connu de relargage accidentel massif de PBDE dans l'environnement.

Une des dernières sources possibles de rejet dans l'environnement de ces composés est due à la malveillance, par relargage illégal et sauvage dans l'environnement de PCB ou de PBDE. A titre d'exemple, tout le monde a en mémoire l'affaire du "poulet belge" à la dioxine au début de l'année 1999. Des huiles minérales contenant des PCB (huiles de transformateurs Arochlor 1260/1254) ont été incorporées de façon criminelle ou accidentelle dans un lot de graisse destinée à l'alimentation des poulets. Au total environ 60 à 80 tonnes de graisse contaminée par 40 à 50 kg de PCB et environ 1g de dioxines ont été distribuées à divers

producteurs de nourriture pour animaux. Plus de 500 tonnes de nourriture contaminée furent vendues à plus de 1500 exploitations avec les conséquences que l'on sait (Focant, 2002).

III.1.2. Devenir des PCB et PBDE dans l'environnement

Une fois introduits dans le milieu naturel, les PCB et les PBDE vont se retrouver disséminés dans les différents compartiments de l'environnement. Les modes de cette dissémination sont majoritairement conditionnés par les propriétés physico-chimiques des composés. Le transport atmosphérique est un mode de distribution efficace pour ces molécules. La volatilisation des composés présents dans les sols, dans les décharges non contrôlées ou inappropriées est la principale source de contamination atmosphérique. Les composés sont ainsi véhiculés sur de longues distances et retombent sous forme de retombées sèches ou humides impactant des écosystèmes loin de toute source de pollution directe, comme l'Arctique ou la région des grands lacs (Hoof *et al.*, 1996 ; Wania et Mackay, 1993). *A contrario*, une zone protégée des apports atmosphériques massifs reste peu contaminée (à condition d'être à l'abri de source d'exposition directe bien sur). Ce phénomène a été démontré par Holmqvist *et al.* (2006), qui ont analysé la teneur en PCB dans le muscle d'anguilles prélevées en Nouvelle Zélande. Il a mis en évidence un niveau de contamination en PCB relativement faible chez ces anguilles (entre 0 et 14 ng.g⁻¹ poids frais). Il explique ce faible niveau de contamination par l'isolement de la nouvelle Zélande en terme de grands courants atmosphériques.

Une fois déposés, ces composés rémanents, qui possèdent une forte affinité pour les particules, s'accumulent dans des compartiments réservoirs comme le sol et les sédiments. Ils vont ensuite être remis en circulation par différents processus biotiques et abiotiques. Dans le cas des PCB, ils sont peu sensibles aux processus d'hydrolyse (Wang, 1998). *A contrario*, la photolyse est le mécanisme de dégradation chimique prépondérant pour ces composés. Les PBDE, comme les PCB, sont des molécules stables, mais il a été mis en évidence des mécanismes de débromation du décaBDE sous l'effet des UV (Ahn, 2006). Les composés les plus bromés sont les plus sensibles à ces dégradations qui aboutissent à la formation de composés moins chlorés, qui pour certains d'entre eux présentent des capacités d'accumulation dans les organismes vivants supérieures à la molécule d'origine (Eriksson *et al.*, 2004). Les composés bromés les plus lourds sont moins mobiles dans l'environnement que les composés plus légers, sans doute à cause de leur volatilité plus faible et de leur absorption plus forte aux sédiments. Les composés les plus légers *a priori* plus biodisponibles vont avoir tendance à se bioaccumuler. Ils ont un comportement dans l'environnement équivalent aux composés chlorés (Figure 4) (Watanabe et Sakai, 2003).

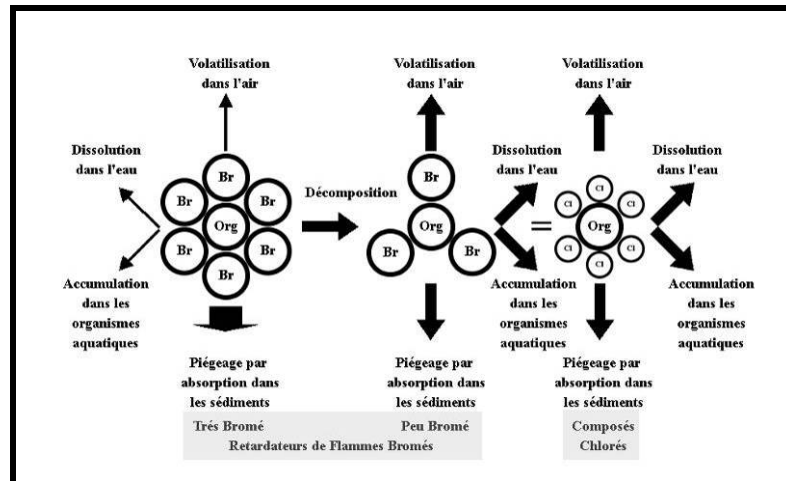


Figure 4 : Devenir des PBDE dans l'environnement d'après Watanabe et Sakai 2003.

Les PCB et les PBDE sont également dégradés par le compartiment biologique notamment par les micro-organismes. Ces mécanismes de dégradation dépendent des espèces bactériennes considérées, des conditions environnementales (température, pH, nutriments...) et des congénères considérés. La capacité de métabolisation par les bactéries diminue avec la masse atomique ($Cl > Br$) et la stéréochimie (para > méta > ortho) (Hakk et Letcher, 2003).

La biodégradation peut se réaliser par deux voies : la minéralisation où le contaminant est utilisé comme source de carbone et la co-métabolisation où le contaminant est métabolisé avec comme source d'énergie une source de carbone extérieure. D'une façon simplifiée pour les PCB, dans des conditions anaérobies majoritairement rencontrées dans les sédiments en milieu aquatique, les micro-organismes entraînent la déchloration partielle des composés les plus chlorés. Alors que dans des conditions aérobies, ce sont les congénères les moins chlorés qui sont dégradés par la cassure du cycle biphényle (Borja *et al.*, 2005). A priori, concernant les PBDE, seule l'utilisation des composés les moins bromés comme source de carbone a été constatée (Hakk et Letcher, 2003). Ces composés organiques sont donc distribués dans l'ensemble des compartiments de l'environnement et des organismes.

III.2. Distribution et devenir dans les organismes et les réseaux trophiques

Une fois introduits dans l'environnement, les PCB et les PBDE se disséminent dans l'ensemble des compartiments de l'écosystème. Ces composés vont impacter les êtres vivants, soit par exposition directe de l'organisme au milieu, soit par exposition par voie trophique, l'organisme se contaminant par les proies qu'il consomme. La voie trophique est la voie d'exposition majoritaire pour les POP (Pompa *et al.*, 2003 ; Sjödin *et al.*, 2003). Ces mécanismes de transfert, d'accumulation et de transformation sont régis par différents paramètres dont les propriétés physico-chimiques des POP et les espèces biologiques considérées.

III.2.1. Notion de bioconcentration, bioaccumulation et bioamplification

Les propriétés physico-chimiques des PCB et des PBDE (Log Kow importants, faibles solubilités) et leurs interactions avec le milieu naturel définissent la fraction biodisponible de ces contaminants, c'est-à-dire la fraction qui peut être accumulée par un organisme.

Les processus d'accumulation des contaminants dans les organismes sont ainsi définis selon plusieurs mécanismes, la bioconcentration, la bioaccumulation et la bioamplification dont on peut rendre compte à partir de plusieurs facteurs (Mackay et Fraser, 2000).

Bioconcentration :

La bioconcentration est le phénomène par lequel une substance chimique pénètre directement du milieu ambiant dans un organisme vivant. Dans notre contexte, ce passage se fait directement de l'eau à l'organisme, par voie cutanée, digestive et/ou respiratoire. La substance considérée s'accumule dans l'organisme, conduisant à une concentration plus élevée dans l'organisme ciblé que dans le milieu ambiant. Un facteur de bioconcentration (BCF) est défini par le rapport d'une substance à l'intérieur d'un organisme sur sa concentration dans l'eau, compte tenu seulement de l'absorption provenant du milieu ambiant :

$$\text{BCF} = \frac{[\text{Contaminant}]_{\text{organisme}}}{[\text{Contaminant}]_{\text{eau}}}$$

Bioaccumulation :

La bioaccumulation est le phénomène qui conduit à l'accumulation par un organisme d'une substance chimique à une concentration supérieure à celle de son milieu de vie. La bioaccumulation englobe donc l'absorption par la voie directe (bioconcentration) et l'absorption par la voie trophique.

Bioamplification:

La bioamplification est le phénomène selon lequel un contaminant se transmet à un consommateur par sa nourriture, aboutissant ainsi à une concentration plus importante dans l'organisme du prédateur que dans celui de la proie qu'il consomme. Ce phénomène se rencontre classiquement dans le cas des contaminants organiques, et plus particulièrement ceux qui sont peu métabolisables. Un facteur de bioamplification (BAF) peut être défini comme une constante issue du rapport de la concentration d'une substance dans le prédateur sur la concentration dans la proie, compte tenu seulement de l'absorption trophique :

$$\text{BAF} = \frac{[\text{Contaminant}]_{\text{prédateur}}}{[\text{Contaminant}]_{\text{proie}}}$$

Ainsi, les PCB et les PBDE vont se disperser dans tous les organismes vivants et vont avoir tendance à se bioaccumuler dans les réseaux trophiques. Cependant, tous les congénères ne vont pas se bioaccumuler de façon identique, les congénères les moins métabolisés, comme le CB 153, font être fortement bioaccumulés (Kannan et al., 1995), alors que des congénères plus métabolisés vont théoriquement peu à peu diminuer le long de la chaîne trophique. L'ensemble des mécanismes influençant la bioaccumulation dans un organisme défini est illustré Figure 5.

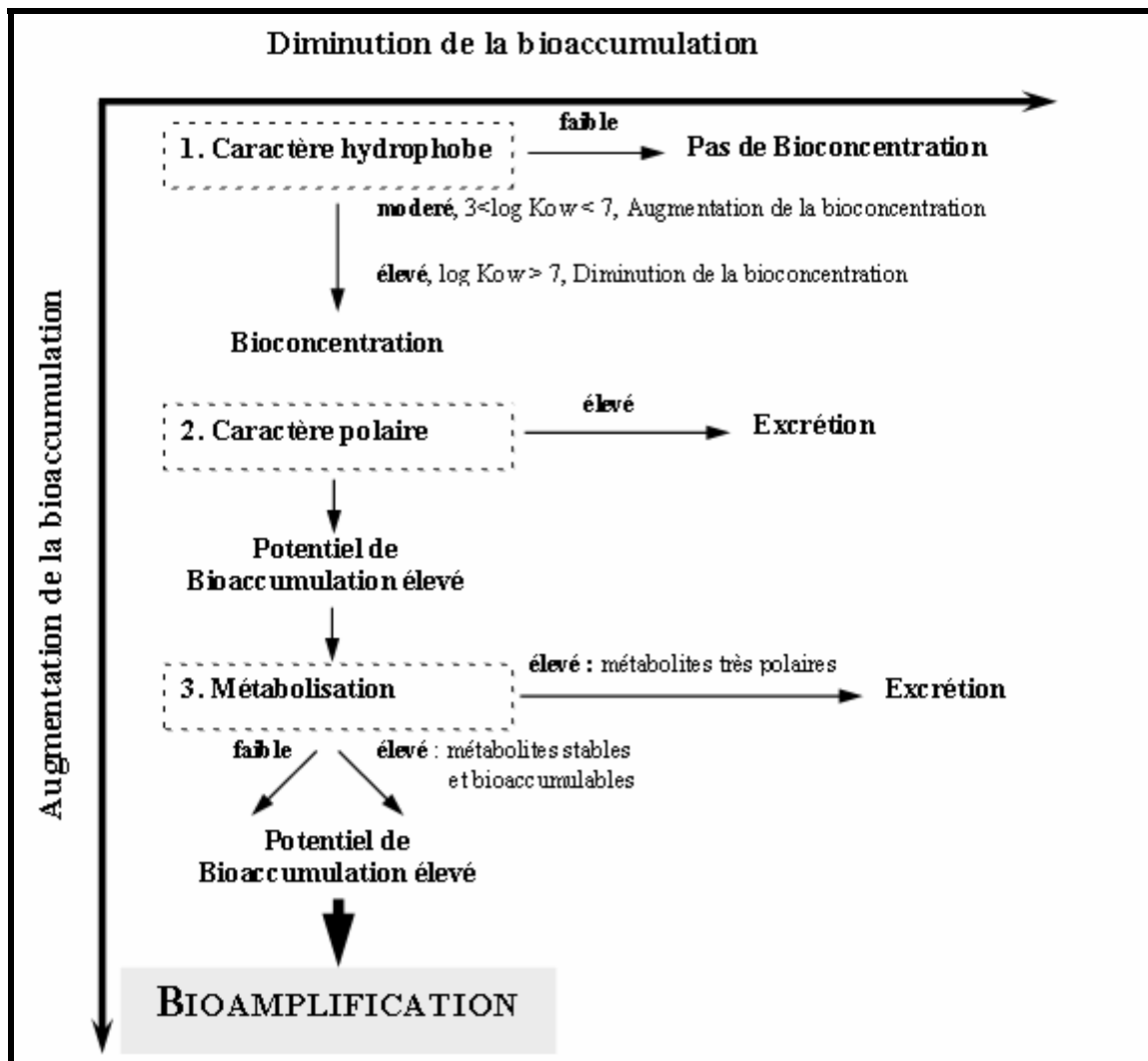


Figure 5 : Propriétés physico-chimiques des contaminants agissant sur leur potentiel de bioaccumulation (d'après Norstrom et Letcher, 1996).

Le potentiel de bioaccumulation d'un composé dépend donc des propriétés physico-chimiques intrinsèques de la molécule ($\log K_{ow}$ notamment) et de la physiologie de l'espèce impactée (capacité de métabolisation notamment). Les mécanismes de contamination et de dépuración au niveau d'un organisme sont illustrés Figure 6 d'après Mackay (2000).

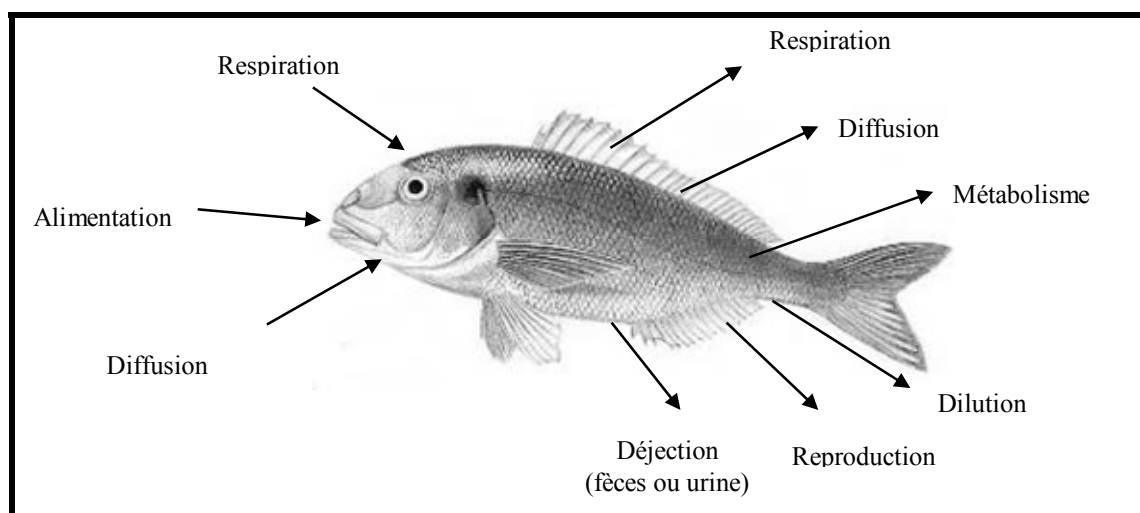


Figure 6 : Mécanismes de contamination et de dépuraction au niveau d'un organisme (Mackay, 2000).

La notion de bioamplification classiquement admise a été critiquée récemment par Gray (2002), écologiste de son état. Il remet en cause le phénomène de bioamplification surtout dans les réseaux trophiques marins. Il a analysé 148 papiers contenant le mot "biomagnification" dans le titre, et pour lui seulement 54% prouvent un phénomène de bioamplification des PCB.

Il regrette le manque de prise en compte de la voie dissoute comme voie de contamination et souligne l'importance de l'unité d'expression des résultats ng.g^{-1} poids sec ou ng.g^{-1} de lipide afin de pouvoir comparer les résultats obtenus entre différentes espèces. Il soulève un autre biais dans l'étude de la bioamplification. En effet, lors de l'étude de chaînes trophiques complexes, les espèces de petite taille sont souvent prises en considération dans leur globalité, alors que pour les espèces de taille plus importante, seul un organe ou deux est considéré. Il déplore également l'absence de prise en compte des phénomènes de bioconcentration dans le processus de bioaccumulation par de nombreux auteurs.

Les spécialistes du domaine lui ont adressé un droit de réponse (Fisk *et al.*, 2003). Les auteurs défendent le mécanisme de bioamplification en tant qu'augmentation des concentrations de contaminant dans les organismes au fur et à mesure que l'on progresse le long de la chaîne trophique. Bien sur, ce concept doit être interprété à la vue de différents paramètres comme la teneur en lipide du tissu analysé, l'âge et la taille des individus, le niveau trophique, la biologie et la physiologie des espèces étudiées. A titre d'exemple, le taux d'assimilation est plus important chez les homéothermes que chez les poïkilothermes, ce qui conduit à une bioaccumulation plus importante chez les homéothermes.

III.2.2. Métabolisation des PCB et PBDE

III.2.2.1. Généralité sur la métabolisation des composés chimiques

Comme nous venons de le voir, une fraction des PCB et des PBDE est accumulée par les organismes sans modification préalable de leur structure chimique. Cependant, une partie de ces composés va subir des mécanismes de biotransformation mis en œuvre par les organismes comme moyen de détoxification.

Ces mécanismes de biotransformation se décomposent en deux phases (Figure 7).

➤ Phase I ou phase de fonctionnalisation :

Cette phase a pour but de former des métabolites électrophiles polaires *a priori* plus facilement éliminables par l'organisme, par l'introduction d'une fonction chimique nouvelle (-OH, -NH₂, -COOH). La plupart du temps, ces réactions sont des réactions d'oxydation faisant intervenir des systèmes enzymatiques particuliers, les cytochromes P 450 (CYP), mais elles comportent également des réactions d'hydrolyse et de réduction. Ces mécanismes prennent place au niveau cellulaire (réticulum endoplasmique), essentiellement au niveau du foie et des glandes surrénales, mais peuvent avoir lieu dans d'autres organes (intestins, gonades...). La caractéristique de ces systèmes enzymatiques est leur capacité d'induction par les hormones, les médicaments et les xénobiotiques (notamment les PCB et les PBDE).

Ces systèmes enzymatiques ont été mis en évidence au niveau de nombreuses espèces, de la bactérie aux mammifères (Nelson, 1999), en passant par les poissons (Goksøyr and Förlin, 1992, Van der Oost, 2003), les crustacés et les mollusques (Solé and Livingstone 2005). Cependant les capacités de métabolisation diffèrent entre les espèces. Les espèces dites les plus évoluées présentent des capacités de biotransformation supérieures aux taxons inférieurs (Mammifères > Poissons > Crustacés > Mollusques).

➤ Phase II ou phase de conjugaison.

Ces réactions de phase II permettent l'ajout d'un radical hydrophile afin de faciliter le transport et l'élimination du métabolite ainsi formé. Ces réactions ont lieu soit sur le métabolite issu de la phase I, soit sur le composé parent. Les molécules hydrophiles utilisées peuvent être : l'acide glucuronique, l'acide sulfurique, le glutathion et des acides aminés.

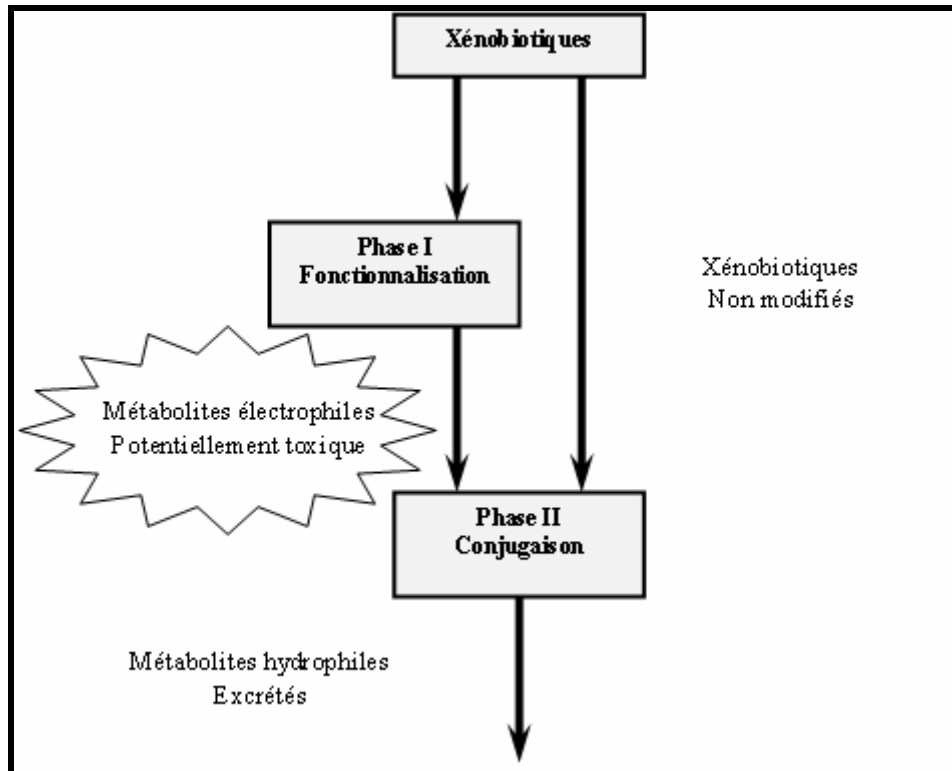


Figure 7 : Schéma synthétique des mécanismes de biotransformation des xénobiotiques.

III.2.2.2. Métabolisation des PCB

La biotransformation des PCB dépend de leur structure moléculaire et plus précisément du positionnement des atomes de chlore sur le cycle biphényle (Boon *et al.*, 1992). Pour être facilement biodégradés, les congénères doivent présenter une paire d'atomes d'hydrogène vicinaux en position méta ou para. L'augmentation du nombre de substitutions de chlore en position ortho diminue la vitesse de métabolisation. La Figure 8 adaptée d'après Cravedi et Narbonne, 2002, illustre les voies de métabolisation supposées des PCB. La première étape de métabolisation fait intervenir des cytochromes P450 particuliers comme le CYP1A1, CYP1A2, CYP2B1, CYP2B2 et vraisemblablement le CYP3A chez l'homme. Les PCB coplanaires inducteurs des CYP1A sont préférentiellement oxydés par ces isoenzymes ; il est à noter que les mécanismes d'hydroxylation de ce type de composés ont lieu de façon préférentielle sur le carbone en para du cycle le moins chloré. *A contrario*, les PCB globulaires sont plutôt métabolisés par les CYP2B et l'hydroxylation se produit surtout sur une position en méta libre. Il faut également noter que l'oxydation des PCB peut entraîner une déchloration de la molécule. Ces capacités de métabolisation varient selon l'espèce et augmentent de façon générale avec le niveau trophique et le niveau d'organisation (Tanabe *et al.*, 1986). Les métabolites hydroxylés ainsi formés sont excrétés par les voies naturelles, soit directement, soit après conjugaison avec l'acide glucuronique, un groupement sulfate ou le glutathion.

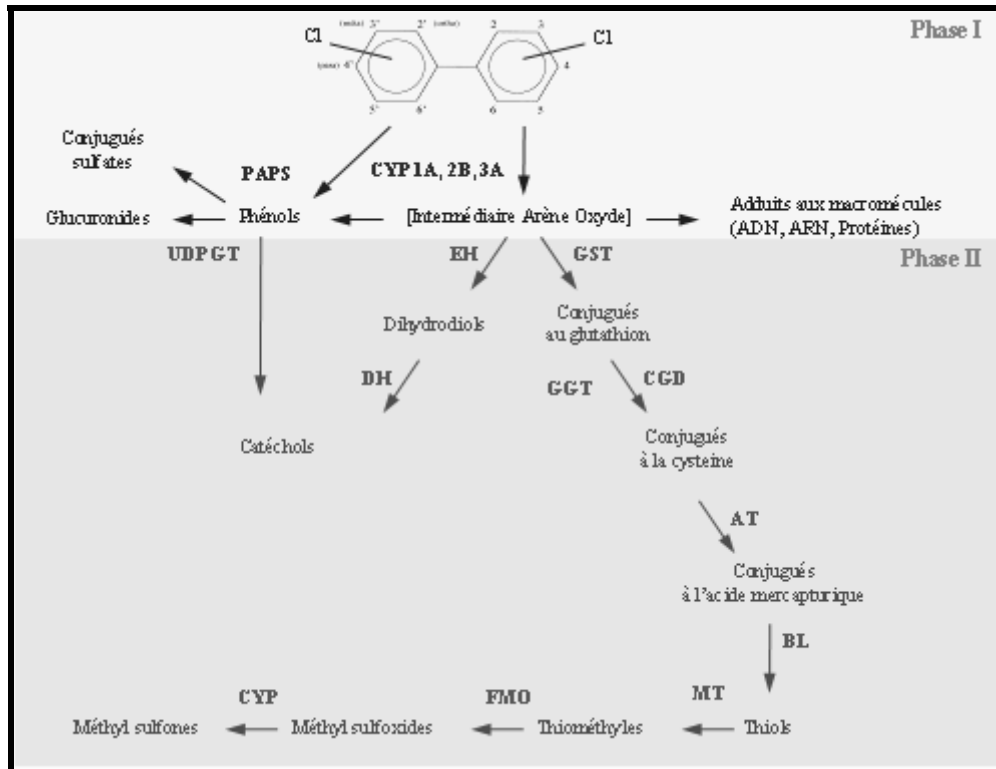


Figure 8 : Schéma de la métabolisation des PCB d'après Narbonne et Cravedi 2002.

Cependant, il faut toutefois garder à l'esprit que certains métabolites comme certains PCB hydroxylés ou certains métabolites méthyl-sulfonylés présentent un caractère lipophile ($\log K_{ow} > 5$) et peuvent se bioaccumuler dans les tissus biologiques (Buckman *et al.*, 2006).

En fonction de leur structure moléculaire et de leur capacité à être métabolisés les PCB ont été séparés en quatre groupes (Kannan *et al.*, 1995) (Les 7 PCB prioritaires sont en gras dans la liste):

➤ **Groupe 1 :**

Non métabolisable, pas d'atomes de carbone vicinaux libres

CB 146, **CB 153**, CB 169, CB 172, **CB 180**, CB 183, CB 187, CB 194

➤ **Groupe 2 :**

Métabolisable par CYP 450 2B, atomes de carbone vicinaux libres en position méta et para.

CB 52, CB 92, **CB 101**, CB 135, CB 136, CB149, CB 174, CB 199.

➤ **Groupe 3 :**

Métabolisable par CYP 450 2B, atomes de carbone vicinaux libres en position ortho et méta.

CB 74, CB 77, CB 99, CB 105, **CB 118**, CB 126, CB 128, **CB 138**, CB 156, CB 170, CB 177.

➤ **Groupe 4 :**

Métabolisable par CYP 450 1A et 2B, atomes de carbone vicinaux libres en position ortho, méta et para, facilement métabolisable.

CB 18, CB 44, CB 49, CB 70, CB 84, CB 87, CB 91, CB 97, CB 110, CB 132.

Ce classement permet d'anticiper les PCB qui vont se bioaccumuler dans les chaînes trophiques ou non. Ainsi, le CB 153 classé dans le groupe 1 est très fortement bioaccumulé dans les organismes alors que le CB 49, qui appartient au groupe 4, est aisément biotransformé et ne se bioaccumule pas ou peu.

En conclusion, la capacité de métabolisation des PCB varie en fonction du congénère et de l'espèce considérée, mais dans l'ensemble, les PCB présentent une forte capacité d'accumulation dans les organismes.

III.2.2.3. Métabolisation des PBDE

Tout comme les PCB, la biotransformation des PBDE dépend de leur structure moléculaire. Ce sont *a priori* des inducteurs des enzymes de phase I et II (De Wit, 2002).

La biotransformation des PBDE a été clairement mise en évidence par dosage de métabolites hydroxylés (OH- et/ou -MeO-PBDE) dans différentes espèces (bactéries, poissons, mammifères) (Hakk et Letcher, 2003, Buckman *et al.*, 2006). Cette biodégradation a été également mise en évidence *in vitro* (De Wit, 2002, De Boer *et al.*, 1998). La présence de ces métabolites confirme qu'une partie des PBDE est dégradée par les cytochromes P450 durant la phase I; ces systèmes enzymatiques sont vraisemblablement les mêmes que dans le cas des PCB le CYP 1A1 et le CYP A2 (De Wit, 2002).

Cependant les mécanismes mis en jeu dans cette biodégradation ne sont pas encore clairement identifiés, le manque d'étalons et leur coût financier ralentissent encore les recherches.

III.2.3. Niveau de contamination et tendance dans l'environnement

III.2.3.1. Niveau de contamination

Comme déjà illustré précédemment, les PCB et les PBDE sont des contaminants ubiquistes, ils ont été retrouvés dans tous les compartiments de l'environnement. A titre d'indication et de façon non exhaustive, les niveaux présents dans l'environnement marin et dans les écosystèmes d'eau douce sont illustrés ci-dessous (Tableau 5 et Tableau 6).

D'une façon générale, le niveau de contamination de la phase dissoute est faible, alors que la phase particulaire et les sédiments servent de compartiment réservoir. Le niveau de contamination des espèces biologiques augmente globalement avec le niveau trophique.

		Somme PCB	Somme PBDE	Deca BDE	Unités
Eau		1-150 [g]	-	nd-75 [g]	Ng.l ⁻¹
Sédiment		0,03-61000 [g]	nd -2 250 [a]	nd - 16000 [a]	µg.g ⁻¹
Plancton	Copépodes	2-80 [c][e][h]	2-6 [h]	-	ng.g ⁻¹ lipide
	Amphipodes	38 [c]	-	-	ng.g ⁻¹ lipide
Bivalves	Moules	1000-2400	5-340 [d]	-	ng.g ⁻¹ lipide
Poissons	Morue	100 [c]	2-360	-	ng.g ⁻¹ lipide
	Hareng	200-978 [f]	3-61 [a][f]	-	ng.g ⁻¹ lipide
Oiseaux	Guillemot	360-1100 [c]	130-570 [a]	-	ng.g ⁻¹ lipide
Mammifères	Phoques	700-100 000 [h][i][k]	20-6000 [a]	-	ng.g ⁻¹ lipide
	Grands dauphins	7000-57 000 [f]	180-8000 [b]	-	ng.g ⁻¹ lipide
	Cachalots	700-1900 [j]	187-349 [b]	-	ng.g ⁻¹ lipide

Tableau 5 : Niveaux de contamination en PCB et PBDE quelques organismes dans l'écosystème marin.

[a] De Wit, 2002, [b] De Boer *et al.*, 1998, [c] Borga *et al.*, 2001; [d] Johansson *et al.*, 2006 ; [e] Muir *et al.*, 2003 ; [f] Storelli *et al.*, 2003 ; [g] Erickson, 1997 ; [h] Burreau *et al.*, 2006 ; [i] Evans *et al.*, 2004.

		Somme PCB	Somme PBDE	Deca BDE	Unités
Eau		1-150 [g][q]	-	nd-75	ng.l ⁻¹
Sédiment		0,03-250 [g]	nd -2 250 [a]		µg.g ⁻¹
Bivalve	Anodonte	nd-400 [l]	-	-	ng.g ⁻¹ lipide
Poisson	Truites	239-14 966 [n]	140-1200 [a]	nd	ng.g ⁻¹ lipide
	Anguilles	nd-64 000 [o][p]	5-1700 [a]	nd	ng.g ⁻¹ lipide
Mammifères	Loutre	1000-50 000 [m]	-	nd	ng.g ⁻¹ lipide

Tableau 6 : Niveaux de contamination en PCB et PBDE quelques organismes dans les écosystèmes aquatiques continentaux. [g] Erickson, 1997 ; [j] Shaw *et al.*, 2005; [k] Kajiwara *et al.*, 2001; [l] Korhonen *et al.*, 1997;

[m] Ashley *et al.*, 2003 ; [n] Holmqvist *et al.*, 2006 ; [o] Wolska *et al.*, 2003.

III.2.3.2. Evolution de la concentration en PCB et PBDE au cours du temps

Le niveau d'imprégnation en PCB et PBDE a été suivi dans différentes espèces par différents auteurs sur les vingt ou trente dernières années (Figure 9, Figure 10, Figure 11 et Figure 12). D'une façon générale, les mesures d'interdiction prises à l'encontre des PCB ont contribué à une diminution des niveaux globaux de contamination à partir des années 1970 jusqu'à nos jours. *A contrario*, le niveau des PBDE dans l'environnement augmente depuis les années 1970. Une inversion de la tendance semble se profiler dans certaines zones du globe depuis les années 1990-2000.

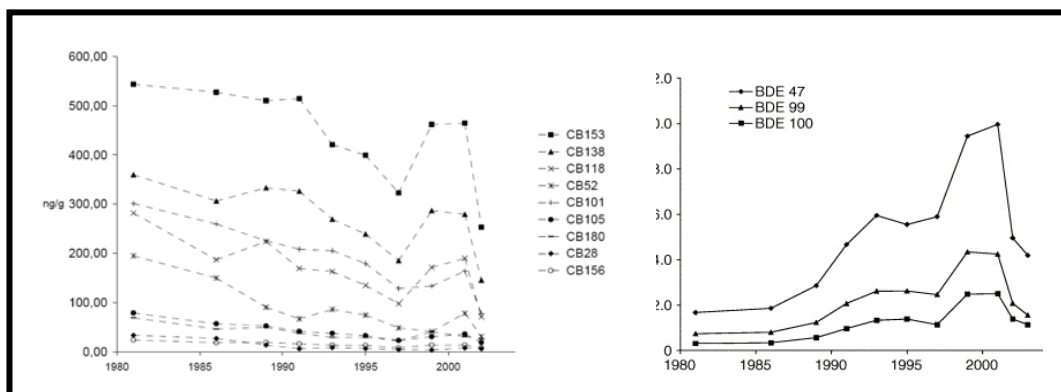


Figure 9 : Evolution de la concentration de différents congénères de PBDE et PCB dans des moules échantillonnées entre 1981 et 2003 à Villerville à la sortie de l'estuaire de la Seine (Johansson *et al.*, 2004).

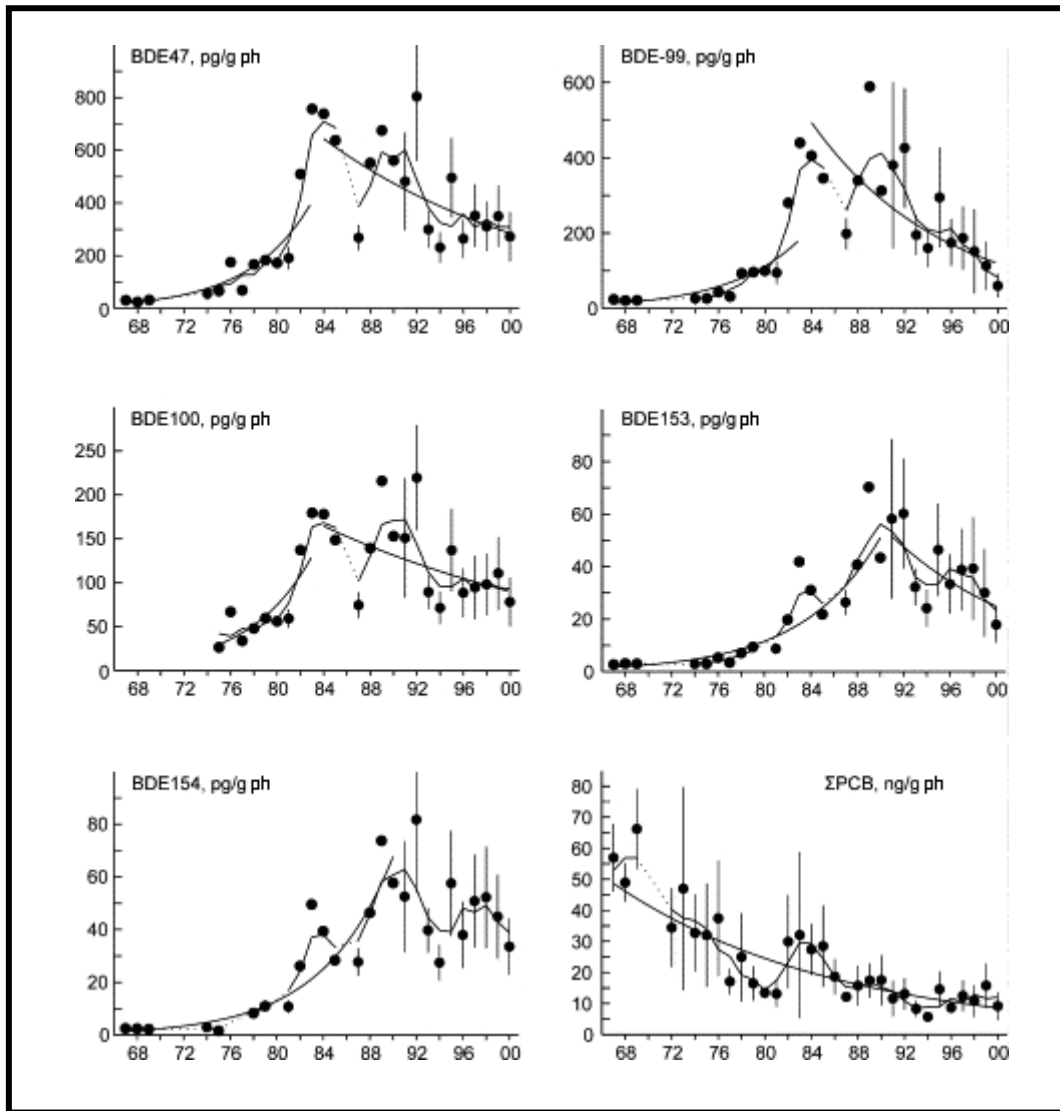


Figure 10 : Evolution de la concentration des PBDE et des PCB dans le brochet du lac Bolen en Suède. (Kierkegaard *et al.*, 2004).

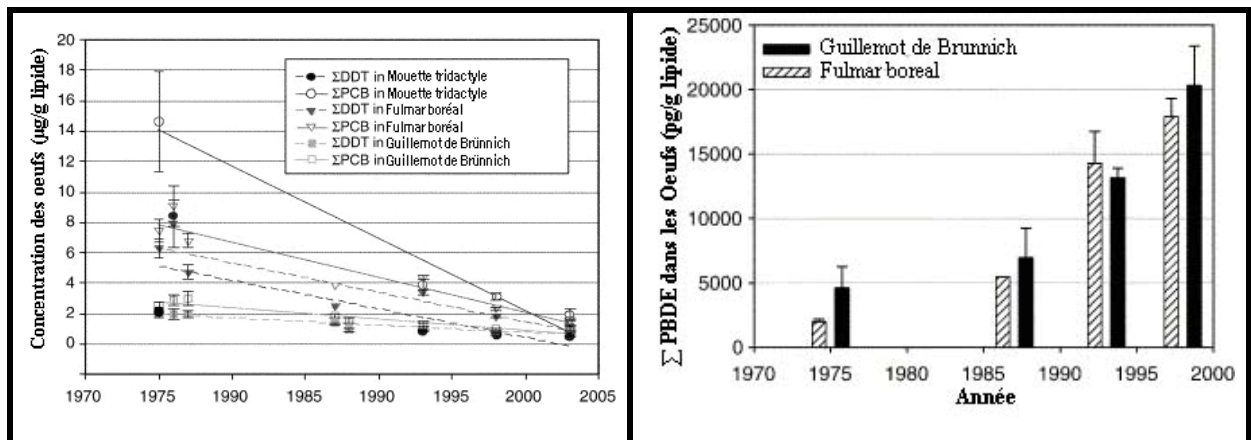


Figure 11 : Evolution de la concentration moyenne en PCB et PBDE dans les oeufs d'oiseaux de mer de l'île Prince Léopold de 1975 à nos jours (Braune *et al.*, 2005).

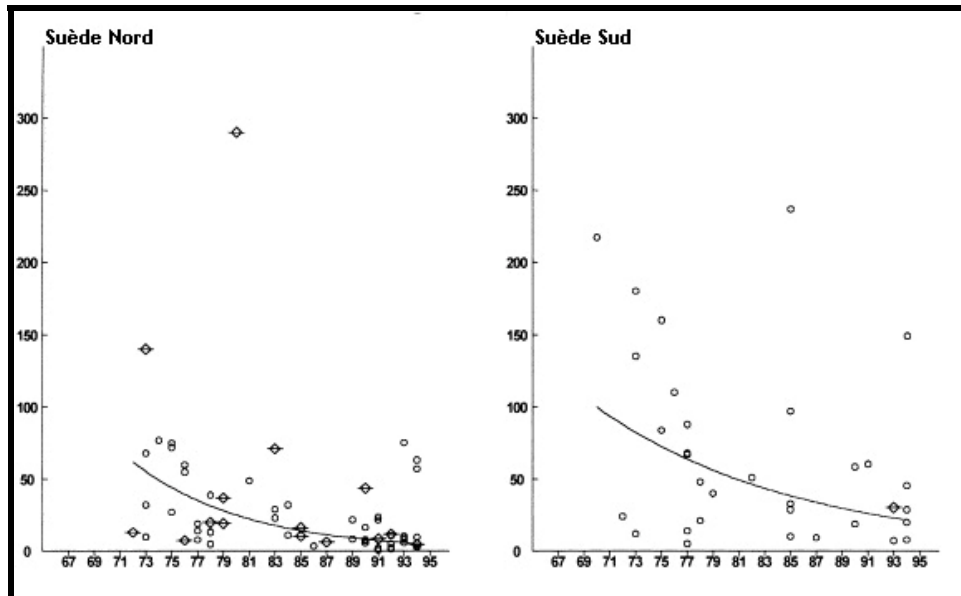


Figure 12 : Evolution de la concentration moyenne en PCB ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ lipide) chez la loutre d'Europe (*Lutra lutra*) en Suède entre 1968-99 (Roos *et al.*, 2001).

Les niveaux de PCB observés dans les différents écosystèmes sont globalement en diminution, les niveaux de PBDE semblent également depuis peu suivent la même tendance. Peu de données sont aujourd'hui disponibles pour évaluer le niveau de contamination des écosystèmes aquatiques français en dehors du suivi réalisé dans le cadre du RNO par l'IFREMER (Johansson *et al.*, 2006) et d'études ponctuelles comme celle réalisée sur la Loire (Bragigand, 2005) ou sur la Camargue (Roche *et al.*, 2002). Ce type d'étude est rendu longue et fastidieuse par les techniques d'extraction et d'analyse qui doivent être mises en place pour l'analyse des composés organiques (PCB, PBDE mais également HAP). Mais récemment, de nouvelles techniques d'extraction comme les extracteurs micro-ondes et les extracteurs par solvant chauffé sous pression ont permis d'automatiser les protocoles de préparation et d'augmenter ainsi le nombre d'échantillons traités par jour et par opérateur.

IV. Buts des travaux

Dans ce contexte, le but de ces travaux est d'appréhender les phénomènes d'accumulation, de dépuration et de transfert des PCB et des PBDE au sein des écosystèmes aquatiques à travers des expérimentations en milieu contrôlé et à travers un suivi environnemental.

Le premier objectif a été de développer des techniques d'analyse simples, rapides et efficaces des PCB et des PBDE dans les matrices biologiques complexes. Ces protocoles d'analyse développés par MAE (Extraction assistée par microonde) et par ASE (Extraction par solvant chauffé sous pression) étaient un pré-requis obligatoire pour l'étude des mécanismes de transfert et d'accumulation des PCB et PBDE. Ces protocoles ont permis

d'augmenter de façon considérable le nombre d'échantillons traités par jour et par manipulateur (de 6 échantillons à plus de 24 échantillons), ce qui a permis l'analyse de plus de 3500 échantillons à l'échelle de cette thèse. Ces résultats font l'objet d'une publication présentée dans ce manuscrit (publication 1 en annexe).

Le deuxième objectif de ces travaux a été de mener une étude en milieu contrôlé des mécanismes d'accumulation et de dépuraction des PCB et des PBDE. Cette étude a été réalisée grâce à des cinétiques d'accumulation et de dépuraction en milieux contrôlés de quelques composés modèles (CB 77, CB 153, BDE 47, BDE 153, chrysène, benzo(a)pyrène, fluoranthène). Trois espèces modèles de différents niveaux trophiques ont été choisies pour ces expositions: une algue unicellulaire, producteur primaire, (*Isochrysis galbana*), un bivalve filtreur, consommateur primaire (*Mytilus edulis*) et un poisson téléostéen, consommateur secondaire (*Sparus aurata*). Ces expérimentations ont été conduites dans le cadre d'un programme européen financé par le CEFIC LRI (European Chemical Industry Council, Long-Range Research Initiative): ECO-1AINIA-1100 Environnement : persistance, bioaccumulation and toxicity.

Ces expérimentations en milieu contrôlé ont eu pour but d'étudier et de comparer les capacités d'accumulation et de dépuraction des différents composés ciblés, mais également de déterminer si leurs structures chimiques (PCB coplanaire ou non, degré de substitution, substitution Cl/Br, différence structurale ...), leurs lipophilies (log Kow) et l'espèce biologique étudiée influencent ces capacités d'accumulation et de dépuraction. Le jeu de données généré a également servi à calibrer un modèle de bioaccumulation développé par E.Alonso et R.S.J.Tarazona (Laboratoire d'écotoxicologie, INIA, Institut pour l'agriculture et la recherche agroalimentaire, Madrid).

Le troisième objectif a été l'étude des mécanismes de transfert des PCB et des PBDE dans les réseaux trophiques aquatiques en milieu naturel. Les facteurs influençant les phénomènes d'accumulation et de dépuraction mis en évidence lors des expérimentations en milieux contrôlés ont été confrontés aux niveaux de contamination de différentes espèces d'un réseau trophique naturel.

Premièrement, une étude sur la contamination des différents estuaires français (Seine, Vilaine, Loire, Gironde et Ster) à travers l'étude d'un organisme cible, le flet, a été menée. Ce suivi avait pour but de définir le niveau de contamination du biota dans les estuaires étudiés et de les classer en fonction de leur niveau de contamination en PCB et PBDE.

Dans un deuxième temps, l'étude environnementale a été focalisée sur l'estuaire de la Gironde. En effet, une étude préliminaire réalisée en 2001, dans le cadre de la première phase du programme GIS-ECOBAG sur la contamination de différentes espèces de poissons, a mis

en évidence des concentrations très élevées dans le muscle de certaines espèces comme l'anguille européenne (*Anguilla anguilla*) (resp. plus de 800 ng/g ps sur la base des 7 PCB prioritaires suivis comme indicateurs).

Le but de ce travail a été d'essayer d'appréhender les phénomènes de transfert et d'accumulation des PCB et PBDE dans le réseau trophique pélagique de l'estuaire de la Gironde, afin de confirmer ou infirmer les résultats de l'étude préliminaire sur la contamination de l'anguille.

Dans un premier temps, afin d'appréhender les voies de contamination possibles de l'anguille et des autres poissons de l'estuaire, la contamination en PCB (CB 28, CB 52, CB 101, CB 118, CB 138, CB 153 et CB 180) et en PBDE (BDE 47, 99, 119, 153) du compartiment abiotique de l'estuaire (eau et particules) a été caractérisé. Les niveaux de contamination des petits crustacés (copépodes, mysidacés, gammarés et crevettes), proies potentielles de l'anguille ont également été caractérisés.

Dans un deuxième temps, les niveaux de contamination de différentes espèces de poissons (maigre, mullet, sole et anguille) issus de l'estuaire ont été caractérisés. Un échantillonnage plus poussé a été réalisé pour le suivi de la contamination de l'anguille (240 individus de différentes classes d'âge).

Ce travail sur l'estuaire de la Gironde a donc visé à :

- Caractériser les niveaux de contamination de la base du réseau trophique et à définir leur variabilité spatio-temporelle. Pour cela plusieurs campagnes d'échantillonnage ont été menées, la première au niveau de Pauillac (point fixe au milieu de l'estuaire salé) sur une période de deux ans (2003-2004), puis des campagnes mensuelles de prélèvement en différents points de l'estuaire sur une période allant d'Avril à Septembre 2003.

- Caractériser les niveaux de contamination de quelques espèces cibles de poissons (maigre, mullet, sole et anguille).

- Caractériser le niveau de contamination global de l'anguille européenne en dressant une première cartographie des niveaux de contamination par les PCB et PBDE de l'espèce *Anguilla anguilla* selon ses stades biologiques (civelle, anguillette, anguille jaune, anguille argentée).

Matériels et Méthodes

Dans le cadre de ce travail, les phénomènes d'accumulation des PCB et des PBDE dans les écosystèmes aquatiques ont été étudiés. Deux approches ont été développées. La première approche est une approche expérimentale en milieu contrôlé, ciblée sur trois espèces (algue unicellulaire, moule bleue, daurade) et sur des composés modèles (CB 77, CB 153, BDE 47 et BDE 153). La deuxième approche est une approche en milieu naturel. La contamination en PCB et PBDE du réseau trophique pélagique de l'estuaire de la Gironde a été caractérisée de la base du réseau trophique (plancton et petits crustacés) aux poissons (anguille, flet, maigre...).

I. Expérimentations en milieu contrôlé

La première partie de ce travail cherche à caractériser les cinétiques d'accumulation et de déuration des PCB et des PBDE en milieu contrôlé. Ces expérimentations ont été réalisées dans le cadre d'un programme européen financé par le CEFIC LRI (European Chemical Industry Council, Long-Range Research Initiative) (ECO-1AINIA-1100 "Environnement : persistance, bioaccumulation and toxicity").

Des espèces de niveaux trophiques différents, une algue unicellulaire (*Isochrysis galbana*) ; un bivalve filtreur (*Mytilus edulis*) et un poisson (*Sparus aurata*), ont été exposées à des congénères individuels de PCB (CB 153 et CB 77) et de PBDE (BDE 47 et BDE 153). Afin de pouvoir comparer les cinétiques obtenues avec les POP à d'autres types de contaminants, des congénères de HAP (chrysène, benzo(a)pyrène, fluoranthène) ont été également étudiés comme molécules modèles des phénomènes de métabolisation.

L'exposition des algues a été réalisée par voie directe, alors que la contamination des moules et des daurades a été réalisée par voie trophique. L'influence de la structure chimique (PCB coplanaire ou non, degré de substitution, substitution Cl/Br, différence structurale ...), de la lipophilie (log Kow) et de l'espèce biologique considérée a été étudiée.

Le jeu de données généré a également servi à calibrer un modèle de bioaccumulation développé par E.Alonso et R.S.J.Tarazona (Laboratoire d'écotoxicologie, INIA, Institut national pour l'agriculture et la recherche agroalimentaire, Madrid).

I.1. Les Algues

I.1.1. Principe de l'expérimentation

Une exposition directe d'algues unicellulaires (*Isochrysis galbana*) à différents contaminants a été réalisée.

Trois classes de contaminants ont été ciblées :

- Les PCB avec comme molécules modèles : CB 153 (2,2',4,4',5,5' Hexa CB)
CB 77 (3,3',4,4' Tetra CB)
- Les PBDE avec comme molécules modèles : BDE 47 (2,2',4,4' Tetra BDE)
BDE 153 (2,2',4,4',5,5' Hexa BDE)
- Les HAP avec comme molécules modèles : Benzo [a] pyrène (BaP)
Chrysène (Chrys)
Fluoranthène (Fluo)

Chacune de ces molécules a été étudiée individuellement. L'effet de la concentration en contaminant et l'effet de la densité algale ont été testés sur une molécule modèle de chaque classe de contaminants (CB 153, BDE 47, chrysène). Pour les PCB, le comportement du CB 153 et du CB 77 a également été étudié au sein d'un mélange industriel de PCB, le pyralène.

I.1.2. Choix de l'organisme cible : *Isochrysis galbana*

Isochrysis galbana (haptophyceae) est une algue brune unicellulaire. Flagellé autotrophe, elle est très utilisée en aquaculture comme alimentation pour les bivalves filtreurs et les premiers stades de développement des poissons. Sa forte teneur en acides gras insaturés en fait un fourrage de très bonne qualité grâce à sa forte valeur nutritive. Du fait de son utilisation en aquaculture, il est relativement facile de se procurer des souches algales et de plus cette espèce est relativement facile à élever. Les cellules algales nécessaires à l'expérimentation nous ont été fournies par la station IFREMER de la Tremblade (J.C. Billy).

I.1.3. Plan expérimental

Les algues ont été exposées par voie directe à différents contaminants (CB 77, CB 153, pyralène, BDE 47, BDE 153, benzo(a)pyrène, chrysène, fluoranthène) pendant 24 heures. Les algues, à une densité de $500\ 000\ \text{ç.ml}^{-1}$, ont été exposées à une concentration théorique nominale de $500\ \text{ng.l}^{-1}$ pour chaque contaminant. De plus, afin de déterminer si la concentration algale ou la concentration en contaminants joue sur la capacité de bioaccumulation, un composé modèle a été choisi par classe de contaminant, le CB 153, le BDE 47 et le chrysène. Les algues, toujours à la même densité de $500\ 000\ \text{ç.ml}^{-1}$, ont alors été exposées à une concentration de contaminants 10 fois supérieure à la précédente soit $5000\ \text{ng.l}^{-1}$. L'effet de la densité algale a été ensuite testée en exposant une suspension algale de $1\ 000\ 000\ \text{ç/ml}$ à une concentration théorique nominale en contaminant de $500\ \text{ng.l}^{-1}$. (Tableau 7). La concentration "réelle" de l'eau a été déterminée expérimentalement et comparée à la valeur nominale.

	Densité algale 500 000 ϵ /ml [contaminants] = 500ng.l ⁻¹	Densité algale 500 000 ϵ /ml [contaminants] = 5 000 ng.l ⁻¹	Densité algale 1 000 000 ϵ /ml [contaminants] = 500 ng.l ⁻¹
CB 77	CB 77 : 500 ng.l ⁻¹ , 500 000 ϵ /ml		
CB 153	CB 153 : 500 ng.l ⁻¹ , 500 000 ϵ /ml	CB 153 : 5 000 ng.l ⁻¹ , 500 000 ϵ /ml	CB 153 : 500 ng.l ⁻¹ , 1 000 000 ϵ /ml
Pyralène	Pyralène : 500 000 ϵ /ml		
BDE 47	BDE 47 : 500 ng.l ⁻¹ , 500 000 ϵ /ml	BDE 47 : 5 000 ng.l ⁻¹ , 500 000 ϵ /ml	BDE 47 : 500 ng.l ⁻¹ , 1 000 000 ϵ /ml
BDE 153	BDE 153 : 500 ng.l ⁻¹ , 500 000 ϵ /ml		
BaP	BaP : 500 ng.l ⁻¹ , 500 000 ϵ /ml		
Chrysène	Chrysène : 500 ng.l ⁻¹ , 500 000 ϵ /ml	Chrysène : 5 000 ng.l ⁻¹ , 500 000 ϵ /ml	Chrysène : 500 ng.l ⁻¹ , 1 000 000 ϵ /ml
Fluoranthène	Fluoranthène : 500 ng.l ⁻¹ , 500 000 ϵ /ml		

Tableau 7 : Résumé des conditions d'exposition d'*Isochrysis galbana* à différents contaminants (Densité algale exprimée en ϵ /ml, concentrations théoriques nominales exprimées en ng.l⁻¹).

Dans la pratique, les expérimentations sont réalisées en 7 blocs expérimentaux (Tableau 8).

			Echantillons prélevés			
			t ₀	t _{1h}	t _{8h}	t _{24h}
Bloc 1	CB 77 500 000 ϵ /ml / 500 ng.l ⁻¹	Eau contaminée avec algues	3	3	3	
		Eau contaminée sans algue	3	3	3	
	Control 1	Eau non contaminée avec algues	3	3	3	
Bloc 2	CB 153 500 000 ϵ /ml / 5 000 ng.l ⁻¹	Eau contaminée avec algues	3	3	3	
		Eau contaminée sans algue	3	3	3	
	CB 153 1 000 000 ϵ /ml / 500 ng.l ⁻¹	Eau contaminée avec algues	3	3	3	
		Eau contaminée sans algue	3	3	3	
	Control 2	Eau non contaminée avec algues	3	3	3	
Bloc 3	Pyralène 500 000 ϵ /ml	Eau contaminée avec algues	3	3	3	
		Eau contaminée sans algue	3	3	3	
	BDE 47 500 000 ϵ /ml / 5 000 ng.l ⁻¹	Eau contaminée avec algues	3	3	3	
		Eau contaminée sans algue	3	3	3	
	Control 3	Eau non contaminée avec algues	3	3	3	
Bloc 4	BDE 47 500 000 ϵ /ml / 500 ng.l ⁻¹	Eau contaminée avec algues	3	3	3	
		Eau contaminée sans algue	3	3	3	
	BDE 47 1 000 000 ϵ /ml / 500 ng.l ⁻¹	Eau contaminée avec algues	3	3	3	
		Eau contaminée sans algue	3	3	3	
	Control 4	Eau non contaminée avec algues	3	3	3	
Bloc 5	BDE 153 500 000 ϵ /ml / 500 ng.l ⁻¹	Eau contaminée avec algues	3	3	3	
		Eau contaminée sans algue	3	3	3	
	Chrysène 1 000 000 ϵ /ml / 500 ng.l ⁻¹	Eau contaminée avec algues	3	3	3	
		Eau contaminée sans algue	3	3	3	
	Control 5	Eau non contaminée avec algues	3	3	3	
Bloc 6	Chrysène 500 000 ϵ /ml / 5000 ng.l ⁻¹	Eau contaminée avec algues	3	3	3	
		Eau contaminée sans algue	3	3	3	
	Chrysène 500 000 ϵ /ml / cel 500 ng.l ⁻¹	Eau contaminée avec algues	3	3	3	
		Eau contaminée sans algue	3	3	3	
	Control 6	Eau non contaminée avec algues	3	3	3	
Bloc 7	B(a)p 500 000 ϵ /ml / 500 ng.l ⁻¹	Eau contaminée avec algues	3	3	3	
		Eau contaminée sans algue	3	3	3	
	Fluo 500 000 ϵ /ml / 500 ng.l ⁻¹	Eau contaminée avec algues	3	3	3	
		Eau contaminée sans algue	3	3	3	
	Control 7	Eau non contaminée avec algues	3	3	3	

Tableau 8 : Plan expérimental de la contamination d'*Isochrysis galbana* par voie directe.

Chaque bloc expérimental présente au moins trois séries d'erenmeyers (Tableau 8) :

- une série d'erenmeyers contenant des algues sans contaminant qui servent de témoins.
- une deuxième série d'erenmeyers qui contiennent le contaminant sans les algues, qui permettent d'évaluer les pertes de contaminant par adsorption sur les parois.
- une ou plusieurs séries d'erenmeyers, contenant les algues et le contaminant qui permettent de définir la capacité de bioaccumulation des algues.

Des prélèvements sont réalisés à t_{0h} , t_{1h} , t_{8h} et t_{24h} . Trois erlenmeyers sont prélevés par condition afin d'évaluer la variabilité propre à l'expérimentation.

I.1.4. Descriptif du dispositif expérimental

Les expérimentations sur les algues ont été réalisées dans des erlenmeyers de 500 ml en verre. La dilution des algues a été réalisée dans de l'eau de mer synthétique (35 psu) fabriquée à partir de sel ultra pur (Instant Océan, Aquarium systems, Sarrebourg, France) et d'eau osmosée, afin d'obtenir la densité algale souhaitée ($500\,000$ ou $1\,000\,000 \text{ } \phi.\text{ml}^{-1}$). Pour optimiser la croissance algale, 0,5 ml de milieu de culture ont été ajoutés par erlenmeyer de 500 ml. Le milieu de culture utilisé est une version adaptée du milieu de Conway qui a été transmise par l'IFREMER la Tremblade : pour 1 litre d'eau, 100 g de nitrate de sodium, 20 g de dihydrogénophosphate de sodium, 45 g d'EDTA et 33,6 g d'acide borique sont ajoutés.

Pour l'expérimentation, les erlenmeyers ont été posés sur une table d'agitation afin d'éviter la sédimentation des algues. Les algues ont été soumises à une photopériode de 10 h de lumière, 14 h d'obscurité (Figure 13). La salle d'expérimentation était climatisée, assurant ainsi la stabilisation de la température de l'air (17°C) et par conséquent celle de l'eau. Du fait du faible temps d'exposition, aucun bullage d'air ou de CO_2 n'a été mis en place dans les erlenmeyers.

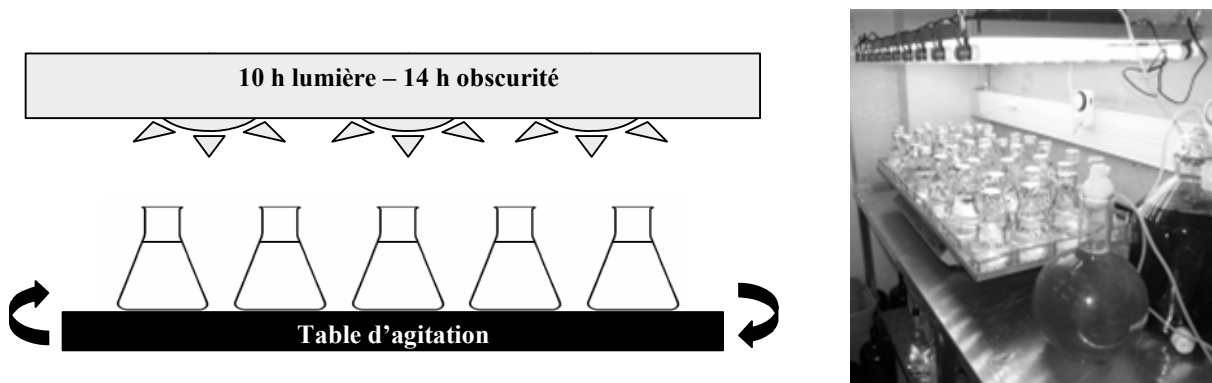


Figure 13 : Représentation du dispositif expérimental de contamination algale.

I.1.5. Stratégie de contamination

Le contenu des erlenmeyers de 500 ml a été contaminé à t_0 , par ajout de 50 μl de solution des composés étudiés dissous dans l'acétone. La concentration des différentes solutions d'acétone a été ajustée à la concentration finale souhaitée. Pour le faible niveau de contamination, la concentration des solutions est de l'ordre de $7,5 \mu\text{g.g}^{-1}$ alors que pour le plus fort niveau de concentration, elle est de l'ordre de $75 \mu\text{g.g}^{-1}$. Les erlenmeyers ont été agités pour homogénéiser le milieu et placés sur la table d'agitation pour l'expérimentation.

I.1.6. Prélèvement des échantillons

Pour chaque bloc expérimental de 24 heures, 3 prélèvements ont été réalisés pour chaque série d'erlenmeyers. La série de témoins a été échantillonnée à t_{0h} , t_{8h} et t_{24h} , la série contenant les contaminants sans algue a été échantillonnée à t_{1h} , t_{8h} et t_{24h} , et la série contenant les algues et les contaminants a été échantillonnée de la même façon (Tableau 8). A chaque temps de prélèvement, trois erlenmeyers ont été prélevés par condition afin d'évaluer la variabilité de l'expérimentation. Un volume de cinq millilitres a été prélevé après homogénéisation du milieu pour réaliser une estimation de la croissance de la population algale. Ce prélèvement a servi au comptage du nombre de cellules algales sous microscope grâce une cellule de Mallassé. Le contenu de chaque erlenmeyer a ensuite été filtré sur filtre GFF ($0.7\mu\text{m}$, Whatman) préalablement calciné à 450°C pendant 6 h et pesé. La phase dissoute ainsi récupérée a été analysée directement pour déterminer la concentration exacte en contaminant. Le filtre GFF qui recueille les algues est stocké à -20°C en attente d'analyse.

I.2. Les moules

I.2.1. Principe de l'expérimentation

Une contamination chronique par voie trophique a été réalisée en aquarium sur un organisme modèle, la moule bleue : *Mytilus edulis*. Comme dans le cas des algues, trois classes de contaminants ont été ciblées :

- Les PCB avec comme molécules modèles CB 153 (2,2',4,4',5,5' HexaCB)
CB 77 (3,3',4,4' Tetra CB)
- Les PBDE avec comme molécules modèles BDE 47 (2,2',4,4' Tetra BDE)
BDE 153 (2,2',4,4',5,5' Hexa BDE)
- Les HAP avec comme molécules modèles Benzo [a] pyrène (BaP)
Chrysène (Chrys)
Fluoranthène (Fluo)

Les cinétiques d'accumulation et de dépuración de ces molécules ont été étudiées séparément, à deux niveaux de concentration. Pour les PCB, le comportement du CB 153 et du CB 77 a également été étudié au sein d'un mélange, le pyralène.

1.2.2. Choix de l'organisme cible

La moule bleue (*Mytilus edulis*) est une espèce commune importante d'un point de vue économique, elle est exploitée dans tout l'Atlantique nord. Mollusque bivalve lamellibranche grégaire, la moule est caractérisée par une coquille bleue foncée à violacée et le rebord de son manteau brun ou jaunâtre. Cette espèce euryhaline présente une aire de répartition large couvrant l'ensemble des eaux tempérées et même polaires, elle est adaptée à des milieux de vie divers comme les estuaires, les milieux littoraux ou les eaux profondes. Mollusque filtreur, la moule s'alimente en filtrant les particules présentes dans l'eau comme le phytoplancton (vivant ou mort) ou de petits débris organique. Sa durée de vie estimée à l'état naturel est de 10 à 15 ans, alors qu'en cycle de production les moules sont commercialisées au bout de 2 ou 3 ans. Cette espèce dioïque se reproduit durant une période allant du début du printemps à l'été selon les paramètres du milieu (température, photopériode, salinité...). Les gamètes sont émis dans la colonne d'eau. Après fécondation, une larve planctonique voit le jour, elle va subir plusieurs métamorphoses et finir par se fixer après 3 ou 4 semaines sur un substrat solide (rochers, piquets...). Une fois fixée, la larve velligère allonge son pied, rétrécit son velum et secrète les filaments du byssus pour s'arrimer. La jeune moule grossit peu à peu à l'endroit où elle s'est fixée en filtrant les particules présentes dans le milieu. La moule de par ses caractéristiques biologiques et écologiques (forte tolérance à divers environnements, forte capacité de filtration ($\cong 2$ à 3 l/h/ind), forte capacité d'accumulation des xénobiotiques) se révèle être une bonne espèce sentinelle. C'est pour ces raisons et ses facilités d'élevage et de maintien en aquarium que notre choix s'est porté sur cette espèce, *Mytilus edulis*.

Les moules utilisées pour ces expérimentations proviennent de deux fournisseurs. L'établissement CODIMER port de Larosse Gujan Mestras (France) nous a fourni les moules pour les expérimentations réalisées sur les PCB et les HAP. Les moules utilisées pour l'expérimentation sur les PBDE viennent d'un producteur du bassin de Marennes d'Oléron (S. Grenon, Chenal de Mérignac, Bourcefrancs le Chapus). Avant leur introduction dans les aquariums de contamination, un temps d'adaptation est nécessaire aux moules. Dès leur arrivée, elles sont calibrées entre 4,5 et 5,5 cm de longueur puis placées dans un bac de 760 litres pour une période d'acclimatation de 15 jours. Les paramètres physico-chimiques de l'eau (concentrations en nitrites, nitrates, température et pH) sont suivis quotidiennement, ainsi que le taux de mortalité.

Lorsque l'ensemble des moules est acclimaté, elles sont réparties dans les aquariums de contamination (100 l, 150 moules par bac). Les paramètres physico-chimiques sont également régulièrement suivis (chaque jour durant les deux premières semaines, puis une fois par semaine) pour assurer les bonnes conditions abiotiques du système.

I.2.3. Plan expérimental

Le but de l'expérimentation est de contaminer des moules par voie trophique ; 150 moules ont été ainsi placées dans des bacs de 100 l et contaminées journalièrement pendant la phase de contamination par un composé défini (CB 77, CB 153, BDE 47 BDE 153, chrysène, benzo(a)pyrène, fluoranthène et pyralène). Deux concentrations nominales théoriques (5 et 100 µg de contaminant par gramme de nourriture) ont été testées pour chaque composé, excepté pour le pyralène. A la suite de cette phase de contamination, les moules ont subi une phase de dépuración durant laquelle elles ont été nourries avec de la nourriture saine. L'aliment utilisé comme base pour nourrir les moules est une suspension algale : le Liquizell (HOBBY[®], Aqua Décor, Bordeaux).

Pendant toute la durée de l'expérimentation, à intervalle régulier, cinq individus ont été prélevés. Ces individus ont été pesés, mesurés, puis analysés individuellement pour suivre l'évolution de la contamination dans les tissus mous de la moule. Les cinq individus prélevés à chaque pas de prélèvement ont été remplacés par cinq autres individus hors expérience pour maintenir un nombre de moules constant. Le taux de filtration a été ainsi gardé constant au sein de chaque bac pendant l'expérimentation. Le taux de filtration moyen d'une moule est d'environ 2 à 3l/h/ind soit entre 300 et 450 litres par heure pour l'ensemble des individus. Parallèlement à cela, les paramètres physico chimiques, ainsi que le niveau de contamination de l'eau, ont été suivis.

Dans la pratique, la série d'expérimentation sur les moules s'est déroulée en deux phases, une première série d'expérimentations avec une durée de contamination de 36 jours et une deuxième série avec une durée de contamination de 10 jours suivie d'une phase de décontamination (Figure 14 et Tableau 9). Cette modification dans le plan expérimental a été réalisée au vu des premiers résultats, en accord avec les différents partenaires du programme et surtout afin d'adapter les résultats expérimentaux aux besoins des modélisateurs. En effet, après la première série d'expérimentations, il ne s'est pas avéré nécessaire d'arriver à un palier de contamination, la durée de contamination a donc été réduite à 10 jours. *A contrario*, la phase de dépuración a été augmentée afin de caractériser plus finement la cinétique de dépuración.

	Concentration théorique du liquizell ($\mu\text{g/g}$)	Phase d'expérimentation	Quantité de nourriture administrée (g)	Durée de contamination (j)
CB 77	5	2	1	10
	100	2	1	10
CB 153	5	2	1	10
	100	1	1	36
Pyralène		2	1	10
BDE 47	5	2	1	10
	100	2	1	10
BDE 153	5	2	1	10
	100	2	1	10
BaP	5	2	1	10
	100	1	2	36
Chrysène	5	2	1	10
	100	1	2	36
Fluoranthène	5	2	1	10
	100	2	1	10

Tableau 9 : Récapitulatif des concentrations en contaminants testées et des temps d'exposition.

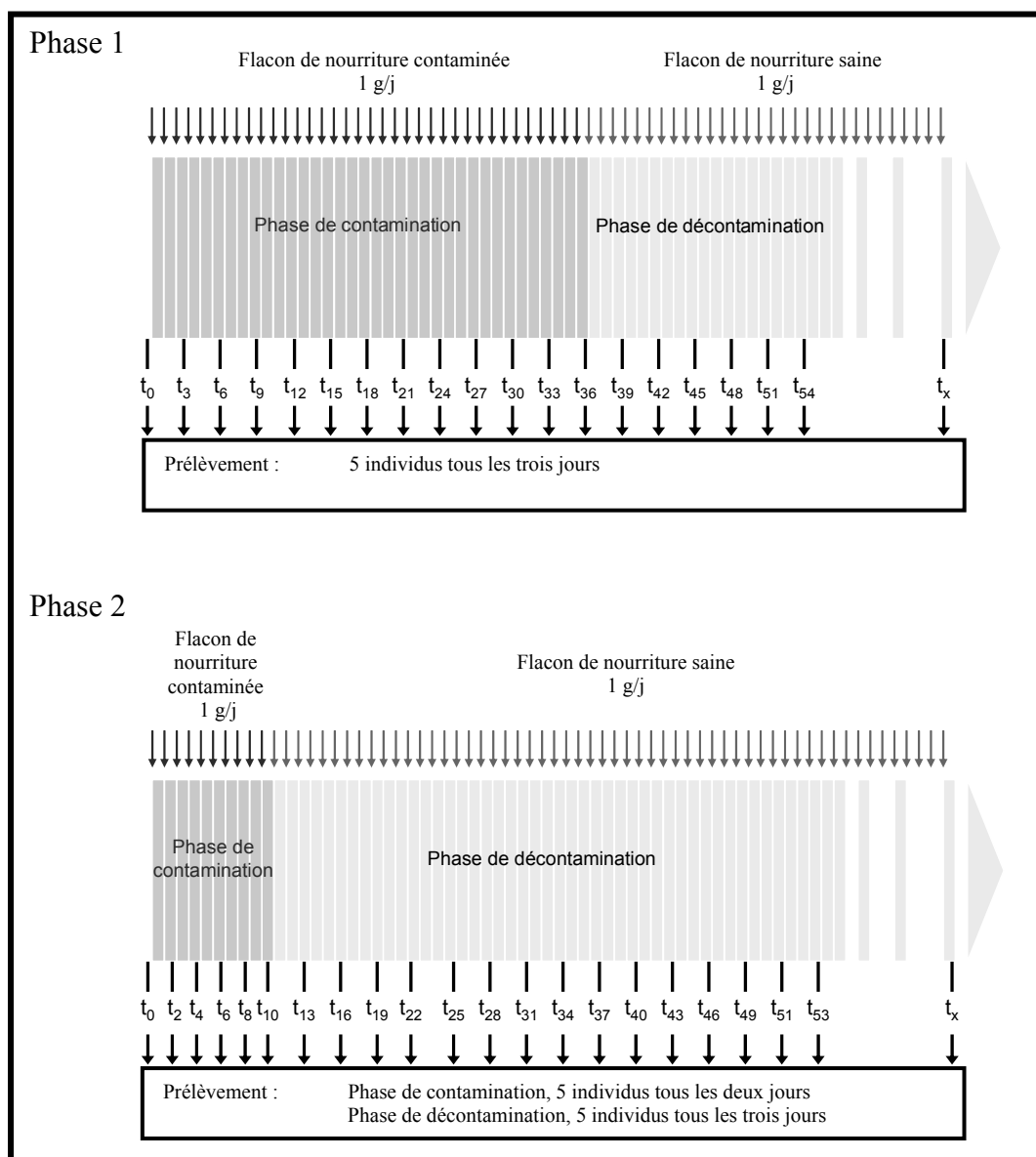


Figure 14 : Plan expérimental de la phase 1 et 2 des expérimentations.

I.2.4. Descriptif du dispositif expérimental

Les expérimentations ont été réalisées dans des aquariums de 100 l en verre. Les moules ont été acclimatées dans de l'eau salée synthétique (35 psu) fabriquée sur place à partir d'eau osmosée et de sel synthétique (Instant Ocean, Aquarium systems, Sarrebourg, France). Chaque aquarium était équipé d'un système de filtration d'eau, d'oxygénation (bulleur) et d'un éclairage permettant d'ajuster la photopériode (10 heures de luminosité, 14 heures d'obscurité) (Figure 15). La salle d'expérimentation était climatisée, assurant ainsi la stabilisation de la température de l'air (17°C) et par conséquent celle de l'eau.

La filtration des unités expérimentales est à la fois biologique et mécanique; des tubes en céramique et des mousses synthétiques jouent le rôle de nids à bactéries, acteurs primordiaux de la dégradation de la matière organique (pseudofaeces, faeces...). Du sable de corail (Instant océan, Aquarium systems, Sarrebourg, France) a été utilisé pour stabiliser le pH entre 7,5 et 8. Avant et après la phase de contamination, l'aquarium a été nettoyé de toute trace de contaminants par l'utilisation de charbon actif dans le système de filtration. Les moules contaminées suivies pendant toute l'expérimentation sont placées dans une cage afin de limiter leur déplacement, et les moules hors expérience, rajoutées pour maintenir le nombre de moules constant tout au long de l'expérimentation sont placées dans des barquettes à l'extérieur de la cage (Figure 15).

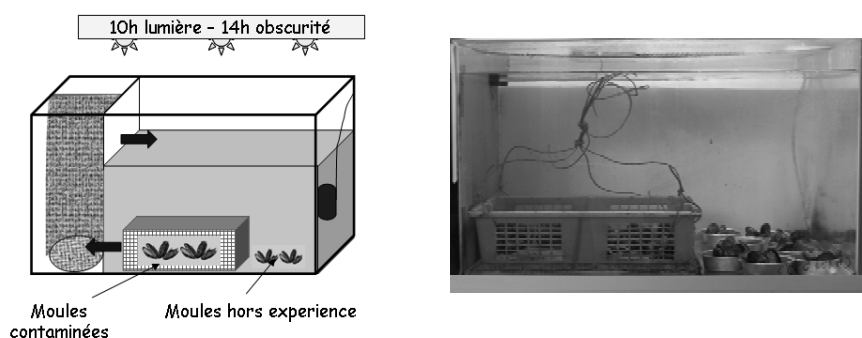


Figure 15 : Dispositif expérimental pour l'expérimentation des moules.

I.2.5. Préparation de la nourriture contaminée

Pendant la phase de contamination, les moules ont été nourries avec une suspension algale commerciale (Liquizell, HOBBY[®], Aqua Décor, Bordeaux) préalablement contaminée. Des solutions individuelles des composés étudiés ont été préparées dans l'acétone. Les composés individuels, sous forme de cristaux CB77, CB 153 (Pureté 99 %, Promochem, Molsheim, France), BDE 47, BDE 153 (Pureté 99%, Accustandard New haven, USA) Benzo(a)pyrène (pureté 97% Sigma Adrich, Steinheim, Germany), Chrysène (pureté 99 %, Sigma Aldrich Steinheim, germany), Fluoranthène (pureté 99 %, Sigma Aldrich, Steinheim,

Germany) et le pyralène ont été dissous dans l'acétone. Les solutions de contaminants ont été ajoutées au Liquizell, afin d'obtenir la contamination voulue. Afin de minimiser l'éventuel effet de l'acétone, le volume de solution contaminante a toujours été inférieur à 2% du volume total de nourriture. Chaque suspension algale contaminée a été homogénéisée au vortex pendant cinq minutes. Le Liquizell ainsi contaminé a été réparti en autant de flacons que nécessaires pour la phase de contamination, plus 3 flacons de contrôle. Ces flacons de contrôle ont permis de réaliser une quantification précise de la contamination de la suspension algale. Les expériences ont été réalisées à des concentrations nominales de $5\mu\text{g.g}^{-1}$ de nourriture, soit 33 ng par jour et par moule, et $100\mu\text{g.g}^{-1}$ de nourriture, soit 667 ng par jour et par moule. Les concentrations réelles ont été caractérisées par extraction liquide/liquide des aliquotes de contrôle.

I.2.6. Stratégie de contamination

Pendant la phase de contamination, la nourriture contaminée a été administrée journalièrement. Un gramme de nourriture préalablement préparé dans un flacon, est introduit dans l'eau à l'aide d'une pipette pasteur. Le volume d'eau est ensuite brassé afin d'assurer une dispersion homogène de la nourriture à l'ensemble des moules. Parallèlement à cela, la filtration des aquariums est arrêtée pendant deux heures après l'introduction de la nourriture afin de laisser aux moules un temps suffisant pour s'alimenter. Le taux de filtration d'une moule est approximativement de 2,4 l/h/ind ; les 150 moules de l'expérimentation ont donc eu le temps de filtrer intégralement quatre à cinq fois le volume total de l'aquarium durant ces deux heures d'arrêt de filtration. Afin d'éviter les phénomènes de photodégradation des contaminants introduits, la lumière a été éteinte pendant les deux heures d'alimentation. Les aquariums ont été nettoyés journalièrement afin d'éviter une éventuelle recontamination des mollusques par les fèces ou pseudo fèces des individus.

A la fin de la période de contamination, les aquariums ont été intégralement nettoyés, l'eau entièrement changée et du charbon actif a été introduit dans la filtration pour piéger les éventuels résidus de contaminants présents dans le système. Au cours de la phase de décontamination, les moules ont été nourries quotidiennement avec du Liquizell non contaminé et l'entretien des bacs a été assuré journalièrement. Les prélèvements de moules ont été poursuivis régulièrement afin de suivre l'évolution du niveau de contamination.

Parallèlement aux bacs contaminés, un bac témoin dans lesquels les moules ont été nourries avec de la nourriture exempte de contamination a servi de contrôle.

I.2.7. Prélèvement des échantillons

I.2.7.1. Prélèvement des moules

Pendant la période de contamination, cinq moules ont été prélevées par aquarium à pas de temps régulier : tous les 3 jours durant la période de contamination de 36 jours de la première phase d'expérimentation, puis tous les deux jours dans la période de contamination de 10 jours de la deuxième phase. Les moules ont été prélevées environ 20h après l'administration de nourriture.

En phase de dépuración, le prélèvement a été effectué tous les trois jours dans un premier temps, puis à intervalles de temps plus espacés. Ce choix de fréquence d'échantillonnage résulte d'un bon compromis entre résolution temporelle et faisabilité technique des analyses. Le prélèvement des moules se fait de manière aléatoire.

Les moules prélevées ont été mesurées individuellement (longueur maximale de la coquille), puis disséquées. L'ensemble du corps mou a été récupéré, pesé et stocké dans une barquette en aluminium à -20°C en attente de l'analyse des contaminants et de la détermination du taux de lipides des tissus mous des moules. Les individus enlevés de l'aquarium ont été remplacés par des moules hors expérience afin de garder un nombre d'individus constant et assurer ainsi un taux de filtration constant tout au long de l'expérience. La quantité de nourriture disponible par jour et par moule est ainsi restée constante au cours de l'expérimentation. Les moules de remplacement hors expérience sont placées hors de la cage contenant les moules d'expérience afin de les différencier facilement.

I.2.7.2. Prélèvement de l'eau

Parallèlement au niveau de contamination des moules, la concentration en contaminants dans l'eau a été suivie. Trois prélèvements sont réalisés, un à t₀, un au milieu de la phase de contamination et un dernier au terme de la phase de contamination. Les échantillons ont été traités par extraction-liquide. Aucune analyse d'eau n'a été réalisée durant la phase de décontamination, le changement d'eau total, le nettoyage complet de l'aquarium ainsi que la présence de charbon actif dans le système de filtration, garantissent en théorie la non-contamination de l'eau.

I.3. Les Daurades

Une contamination chronique par voie trophique a été réalisée en aquarium sur un organisme modèle la daurade : *Sparus aurata*. Les mêmes classes de contaminants que précédemment ont été ciblées :

- Les PCB avec comme molécules modèles CB 153 (2,2',4,4',5,5' Hx CB).
CB 77 (3,3',4,4' Te CB).
- Les PBDE avec comme molécules modèles BDE 47 (2,2',4,4' Te BDE).
BDE 153 (2,2',4,4',5,5' Hx BDE).
- Les HAP avec comme molécules modèles BaP (Benzo [a] pyrène).
Chrysène.

Les cinétiques d'accumulation et de dépuration de ces molécules ont été étudiées séparément. En ce qui concerne les HAP, seuls deux composés et une seule concentration ont été testés. Les résultats obtenus pour la plus forte concentration de benzo(a)pyrène et de chrysène au cours des premières expérimentations montrant une absence d'accumulation des HAP par les daurades, le fluoranthène et les concentrations les plus faibles n'ont pas été explorées. Pour les PCB et les PBDE, deux concentrations ont été testées. Un mélange technique de PCB, le pyralène a été également testé.

I.3.1. Choix de l'organisme cible

La daurade royale (*Sparus aurata*) est une espèce d'intérêt économique exploitée en aquaculture et par les pêcheries. Poisson téléostéen grégaire, son aire de répartition s'étend sur la côte Est Atlantique de l'Angleterre aux côtes nord de l'Afrique en passant par l'ensemble de la Méditerranée. Cette espèce euryhaline fréquente les zones côtières sableuses à proximité de roches ou les fonds coquilliers vaseux, elle pénètre également dans les étangs littoraux et les estuaires. Le régime alimentaire de l'espèce est principalement composé de mollusques bivalves, en particulier de moules dont elle broie les coquilles avec ses molaires, de crustacés, de poissons et d'algues. La daurade est un poisson hermaphrodite protandre, les juvéniles atteignent leur maturité sexuelle au bout de deux à trois ans. Le changement de sexe intervient dans le cours de la troisième ou quatrième année. La reproduction s'effectue par fécondation externe pendant une période qui court d'octobre à décembre.

Les caractéristiques biologiques et écologiques (espèce robuste, tolérante à divers environnements) de la daurade en font une espèce sentinelle intéressante. De plus, son élevage est bien maîtrisé et bien développé, ce qui facilite l'approvisionnement en poissons pour les expérimentations. Les juvéniles de daurades utilisées pour ces expérimentations proviennent de la ferme marine du Douhet, Ile d'Oléron (France). Avant leur introduction dans les unités

d'expérimentation, un temps d'adaptation est nécessaire aux daurades pour s'acclimater à leur nouvel environnement et à l'eau de mer artificielle utilisée pour les expérimentations. Elles sont placées en stabulation dans un bac de 760 litres pour une période d'acclimatation d'environ 15 jours. Les paramètres physico-chimiques de l'eau (concentrations en nitrites, nitrates, température et pH) sont suivis quotidiennement, ainsi que le taux de mortalité. Lorsque l'ensemble des poissons est acclimaté, ils sont répartis dans les unités expérimentales (100 l, 130 poissons par bac). Les paramètres physico-chimiques sont également régulièrement suivis (chaque jour pour les deux premières semaines, puis une fois par semaine) pour assurer les bonnes conditions abiotiques du système.

I.3.2. Plan expérimental

Le but de l'expérimentation était de contaminer des daurades par voie trophique ; 130 poissons ont été ainsi placés dans des bacs de 100 l et contaminés journalièrement pendant une phase de contamination (36j ou 10 j) par un composé défini (CB 77, CB 153, BDE 47 BDE 153, chrysène, benzo(a)pyrène, et pyralène). A la suite de cette phase de contamination, les daurades ont subi une phase de dépuración durant laquelle elles ont été nourries avec de la nourriture saine.

Pendant toute la durée de l'expérimentation, à intervalles réguliers, cinq individus ont été prélevés. Ces individus ont été pesés, mesurés puis stockés individuellement à -20°C en attente d'analyse. Les cinq individus prélevés à chaque pas de prélèvement ont été remplacés par cinq autres individus hors expérience pour maintenir un nombre constant de poissons au cours de l'expérimentation. Les daurades de remplacement, hors expérimentation, ont été marquées par section de la nageoire pelvienne, afin d'éviter leur recapture dans les prélèvements ultérieurs. Parallèlement à cela les paramètres physico-chimiques, et le niveau de contamination de l'eau ont été suivis.

Dans la pratique, la série d'expérimentation sur les daurades s'est également déroulée en deux phases tout comme les expérimentations sur les moules : une première série d'expérimentation avec une durée de contamination de 36 jours et une deuxième série avec une durée de contamination de 10 jours suivie d'une phase de décontamination (Figure 16). Cette modification dans le plan expérimental a là encore été réalisée à la vue des premiers résultats, en accord avec les différents partenaires du programme, mais surtout afin d'adapter les résultats expérimentaux aux besoins des modélisateurs. Tout comme dans le cas des moules, l'objectif de l'expérimentation a été recentré sur la cinétique de dépuración des différents composés par les daurades. La durée de la phase de contamination a été réduite à 10 jours afin de permettre une phase de décontamination plus longue.

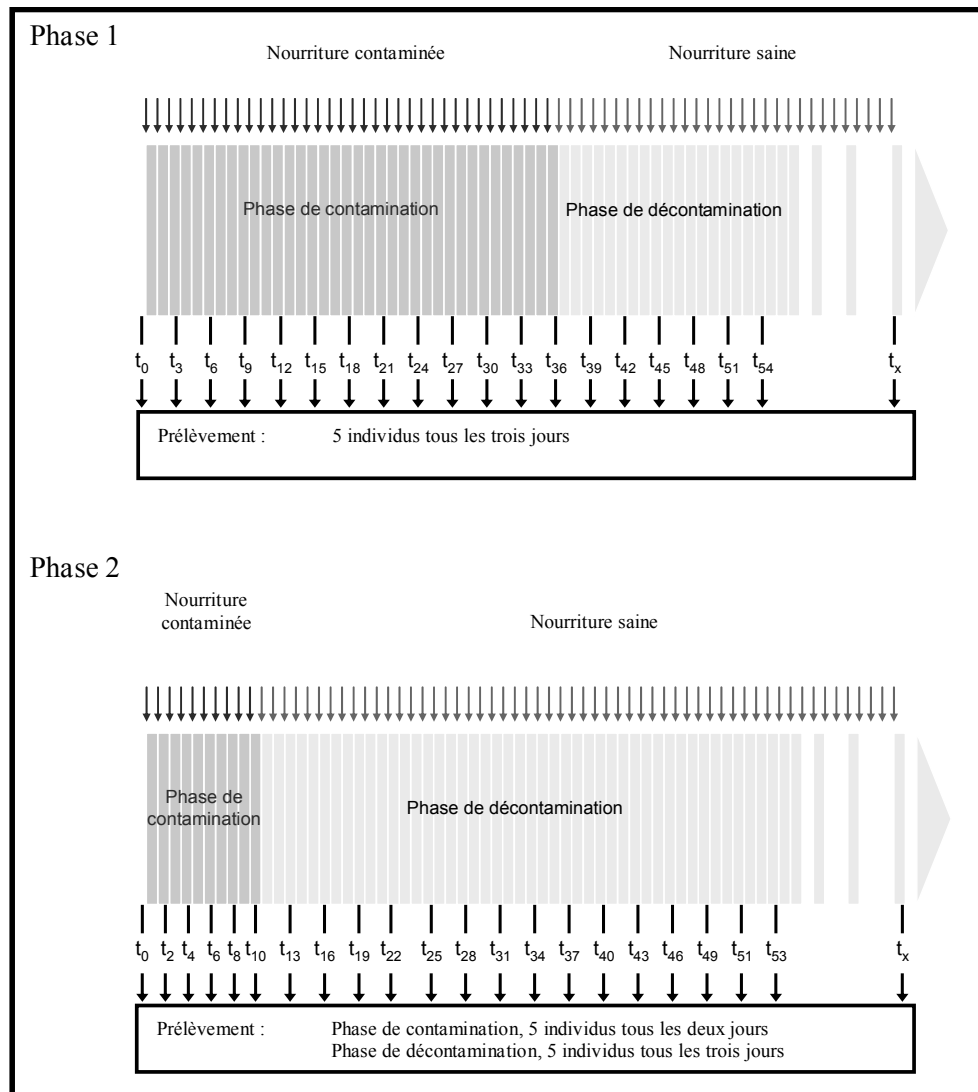


Figure 16 : Plan expérimental de la phase 1 et 2 des expérimentations.

I.3.3. Descriptif du dispositif expérimental

Les expérimentations ont été réalisées dans des aquariums de 100 l en verre similaire à ceux utilisés pour l'expérimentation des moules. Chaque aquarium était équipé d'un système de filtration d'eau, d'oxygénation (bulleur) et d'un éclairage permettant d'ajuster la photopériode (10 heures de luminosité, 14 heures d'obscurité) (Figure 17). La salle d'expérimentation était climatisée assurant ainsi la stabilisation de la température de l'air (17°C) et par conséquent celle de l'eau. La filtration des unités expérimentales est à la fois biologique et mécanique; des tubes en céramique et des mousses synthétiques jouent le rôle de nids à bactéries, acteurs primordiaux de la dégradation de la matière organique (Pseudofèces, fèces...). Du sable de corail a été utilisé pour stabiliser le pH entre 7,5 et 8. Avant et après expérience, l'aquarium a été nettoyé de toute trace de contaminants par l'utilisation de charbon actif dans le système de filtration.

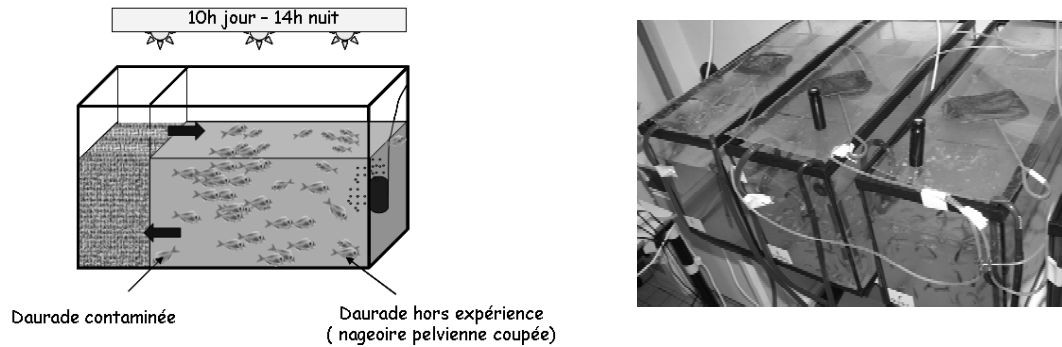


Figure 17 : Dispositif expérimental pour l'expérimentation des daurades.

I.3.4. Préparation de la nourriture contaminée

Durant l'expérimentation, les poissons ont été nourris avec des granulés commerciaux fournis par leur ferme d'élevage. Pour la phase de contamination, ces granulés ont été préalablement contaminés. Des solutions individuelles des composés étudiés ont été préparées dans l'acétone. Les composés individuels, sous forme de cristaux CB77, CB 153 (Pureté 99 %, Promochem, Molsheim, France), BDE 47, BDE 153 (Pureté 99%, Accustandard New haven, USA) Benzo(a)pyrène (pureté 97% Sigma Aldrich, Steinheim, Germany), Chrysène (pureté 99 %, Sigma Aldrich Steinheim, germany), Fluoranthène (pureté 99 %, Sigma Aldrich, Steinheim, Germany) et le pyralène ont été dissous dans l'acétone.

Les granulés de nourriture ont été placés dans un ballon d'un litre, un volume d'acétone suffisant pour recouvrir les granulés a été introduit dans le ballon et ensuite la solution contaminante a été ajoutée. Le mélange est ensuite reconcentré grâce à un évaporateur rotatif. Le contaminant s'adsorbe sur les granulés de nourriture. La nourriture ainsi contaminée est répartie en fractions journalières représentant environ 2% de la masse de poisson à nourrir, en pratique 7 et 6 grammes de nourriture pour la première série d'expérience et 3 grammes pour la deuxième série. Les fractions journalières de nourriture sont placées dans des flacons individuels. Des flacons de contrôle ont été préparés pour chaque série de contaminant afin de pouvoir caractériser la contamination réelle de la nourriture administrée.

Les expériences ont été réalisées à des concentrations nominales de $5\mu\text{g}$ par ration de nourriture, soit 38 ng par jour et par poisson, et $100\mu\text{g.g}^{-1}$ de nourriture, soit 770 ng par jour et par poisson.

I.3.5. Stratégie de contamination

Pendant la phase de contamination, les daurades ont été nourries quotidiennement avec de la nourriture contaminée préalablement. La quantité de granulés préalablement pesée a été distribuée manuellement, pour permettre une bonne répartition de la nourriture à l'ensemble des poissons. Le manipulateur a toujours veillé à ce que tous les poissons puissent avoir accès à la nourriture, en évitant au maximum les phénomènes d'individus dominants / dominés qui peuvent s'instaurer au sein d'un banc de poissons. De plus, la filtration des aquariums a été arrêtée pendant deux heures après l'introduction de la nourriture afin de laisser aux poissons un temps suffisant pour s'alimenter, même si l'intégralité de la nourriture est consommée en moins de 10 minutes. Afin d'éviter d'éventuels phénomènes de photodégradation des contaminants introduits, la lumière a été éteinte pendant les deux heures d'alimentation. Les aquariums ont été nettoyés journalièrement afin d'éviter une éventuelle recontamination par ingestion des fèces des poissons.

A la fin de la période de contamination, les aquariums ont été intégralement nettoyés, l'eau entièrement changée et du charbon actif a été introduit dans la filtration pour piéger les éventuels résidus de contaminants présents dans le système. Au cours de la phase de décontamination, les daurades ont été nourries quotidiennement avec de la nourriture non contaminée et l'entretien des bacs a été assuré journalièrement. Les prélèvements de poissons ont été poursuivis régulièrement afin de suivre l'évolution du niveau de contamination. Parallèlement aux bacs contaminés, un bac témoin dans lesquels les daurades ont été nourries avec de la nourriture exempte de contamination, a servi de contrôle.

I.3.6. Prélèvement des échantillons

I.3.6.1. Prélèvement des daurades

Pendant la période de contamination, cinq daurades ont été prélevées par aquarium à pas de temps régulier, tous les 3 jours durant la période de contamination de 36 jours de la première phase d'expérimentation, puis tous les deux jours dans la période de contamination de 10 jours de la deuxième phase. Les poissons ont été prélevés environ 20 heures après l'alimentation.

En phase de dépuración, les prélèvements ont été effectués tous les trois jours dans un premier temps, puis à intervalles de temps plus espacés par la suite. Ce choix de fréquence d'échantillonnage résulte d'un bon compromis entre résolution temporelle et faisabilité technique. Le prélèvement des daurades a été fait de façon aléatoire. Les poissons prélevés ont été mesurés individuellement (longueur maximale du poisson), puis pesés.

Les daurades ont été ensuite stockées individuellement dans des barquettes en aluminium à -20°C dans l'attente de l'analyse. Les individus enlevés de l'aquarium ont été remplacés par des poissons "hors expérience" afin de garder un nombre d'individus constant et d'assurer ainsi un taux d'alimentation constant tout au long de l'expérience. La quantité de nourriture disponible par jour et par poisson reste ainsi constante au cours de l'expérimentation. Les daurades de remplacement hors expérience ont été marquées par section de la nageoire pelvienne afin de les différencier facilement et d'éviter ainsi une recapture lors d'un prochain échantillonnage. Les daurades ont été anesthésiées (MS222 : Ethyl 3 aminobenzoate methanesulfonate, Sigma Aldrich, Steinheim, Germany), la section de la pelvienne a été réalisée à l'aide d'un ciseau à dissection classique. Les daurades sont ensuite "réveillées" dans un bain d'eau salée surchargé en oxygène. Aucune perte n'a eu lieu durant cette phase de marquage, les poissons récupèrent vite un comportement natatoire normal.

I.3.6.2. Prélèvement de l'eau

Parallèlement au niveau de contamination des poissons, la concentration en contaminants dans l'eau a été suivie. Trois prélèvements ont été réalisés, un à t₀, un au milieu de la phase de contamination et un dernier au terme de la phase de contamination. Ces prélèvements ont été analysés, en suivant par extraction liquide/ liquide.

I.3.7. Correction mathématique des données de contamination

Afin de s'affranchir de la dilution pondérale due à la croissance des poissons, les teneurs en contaminant ont été corrigées par le taux de croissance. Le taux de croissance des téléostéens peut être estimé d'après l'équation suivante (Tomy *et al.*, 2004 ; Stapleton *et al.*, 2004 ; Buckman *et al.*, 2004) :

$$W_t = W_0 [1+b \times t \text{ (day)}]$$

Où W_0 est la masse du poisson au début de l'expérimentation, t₀
 W_t est la masse du poisson à l'instant t
 b est le taux de croissance

La concentration en contaminant dans les daurades est donc corrigée par un facteur de dilution en multipliant la concentration en contaminant par le facteur suivant (1 + b × temps).

I.4. Modélisation

I.4.1. Concept général

Les données acquises dans le cadre de ces expérimentations ont permis à E. Alonzo et J.V. Tarazona (INIA, Madrid) de valider un modèle dynamique permettant d'estimer la bioamplification des substances chimiques toxiques à travers la chaîne alimentaire dans les systèmes aquatiques (projet CEFIC-LRI : ECO-1AINIA-1100 Environnement : persistance, bioaccumulation and toxicity) (publication 2 en annexe). Le modèle, réalisé à partir du logiciel Microsoft Excel, simule l'accumulation des contaminants dans les organismes biologiques suivant une cinétique de 1^{er} ordre pour chacune des proies et des prédateurs d'un même écosystème. Dans le cadre de cette étude, le modèle a été utilisé comme modèle monocompartimental (Figure 18).

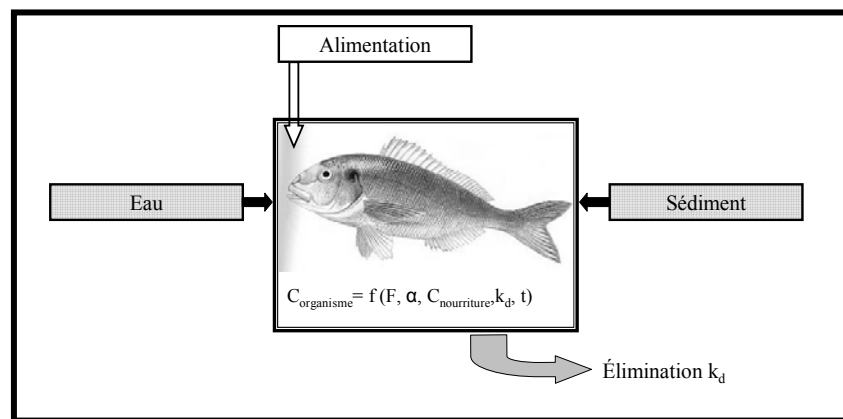


Figure 18 : Modèle de régulation de la concentration en contaminant dans un organisme cible en fonction des différentes voies d'exposition (voie trophique: alimentation ou voie directe : sédiment, eau).

Ce modèle se base sur les paramètres suivants :

- l'efficacité d'assimilation (α)
- le taux d'alimentation (F)
- le taux d'élimination (k_d)
- le facteur de bioaccumulation ($BAF = \alpha * F / k_d$)

Ainsi la concentration en contaminant dans un organisme ($C_{\text{organisme}}$) étudié est approchée par l'équation suivante :

$$C \times t = C_{\text{organisme } t-1} + (F \times \alpha \times C_{\text{food}} \times \Delta t) - (k_d \times C_{\text{organisme } t-1} \times \Delta t)$$

Ces paramètres sont déterminés pour chaque organisme étudié grâce à la littérature et aux études environnementales. Par contre, ce modèle ne tient pas compte dans sa dynamique de la croissance des organismes, il simplifie l'étude à un stade du cycle de vie de l'organisme.

I.4.2. Détermination des constantes d'accumulation k_1 et d'élimination k_d

La banque de données générée par les expérimentations de contamination de moules (*Mytilus edulis*) et de daurades (*Sparus aurata*) pour les différents composés testés (PCB 77 et 153, PBDE 47 et 153, Benzo(a)pyrène, fluoranthène et chrysène) a permis de calculer les constantes d'accumulation et de dépuration spécifiques à chaque cas.

I.4.2.1. Estimation de la constante d'élimination k_d

L'élimination d'un contaminant dans un modèle monocompartimental peut être caractérisée par une cinétique du premier ordre :

$$dC_{\text{organisme}}/dt = -k_d \times C_{\text{organisme } t}$$

Si l'on considère cette équation au temps initial t_0 , la concentration à un instant t dans un organisme peut être décrite par l'équation suivante :

$$C = C_0 e^{-k_d t}$$

I.4.2.2. Estimation de la constante d'accumulation k_1

L'incorporation d'un contaminant dans un modèle monocompartimental peut également être caractérisée par une cinétique du premier ordre :

$$C = k_0/k_d (1 - e^{-k_d t})$$

Où k_0 est la constante d'accumulation à t_0 .

La constante d'accumulation k_0 peut être calculée par l'équation suivante, en considérant k_d et la concentration estimée (C_{t1}) à t_1 :

$$k_0 = k_d \times C_{t1} / (1 - e^{-k_d t})$$

La constante k_0 ne prend pas en considération le processus d'élimination mis œuvre pendant la période où les organismes ont été exposés à la nourriture contaminée. La constante k_0 décrit l'incorporation d'un composé dans un organisme par unité de temps et peut être exprimée ainsi :

$$k_0 = C_{\text{nourriture}} \times F \times \alpha$$

Où $C_{\text{nourriture}}$ est la concentration dans la nourriture ($\mu\text{g/g}$)
 F est le taux d'alimentation
 α est l'efficacité d'assimilation

Or, dans le cadre des expérimentations, la concentration de contaminants dans la nourriture est connue et la constante d'accumulation k_1 peut être calculée en remplaçant $F \times \alpha$ par k_1 .

$$k_1 = k_0 / C_{\text{nourriture}}$$

Où k_1 est la constante d'accumulation (constante du premier ordre) qui décrit le changement de concentration en contaminant par unité de temps.

L'ensemble des constantes d'accumulation et de déuration ont été calculées grâce à l'outil statistique Crystal ball[®] par E. Alonso et J.S.V. Tarazona (INIA, Madrid). Ces constantes leur ont permis de proposer une simulation pour la cinétique d'accumulation et de déuration des composés étudiés d'après le modèle présenté initialement.

$$C_{\text{organisme } t} = C_{\text{organisme } t_1} + (F \times \alpha \times C_{\text{food}} \times \Delta t) - (k_d \times C_{\text{organisme } t_1} \times \Delta t)$$

Où $C_{\text{organisme}}$ est la concentration dans l'organisme
 $C_{\text{nourriture}}$ est la concentration dans la nourriture
 k_d est la constante d'élimination
 F est le taux d'alimentation
 α est l'efficacité d'assimilation

I.4.3. Calibration du modèle de bioaccumulation

Les paramètres toxicocinétiques (k_d et k_1) sont inclus dans le modèle en tant que valeurs entrantes (inputs). Les concentrations chimiques estimées en fonction du temps par le modèle sont ensuite comparées aux concentrations réelles mesurées dans l'organisme étudié.

II. Etude en milieu naturel

Parallèlement à l'approche en milieu contrôlé, une étude en milieu naturel ciblée sur le milieu estuarien a été réalisée.

II.1. Comparaison inter-estuariens des niveaux de contamination

Afin d'évaluer le niveau de contamination des différents estuaires français, le flet (*Platichthys flesus*) a été choisi comme espèce cible. Cette espèce a donc été échantillonnée en collaboration avec le LEMAR UMR 6539 (Brest) et le LEMA (Le Havre).

II.1.1. Estuaires étudiés

Un plan d'échantillonnage a été mené sur 4 estuaires français (la Seine, la Vaine, la Loire et la Gironde) et sur un site de référence en Bretagne (le Ster) (Figure 19). Les prélèvements ont été réalisés sur deux années (2003-2004) pendant la période de reproduction du flet (Janvier/Février).

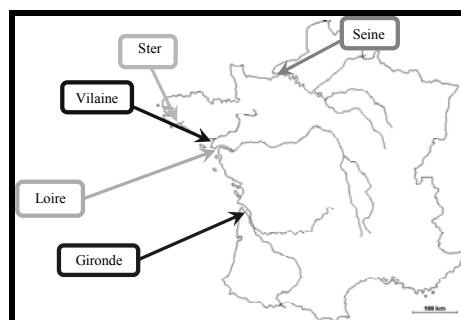


Figure 19 : Estuaire échantillonné dans le cadre de la comparaison des niveaux de contamination du flet.

II.1.2. Prélèvement des échantillons

Sur chaque site, 10 individus (5 mâles et 5 femelles) ont été échantillonnés sur une période de deux ans pendant la saison hivernale. Les campagnes de pêche sur les différents estuaires ont été réalisées à bord du navire océanographique le Côte d'Aquitaine ou en collaboration avec des pêcheurs locaux. Les poissons ont été conservés en vivier jusqu'à la dissection. Avant la dissection, les poissons ont été anesthésiés selon les besoins de prélèvement des autres équipes. Les poissons ont été pesés, mesurés puis sexés. Dans le cadre de cette étude, pour chaque poisson, un échantillon de muscle et de foie ont été prélevés, conditionnés en barquette aluminium puis congelés à -20°C dans l'attente des analyses.

II.2. L'estuaire de la Gironde

Après l'étude des différents estuaires français à travers une espèce cible, le flet, les phénomènes de transfert des PCB et PBDE ont été étudiés dans un écosystème particulier, l'estuaire de la Gironde.

II.2.1. Présentation du milieu

L'estuaire de la Gironde, situé au sud-ouest de la France, est le plus grand estuaire européen. Il naît de la confluence de la Garonne et de la Dordogne au Bec d'Ambès. Il s'étend donc sur 76 km et couvre une superficie de 450 km^2 à marée basse et 635 km^2 à marée haute (Figure 20). Le bec d'Ambès est classiquement considéré comme la limite aval de l'intrusion haline et délimite ainsi la limite de l'estuaire marin. *A contrario*, la marée dynamique se fait ressentir beaucoup plus en amont, jusqu'à Casseuil sur la Garonne et Castillon la Bataille sur la Dordogne (Lobry, 2003). Afin de pouvoir localiser les points de prélèvements ou les villes le long de l'estuaire, il est classiquement admis de les caractériser par leur distance par rapport à Bordeaux qui représente le point kilométrique 0 (PK 0). Ainsi, les PK sont notés le long de l'estuaire positivement vers l'aval et négativement vers l'amont.

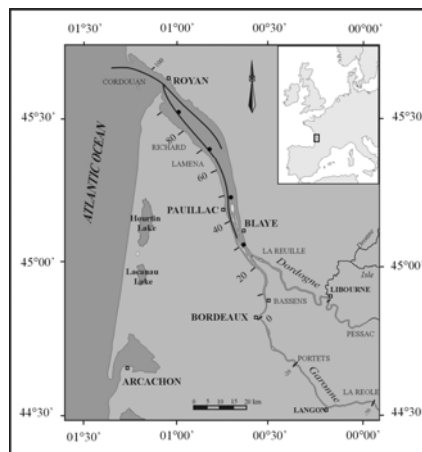


Figure 20 : Estuaire de la Gironde.

L'estuaire de la Gironde est un estuaire macrotidal. Il est soumis à un fort marnage (4 à 5 m) et est caractérisé par une forte teneur en particules. La teneur en matières en suspension (MES) dans l'estuaire est classiquement plus élevée au fond qu'en surface (respectivement 10 g.l⁻¹ et 1 g.l⁻¹) et il peut se former par endroit des lentilles d'eau extrêmement turbides (jusqu'à 400 g.l⁻¹) appelées "crème de vase" (Sottolichio et Castaing, 1999). Ces particules sont piégées par des mécanismes hydrosédimentaires et donnent naissance à une zone de turbidité maximale nommée "bouchon vaseux". Le bouchon vaseux, qui peut s'étendre sur plusieurs kilomètres, se forme classiquement en amont de l'intrusion saline au niveau du point nodal et se déplace avec le front de salinité. Ce bouchon vaseux est un véritable piège à particules, bactéries et contaminants. En outre, la faible pénétration de la lumière dans cette zone maximale de turbidité limite la production primaire. La Figure 21 illustre bien le profil type d'un estuaire macrotidal et la formation d'un bouchon vaseux.

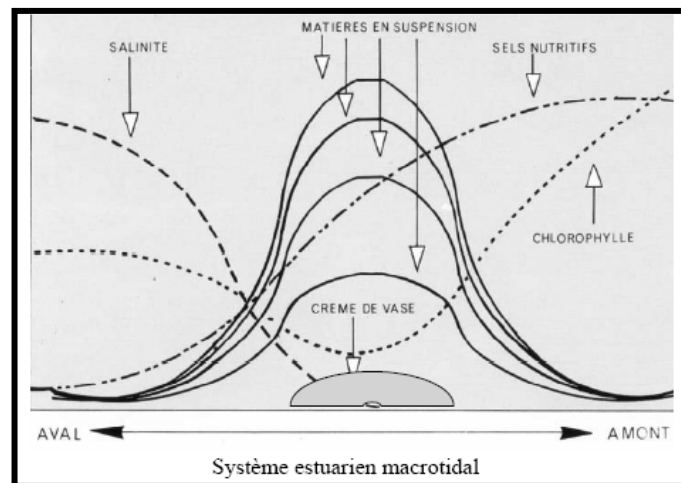


Figure 21 : Profil type d'estuaire macrotidal d'après Romaña, 1994.

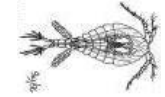
L'ensemble des paramètres abiotiques (marée saline et dynamique, teneur en particules...) influence et conditionne la répartition des espèces biologiques. L'estuaire, zone de transition entre l'eau douce et les eaux marines, joue un rôle important en tant que zone de reproduction, de nurserie et d'alimentation. L'estuaire de la Gironde présente peu d'espèces y déroulant l'ensemble de leur cycle de vie, mais il apparaît comme l'estuaire d'Europe de l'ouest présentant le plus grand cortège de migrateurs amphihalins comme l'anguille, la lamproie, le mullet, l'alose... La présence de ces espèces fait de l'estuaire de la Gironde un bon estuaire de référence d'un point de vue halieutique (Lobry, 2003).

II.2.2. Espèces étudiées

II.2.2.1. Les crustacés

Le zooplancton dans l'estuaire de la Gironde, comme dans tous les grands estuaires, est très peu diversifié, mais les espèces présentes sont abondantes (David *et al.*, 2005).

II.2.2.1.a. Les copépodes estuariens



L'estuaire de la Gironde est dominé par une espèce de copépodes *Eurytemora affinis*. Deux autres espèces de copépodes sont également présentes, *Acartia bifilosa* et *Acartia tonsa*. (David *et al.*, 2005). Ces espèces sont euryhalines et eurythermiques (3 - 30°C et 2 - 35°C).

Eurytemora affinis est une espèce classiquement observée dans les estuaires européens ou américains (Sautour et Castel, 1995). Cette espèce est inféodée au milieu estuarien et se retrouve en amont du bouchon vaseux. Son maximum d'abondance dans l'estuaire a lieu en fin d'hiver début de printemps ; un deuxième pic d'abondance moindre peut se produire en été. Les copépodes du genre *Acartia* se situent plus en aval dans l'estuaire. Ces copépodes occupent la zone médiane de l'estuaire et présentent des pics d'abondance estivaux d'amplitude dix fois inférieure à celle d' *Eurytemora affinis*.

Dans cette étude, les copépodes ont été appréhendés dans leur ensemble et ont été considérés comme un compartiment biologique homogène.

II.2.2.1.b. Les mysidacés



Dans l'estuaire de la Gironde, deux espèces de mysidacés sont présentes, *Neomysis integer* et *Mesopodopsis slabberi*.

M. slabberi est connu pour être une espèce plus marine que *N. integer*. De régime trophique, préférentiellement herbivore, cette espèce est plutôt présente dans la zone plus aval de l'estuaire et se situe préférentiellement en surface où la pénétration de la lumière favorise la production phytoplanctonique.

N. integer est une espèce caractéristique des estuaires. Cette espèce a un régime trophique plus carnivore. Sa proie majoritaire est *a priori* *E. affinis*, mais il se nourrit également sur le matériel détritique (David *et al.*, 2005). La répartition temporelle de ces espèces est présentée Figure 22.

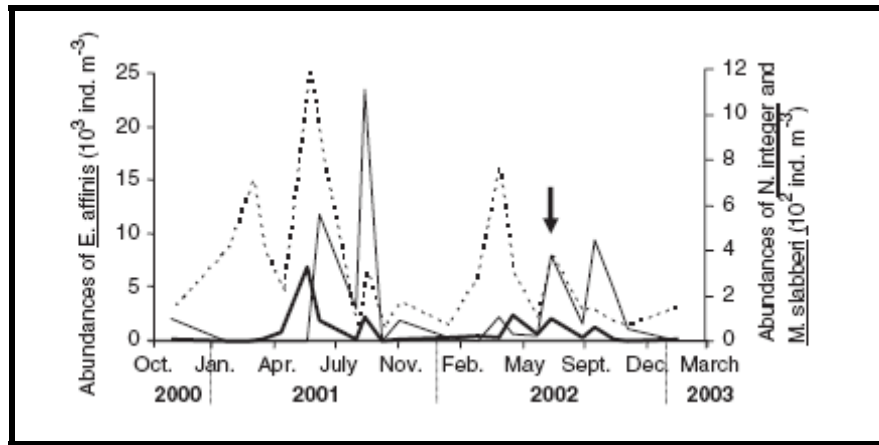


Figure 22 : Abondance du zooplancton (David *et al.*, 2006a).

(*Eurytemora affinis* : ligne pointillée; *Neomysis integer* : ligne continue en gras; *Mesopodopsis slabberi* : ligne continue).

II.2.2.1.c. Les gammares



Les gammares dans cette étude ont été considérés comme un groupe homogène. Aucune différence entre les espèces n'a été faite.

Dans l'estuaire de la Gironde, le genre *Gammarus sp.* est dominant. Il est représenté par trois espèces pélagiques caractéristiques des milieux estuariens qui se succèdent d'amont en aval, *Gammarus zaddachi*, *Gammarus salinus*, *Gammarus crinicornis*. Le régime trophique de ces espèces semble être détritivore (Sorbe, 1979).

II.2.2.1.d. La crevette blanche : *Palaemon longirostris* (Edwards, 1837)



La crevette blanche est une espèce caractéristique des milieux estuariens dont la taille varie entre 5 et 9 cm. Son aire de répartition s'étend du Maroc au nord de l'Allemagne et sur certaines zones du bassin méditerranéen. Ces capacités d'osmorégulation permettent à l'espèce de supporter de grandes variations de salinité (0 à 30 psu). Dans l'estuaire de la Gironde, une ségrégation mâle / femelle selon la salinité est observée, les mâles sont plus inféodés aux eaux salées alors que les femelles restent toujours en amont.

D'une façon plus générale, en tant qu'espèce supra benthique, son régime alimentaire est essentiellement composé de copépodes, de mysidacés et de gammares. Il faut également noter qu'elle a une tendance détritivore et nécrophage. Son espérance de vie varie entre 24 et 30 mois, la première reproduction a lieu à l'âge d'un an. Au printemps, vers les mois de mars - avril, la hausse des températures des masses d'eau estuarienne donne le signal de la période de reproduction. Les accouplements donnent lieu à des œufs que les femelles gardent sur les pléiopodes jusqu'à leur éclosion en juin - juillet. La croissance et la sexualisation des jeunes ont lieu d'août à septembre. Cette espèce est exploitée par les pêcheurs amateurs et professionnels.

II.2.2.1.e. La crevette grise : *Crangon crangon* (Linné, 1758)



La crevette grise n'est pas à proprement dit une espèce caractéristique des milieux estuariens. Espèce démersale, elle évolue au-dessus des fonds sableux et vaso-sableux et sur des herbiers dans les eaux marines côtières (de 0 à 20 m), mais elle pénètre également dans les lagunes et les estuaires. Sa durée de vie est d'environ 1 an et demi. Cette crevette de 4 à 7 cm de longueur présente une couleur grise brunâtre transparente et pigmentée de taches irrégulières. Sa coloration la rend difficilement observable sur les fonds de sable où elle vit. Son activité est liée au rythme des marées et au rythme circadien. A marée basse, elle vit enterrée près de la limite inférieure des eaux; à marée haute, elle nage dans la zone inférieure de l'estran. De régime omnivore, elle se nourrit essentiellement de petits crustacés et d'annélides. Cette espèce est gonochorique avec possibilité d'hermaphroditisme protandrique. On dénote deux à trois périodes de ponte en fonction de sa zone d'habitat qui s'étend de l'Atlantique nord à la Méditerranée. La maturité sexuelle est atteinte à l'âge d'un an environ. Après la fécondation, les œufs sont accrochés sous l'abdomen pendant une période d'incubation de quatre à dix semaines en fonction de la température de l'eau. Après l'éclosion, la vie larvaire, planctonique, dure environ cinq semaines à l'issue de laquelle débute la vie benthique de l'animal.

II.2.2.2. Les poissons



II.2.2.2.a. L'anguille : *Anguilla anguilla* (Linné, 1758)

L'anguille européenne est un poisson serpentiforme, recouvert d'une peau épaisse qui sécrète un épais mucus. Elle ne possède pas de nageoire pelvienne, ses nageoires pectorales sont atrophiées, mais elle possède une nageoire impaire unique qui réunit les nageoires dorsale, caudale et anale.

L'aire de répartition de l'anguille était à l'origine très vaste, s'étendant en latitude du nord de la Scandinavie au sud du Maroc, et en longitude de l'Irlande à l'est aux rivages de la mer Noire à l'ouest. Cependant, depuis une vingtaine d'années, la raréfaction de l'espèce conduit à une forte diminution de l'abondance de l'anguille Européenne au nord et au sud de son aire de répartition d'origine, en particulier à l'est d'un axe Italie –Tunisie et au nord du Danemark (Elie, 2001) (Figure 23).

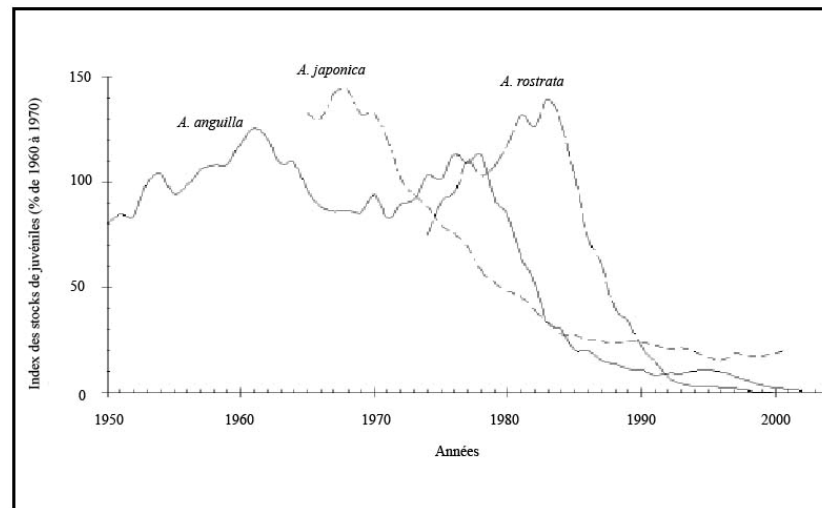


Figure 23 : Baisse des indices de recrutement pour les trois espèces d'anguilles de l'hémisphère nord : l'anguille européenne *A. anguilla*, l'anguille américaine *A. rostrata* et l'anguille japonaise *A. japonica*. Dekker, 2003.

L'anguille est un poisson opportuniste en terme d'alimentation. Classiquement, la nourriture de l'espèce se compose de crustacés, d'insectes, de vers, de mollusques, d'écrevisses, de grenouilles, de petits poissons morts ou vivants. Cependant, dans l'estuaire de la Gironde, l'anguille se nourrit préférentiellement d'amphipodes, de crevettes et de mysidacés (Pascaud, 2006).

Poisson migrateur amphihaline, l'anguille utilise au cours de son existence le milieu marin et différents milieux continentaux (herbiers et vasières littorales ; marais, estuaires et zones humides annexes ; les axes des rivières et leurs chevelus). Le cycle biologique de l'anguille est marqué par deux migrations transocéaniques de 6000 km à 8000 km (Figure 24). L'ampleur de ces migrations place l'anguille parmi les poissons migrateurs amphihalins parcourant les plus grandes distances. La première migration est réalisée par les adultes matures qui traversent l'Atlantique pour aller pondre au niveau de la mer des Sargasses en Floride. Après l'éclosion, les larves leptocéphales de l'anguille utilisent les courants marins de la dérive Atlantique Nord (en particulier le Gulf Stream) pour la migration de retour vers les façades maritimes des pays d'Europe et des pays d'Afrique du nord. Au niveau du talus continental, la larve leptocéphale en fin de croissance subit alors une importante métamorphose, où la forme du poisson et sa physiologie sont entièrement réorganisées : elle se transforme en civelle transparente. Durant cette transformation, la civelle ne s'alimente pas de façon autonome, elle vit sur ses réserves constituées lors de sa migration transocéanique. (Elie, 2001). A ce stade, les civelles colonisent les bassins versants, investissant des milieux comme les estuaires, les lagunes, les lacs et les cours d'eau plus en amont (Daverat *et al*, 2004; Edeline *et al*, 2004).

La phase de colonisation est suivie par une phase de croissance (stade dit "anguille jaune") plus ou moins longue selon les individus, les sexes et les hydrosystèmes fréquentés. Au cours de cette phase sédentaire, l'anguille constitue des réserves de triglycérides pour sa future migration transocéanique de reproduction et se différencie sexuellement. Au terme de cette période, les anguilles jaunes subissent une seconde métamorphose, qui les conduit au stade dit « anguille argentée» par une transformation morpho-physiologique profonde (augmentation des diamètres oculaires, épaissement de la peau et de la paroi de la vessie natatoire, amplification de la sécrétion des hormones gonadotropes sous l'effet de la pression hydrostatique). Ces transformations vont se poursuivre lors de la migration transocéanique de retour sur l'aire de ponte (Durif et Elie, 2004; Durif *et al.*, 2005).

Durant cette phase de dévalaison et durant la migration transocéanique, les anguilles argentées ne s'alimentent plus et vivent sur leurs réserves. Au moment du départ des anguilles, les taux de réserves lipidiques doivent atteindre et dépasser 30% de la biomasse corporelle. Ces réserves serviront pour la migration transocéanique (maintien de la vitesse de croisière requise durant un certain temps), pour la maturation des gonades et pour le transfert des réserves vers les ovocytes (présence de nombreuses gouttelettes lipidiques dans les ovocytes au stade terminal avant leur émission dans la masse d'eau et leur fécondation).

Cette espèce est exploitée à tous ses stades de maturation par les pêcheurs professionnels et amateurs.

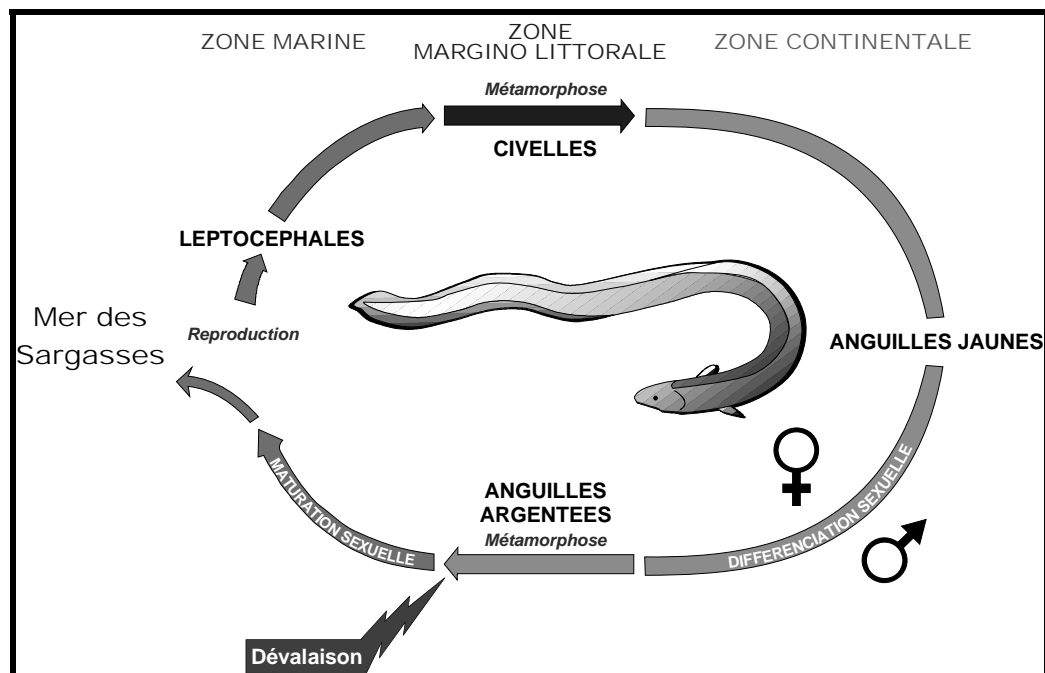


Figure 24 : Cycle de vie de l'anguille européenne (*Anguilla anguilla*). (Anonyme, 1984a et b).

II.2.2.2.b. Le flet : *Platichthys flesus* (Linné, 1758)

Le flet est un poisson plat dextre, il présente les deux yeux sur le côté droit. Sa coloration est grisâtre avec des taches noirâtres sur la face coulée et grises blanchâtres sur la face aveugle. Une rangée de tubercules épineux s'étend à la base des nageoires dorsales et anales et des tubercules ossifiés courent le long de la ligne latérale. Le flet est un poisson migrateur amphihalín thalassotoque. Son aire de répartition s'étend sur toutes les côtes d'Europe de la mer Blanche à la Méditerranée occidentale où il vit la majeure partie de l'année, en estuaire ou dans les eaux déssalées. A la belle saison, il est abondant dans les eaux saumâtres et pénètre même en eau douce alors qu'en hiver il regagne des eaux plus profondes. Il affectionne les fonds sablo-vaseux où il se nourrit de petits invertébrés benthiques et supra benthiques (bivalves, polychètes, crevettes...) et de petits poissons (gobies, lançons...). La maturité sexuelle est atteinte à l'âge de 3 ans pour les mâles et 4 ans pour les femelles. La reproduction a lieu de janvier à avril, sur des fonds marins à substrats meubles dans la zone des 30-70 m. Les oeufs (de 400 000 à 2 millions par femelle) donnent naissance à une larve qui mesure 2,5-3,0 mm à l'éclosion. En grandissant, ces larves se rapprochent de la côte puis pénètrent dans les eaux déssalées où la métamorphose s'effectue, pour donner naissance à la forme benthique (15-30 mm). Cette espèce ne subit aucune exploitation dirigée mais est parfois pêchée par des pêcheurs amateurs au carrelet dans les parties basses des fleuves.

II.2.2.2.c. Le maigre : *Argyrosomus regius*

Le maigre est un poisson euryhalín au corps fusiforme et aux reflets argentés. Le maigre a une taille maximale élevée, il peut atteindre deux mètres, pour un poids avoisinant 50 kilos. Poisson carnassier, il se nourrit aussi bien près du fond qu'en eau pleine ou vers la surface d'eau où il chasse des poissons côtiers comme les mullets, les sardines, les anchois, les sprats, les tacauds et les céphalopodes. Son aire de répartition s'étend sur les côtes Atlantiques de la Norvège à Gibraltar, jusqu'à la Mer Méditerranée et la Mer Noire.

Dans ses premières années de vie, le maigre paraît rester côtier alors que les adultes vivent plus au large. Pendant la période de reproduction (mai-juin), les maigres se regroupent sur la zone de reproduction. Trois zones de fraye sont identifiées : l'estuaire de la Gironde, l'Estuaire du Nil et les côtes Mauritanienes. C'est durant la période de reproduction que le surnom de grogneur du maigre prend toute sa signification. En période de fraye, il produit un son proche du grognement en agissant sur un muscle qui fait résonner sa vessie natatoire. Ce bruit est audible depuis un bateau si celui-ci est à la verticale d'un banc de maigres. A la fin de l'été, les maigres repartent vers des eaux plus profondes plus au large. L'espèce est exploitée par les pêcheries professionnelles et en pêche sportive.

II.2.2.2.d. Le mullet porc : *Liza ramada* (Linné, 1758)

Le mullet possède un corps fuselé, une tête massive, aplatie au dessus des yeux avec un museau court et obtus. Ses yeux écartés, ses nageoires pectorales haut placées, sa coloration grise plombée sur le dessus et les flancs lui donnent une allure caractéristique. L'aire de répartition de cette espèce s'étend des côtes Atlantiques au Maroc. Amphihaline, le mullet remonte les estuaires et parfois plus en amont dans les fleuves. De mœurs pélagiques, le mullet vit soit près de la surface, soit sur le fond où il "broute" la surface des sédiments ou les végétaux sur les rochers. Leur contenu stomacal renferme, mélangées à du sable et de la vase, de nombreuses diatomées, des cyanophycées, des chlorophycées et un peu de matière organique en décomposition. Le mullet est un omnivore.

Le mullet est un poisson migrateur thalassotoque. Les mullets se rassemblent en banc près des côtes entre septembre et février. Durant cette période, les adultes matures (3 à 4 ans et 30 cm) pondent. Les oeufs se développent en mer, puis les juvéniles colonisent les zones de nurserie situées dans les zones littorales et estuariennes. Après une période hivernale passée en mer, les mullets adultes remontent les estuaires pour gagner les parties basses des fleuves plus riches en ressources trophiques. Cette espèce est exploitée par la pêche professionnelle et amateur, que ce soit au filet, à la ligne ou au carrelet.

II.2.2.2.e. La sole : *Solea solea* (Linné, 1758)

La sole commune a un corps ovale de couleur brune marquée de taches sombre avec une face aveugle blanchâtre. Elle porte une longue nageoire dorsale, mais de faible hauteur, qui s'étire depuis l'avant de l'oeil supérieur jusqu'à la queue et qui s'oppose à la nageoire anale de longueur presque identique.

La sole est un poisson benthique, vivant sur des fonds sableux ou sablo-vaseux de quelques mètres à 200 m de profondeur. Espèce euryhaline, elle supporte aisément les eaux saumâtres estuariennes. Les adultes peuvent atteindre des tailles variant de 30 à 60 cm et peser jusqu'à 3 kg. Les soles se rapprochent des côtes à la fin de l'hiver pour la période de reproduction. La femelle pond quelques centaines de milliers d'oeufs pélagiques, qui donneront naissance après métamorphose aux juvéniles. Les juvéniles se développent dans les eaux côtières et estuariennes.

Le régime alimentaire de la sole est principalement composé de vers, de crustacés et de petits coquillages. Elle détecte ses proies enfouies dans le sédiment grâce à des papilles sensibles situées à proximité de la bouche. Cette espèce est également exploitée par les pêcheries professionnelles et par les pêcheurs amateurs.

II.2.3. Etude de la contamination des premiers maillons du réseau trophique estuarien

La contamination des premiers maillons du réseau trophique estuarien (copépodes, mysidacés, gammarés et crevettes) et de leur milieu (eau, particules) a été suivie à travers deux grandes campagnes de prélèvements sur l'estuaire de la Gironde. Une première série de campagnes au niveau de Pauillac avec un prélèvement mensuel pendant une période de deux ans et une série de campagnes sur l'estuaire (RETROGIR) pendant le maximum de production biologique du système d'avril à septembre 2003.

II.2.3.1. Suivi mensuel à Pauillac

Durant deux années (2003-2004), des prélèvements mensuels (eau, particules, petits crustacés) ont été réalisés à Pauillac (PK 50 environ) sur la rive gauche de l'estuaire de la Gironde, au niveau du ponton extérieur du port de plaisance, afin d'évaluer le niveau de contamination en PCB et PBDE (Figure 25).

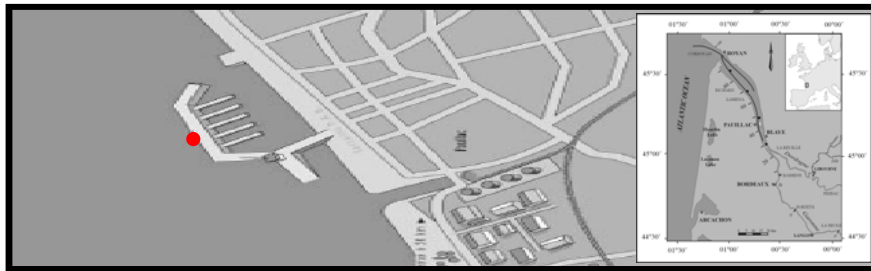


Figure 25 : Plan du port de Pauillac, les prélèvements ont eu lieu sur le ponton extérieur du port (●).

Les prélèvements ont toujours été réalisés en milieu de journée sur les deux dernières heures du flot par des marées de faibles coefficients (22 à 73, coefficient moyen 50 ± 13).

Les prélèvements pour l'analyse de la contamination abiotique du milieu (eau et particules) ont été réalisés avec l'aide d'un préleveur artisanal sur lequel est fixé une bouteille ambrée de 4 litres préalablement lavée et calcinée (450°C , 6h). L'ensemble des prélèvements a été réalisé 1 mètre sous la surface.

De retour au laboratoire, l'eau prélevée a été filtrée sur filtre en fibre de verre (Whatman GF/F, $0,7 \mu\text{m}$) préalablement pesé et calciné. L'eau passe ainsi à travers le filtre et les particules restent sur le filtre (Figure 26). L'eau filtrée a ensuite été analysée directement pour déterminer la concentration de contaminants dans la phase dissoute et le filtre contenant les particules a été congelé à -20°C dans l'attente de l'analyse de la contamination de la phase particulaire.

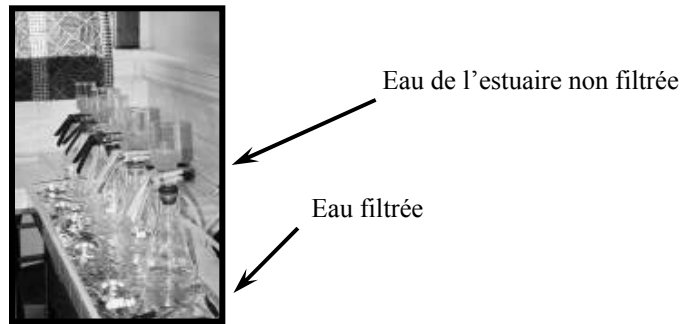


Figure 26 : Unités de filtration de l'eau de l'estuaire.

Les prélèvements biologiques ont été réalisés par un filet WP2 standard (200 μm). Les petits crustacés comme les crevettes, les gammarés et les mysidacés ont été triés directement à la sortie du filet sur un tamis à la pince. Les crevettes ont été séparées par espèce (*Palaemon longirostris* et *Crangon crangon*), alors que les gammarés et les mysidacés ont été considérés chacune comme un groupe homogène sans différenciation d'espèces. Après rinçage, ils ont été conditionnés dans des barquettes en aluminium puis congelés à -20°C dès le retour au laboratoire.

Les autres petits crustacés de type copépodes ont été récupérés vivants après un premier tri sur tamis 500 μm , puis conservés dans l'eau du milieu jusqu'au retour au laboratoire. Une fois au laboratoire, l'eau contenant les copépodes a été mélangée à 50% avec de l'eau de Volvic ajustée à la salinité du milieu (2 à 10 psu). Puis le tout a été laissé à décanter dans des béciers de 4 l pendant une heure. Les particules du milieu et les animaux morts sédimentent, alors que les copépodes vivants sont attirés en surface par phototropisme vers une source lumineuse placée au dessus du bécier. Les copépodes vivants ont été récupérés, puis replacés dans de l'eau de Volvic claire ajustée à la salinité du milieu. Une nouvelle étape de décantation est nécessaire, l'opération est renouvelée jusqu'à ce que les copépodes nagent dans une eau limpide exempte de particules. Les copépodes sont alors laissés une nuit dans l'eau claire, afin qu'ils relarguent les dernières particules éventuellement piégées dans leurs pattes. Le lendemain matin, les copépodes vivants sont récupérés dans la colonne d'eau par tamisage. Ils sont ensuite conditionnés dans des barquettes aluminium puis congelés dans l'attente de l'analyse.

II.2.3.2. Variation spatio-temporelle de la contamination : Mission Retrogir

Durant la période de production maximale dans l'estuaire, cinq campagnes de prélèvements ont été conduites d'avril à septembre 2003 sur le Navire CNRS/INSU le Côte d'Aquitaine (Missions Retrogir coordonnées par V.David et B.Sautour, LOB : Laboratoire d'Océanographie Biologique). Durant ces campagnes, cinq sites ont été échantillonnés le long de l'estuaire dans le chenal de navigation (Figure 27).

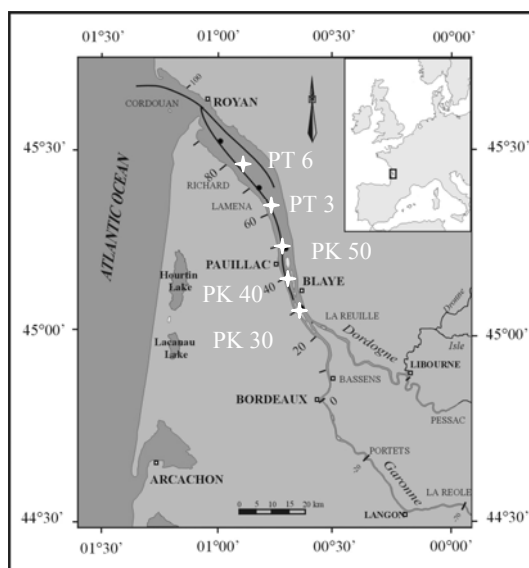


Figure 27 : Sites de prélèvements échantillonnés durant les campagnes Retrogir.

Pour chaque site, des prélèvements d'eau ont été réalisés afin de caractériser le niveau de contamination abiotique du milieu. Les prélèvements ont été réalisés 1 m sous la surface à l'aide d'un préleveur artisanal dans lequel était fixé une bouteille de 4 l ambrée préalablement lavée et calcinée (450°C, 6h). L'eau prélevée a ensuite été directement filtrée à bord sur filtres en fibre de verre (Whatman GF/F, 0,7µm) préalablement pesés et calcinés. L'eau passe ainsi à travers le filtre et les particules restent sur le filtre. L'eau a été ensuite stockée au frais dans l'attente de l'analyse au laboratoire. Les filtres contenant les particules ont été congelés à -20°C dans l'attente de l'analyse de la contamination de la phase particulaire.

Pour chaque site des prélèvements biologiques ont également été réalisés. Les copépodes ont été échantillonnés grâce à un filet WP2 standard de vide de maille 200 µm, alors que les mysidacés, les gammares et les crevettes ont été échantillonnés avec un filet du type IOSN de vide de maille 500 µm (Figure 28).



a.



b.

Figure 28 : Filets utilisés pour le prélèvement :
a. Filet WP2 de vide de maille 200 µm utilisé pour le prélèvement des copépodes.
b. Filet type IOSN de vide de maille 500 µm pour le prélèvement des mysidacés.

Comme pour le suivi sur Pauillac, les crustacés (mysidacés, gammares et crevettes) ont été triés, rincés et conditionnés en barquettes aluminium directement à bord et conservés à -20°C. Les crevettes ont été séparées par espèce *Palaemon longirostris* et *Crangon crangon*, alors que les gammares et les mysidacés ont été considérés comme un groupe homogène sans différenciation d'espèces. Les copépodes ont été récupérés vivants puis mis à décanter selon le même principe que précédemment pour le suivi au niveau de Pauillac. Ils ont ensuite été récupérés, conditionnés dans des barquettes aluminium puis congelés à -20°C.

II.2.4. Protocole d'étude de la contamination des poissons de la Gironde

Parallèlement aux études sur les premiers maillons trophiques du système, les niveaux de contamination de quelques espèces cibles du peuplement ichtyologique ont été analysées (anguille, maigre, flet, mullet). Deux types de campagnes d'échantillonnage ont été conduites en collaboration avec le Cemagref. Une première série de prélèvements a ciblé les différentes espèces de poissons dans la zone de l'estuaire marin (Missions Retroph). Puis, un plan d'échantillonnage ciblé plus spécifiquement sur l'anguille européenne a été conduit sur l'ensemble du système fluvio-estuarien de la Gironde (Echantillonnage SMIDDEST).

II.2.4.1. Mission Retroph CEMAGREF

Les campagnes de prélèvements Retroph coordonnées par le Cemagref se sont déroulées à bord de "l'Esturial" dans l'estuaire marin au mois d'avril 2004, afin de capturer les espèces de poissons représentatives de cette zone. L'engin qui a été utilisé est un chalut possédant une double poche terminale de 4 m d'ouverture avec un maillage de 8 mm. La durée de chaque trait a été limitée à 15 min.

II.2.4.2. Echantillonnage SMIDDEST

Parallèlement aux échantillonnages des différentes espèces de poissons, un échantillonnage plus ciblé sur l'anguille européenne a été conduit sur les différents compartiments du système fluvio-estuarien de la Gironde (Figure 29):

Le compartiment estuarien proprement dit :

Il constitue un milieu saumâtre où la marée dynamique est présente, il s'étend sur environ 80 km de la limite transversale de la mer (Pointe de Grave - pointe de Suzac) à la limite de salure des eaux (Bec d'Ambès). Il a été séparé en deux zones, l'estuaire aval et l'estuaire amont. La délimitation entre les deux parties de l'estuaire a été établie au niveau d'une ligne virtuelle tracée entre le port de Conac en rive droite de l'estuaire et le Village de Laména en rive gauche.

La zone fluviale :

Elle constitue un milieu d'eau douce avec présence de la marée dynamique. Elle s'étend sur 85 km sur la Garonne (jusqu'à Casseuil), sur 75 km sur la Dordogne (jusqu'à Castillon la Bataille) et sur 31 km sur l'Isle (entre Libourne et Laubardement), de la limite de salure des eaux aux limites de la marée dynamique.

La zone amont :

Elle constitue un milieu d'eau douce avec absence de marée. Elle débute dès la limite de la marée dynamique et remonte jusqu'aux barrages : le barrage de Tuilières (situé à 220 km de la mer sur la Dordogne) et le barrage de Golfech (situé à 293 km sur la Garonne). Les campagnes de pêche sur l'estuaire ont été réalisées comme précédemment à bord de l'Esturial, navire de recherche du Cemagref. Les zones fluviales ont été échantillonnées grâce à la vedette du Cemagref, par échantillonnage biologique auprès des pêcheurs, ainsi que par des techniques de pêche électrique.

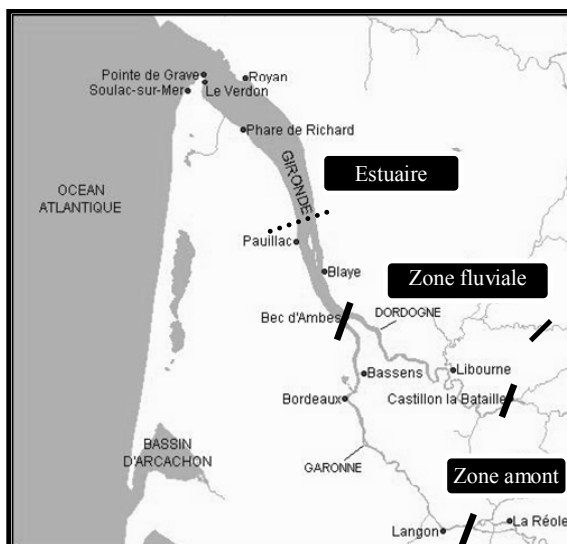


Figure 29 : Zones d'échantillonnage des anguilles du programme SMIDDEST.

III. Analyse des contaminants organohalogénés

III.1. Préparation préalable des échantillons

Les analyses des composés organohalogénés ont été développées sur des matrices sèches. Afin de s'affranchir de la teneur en eau, les échantillons biologiques ont été lyophilisés. La masse de l'échantillon est pesée avant et après lyophilisation afin de déterminer le pourcentage d'humidité de l'échantillon. Ce pourcentage permet de normaliser les résultats de l'imprégnation en polluants en fonction du poids sec ou du poids humide. Une fois lyophilisés, les échantillons ont été ensuite broyés finement, homogénéisés puis stockés dans des pots en verre ambrés à l'abri de la lumière dans l'attente de l'analyse.

III.2. Mode de quantification : Etalonnage interne

III.2.1. Principe de l'étalonnage interne

Toutes les données obtenues dans le cadre de ce travail ont été obtenues par étalonnage interne. Cette méthode consiste à rajouter, en début de protocole analytique, des composés non présents dans l'échantillon naturel, de structure et de propriétés physico-chimiques proches de celle des analytes : les étalons internes.

L'intérêt de ce procédé est de s'affranchir des pertes d'analytes intervenant au cours de l'analyse : rinçage incomplet de la verrerie, pertes par volatilisation... Les pertes d'étalons internes sont considérées comme équivalentes aux pertes d'analytes.

Un autre avantage de l'étalonnage interne est de s'affranchir de la quantité de composé injecté. En effet, le facteur de réponse correspond à une quantité précise injectée dans l'appareil chromatographique. En considérant que l'extrait est homogène et que la partie injectée est proportionnelle à l'ensemble de l'extrait, il est considéré que le signal chromatographique de l'étalon interne est représentatif de la quantité connue ajoutée au début de la préparation de l'échantillon. De plus, un second étalon supplémentaire, appelé étalon de rendement, est ajouté gravimétriquement à l'échantillon juste avant l'injection. Il permet de calculer le rendement d'extraction de l'étalon interne.

Le choix d'un étalon interne repose donc sur les points suivants :

- sa capacité à pouvoir subir les mêmes étapes de préparation d'échantillons que les composés recherchés.
- ses propriétés physico chimiques similaires à celles des composés recherchés.
- sa réponse chromatographique similaire à celles des composés recherchés.
- son absence de l'échantillon naturel.

Le principe de quantification par étalonnage interne est basé sur un principe simple de proportionnalité, la quantité de composé (m) est proportionnelle à l'aire du pic chromatographique produit (A):

$$m_{\text{composé}} = k_{\text{composé}} \cdot A_{\text{composé}}$$

La méthode de quantification par étalonnage interne repose sur l'utilisation de mélanges étalons, dans lesquels les concentrations respectives en analytes et en étalons internes sont connues. A chaque pic chromatographique A est associée une aire proportionnelle à une quantité injectée m .

Le coefficient de réponse (K_i) d'un analyte par rapport à un étalon est obtenu par la relation suivante :

$$\frac{m_{\text{analyte}}}{m_{\text{étalon interne}}} = \frac{K_i}{k_{\text{analyte}} / k_{\text{étalon interne}}} \times \frac{A_{\text{analyte}}}{A_{\text{étalon interne}}}$$

Par conséquent

$$K_i = \frac{k_{\text{analyte}}}{k_{\text{étalon interne}}} = \frac{A_{\text{étalon interne}}}{A_{\text{analyte}}} \times \frac{m_{\text{analyte}}}{m_{\text{étalon interne}}}$$

Et donc

$$m_{\text{analyte}} = K_i \times m_{\text{étalon interne}} \times \frac{A_{\text{étalon interne}}}{A_{\text{analyte}}}$$

La quantité d'analyte présente dans un échantillon inconnu peut être calculé d'après l'équation précédente. Les aires sont données par le chromatogramme, la quantité d'étalon interne est connue puisqu'elle a été ajoutée par gravimétrie avant l'étape d'extraction, et le coefficient de réponse de chaque composé par rapport à son étalon interne a été déterminé par l'analyse d'une solution de référence qui contient chaque composé recherché et l'étalon.

III.2.2. Etalons internes utilisés, composés analysés

L'ensemble des PCB et des PBDE analysés ainsi que les étalons correspondants pour la quantification sont listés dans le Tableau 10.

Composés analysés	Etalons internes	Etalon de rendement
CB 8	CB 30	OCN
CB 18	CB 30	OCN
CB 29	CB 30	OCN
CB 50+28	CB 30	OCN
CB 52	CB 103	OCN
CB 104	CB 103	OCN
CB 44	CB 103	OCN
CB 66	CB 103	OCN
CB 101	CB 155	OCN
CB 87	CB 155	OCN
CB 154+77	CB 155	OCN
CB 118	CB 198	OCN
CB 188	CB 198	OCN
CB 153	CB 198	OCN
CB 105	CB 198	OCN
CB 138	CB 198	OCN
CB 126	CB 198	OCN
CB 187	CB 198	OCN
CB 128	CB 198	OCN
CB 200	CB 198	OCN
CB 180	CB 198	OCN
BDE 47	CB 198	OCN
CB 170	CB 198	OCN
CB 195	CB 198	OCN
BDE 119	CB 198	OCN
BDE 99	CB 198	OCN
CB 206	CB 198	OCN
CB 209	CB 198	OCN
BDE 153	CB 198	OCN

Tableau 10 : Liste des composés analysés et de leurs étalons internes.

III.3. Protocole d'extraction

III.3.1. Protocole d'extraction des matrices liquides

III.3.1.1. Principe général de l'extraction

L'extraction liquide/liquide est un procédé physico-chimique permettant la récupération (ou la purification) d'un composé en utilisant les différences de solubilités entre différents liquides. Cette méthode permet d'extraire les composés organiques d'une matrice aqueuse vers un solvant organique non miscible avec l'eau par agitation. Dans le cas de cette étude, le solvant utilisé est le dichlorométhane.

III.3.1.2. Protocole d'extraction liquide/liquide

Les échantillons d'eau prélevés (0,1 ou 1 l pour les expérimentations en milieu contrôlé, 2 l pour les échantillons d'eaux naturelles) ont été extraits avec du dichlorométhane. Les échantillons sont traités litre par litre. Chaque litre d'eau est introduit dans une ampoule à décanter, les étalons internes préalablement pesés (classiquement 30 µl d'une solution à 700 ng.g⁻¹) sont ajoutés à l'eau dans un petit volume de dichlorométhane. Ensuite le volume d'eau est extrait avec trois fois 20 ml de dichlorométhane (extraction liquide-liquide). La phase organique est récupérée puis séchée sur Na₂SO₄ anhydre. L'extrait ainsi récupéré est ensuite reconcentré puis repris dans de l'isooctane avant une purification sur colonne de silice. L'échantillon est déposé en tête de colonne de silice puis élué avec 3×5 ml d'un mélange pentane/dichlorométhane (90:10 v/v). L'éluât est reconcentré et repris dans l'isooctane avant ajout de la solution seringue et injection en GC-ECD.

III.3.2. Protocole d'extraction dans les matrices solides

III.3.2.1. Extraction sous champ micro-ondes (MAE Acide)

III.3.2.1.a. Principe général

Le principe de l'extraction repose sur le fait de transférer les composés organiques (PCB, PBDE) initialement contenus dans la matrice solide vers un solvant organique par chauffage. Le champ micro-ondes est généré à l'aide d'un magnétron, sorte de tube à vide qui convertit l'énergie électrique des électrons tournants en énergie cinétique puis en énergie électromagnétique à fréquence élevée (Figure 30). Soumises au champ micro-ondes, les molécules de solvant vont s'aligner selon ce champ, provoquant une agitation (énergie vibrationnelle et rotationnelle des molécules) et un chauffage de l'extrait.

Le phénomène de chauffage de l'extrait est basé sur les propriétés d'interactions du champ électrique avec les constituants du produit. La transformation de l'énergie électromagnétique en énergie calorifique se fait essentiellement par deux mécanismes : la conduction ionique et la rotation dipolaire. La conduction ionique génère de la chaleur provenant de la résistance du milieu vis-à-vis de la migration des ions dans le champ électromagnétique. Sous l'action du champ électromagnétique, la migration des ions contenus dans le solvant provoque des collisions entre les molécules dans la mesure où les ions changent de direction autant de fois que le champ change de signe.

La rotation dipolaire est liée au mouvement de rotation alternatif des molécules polaires qui tentent de s'aligner sur le champ électrique. Des collisions multiples résultant de cette agitation des molécules conduisent à un dégagement d'énergie et donc à une élévation de température. Ces deux mécanismes permettent un rendement énergétique exceptionnellement élevé et ainsi de mettre en solution les analytes recherchés.

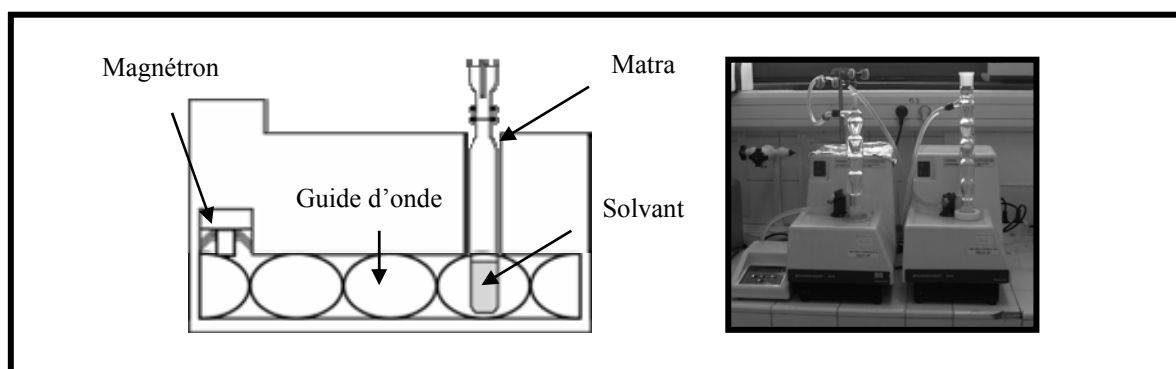


Figure 30 : Schéma de principe et photographie des systèmes micro-ondes utilisés.

III.3.2.1.b. Protocole d'extraction sous champ micro-ondes des PCB et PBDE

Une prise d'essai variant de 0,1 à 1g est utilisée en fonction du niveau de contamination. La prise d'essai est pesée, puis les étalons internes sont rajoutés par gravimétrie. Les échantillons subissent ensuite une extraction sous champ micro-ondes (30 Watt, 10 min) avec 20 ml de dichlorométhane. L'extrait est ensuite filtré sur coton de fibre de verre, préalablement nettoyé au dichlorométhane. L'extrait organique ainsi récupéré est reconcentré par un évaporateur à température et à vide modulable (Rapidvap, Labconco) après ajout de 1 ml d'iso-octane. Les conditions d'évaporation sont les suivantes : vitesse d'agitation 70 %, température 51°C, temps de reconcentration 20 min et vide 900 mBar. L'extrait est repris dans l'iso-octane (0,5 ml) pour la purification.

III.3.2.2. Extraction par fluide pressurisé (ASE Acide)

III.3.2.2.a. Principe général

Dans ce type d'extraction, le solvant en contact avec l'échantillon est soumis à une pression élevée permettant d'augmenter sa température d'ébullition et donc de le garder sous forme liquide à haute température, facilitant ainsi l'extraction à chaud des analytes recherchés. L'extrait est ensuite récupéré directement filtré dans des flacons ambrés pour être purifié (Figure 31).

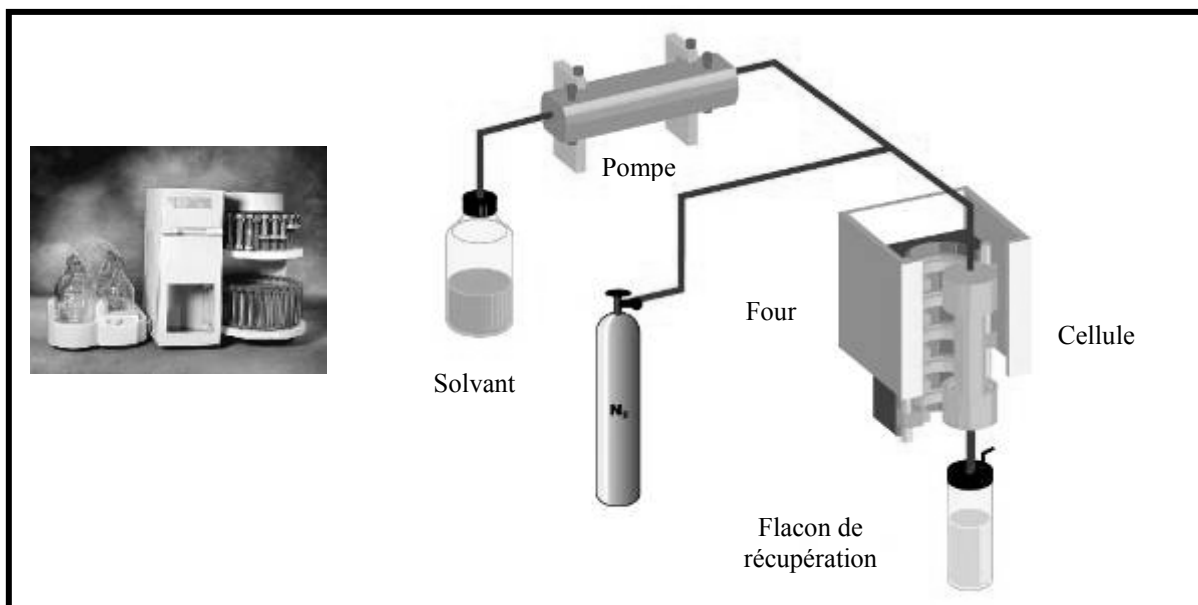


Figure 31 : Photographie et schéma de principe du système d'extraction ASE 200 (Dionex).

III.3.2.2.b. Protocole d'extraction par fluide pressurisé

Ce protocole a été utilisé pour traiter les échantillons biologiques les plus chargés en lipides (plus de 25% du poids sec). En effet, certaines matrices demandent une purification plus poussée, afin d'éliminer les interférents comme les lipides et obtenir un extrait clair et limpide ainsi qu'un chromatogramme sans interférents. Un protocole d'extraction et purification a donc été développé utilisant l'ASE 200 (Dionex, Voisins le bretonneux) afin de diminuer les étapes de purification longues et fastidieuses nécessaires pour la quantification de ces composés organohalogénés.

Préalablement à l'extraction, les cellules de 22 ml de l'ASE sont préparées avec 2 filtres en cellulose, 5 g de silice acidifiée recouverte d'un filtre de cellulose (Figure 32). La silice acidifiée a été préalablement préparée par mélange d'acide sulfurique ultra pur, avec du gel de silice dans les proportions suivantes : 40 grammes d'acide pour 60 grammes de silice. Le mélange est ensuite placé à 200°C pendant 12 h.

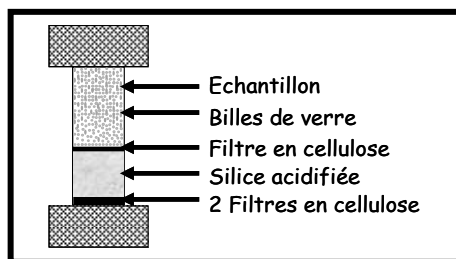


Figure 32 : Préparation de la cellule de 22ml avant extraction par ASE.

Les échantillons sont ensuite introduits par gravimétrie dans la cellule. Les étalons internes sont introduits directement dans les flacons de récupération de l'extrait, afin d'éviter les phénomènes d'"effet mémoire" dans la cellule. L'échantillon est ensuite extrait selon les conditions décrites Tableau 11.

Température	100°C
Phase statique	8 min
Cycle	1
Solvant	Dichlorométhane
Pression	130 bars
Temps de chauffe	5 min
Volume de flush	60 %
Temps de purge	60 s
Matériel de comblement	Billes de verre (Roth)

Tableau 11 : Conditions d'extraction des échantillons par ASE.

L'extrait organique déjà en partie purifié par la silice acide est récupéré et reconcentré par un évaporateur sous dépression (Rapidvap, Labconco) après ajout de 1 ml d'iso-octane. Les conditions d'évaporation sont les mêmes que précédemment : vitesse d'agitation 70 %, température 51°C, temps de reconcentration 20 min et vide 900 mBar. L'extrait est repris dans l'iso-octane (0,5 ml) pour la purification.

III.3.2.3. Etape de purification

III.3.2.3.a. Principe de la purification sur colonne de silice acidifiée

La purification a pour but d'éliminer les molécules interférentes pouvant gêner la quantification des PCB et PBDE. La purification par chromatographie d'adsorption sur colonne de silice acidifiée sert à éliminer deux types d'interférents. D'une part, l'acide fixé sur la colonne permet une oxydation ménagée qui permet d'éliminer les lipides encore présents dans l'extrait, ainsi que les molécules les moins stables et d'autre part la purification de la chromatographie d'adsorption sur colonne de silice élimine les composés interférents les plus polaires.

III.3.2.3.b. Protocole de purification

L'extrait une fois reconcentré (0,5 ml) est déposé en tête de colonne, puis élué avec trois fois 5 ml d'un mélange pentane/dichlorométhane (90:10, v:v) (Figure 33). L'éluât est récupéré, reconcentré et repris dans 90 μ l d'isooctane. Un étalon de rendement (octachloronaphtalène) est ajouté par gravimétrie en fin de manipulation (25 μ l) afin de calculer le rendement d'extraction pour chaque échantillon et de valider ainsi chaque mesure. L'échantillon est ensuite injecté en chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à capture d'électrons (GC/ECD) pour l'analyse des PCB et des PBDE.

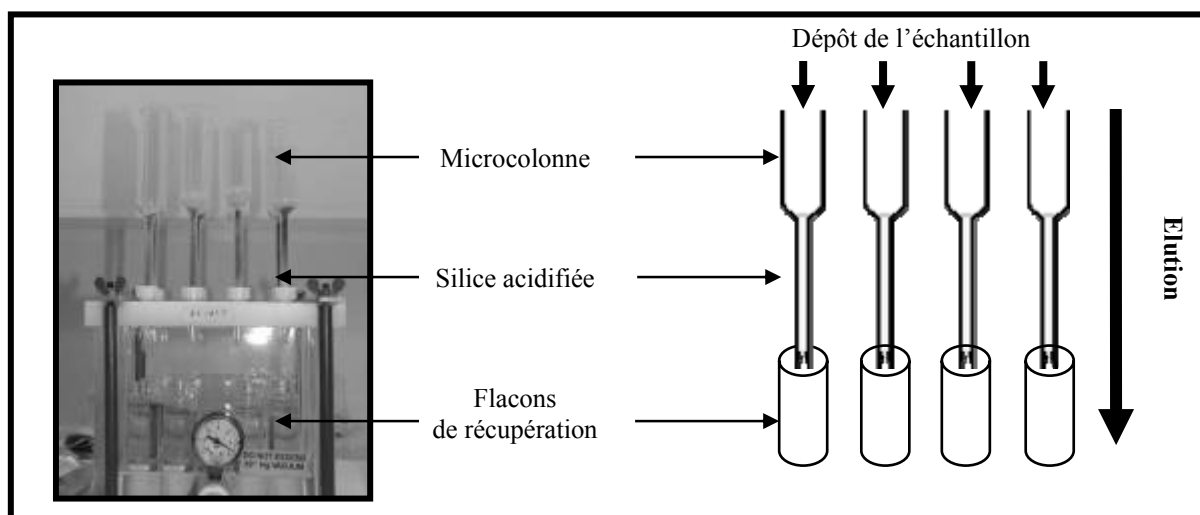


Figure 33 : Photographie et schéma de principe de la purification par colonne de silice acide.

III.3.2.4. Protocoles de nettoyage du matériel utilisé

Les protocoles mis en œuvre permettent de détecter des contaminants à l'état de trace dans les matrices biologiques ; leur mise en œuvre nécessite de la rigueur et des précautions particulières à toutes les étapes d'exécution. Le nettoyage de la verrerie et du matériel utilisé est également une étape importante du protocole, cela permet de maintenir un niveau de contamination ambiant minimal. Toute la verrerie utilisée dans le cadre de ces analyses est gravée et dédiée par niveau de contamination. Ainsi le matériel utilisé pour l'analyse de l'eau, celui utilisé pour les matrices peu chargées (plancton), et celui utilisé pour les matrices chargées (anguilles) est parfaitement identifié et différencié. Chaque lot de vaisselle est stocké et géré séparément. Après chaque utilisation, la vaisselle est prénettoyée sous la hotte de travail, puis elle est lavée automatiquement par un lave-vaisselle (Détergent : TFD 7 et Agent de rinçage : Neutrax PF fournis par Franklab S.A., St Quentin en Yveline, France) puis ensuite calcinée à 450°C pendant 6 h afin d'éliminer les traces de résidus organiques. La vaisselle est ensuite stockée dans des placards adaptés protégés dans du papier aluminium afin d'éviter une éventuelle contamination.

Les cellules en métal utilisées sur l'ASE sont traitées différemment. Les cellules en métal ne supportent pas le passage à 450°C pendant 6 h. Les cellules sont pré-nettoyées dans le laboratoire ; le corps des cellules est nettoyé dans le lave vaisselle, alors que les parties en contact direct avec l'échantillon sont nettoyées aux ultrasons dans du dichlorométhane pour les parties métalliques et dans de l'eau ultra-pure pour les parties non métalliques. Les cellules sont ensuite protégées et stockées dans du papier aluminium en attente d'utilisation.

De plus, avant chaque utilisation, les cellules sont pré-extraites une première fois par la méthode d'extraction utilisée pour analyse des PCB et PBDE (Tableau 11) sur l'ASE 200, afin d'éliminer les interférants potentiels et éventuelles traces de POP.

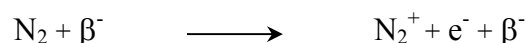
III.4. Analyse des organohalogénés étudiés par GC/ECD

III.4.1. Principe de l'analyse

La chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à capture d'électrons GC/ECD est une technique d'analyse qui combine une séparation par chromatographie en phase gazeuse avec un détecteur sélectif à capture d'électrons.

La chromatographie en phase gazeuse est une méthode de séparation qui consiste en une série d'équilibres entre la phase mobile et la phase stationnaire à l'intérieur d'une colonne chromatographique (Tranchant, 1995). La phase mobile est un gaz inerte par rapport aux composés analysés ayant une faible viscosité. Cette technique permet de séparer des composés gazeux ou susceptibles d'être vaporisés par chauffage. Les composés sont plus ou moins retenus par la colonne chromatographique selon leurs propriétés physico-chimiques. Le temps de rétention caractérise qualitativement la substance analysée.

Une source radioactive de ^{63}Ni émet en permanence des particules β . Lorsque ces particules sont mises en contact avec le gaz auxiliaire, l'azote, un électron est libéré selon la réaction :



L'établissement d'un flux d'azote continu entraîne donc la formation d'un nuage d'électrons libres qui est ensuite capté par une électrode convertissant le courant électrique en un signal. Lorsqu'une molécule électrophile entre dans le détecteur, elle capte des électrons libres entraînant un déficit de potentiel, le signal de base est modifié et donne un pic chromatographique. La réponse du détecteur dépend fortement du degré d'affinité électronique du composé. Ce type de détecteur est très sensible. L'identification des pics se fait par comparaison des temps de rétention des composés à identifier avec ceux des étalons.

III.4.2. Validation des protocoles utilisés

III.4.2.1. Validation des solutions de quantification pour l'étalonnage interne

Afin de valider les solutions de référence permettant de calculer les facteurs de réponse des différents composés par rapport à leur étalon interne, deux solutions de référence, contenant les composés à analyser et leurs étalons internes en quantité connue, sont régulièrement injectées en GC/ECD. La première solution est utilisée comme solution de référence pour le calcul des facteurs de réponse des différents composés par rapport à leur étalon interne, alors que la deuxième solution sert d'échantillon pseudo inconnu. Un exemple de pourcentages de quantification obtenus lors de ce contrôle qualité est présenté Tableau 12. Les pourcentages de recouvrement pour ce genre de validation oscillent entre 90 et 110%.

Composés analysés	Aire des composés analysés	Coefficient de réponse	Etalons internes	Masse étalon interne (ng)	Masse calculée (ng)	Valeur réelle (ng)	Pourcentage de recouvrement (%)
CB 8	29 884	2,40	CB 30	143	223	213	105
CB 30	46 024	1,00	CB 30	143	143	143	100
lindane	53 558	0,76	CB 30	143	128	122	105
CB 18	34 834	2,06	CB 30	143	224	205	109
CB 29	59 858	1,13	CB 30	143	211	204	103
CB 50+28	111 880	1,25	CB 30	143	437	412	106
CB 52	51 654	0,95	CB 103	185	224	206	109
CB 104	49 541	0,97	CB 103	185	219	206	106
CB 44	63 325	0,73	CB 103	185	210	204	103
CB 103	40 532	1,00	CB 103	185	185	185	100
CB 66	68 979	0,69	CB 103	185	217	204	106
CB 155	81 841	1,00	CB 155	306	306	306	100
CB 101	64 429	0,87	CB 155	306	211	202	104
CB 87	79 949	0,71	CB 155	306	213	206	103
CB 154+77	102 019	1,09	CB 155	306	418	408	102
CB 118	67 835	1,29	CB 198	339	221	205	108
CB 188	64 931	1,38	CB 198	339	227	206	110
CB 153	70 055	1,28	CB 198	339	227	203	112
CB 105	81 968	1,05	CB 198	339	218	203	107
CB 138	76 221	1,13	CB 198	339	217	202	108
CB 126	60 152	1,45	CB 198	339	221	206	107
CB 187	69 966	1,29	CB 198	339	229	204	113
CB 128	88 082	1,00	CB 198	339	224	205	109
CB 200	69 933	1,27	CB 198	339	225	206	109
CB 180	81 845	1,09	CB 198	339	227	205	111
BDE 47	57 283	1,39	CB 198	339	202	195	103
CB 170	85 220	1,02	CB 198	339	220	203	108
CB 198	134 075	1,00	CB 198	339	339	339	100
CB 195	77 750	1,09	CB 198	339	215	204	105
BDE 119	47 397	1,60	CB 198	339	192	193	100
BDE 99	44 531	1,76	CB 198	339	199	195	102
CB 206	80 389	1,06	CB 198	339	216	199	109
Ocn	53 538	0,99	CB 198	339	135	131	103
CB 209	73 855	1,22	CB 198	339	228	205	111
BDE 153	30 864	2,60	CB 198	339	203	195	104

Tableau 12 : Pourcentages de quantification obtenus classiquement lors de l'injection d'une solution de référence et d'une solution pseudo inconnue.

III.4.2.2. Validation des protocoles d'extraction utilisés

Les protocoles utilisés pour ces travaux, protocole MAE Acide et ASE Acide, ont été validés en fonction des protocoles utilisés originellement en routine au laboratoire. Les détails de la validation de ces protocoles sur différentes matrices (muscle de truite supplémenté, matrice certifiée SRM 2977, muscle d'anguille et mysidacés) sont détaillées dans la Publication 1 en annexe.

Seuls les résultats de la validation finale de ces deux protocoles sur matrices certifiées seront détaillés ici. La première matrice certifiée utilisée est le SRM 2977 (Tissu de moule, *Perna perna*, Baie de Guanabara, Brésil) obtenu au près du NIST (National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD, USA). Cette matrice est certifiée pour les concentrations en PCB, mais pas pour les concentrations en PBDE. Les valeurs de référence de ces derniers ont été obtenues d'après la littérature (Zhu et Hites, 2003). La deuxième matrice certifiée est un échantillon de muscle de poisson WMF 01 (Wellington Laboratories, BCP Instrument, Irigny, France) certifié pour les concentrations en PBDE mais pas pour les sept PCB prioritaires.

Pour cette validation, trois répliquats par protocole et par matrice ont été réalisés avec à chaque fois une prise d'essai de 0,5 grammes. Les deux protocoles ont été appliqués selon le mode opératoire décrit Figure 34.

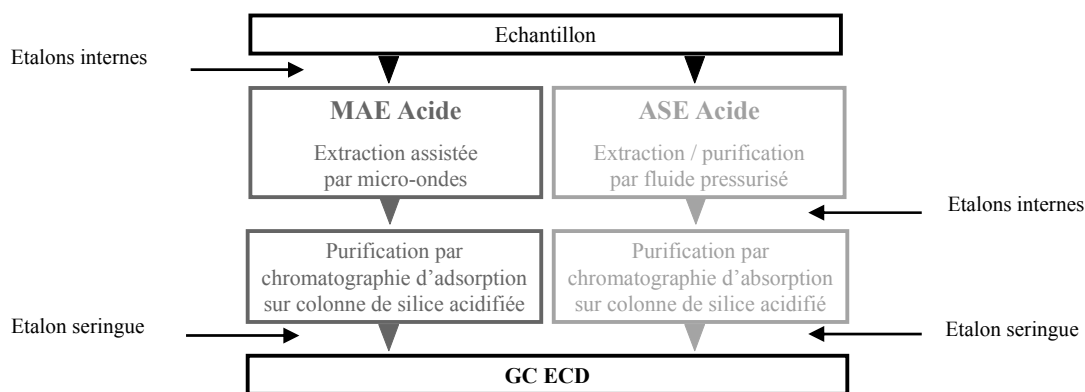


Figure 34 : Protocole MAE Acide et ASE Acide.

Les résultats Figure 35 et Tableau 13 sont la moyenne des trois triplicats obtenus pour l'analyse du SRM 2977 (Tissu de moule, *Perna perna* Baie de Guanabara, Brésil) par les deux protocoles. Le pourcentage de recouvrement est supérieur à 80% pour chacun des composés (Figure 35) et les écarts types sont faibles par rapport aux valeurs certifiées, dans tous les cas inférieurs à 15%.

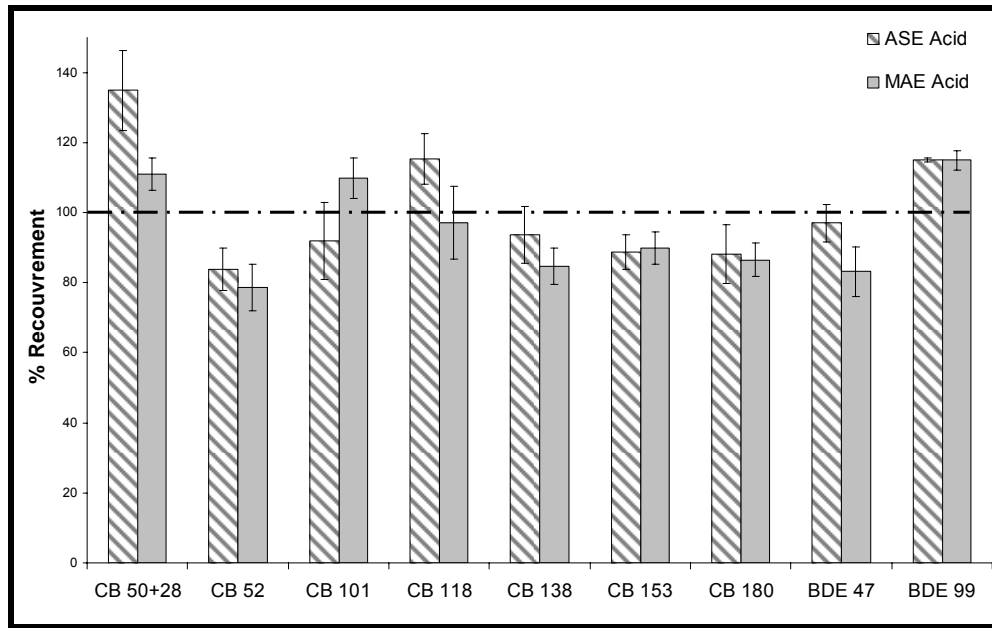


Figure 35 : Pourcentages de recouvrement obtenus pour l'analyse du SRM 2977 par les protocoles testés MAE Acide et ASE Acide, calculés à partir des valeurs certifiées et des données de Zhu et Hites (2003) (n=3).

numéro IUPAC	ASE Acid		MAE Acid		Valeur certifiée	
	Conc (ng.g ⁻¹ ps)	SD	Conc (ng.g ⁻¹ ps)	SD	Conc (ng.g ⁻¹ ps)	SD
CB 50+28	7,2	0,8	6,0	0,3	5,4	0,4
CB 52	7,0	0,4	6,6	0,4	8,4	0,5
CB 101	10,3	1,1	12,3	0,7	11,2	1,2
CB 118	12,1	0,9	10,2	1,1	10,5	1,0
CB 138	15,5	1,3	14,1	0,7	16,6	1,6
CB 153	12,5	0,6	12,7	0,6	14,1	1,0
CB 180	6,0	0,5	5,9	0,3	6,8	0,7
BDE 47	40,1	2,5	34,2	2,5	41,1	1,3
BDE 99	6,5	0,1	6,4	0,2	5,6	0,8
BDE 119	< 1,5	-	< 1,5	-	-	-
BDE 153	< 2,6	-	< 2,6	-	0,2	0,1
BDE 190	< 3,2	-	< 3,2	-	-	-

Tableau 13 : Résultats exprimés en ng/g ps obtenus pour l'analyse du SRM 2977 par les protocoles MAE Acide et ASE Acide.

Les résultats Figure 36 et Tableau 14 sont la moyenne des trois triplicats obtenus pour l'analyse du WMF 01 (Tissu de poisson) par les deux protocoles MAE Acid et ASE Acid. Les pourcentages de recouvrement sont supérieurs à 70% pour chacun des composés et les écarts types sont faibles et dans tous les cas inférieurs à 15%.

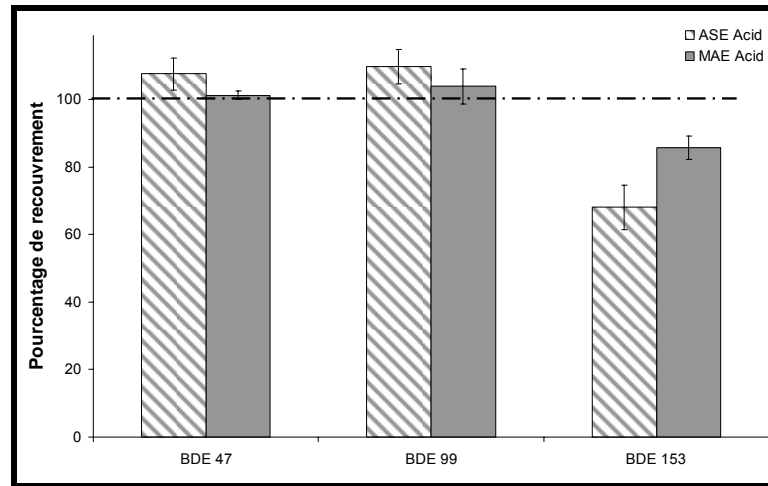


Figure 36 : Pourcentages de recouvrement obtenus pour l'analyse du WMF 01 par les protocoles testés MAE Acide et ASE Acide, calculés à partir des valeurs certifiées (n=3).

numéro IUPAC	ASE Acide		MAE Acide		Valeur certifiée	
	Concentration	SD	Concentration	SD	Concentration	SD
CB 50+28	7,2	0,3	5,6	0,3	-	-
CB 52	28,1	4,1	23,1	5,0	-	-
CB 101	125,9	7,7	103,5	1,1	-	-
CB 118	97,6	6,6	103,0	0,5	130,1	32,5
CB 138	192,2	9,5	206,9	9,3	-	-
CB 153	195,0	8,4	201,4	6,7	-	-
CB 180	118,7	6,0	119,9	5,5	-	-
BDE 47	132,5	6,3	124,8	1,6	123,2	24,8
BDE 99	41,2	2,1	38,9	2,0	37,5	4,2
BDE 119	0,0	0,0	0,0	0,0	-	-
BDE 153	11,6	0,8	14,6	0,5	17,0	8,0
BDE 190	nd	nd	nd	nd	-	-

Tableau 14 : Résultats exprimés en $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ ps obtenus pour l'analyse du WMF 01 par les protocoles testés MAE Acide et ASE Acide, calculés à partir des valeurs certifiées (n=3).

Les limites de détections obtenues par ces protocoles de préparation et l'analyse en GC ECD sont de l'ordre du ng par gramme de matrice avec une prise d'essai 0,5 à 1 g.

Composés étudiés	Limite de détection ($\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$)
CB 50+28	0,8
CB 52	1,2
CB 101	1,0
CB 118	0,3
CB 153	1,0
CB 138	1,0
CB 180	0,9
BDE 47	1,1
BDE 99	1,7
BDE 119	1,5
BDE 153	2,6

Figure 37 : Limites de détection des différents composés analysés dans les matrices biologiques complexes exprimé en $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ ps.

III.4.2.3. Validation des analyses

III.4.2.3.a. Témoin de contamination

Dans le but d'assurer la qualité des analyses, il est nécessaire d'effectuer des témoins de contamination pour vérifier l'absence de contamination due au protocole de préparation, au manipulateur, au matériel utilisé et à l'environnement de travail. Pour chaque série d'échantillons, un témoin de contamination est mené en parallèle aux échantillons. Le protocole d'extraction est réalisé "à blanc" sans ajout de matrice ; il subit donc toutes les étapes du protocole d'extraction, de purification et de quantification. Les témoins de contamination ont été constants et relativement faibles au cours du temps, leur valeur a oscillé entre 4 et 10 ng pour les 7 PCB prioritaires (CB 28, CB 52, CB 101, CB 118, CB 138, CB 153 et CB 180). Pour les BDE, seul le BDE 47 a été détecté dans les témoins, mais toujours à des quantités inférieures à la limite de détection.

III.4.2.3.b. Double étalonnage / rendement de manipulation

Toujours dans le but d'assurer la qualité des analyses, un double étalonnage a été mis en place au niveau de la quantification des PCB et PBDE. Un étalon de rendement, l'OCN (Octachloronaphtalène), a été ajouté dans chaque échantillon pour quantifier les étalons internes ajoutés initialement et ainsi calculer un rendement d'extraction pour chaque échantillon. Les rendements d'extraction ont été constants au cours du temps et toujours supérieurs à 70 %.

III.4.2.3.c. Carte de contrôle

Dans un souci de suivi qualité, deux matrices de contrôle internes ont été fabriquées au laboratoire. La première matrice a été fabriquée à partir d'un pool de mysidacés prélevés à Pauillac. Elle a été caractérisée par plusieurs manipulateurs, puis a servi de matrice de référence pour les séries d'analyses de plancton. Son niveau de contamination est de l'ordre de $150 \pm 10 \text{ ng.g}^{-1}$ de PCB soit un coefficient de variation de l'ordre de 7%, et pour les PBDE $6 \pm 0,7 \text{ ng.g}^{-1}$ soit un coefficient de variation de l'ordre de 10%.

La deuxième matrice a été fabriquée à partir de muscle d'anguille prélevée dans l'estuaire de la Gironde et, toujours après caractérisation par plusieurs manipulateurs, elle a servi de matrice de référence pour les analyses de poissons. Son niveau de contamination est de $882 \pm 69 \text{ ng.g}^{-1}$ de PCB soit un coefficient de variation de l'ordre de 8%, et pour les PBDE $28 \pm 4 \text{ ng.g}^{-1}$ soit un coefficient de variation de l'ordre de 14%.

Les résultats obtenus lors des différentes analyses des matrices contrôles sont présentés en termes de pourcentage de recouvrement par rapport à la concentration moyenne analysée (Figure 38).

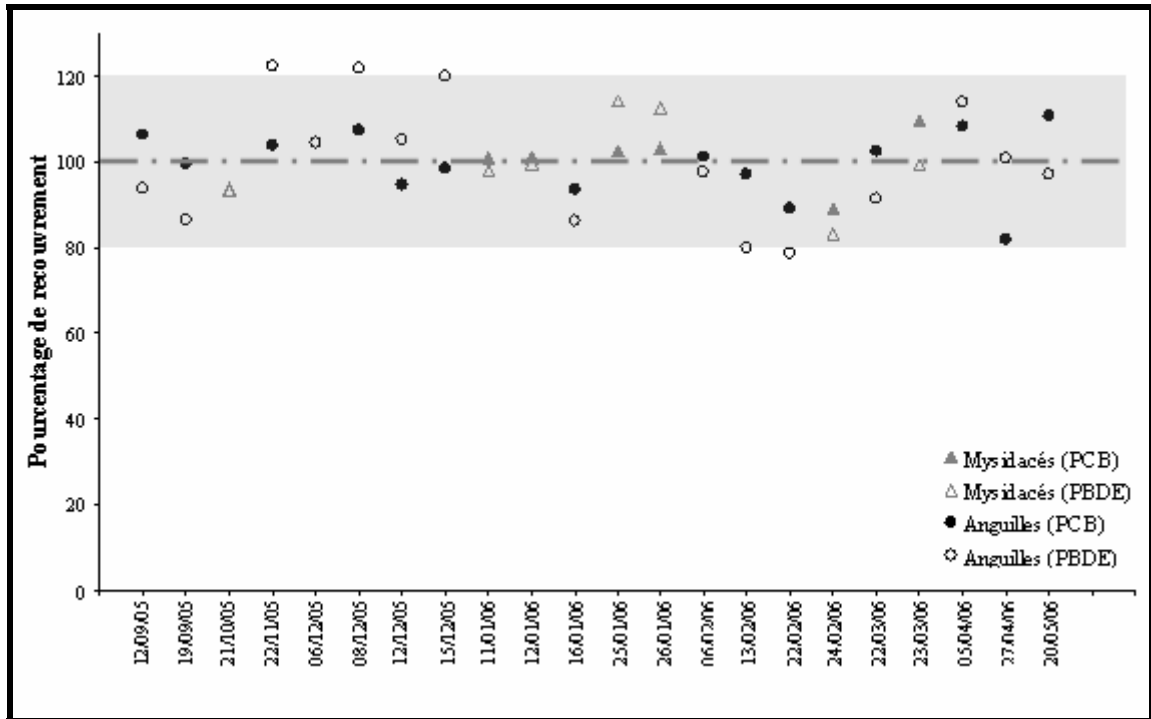


Figure 38 : Carte de contrôle présentant les pourcentages de recouvrement des matrices de contrôle calculée à partir de leur valeurs de contamination moyenne. Les mysidacés ont été analysés par le protocole MAE Acid et les muscles d'anguilles analysés par le protocole ASE Acid.

Le suivi de ces matrices de contrôle au cours du temps permet d'identifier une éventuelle dérive du protocole de quantification. Les concentrations doivent être constantes au cours du temps à la variabilité près du protocole de dosage (20%). La variabilité de ces échantillons de référence sur l'ensemble des séries d'échantillons est en moyenne inférieure à 15 % sur l'ensemble des analyses effectuées. On peut donc assurer une bonne robustesse des protocoles de préparation et d'analyse.

Résultats et Discussion

I. Expérimentations en milieu contrôlé

Afin de comprendre les mécanismes de transfert des contaminants étudiés (PCB et PBDE), des expérimentations en milieu contrôlé ont été menées sur trois espèces de positions trophiques différentes : une algue (*Isochrysis galbana*), un bivalve filtreur (*Mytilus edulis*) et un poisson (*Sparus aurata*).

I.1. Les algues

Le premier organisme étudié est une algue brune unicellulaire, *Isochrysis galbana*.

I.1.1. Contamination initiale de l'eau

Chaque erlenmeyer, excepté ceux de la série de contrôle, a été supplémenté avec 50 µl d'une solution de contaminants dans l'acétone. Les concentrations nominales associées à chaque composé et à chaque expérimentation sont présentées dans le Tableau 15.

	Volume de solution (µl)	Concentration de solution (ng.g ⁻¹)	Quantité dans un répliquât (ng)
BDE 153 (500 000 ç.ml ⁻¹ : 500 ng.l ⁻¹)	50	7 440	294
BDE 47 (500 000 ç.ml ⁻¹ : 500 ng.l ⁻¹)	50	7 820	309
BDE 47 (500 000 ç.ml ⁻¹ : 5 000 ng.l ⁻¹)	50	79 480	3 139
BDE 47 (1 000 000 ç.ml ⁻¹ : 500 ng.l ⁻¹)	50	7 820	309
CB 77 (500 000 ç.ml ⁻¹ : 500 ng.l ⁻¹)	50	6 874	272
CB 153 (500 000 ç.ml ⁻¹ : 500 ng.l ⁻¹)	50	7 625	301
CB 153 (500 000 ç.ml ⁻¹ : 5 000 ng.l ⁻¹)	50	79 000	3 121
CB 153 (1 000 000 ç.ml ⁻¹ : 500 ng.l ⁻¹)	50	7 625	301
BaP (500 000 ç.ml ⁻¹ : 500 ng.l ⁻¹)	50	8 010	316
Fluo (500 000 ç.ml ⁻¹ : 500 ng.l ⁻¹)	50	7 520	297
Chrys (500 000 ç.ml ⁻¹ : 500 ng.l ⁻¹)	50	7 875	311
Chrys (500 000 ç.ml ⁻¹ : 5 000 ng.l ⁻¹)	50	78 750	3 111
Chrys (1 000 000 ç.ml ⁻¹ : 500 ng.l ⁻¹)	50	7 875	311

Tableau 15 : Quantité de contaminants introduite dans chaque erlenmeyer pour chaque condition.

I.1.2. Cinétique d'accumulation des PCB par les algues, *Isochrysis galbana*

I.1.2.1. CB 77

Pour les expérimentations sur le CB 77, une seule condition a été testée avec une concentration algale théorique de 500 000 ç.ml⁻¹ et une concentration en CB 77 de 500 ng.l⁻¹. Les quantités de CB 77 retrouvées dans les algues, dans leur milieu de culture et dans les erlenmeyers contenant l'eau supplémentée sont présentées Figure 39.

La quantité de CB 77 retrouvée dans les erlenmeyers contenant l'eau supplémentée nous permet de définir les pertes de contaminants par adsorption sur les parois de

l'erenmeyer. En absence d'algues dans le système, une perte par d'adsorption d'environ 26 % de la quantité de chrysène initialement introduite a eu lieu. En présence d'algues, une perte similaire est observée, dans ce cas la présence d'algues ne semblent pas jouer sur la perte de composé.

Si l'on s'intéresse à la cinétique d'accumulation des algues, en moins d'une heure les algues captent le maximum de CB 77, environ 100 ng (soit 36 % du chrysène introduit). Cette quantité reste constante au cours des 24 heures. La quantité de contaminant dans la phase dissoute est de l'ordre de 100 ng (soit également 36 % du chrysène introduit). Cette quantité est également constante au cours du temps.

Les résultats ont également été exprimés en terme de concentration de CB 77 retrouvé dans les algues et dans les milieux de culture. Le niveau de contamination maximale est également atteint en moins d'une heure, et ensuite le niveau décroît tout au long des 24 h de l'exposition (Figure 39). Cette décroissance s'explique par la croissance de la population algale, la masse d'algues augmente alors que la quantité de contaminant captée reste la même, donc la concentration en CB 77 diminue.

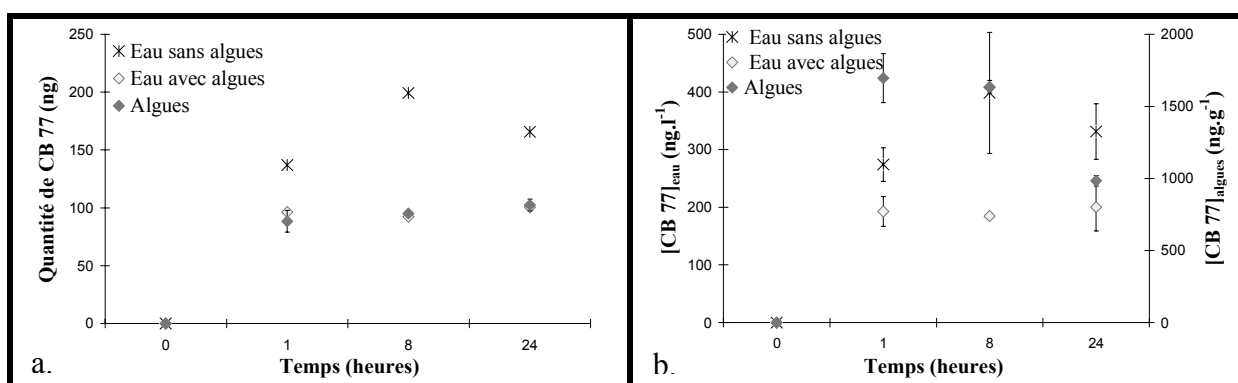


Figure 39 : a : Bilan quantitatif du CB 77 dans les algues, le milieu de croissance et les eaux supplémentées (n=3).

b : Evolution de la concentration en CB 77 au cours du temps dans les algues, le milieu de croissance et les eaux supplémentées (n=3).

1.1.2.2. CB 153

Pour les expérimentations sur le CB 153, trois conditions ont été testées :

- CB 153 (500 000 ϕ .ml⁻¹ : 500 ng.l⁻¹)
- CB 153 (500 000 ϕ .ml⁻¹ : 5 000 ng.l⁻¹)
- CB 153 (1 000 000 ϕ .ml⁻¹ : 500 ng.l⁻¹)

Les résultats obtenus pour les algues, les milieux de culture et les erlenmeyers contenant l'eau supplémentée pour les trois conditions d'exposition au CB 153 sont présentés dans la Figure 40.

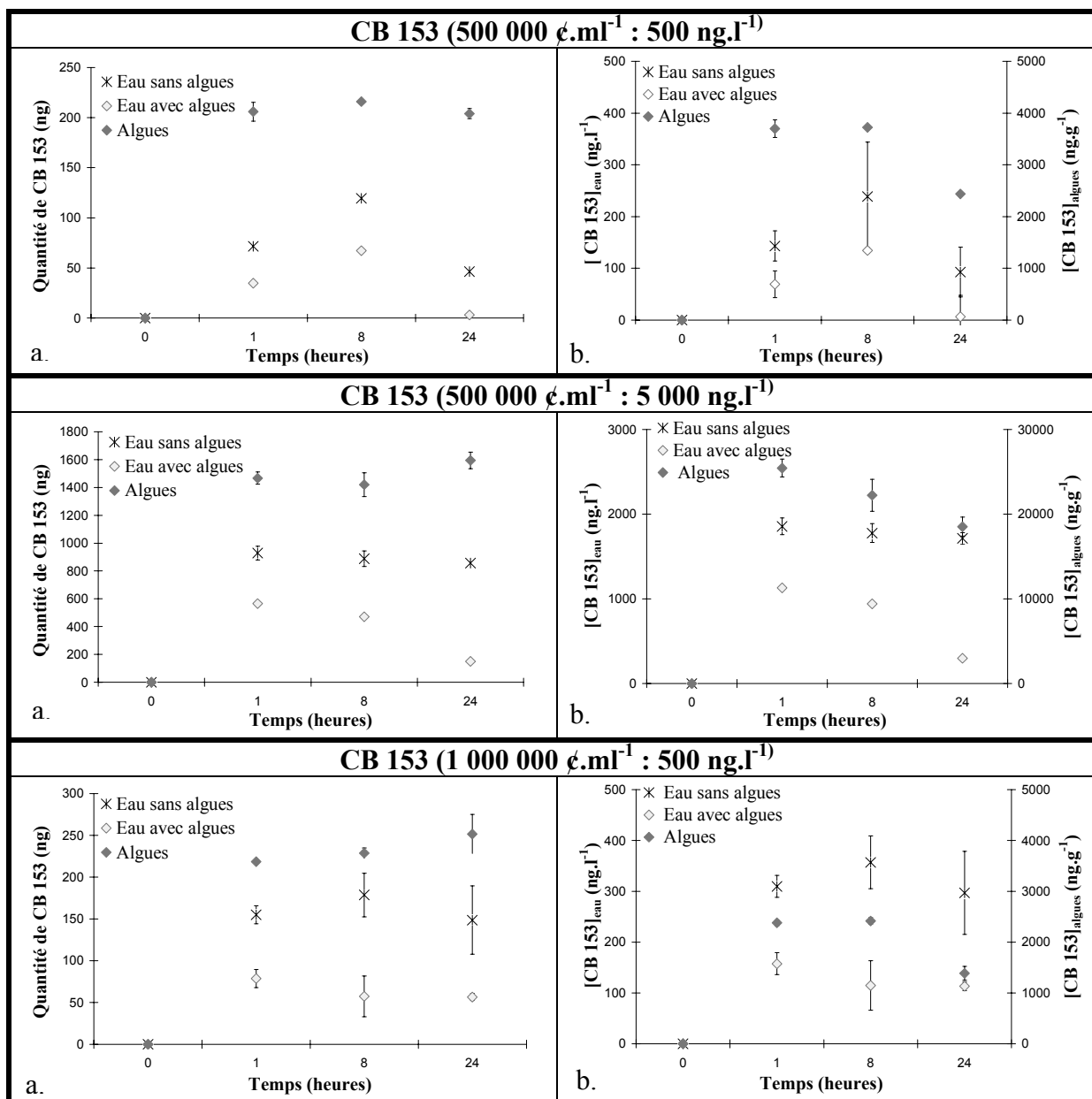


Figure 40 : a. Bilan quantitatif du CB 153 dans les algues, le milieu de croissance et les eaux supplémentées pour les différentes conditions d'exposition.
 b. Concentration en CB 153 dans les algues, le milieu de croissance et les eaux supplémentées pour les différentes conditions d'exposition.

La quantité de CB 153 retrouvée dans les erlenmeyers contenant uniquement l'eau et le contaminant permet de définir les pertes par adsorption sur les parois de l'erlenmeyer. Ces pertes sont estimées à environ $65 \pm 13 \%$ et ne semblent pas être affectées par la concentration théorique nominale en CB 153 dans le cadre de ces expériences.

En présence d'algues, ces pertes sont significativement diminuées (de 2 à 37% selon la condition considérée). Le contaminant a plus d'affinité pour les algues que pour les parois de l'erlenmeyer : plus la concentration algale est élevée plus la perte de composés par adsorption sur les parois de l'erlenmeyer diminue. La concentration d'exposition est donc proche de la concentration nominale introduite.

La contamination moyenne de la phase dissoute en présence d'algues est de l'ordre de 18 ± 2 % en moyenne, quelle que soit la condition considérée. Ni la concentration algale, ni la concentration en contaminant ne semblent jouer sur la quantité de CB 153 restant dans la phase dissoute en présence d'algues.

A la plus faible concentration en CB 153 (500 ng.l^{-1}), quelle que soit la concentration algale considérée, le pourcentage de CB 153 retrouvé dans les algues est de l'ordre de 70%. Par contre, à la plus forte concentration en CB 153, le pourcentage de CB 153 dans les algues diminue à 45%. La variation du pourcentage d'accumulation du CB 153 par les algues semble plus influencée par la concentration en contaminant que par la concentration algale. Plus la concentration d'exposition est forte, moins les algues semblent accumuler de CB 153.

Si l'on considère maintenant non plus la quantité de CB 153 dans les algues mais la concentration de CB 153, le niveau de contamination maximale est atteint en moins d'une heure et ensuite il décroît tout au long des 24h de l'exposition. Cette décroissance s'explique par la croissance algale, la masse d'algue augmente alors que la quantité de contaminant captée reste la même diminuant ainsi la concentration en CB 153 dans les algues.

I.1.2.3. Pyralène

Pour cette condition, la quantité de cellules algales introduite dans les erlenmeyers est de $500\,000 \text{ } \mu\text{.ml}^{-1}$. Les algues ont été exposées à un mélange de PCB complexe présentant des concentrations en congénères différentes. Pour cette exposition au pyralène, les 7 PCB prioritaires ont été suivis (CB 28, CB 52, CB 101, CB 118, CB 138, CB 153, CB 180) ainsi que le CB 77. Les CB 28 et 52 ne sont pas représentés ici du fait de la très faible concentration retrouvée.

La dynamique d'accumulation des différents composés dans les algues est illustrée Figure 41. Le comportement de l'ensemble des PCB étudiés est similaire à celui observé précédemment pour le CB 153 et CB 77 en exposition individuelle. Le maximum de contaminant est fixé par les algues en moins d'une heure. Ce phénomène est conditionné par le coefficient de partage d'octanol/eau des PCB ($\log K_{ow} \geq 5$) qui traduit une forte hydrophobicité et donc une capacité à s'accumuler dans les organismes.

La nature des phénomènes mise en œuvre dans cette accumulation ne peut pas être élucidé dans le cadre de ces expériences, mais la rapidité du phénomène laisse à penser que l'accumulation des PCB est au moins dans un premier temps due à des phénomènes d'adsorptions rapides.

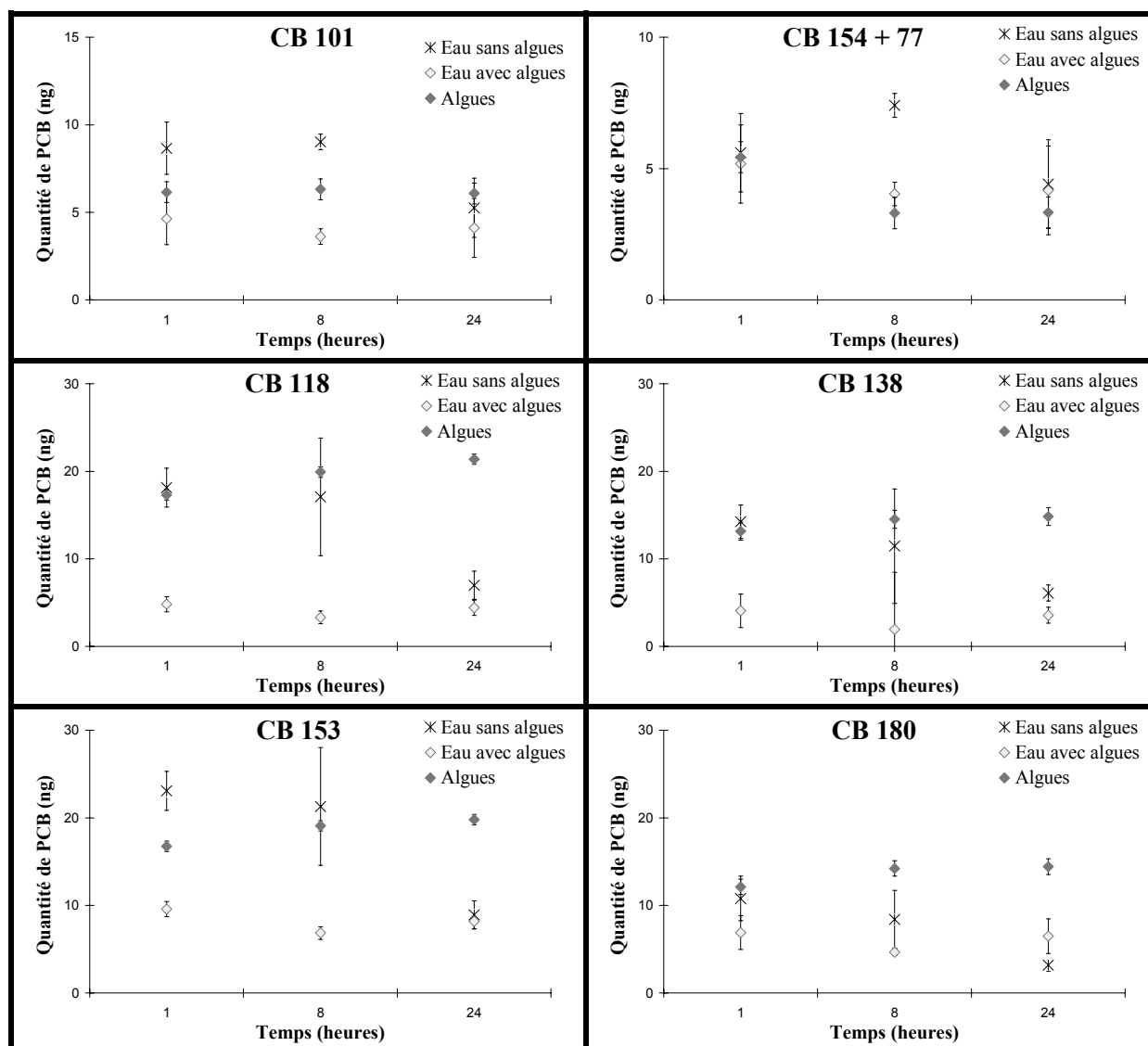


Figure 41: Bilan quantitatif des différents composés analysés dans le cadre de l'exposition au pyralène ($500\,000\ \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) dans les algues, le milieu de croissance et les eaux dopées.

I.1.3. Cinétique d'accumulation des PBDE par les algues, *Isochrysis galbana*

Les phénomènes observés dans le cas des PCB sont semblables dans le cas des PBDE.

I.1.3.1. BDE 153

Les expérimentations sur le BDE 153 ont été réalisées à une concentration algale théorique de $500\,000\ \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ et une concentration en polluant de $500\ \text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$.

Les quantités de BDE 153 retrouvées dans les algues, dans leur milieu de croissance et dans les erlenmeyers contenant l'eau dopée sont présentées Figure 42a. La quantité de BDE 153 retrouvée dans les erlenmeyers contenant l'eau dopée permet de définir comme précédemment les pertes par adsorption sur les parois de l'erlenmeyer, elles sont du même ordre de grandeur que celles observées pour les PCB, environ 60 %.

La cinétique d'accumulation dans les algues est similaire à celle observée pour les PCB, le maximum de BDE 153 est capté en moins d'une heure (environ 180 ng soit 60% de la quantité introduite). Cette quantité reste quasi constante au cours des 24 heures d'expérimentation.

La contamination de la phase dissoute présente une quantité de composé de l'ordre de 150 ng soit environ 40 %, cette quantité suit l'évolution de la quantité de contaminant capté par les algues, elle reste constante au cours du temps. Il est intéressant de noter que la quantité totale de BDE 153 est proche de la valeur nominale introduite (300 ng). Les phénomènes d'adsorption du BDE 153 sur les parois de l'erlenmeyer sont quasi inexistantes en présence d'algues.

Les résultats exprimés en termes de concentration montrent une décroissance de la concentration en BDE 153 dans les algues au cours du temps, sous l'effet de la croissance algale (Figure 42 b.).

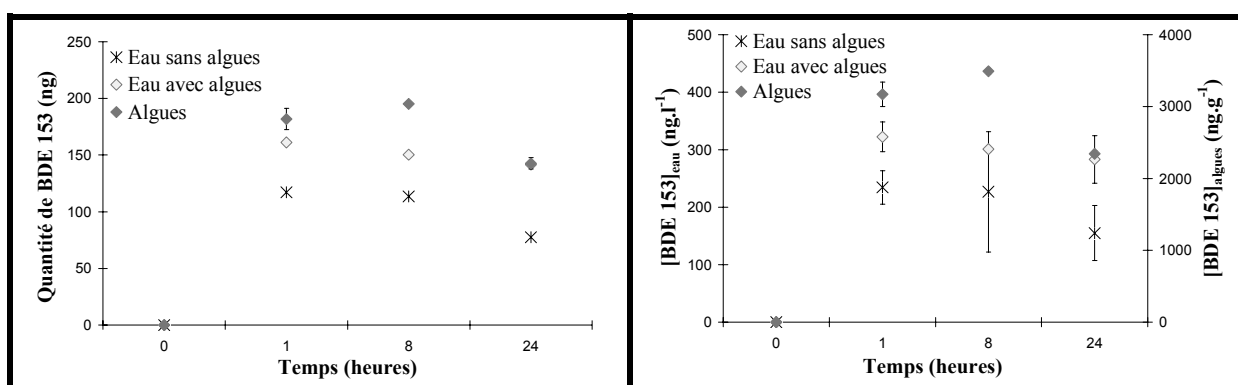


Figure 42 : a. Bilan quantitatif du BDE 153 (500 000 ϕ : 500 ng.l^{-1}) dans les algues, le milieu de croissance et les eaux supplémentées.
b. Evolution de la concentration en BDE 153 (500 000 ϕ : 500 ng.l^{-1}) au cours du temps dans les algues, le milieu de croissance et les eaux supplémentées.

1.1.3.2. BDE 47

Pour les expérimentations sur le BDE 47, trois conditions ont été testées :

- BDE 47 (500 000 $\phi.\text{ml}^{-1}$: 500 ng.l^{-1})
- BDE 47 (500 000 $\phi.\text{ml}^{-1}$: 5 000 ng.l^{-1})
- BDE 47 (1 000 000 $\phi.\text{ml}^{-1}$: 500 ng.l^{-1})

Les résultats obtenus pour les algues, les milieux de culture et les erlenmeyers contenant l'eau supplémentée pour les trois conditions d'exposition au CB 153 sont présentés dans la Figure 43. Les résultats ont été représentés en terme de quantité de contaminant et en terme de concentration de contaminant dans les différents compartiments considérés.

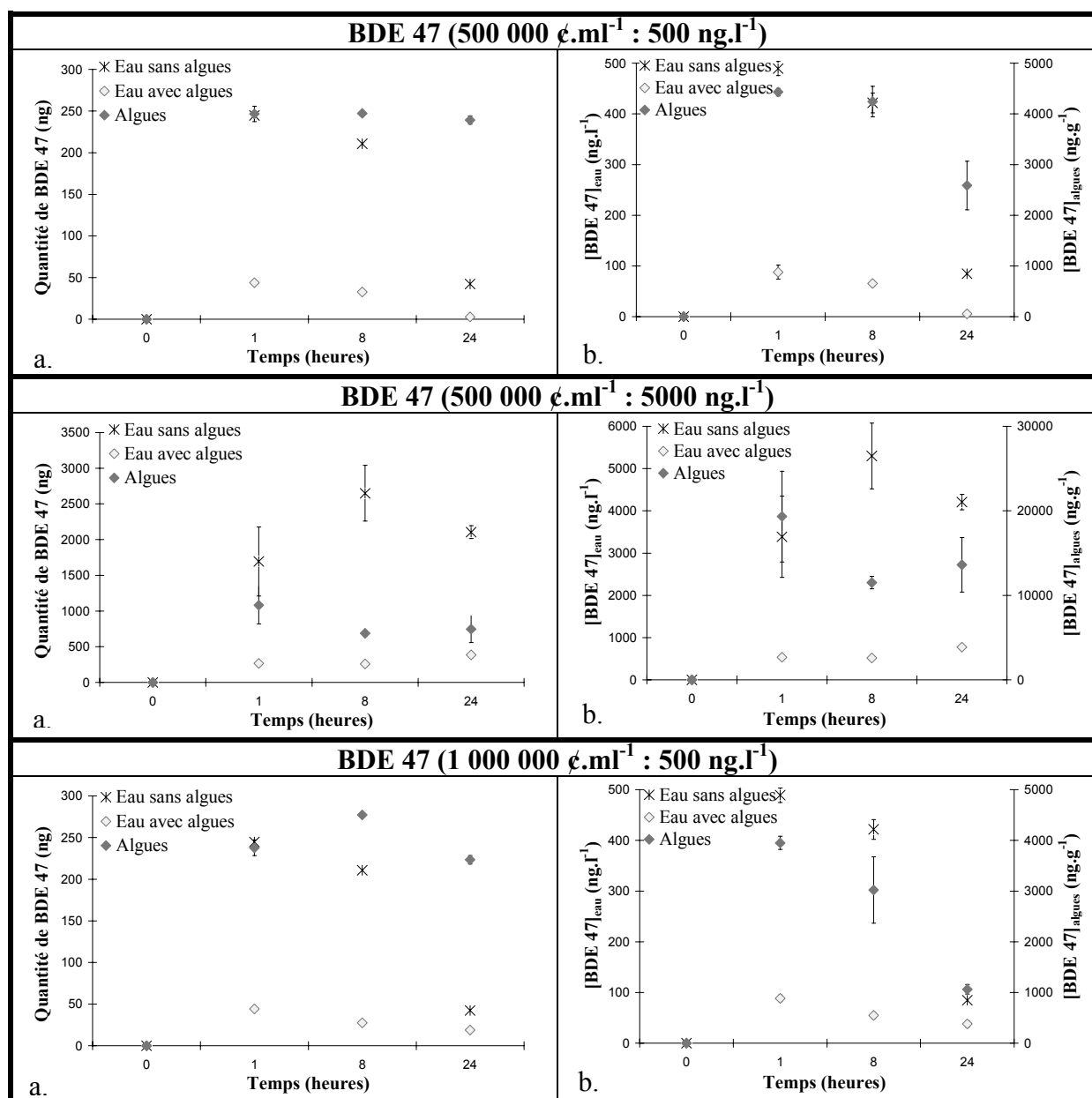


Figure 43 : a. Bilan quantitatif du BDE 47 dans les algues, le milieu de croissance et les eaux supplémentées pour les différentes conditions d'exposition.

b. Concentration en BDE 47 dans les algues, le milieu de croissance et les eaux supplémentées pour les différentes conditions d'exposition.

Les pertes par adsorption mises en évidence dans les erlenmeyers contenant uniquement le milieu de culture varient de 20 à 50% au bout d'une heure d'expérimentation. Contrairement aux composés précédents, ces phénomènes d'adsorption sur les parois de l'erlenmeyer continuent à augmenter au cours du temps jusqu'à atteindre 80 % de perte pour la condition BDE 47 (1 000 000 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$: 500 $\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$). La présence des algues dans le système diminue les pertes de BDE 47 par adsorption sur les parois des erlenmeyers à 10% pour la faible concentration (500 $\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$) et à 40 % pour la plus forte concentration (5 000 $\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$).

La contamination moyenne de la phase dissoute en présence d'algues est constante au cours du temps (environ 12 ± 3 %) quelle que soit la condition considérée.

Pour les expositions à faible concentration, le pourcentage de BDE 47 retrouvé dans les algues est de l'ordre de 80 % de la quantité nominale introduite. Par contre à plus forte concentration ($5\,000\text{ ng.l}^{-1}$), le pourcentage de BDE 47 retrouvé dans les algues est de 33 % de la quantité nominale. Le pourcentage d'accumulation du BDE 47 semble plus influencé par la concentration en contaminant que par la concentration algale. Le BDE 47 présente en cela un comportement similaire au CB 153, plus la concentration d'exposition est élevée, moins les algues semblent accumuler le contaminant, comme si il existait un seuil maximal d'accumulation ou un facteur limitant à l'accumulation.

La représentation des résultats en terme de concentration en BDE 47 montre une décroissance de cette concentration sous l'action de la croissance algale comme dans le cas des autres composés.

I.1.4. Cinétique d'accumulation des HAP par les algues, *Isochrysis galbana*

I.1.4.1. Benzo(a)pyrène

Les résultats obtenus pour cette condition de contamination en benzo(a)pyrène ($500\,000\ \phi : 500\text{ ng}$) sont présentés Figure 44. Les pertes par adsorption dans le milieu sans algues sont de l'ordre d'environ 60 %. Elles sont similaires à celles observées pour les PCB et PBDE à cette concentration de contaminant. En présence d'algues, la contamination de la phase dissoute est constante au cours du temps, environ 30 ng (soit 10 % de la quantité nominale introduite).

Les algues captent un maximum de contaminant en huit heures, environ 50 % de la quantité totale introduite (soit 150 ng). Les phénomènes d'accumulation semblent plus longs à se mettre en place dans le cas du benzo(a)pyrène que dans le cas des PCB et PBDE étudiés.

L'expression des résultats en termes de concentration de benzo(a)pyrène dans les algues conduit à une décroissance de la concentration après t_{8h} .

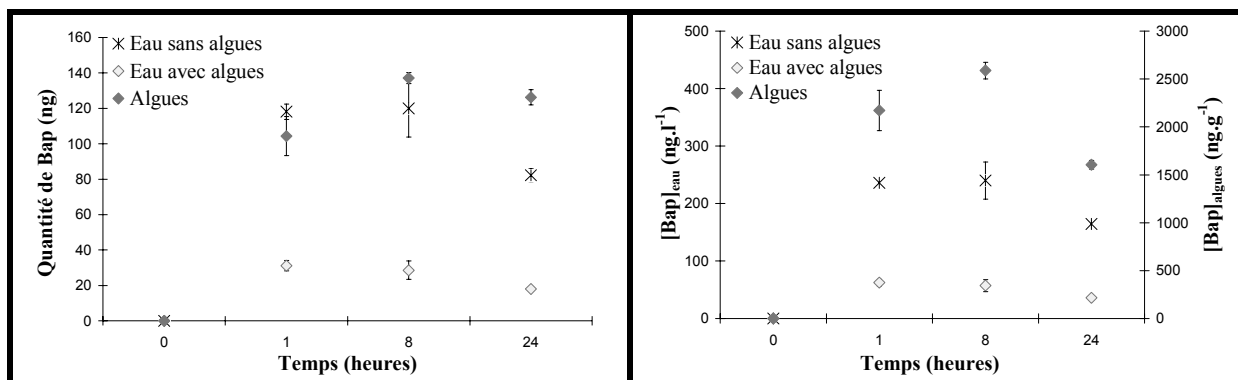


Figure 44 a. Bilan quantitatif du BaP ($500\,000\ \phi : 500\text{ ng.l}^{-1}$) dans les algues, le milieu de croissance et les eaux dopées.

b. Evolution de la concentration en BaP ($500\,000\ \phi : 500\text{ ng.l}^{-1}$) au cours du temps dans les algues, le milieu de croissance et les eaux dopées.

I.1.4.2. Fluoranthène

La Figure 45 présente les résultats obtenus pour l'exposition au fluoranthène d'*Isochrysis galbana* ($500\,000\ \phi.\text{ml}^{-1}$: $500\ \text{ng.l}^{-1}$).

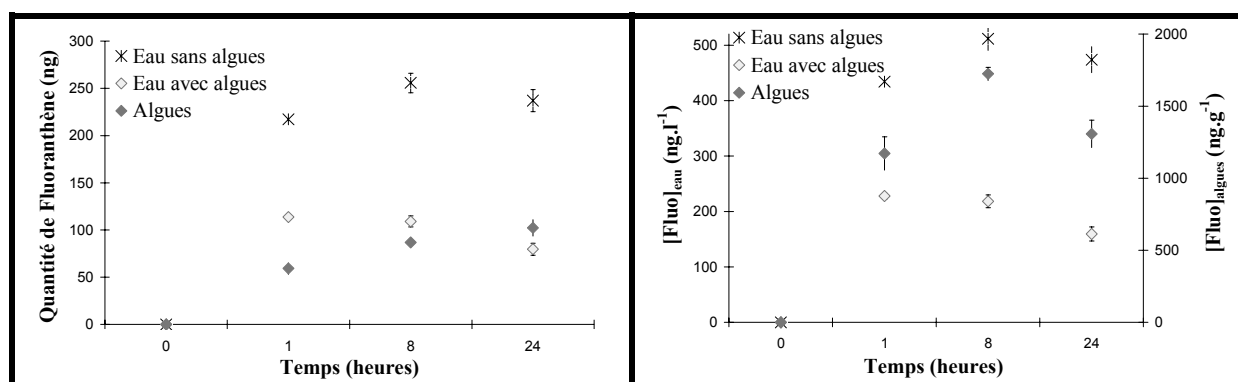


Figure 45 a. Bilan quantitatif du fluoranthène (500 000 ϕ : 500 ng.l^{-1}) dans les algues, le milieu de croissance et les eaux supplémentées.
b. Evolution de la concentration en fluoranthène (500 000 ϕ : 500 ng.l^{-1}) au cours du temps dans les algues, le milieu de croissance et les eaux supplémentées.

Les pertes par adsorption dans le milieu sans algues sont de l'ordre de 27 %, ce qui est relativement faible à la vue des pertes observées pour les PCB et PBDE (environ 60 % en moyenne). Ceci est cohérent avec le fait que le fluoranthène soit le composé étudié présentant le plus faible log de Kow (4,8), donc à priori le composé le moins hydrophobe. Contrairement aux phénomènes observés pour les autres composés, les phénomènes de pertes de contaminants sont plus importants en présence d'algues (environ 40 %).

La quantité de fluoranthène retrouvée dans les algues augmente au cours du temps, passant de 59 ng à t_{1h} à 102 ng après 24 heures d'exposition (soit environ 35 % de la quantité réellement introduite). Parallèlement à cette augmentation de concentration dans les algues, la contamination de la phase dissoute diminue (de 114 ng à t_{1h} pour 80 ng à t_{24h}). Cette accumulation progressive du fluoranthène dans les algues fait plus penser à une absorption progressive du composé à l'intérieur de la cellule qu'à un phénomène d'adsorption. Ce type de processus d'accumulation a déjà été suspecté lors de l'exposition d'une algue verte (*Selenastrum capricornutum*) à un composé organique, le phénol (Newstes, 2003).

Si l'on considère maintenant la concentration en fluoranthène dans les algues, elle augmente jusqu'à t_{8h} puis diminue jusqu'à t_{24h} sous l'effet de la croissance algale.

I.1.4.3. Chrysène

Pour les expérimentations sur le chrysène, trois conditions ont été testées :

- Chrysène ($500\ 000\ \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$: $500\ \text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$)
- Chrysène ($500\ 000\ \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$: $5\ 000\ \text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$)
- Chrysène ($1\ 000\ 000\ \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$: $500\ \text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$)

Les résultats obtenus pour les algues, les milieux de culture et les erlenmeyers contenant l'eau supplémentée pour les trois conditions d'exposition au Chrysène sont présentés dans la Figure 46.

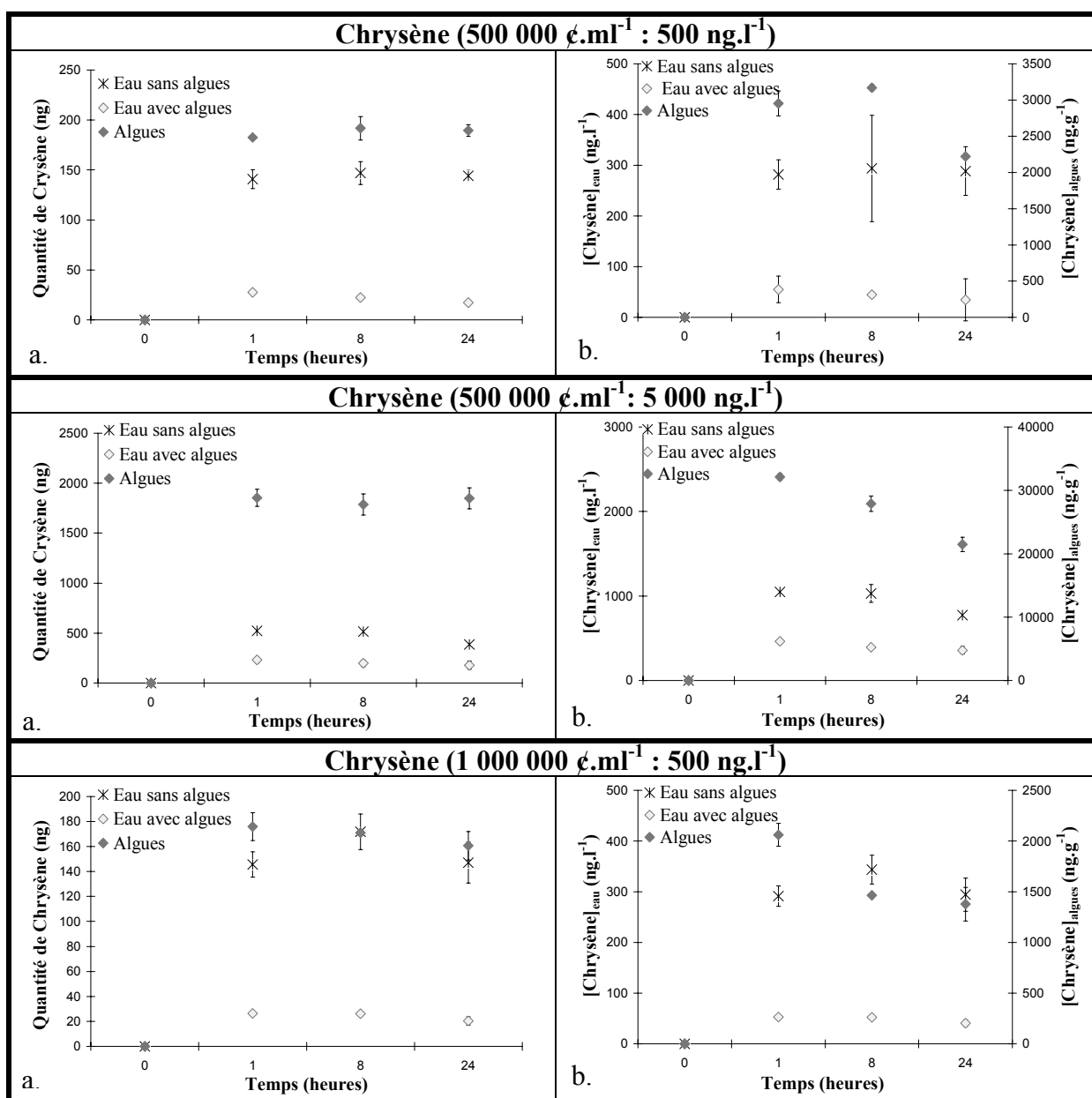


Figure 46 : a. Bilan quantitatif du Chrysène dans les algues, le milieu de croissance et les eaux supplémentées pour les différentes conditions d'exposition.
 b. Concentration en Chrysène dans les algues, le milieu de croissance et les eaux supplémentées pour les différentes conditions d'exposition.

Les pertes de chrysène par adsorption dans le milieu de culture sans algues sont estimées à environ $50 \% \pm 5$ pour la concentration d'exposition la plus faible (500 ng.l^{-1}). Pour la concentration de chrysène la plus forte, les pertes s'élèvent à 80% de la quantité introduite initialement. La concentration en chrysène influencerait sur les pertes par adsorption sur les parois de l'erlenmeyer.

En présence d'algues, ces pertes sont significativement diminuées et similaires, quelle que soit la concentration algale ou la concentration de chrysène considérées ($\approx 35 \%$). La quantité moyenne de chrysène dans la phase dissoute en présence d'algues représente $7 \pm 2 \%$ de la quantité initialement introduite, quelle que soit la condition considérée.

Pour les faibles concentrations d'exposition (500 ng.l^{-1}), la quantité de chrysène liée aux algues est de l'ordre de 68 % de la quantité de chrysène initialement introduite. A la forte concentration d'exposition, la fraction fixée par les algues est moindre, de l'ordre de 57%. La concentration d'exposition en chrysène semble jouer sur la fraction de chrysène fixée par les algues, mais de manière moindre à ce qui a été observé pour le CB 153 et le BDE 47.

1.1.5. Comparaison de l'accumulation des PCB PBDE et HAP chez *Isochrysis galbana*

Globalement, les cinétiques d'accumulation des composés étudiés PCB, PBDE et HAP présentent la même allure. Les contaminants s'accumulent très rapidement dans les algues, le maximum de contaminant "dans" les algues est retrouvé après 1 heure d'exposition. Ce type de résultats a déjà été observé pour le CB 52 et CB 153 (Walberg *et al.*, 1997). La rapidité du phénomène laisse à penser que les mécanismes mis en jeu lors de l'accumulation sont des phénomènes d'adsorption, probablement liés à des processus de partitions des composés en fonction de leurs propriétés physico-chimiques (Newsted, 2003). Cependant, on ne peut pas exclure, notamment dans le cas du fluoranthène, le fait que les contaminants peuvent pénétrer dans la cellule, mettant en jeu des mécanismes d'absorption passifs ou actifs.

Afin de comparer l'accumulation des différents contaminants dans les algues, les facteurs de bioconcentration (BCF) ont été calculés pour chaque contaminant et pour chaque condition (Tableau 16). Les BCF ont été calculés de deux manières, mais toujours à partir des valeurs de contamination mesurées, afin de s'affranchir de la part de contaminant perdu par adsorption sur les parois des erlenmeyers et d'avoir une vision du système à l'équilibre. Le premier calcul est réalisé à partir des quantités retrouvées dans l'eau et dans les algues exprimées en nanogrammes, le second est réalisé à partir des concentrations retrouvées dans l'eau (ng.l^{-1}) et dans les algues (ng.g^{-1} ps).

	Quantité dans l'eau à t_{1h} (ng)	Quantité dans les algues à t_{1h} (ng)	BCF	Concentration dans l'eau à t_{1h} (ng.l ⁻¹)	Concentration dans les algues t_{1h} (ng.g ⁻¹)	BCF
BDE 153 (500 000 $\mu\text{g.l}^{-1}$: 500 ng.l ⁻¹)	161 \pm 23	182 \pm 34	1,1	322 \pm 45	3171 \pm 397	9,8
BDE 47 (500 000 $\mu\text{g.l}^{-1}$: 500 ng.l ⁻¹)	44 \pm 7	247 \pm 4	5,6	88 \pm 14	4429 \pm 73	50,3
BDE 47 (500 000 $\mu\text{g.l}^{-1}$: 5 000 ng.l ⁻¹)	268 \pm 8	1081 \pm 262	4,0	537 \pm 15	19328 \pm 5372	36,0
BDE 47 (1 000 000 $\mu\text{g.l}^{-1}$: 500 ng.l ⁻¹)	44 \pm 3	238 \pm 7	5,4	89 \pm 6	3952 \pm 128	44,4
CB 77 (500 000 $\mu\text{g.l}^{-1}$: 500 ng.l ⁻¹)	96 \pm 13	88 \pm 9	0,9	193 \pm 26	1696 \pm 171	8,8
CB 153 (500 000 $\mu\text{g.l}^{-1}$: 500 ng.l ⁻¹)	35 \pm 3	206 \pm 23	5,9	69 \pm 7	3699 \pm 467	53,6
CB 153 (500 000 $\mu\text{g.l}^{-1}$: 5 000 ng.l ⁻¹)	565 \pm 9	1467 \pm 43	2,6	1130 \pm 17	25444 \pm 1057	22,5
CB 153 (1 000 000 $\mu\text{g.l}^{-1}$: 500 ng.l ⁻¹)	79 \pm 11	218 \pm 1	2,8	157 \pm 22	2380 \pm 54	15,2
Bap (500 000 $\mu\text{g.l}^{-1}$: 500 ng.l ⁻¹)	31 \pm 3	104 \pm 11	3,4	62 \pm 6	2171 \pm 209	35,0
Fluo (500 000 $\mu\text{g.l}^{-1}$: 500 ng.l ⁻¹)	114 \pm 3	59 \pm 6	0,5	228 \pm 6	1173 \pm 115	5,1
Chrys (500 000 $\mu\text{g.l}^{-1}$: 500 ng.l ⁻¹)	28 \pm 1	183 \pm 2	6,5	55 \pm 2	2954 \pm 102	53,7
Chrys (500 000 $\mu\text{g.l}^{-1}$: 5 000 ng.l ⁻¹)	231 \pm 16	1854 \pm 84	8,0	461 \pm 33	32123 \pm 527	69,7
Chrys (1 000 000 $\mu\text{g.l}^{-1}$: 500 ng.l ⁻¹)	26 \pm 2	176 \pm 11	6,8	53 \pm 3	2062 \pm 113	38,9

Tableau 16 : BCF (Facteur de bioconcentration) calculés d'une part en fonction de la quantité de contaminants présents dans les algues et dans l'eau et d'autre part en fonction de la concentration de contaminants présents dans les algues et dans l'eau.

Afin d'augmenter la lisibilité des résultats, les valeurs de BCF ont été reportées en fonction du log Kow des composés étudiés (Figure 47).

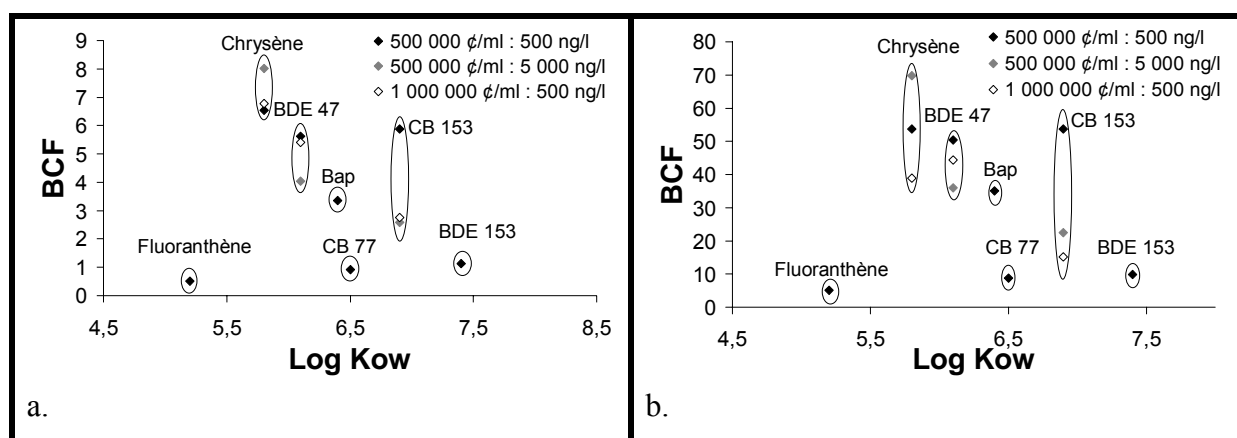


Figure 47 : BCF (Facteur de bioconcentration) calculés d'une part en fonction de la quantité de contaminants présents dans les algues et dans l'eau (a.) et d'autre part en fonction de la concentration de contaminants présents dans les algues et dans l'eau (b.).

Les composés présentant les facteurs de bioconcentration les plus faibles sont respectivement le fluoranthène, le CB 77 et le BDE 153. Cela est vrai quelque soit le mode de calcul du BCF retenu, à partir de la quantité de contaminant ou de la concentration. Un des facteurs explicatif pourrait être le log de Kow. Il semble être pertinent pour le fluoranthène qui présente le log de Kow le plus faible (4,8) et le BCF le plus faible, mais ne semble pas suffisant pour expliquer pour les différences entre les autres composés, puisque le chrysène (log Kow = (5,8)) a un BCF bien supérieur à celui du BDE 153 (log Kow = (7,4)).

Le chrysène est le composé qui présente les BCF les plus importants dans le cadre de nos expérimentations. Le BDE 47, le Benzo(a)pyrène et le CB 153 montrent des BCF intermédiaires et quasi équivalents. Le CB 153, BDE 47 et le chrysène ont été utilisés pour plusieurs types d'expositions, à concentration algale et à concentration en contaminant différentes. A première vue, ces variations jouent peu sur le BCF des composés étudiés, les BCF calculés restent dans une gamme de variation cohérente. Cependant, pour une même concentration en contaminants, le BCF est globalement plus faible pour la forte concentration algale. Cette variation du BCF est due à une quantité en contaminants dans le milieu plus forte lorsque la population algale est plus importante, alors que la quantité liée aux algues reste équivalente quelle que soit la concentration algale. Une hypothèse expliquant ce phénomène est la production d'exsudats par les algues, capables d'interagir avec les contaminants. En effet, plus la concentration d'algues dans le milieu est importante, plus la quantité d'exsudats produits est importante, plus la quantité de contamination liée aux exsudats augmente, faisant ainsi augmenter la concentration de contaminant dans l'eau et donc diminuer le BCF. Ce type de décroissance du BCF en fonction de l'augmentation de la population algale a déjà été mis en évidence (Sjim, 1995).

Les PCB ont été utilisés en mélange (pyralène), les BCF calculés lors de cette exposition sont présentés Tableau 17.

	Quantité dans l'eau (ng)	Quantité dans les algues (ng)	BCF	Concentration dans l'eau (ng.l ⁻¹)	Concentration dans les algues (ng.g ⁻¹)	BCF
CB 50 + 28	nd	nd	-	nd	nd	-
CB 52	nd	nd	-	nd	nd	-
CB 101	2 ± 1	7 ± 1	2,7	9 ± 3	130 ± 2	14,8
CB 154 + 77	5 ± 2	7 ± 1	1,5	10 ± 4	100 ± 4	10,1
CB 118	5 ± 1	17 ± 2	3,2	9 ± 2	320 ± 3	33,3
CB 138	6 ± 1	14 ± 1	2,7	8 ± 1	240 ± 2	30,6
CB 153	8 ± 2	17 ± 2	2,1	20 ± 4	320 ± 5	16,6
CB 180	10 ± 2	12 ± 1	1,6	13 ± 4	233 ± 3	17,8

Tableau 17 : BCF (Facteur de bioconcentration) des composés du pyralène calculés d'une part en fonction de la quantité de contaminants présents dans les algues et dans l'eau, et d'autre part en fonction de la concentration de contaminants présents dans les algues et dans l'eau.

Les BCF calculés pour le CB 77 et le CB 153 sont du même ordre que ceux calculés pour le mélange individuel. L'exposition en mélange et à des concentrations différentes ne semble pas jouer de façon significative sur le BCF. Il faut aussi noter que les valeurs du log Kow des composés étudiés ne sont pas directement corrélées à leur capacité d'accumulation. En effet, les composés présentant les log de Kow les plus élevés ne sont pas les plus accumulés (par exemple BDE 153). Le log Kow ne permet donc pas de prévoir de façon fiable les capacités d'accumulation des contaminants, même si cela reste un indicateur.

I.2. Les moules

Le deuxième organisme cible est un bivalve filtreur, la moule bleue (*Mytilus edulis*).

I.2.1. Contamination réelle de la nourriture

Les moules ont été contaminées par chaque composé (CB 153, CB 77, BDE 47, BDE 153, chrysène, fluoranthène, benzo(a)pyrène) à deux niveaux de concentration (5 et 100 µg par ration de nourriture). Les résultats de l'analyse des flacons de contrôle permettant de caractériser la contamination réelle des aliquotes de nourriture sont présentés Tableau 18.

	Contamination moyenne (ng.g ⁻¹)	Ecart type (n=3)	Temps de contamination (jours)	Quantité de nourriture par jour (g)	Quantité journalière de contaminant par moules (ng)	
Fluo 5 µg	4 757	82	10	1	31	
Fluo 100 µg	115 559	6 572	10	1	770	
BaP 5 µg	5 114	301	10	1	34	
BaP 100 µg	105 700	1 100	36	2	1409	
Chrys 5 µg	4 076	145	10	1	27	
Chrys 100 µg	82 600	2 200	36	2	1101	
CB 77 5µg	4 635	66	10	1	31	
CB 77 100 µg	89 285	10 138	10	1	595	
CB 153 5 µg	4 549	152	10	1	30	
CB 153 100 µg	117 500	11 000	36	1	783	
BDE 47 5 µg	3 917	101	10	1	26	
BDE 47 100 µg	67 511	1 977	10	1	450	
BDE 153 5 µg	2 753	680	10	1	18	
BDE 153 100 µg	77 555	1 979	10	1	517	
Pyralène	CB 50 +28	6	0	10	1	nd
	CB 52	81	8	10	1	0.5
	CB 101	827	70	10	1	6
	CB 154 + 77	467	41	10	1	3
	CB 118	1 444	75	10	1	10
	CB 153	1 720	129	10	1	11
	CB 138	1 466	105	10	1	10
	CB 180	1 732	130	10	1	12
	7 PCB	7 744	515	10	1	52

Tableau 18 : Niveau de contamination des aliquotes de nourriture (Liquizell) et quantité de nourriture administrée par jour et par condition.

I.2.2. Contamination de l'eau

La contamination de l'eau des aquariums a été suivie au cours de l'expérimentation au début de la phase de contamination, au milieu, et à la fin de cette phase (Tableau 19). Les valeurs retrouvées restent faibles (< 10 ng.l⁻¹), mais elles ne permettent pas d'exclure totalement le fait qu'une infime partie de la contamination se soit réalisée par voie directe plutôt que par voie trophique.

	t_0	$t_{final/2}$	t_{final}
Fluoranthène 5 µg	2,3	4,6	5,3
Fluoranthène 100 µg	1,8	5,6	6,8
Benzo(a)pyrène 5 µg	2,4	4,2	4,1
Benzo(a)pyrène 100 µg	3	6	6,2
Chrysène 5 µg	nd	3,8	4,2
Chrysène 100µg	1,5	4	5,1
CB 77 5 µg	nd	1,8	2,2
CB 77 100 µg	nd	2,4	2,4
CB 153 5 µg	nd	1,1	1,2
CB 153 100 µg	1,2	4,3	6,4
Pyralène	2,5	15,4	16,8
BDE 47 5 µg	nd	2,1	2,8
BDE 47 100 µg	nd	2,1	2,4
BDE 153 5 µg	nd	nd	nd
BDE 153 100 µg	nd	nd	nd

Tableau 19 : Contamination de l'eau exprimée en ng.l⁻¹.

A la fin de la période de contamination, l'intégralité de l'eau a été changée, les aquariums ont été intégralement nettoyés et du charbon actif a été introduit dans la filtration pour neutraliser les composés éventuels restant.

I.2.3. Paramètres biométriques des moules

Au début de chaque expérimentation, les moules ont été calibrées entre 4,5 et 5,5 cm. A chaque prélèvement, les individus prélevés ont été mesurés et pesés. Leur teneur lipidique a été également déterminée. Les Tableaux 20 et 21 montrent les résultats obtenus. Aucune différence significative n'a pu être mise en évidence entre les paramètres biométriques des moules en début et en fin d'expérience.

	t_0		t_{final}		$t_{fin\ d'expérimentation}$	
	Longueur (mm)	Poids (g)	Longueur (mm)	Poids (g)	Longueur (mm)	Poids (g)
Témoin 1	46 ± 3	2,86 ± 0,6	47 ± 3	4,3 ± 1,3	45 ± 3	2,2 ± 0,6
CB 153 100µg	47 ± 4	3,6 ± 0,9	47 ± 3	4,2 ± 1,1	48 ± 3	3,4 ± 0,5
Témoin 2	44 ± 2	2,5 ± 0,5	46 ± 5	2,6 ± 0,6	45 ± 3	2,5 ± 0,5
Benzo (a) Pyrène 100µg	46 ± 2	2,6 ± 0,6	49 ± 6	2,3 ± 0,4	46 ± 3	2,5 ± 0,7
Chrysène 100µg	44 ± 3	2,2 ± 0,5	44 ± 2	1,9 ± 0,6	45 ± 3	2,4 ± 0,54
Témoin 3	50 ± 3	5,9 ± 1,9	47 ± 5	4,6 ± 2	47 ± 4	4,9 ± 1,8
Fluoranthène 5µg	48 ± 3	4,4 ± 0,9	47 ± 2	3,9 ± 0,5	46 ± 3	4,1 ± 0,9
Fluoranthène 100µg	47 ± 3	4,8 ± 1,5	44 ± 1	2,6 ± 0,5	49 ± 3	2,8 ± 1,2
Pyralène	48 ± 3	4,2 ± 1,5	45 ± 2	3,4 ± 1,2	47 ± 2	3,7 ± 1,2
Témoin 4	46 ± 2	3,8 ± 1,4	45 ± 2	3,7 ± 1,5	44 ± 1	2,4 ± 0,6
Benzo (a) Pyrène 5µg	47 ± 2	4,4 ± 1,1	48 ± 2	3,9 ± 0,4	44 ± 3	4,1 ± 0,6
Chrysène 5µg	44 ± 1	4,0 ± 0,8	46 ± 2	3,9 ± 0,6	44 ± 2	3,9 ± 0,6
CB 153 5µg	46 ± 2	3,2 ± 0,1	45 ± 2	3,6 ± 0,5	45 ± 2	3,4 ± 1,0
CB 77 5µg	43 ± 1	2,9 ± 0,6	45 ± 1	3,6 ± 0,5	46 ± 2	4,3 ± 0,5
CB 77 100µg	45 ± 2	3,0 ± 0,8	45 ± 1	3,6 ± 0,5	44 ± 2	3,6 ± 1,1
Témoin 5	45 ± 2	3,1 ± 0,5	44 ± 2	2,7 ± 0,4	45 ± 2	1,5 ± 0,3
BDE 47 5µg	45 ± 1,5	3,0 ± 0,6	45 ± 2	2,7 ± 0,5	45 ± 2	1,5 ± 0,4
BDE 47 100µg	45 ± 2	3,1 ± 0,4	45 ± 3	2,7 ± 0,8	42 ± 2	2,3 ± 0,6
BDE 153 5µg	46 ± 2	3,1 ± 0,4	44 ± 2	2,7 ± 0,8	48 ± 3	1,9 ± 0,1
BDE 153 100µg	44 ± 4	2,4 ± 0,4	45 ± 3	3,1 ± 0,6	45 ± 2	2,5 ± 0,4

Tableau 20 : Données biométriques des moules utilisées pendant les expérimentations (n=5).

	t_0	$t_{\text{fin d'exposition}}$	t_{final}
Témoin 1	7 ± 2	7 ± 2	6 ± 1
CB 153 100µg	8 ± 1	7 ± 1	5 ± 1
Témoin 2	6 ± 1	6 ± 1	6 ± 2
Benzo (a) Pyrène 100µg	6 ± 1	7 ± 1	7 ± 1
Chrysène 100µg	6 ± 1	5 ± 1	5 ± 1
Témoin 3	6 ± 1	6 ± 1	6 ± 2
Fluoranthène 5µg	6 ± 1	6 ± 1	7 ± 1
Fluoranthène 100µg	6 ± 1	7 ± 1	9 ± 1
Pyralène	6 ± 1	7 ± 1	9 ± 1
Témoin 4	6 ± 1	6 ± 2	7 ± 3
Benzo (a) Pyrène 5µg	6 ± 1	5 ± 1	9 ± 2
Chrysène 5µg	6 ± 1	7 ± 2	8 ± 1
CB 153 5µg	7 ± 1	7 ± 2	6 ± 1
CB 77 5µg	6 ± 1	6 ± 1	6 ± 1
CB 77 100µg	6 ± 1	8 ± 1	6 ± 1
Témoin 5	4 ± 1	4 ± 2	4 ± 3
BDE 47 5µg	4 ± 1	3 ± 1	4 ± 1
BDE 47 100µg	4 ± 1	6 ± 1	3 ± 1
BDE 153 5µg	4 ± 1	5 ± 4	4 ± 1
BDE 153 100µg	4 ± 1	5 ± 2	5 ± 1

Tableau 21 : Teneurs lipidiques des moules analysées exprimée en pourcentage de lipide par gramme de poids sec (n=5).

I.2.4. Niveau de contamination des moules des aquariums témoins

Afin d'écartier une source de contamination extérieure, des bacs témoins contenant des moules nourries avec de la nourriture saine ont été menés. Trois points de prélèvement représentatifs ont été analysés t_0 , $t_{\text{fin de contamination}}$, $t_{\text{fin d'expérimentation}}$. Pour chaque temps sélectionné, les 5 moules prélevées ont été analysées en pool. Une seule analyse par pool a été réalisée, la variabilité des protocoles analytiques utilisés est de l'ordre de 15%. Aucune variation significative de concentration n'est à noter (Tableau 22).

	t_0	$t_{\text{fin de contamination}}$	$t_{\text{fin d'expérimentation}}$
Fluoranthène 5µg	9	12	13
Fluoranthène 100µg	9	12	13
Benzo (a) Pyrène 5µg	nd	nd	nd
Benzo (a) Pyrène 100µg	nd	nd	nd
Chrysène 5µg	12	12	11
Chrysène 100µg	57	12	40
CB 77 5µg	29	23	22
CB 77 100µg	29	23	22
CB 153 5µg	47	31	52
CB 153 100µg	45	62	59
BDE 47 5µg	nd	nd	nd
BDE 47 100µg	nd	nd	nd
BDE 153 5µg	nd	nd	nd
BDE 153 100µg	nd	nd	nd
Pyralène	520	365	597

Tableau 22 : Niveau de contamination des moules des aquariums témoins exprimé en ng.g⁻¹ ps.

Aucune contamination n'est observée chez les moules témoins, ce qui montre que les phénomènes observés chez les moules contaminées sont bien la résultante de la contamination par voie trophique.

I.2.5. Contamination par les PCB

Les moules ont été exposées à deux concentrations de deux PCB (CB 77 et CB 153) ainsi qu'à un mélange industriel de PCB, le pyralène.

I.2.5.1. CB 77

I.2.5.1.a. CB 77 5 μg

Les 150 moules de la condition ont été nourries journalièrement avec 1 g de nourriture contaminée au CB 77 à hauteur de $4\,635 \pm 66 \text{ ng.g}^{-1}$, soit une dose de contaminant d'environ 31 ng par jour et par moule. Durant les 10 jours de contamination, la concentration de CB 77 augmente de façon quasi-linéaire de 29 à 214 ng.g^{-1} ps (Figure 48). Les écarts types indiqués sur la figure représentent la variabilité individuelle entre chaque individu prélevé. Cette variabilité est due à plusieurs facteurs. Premièrement, la variabilité analytique due à la préparation d'échantillons et à l'analyse introduit une variation oscillant entre 15 et 20 %. A cela s'ajoute la variabilité du temps de filtration des moules, il n'est pas possible de certifier que l'ensemble des moules filtre de façon similaire pendant l'intégralité des deux heures qui leur sont imparties pour se nourrir. Le dernier facteur à prendre en considération est la capacité intrinsèque de chaque moule à capter, assimiler et métaboliser ou non le contaminant. Durant la phase de décontamination, la concentration de CB 77, diminue au cours du temps jusqu'à atteindre un palier d'environ 130 ng qui perdure jusqu'à la fin de l'expérimentation.

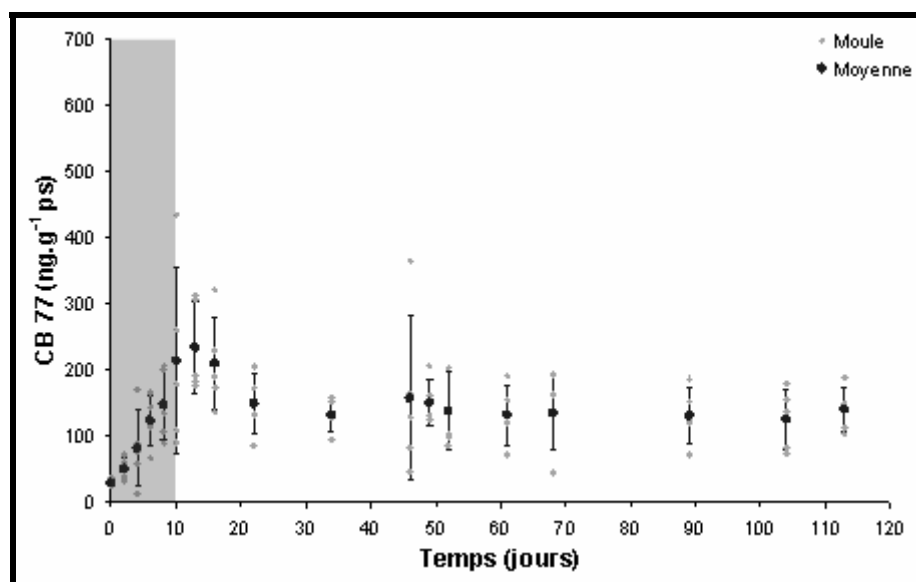


Figure 48 : Cinétique d'accumulation du CB 77 administré à une concentration théorique de $5 \mu\text{g.j}^{-1}$ à des moules (ng.g^{-1} ps) ($n=5$).

La Figure 49 illustre l'évolution de la concentration du CB 77 dans les moules contaminées à une concentration théorique de $5 \mu\text{g.j}^{-1}$, les concentrations sont cette fois-ci exprimées en ng.g^{-1} de lipides. La tendance d'accumulation et de dépuration du CB 77 ainsi exprimée est similaire à celle observée avec les concentrations exprimées en ng.g^{-1} . Durant les 10 jours de contamination, la concentration de CB 77 augmente de façon quasi-linéaire de 504 à 3590ng.g^{-1} de lipides, puis décroît jusqu'à 2235ng.g^{-1} de lipides au terme de la période de dépuration. Au cours des l'expérimentation, l'ensemble des moules a montré une teneur lipidique constante de l'ordre de $7 \pm 2 \%$ de lipides par gramme de matière sèche. La teneur lipidique dans les moules utilisées pour l'ensemble des expérimentations variant peu, la représentation en ng.g^{-1} lipides ne modifie pas l'allure de la cinétique de façon significative et apporte donc peu d'informations complémentaires. Ce type de représentation ne sera donc pas reproduite pour illustrer les résultats obtenus au cours des expositions aux autres contaminants. Cette approche d'expression des résultats en ng.g^{-1} de lipides est surtout intéressante pour comparer la contamination entre deux espèces (ou éventuellement deux individus d'une même espèce) ayant des teneurs lipidiques différentes, permettant ainsi de normaliser les résultats (Fisk *et al.*, 2003).

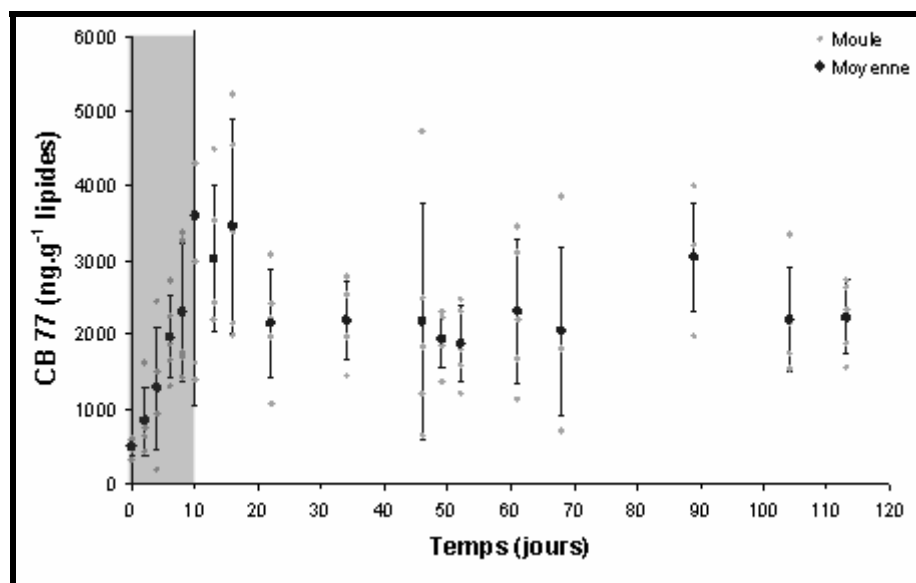


Figure 49 : Cinétique d'accumulation du CB 77 administré à une concentration théorique de $5 \mu\text{g.j}^{-1}$ à des moules (ng.g^{-1} lipide) ($n=5$).

1.2.5.1.b. CB 77 100 μg

Les 150 moules de la condition ont été nourries journalièrement avec 1 g de nourriture contaminée au CB 77 à la hauteur de $89\,285 \pm 10\,138 \text{ng.g}^{-1}$, soit une dose de contaminant d'environ 595 ng par jour et par moule. Durant les 10 jours de contamination, la concentration de CB 77 augmente de façon quasi-linéaire de 29 à 744ng.g^{-1} ps (Figure 50). La variabilité individuelle est importante et ne permet pas d'établir de tendance claire de dépuration. On

peut tout de même noter que les écarts de contamination entre les moules diminuent au cours du temps de dépuración, laissant présager un début d'élimination du composé. Ces résultats montrent l'intérêt de l'analyse individuelle, permettant de représenter les comportements de chaque individu au sein d'une tendance globale.

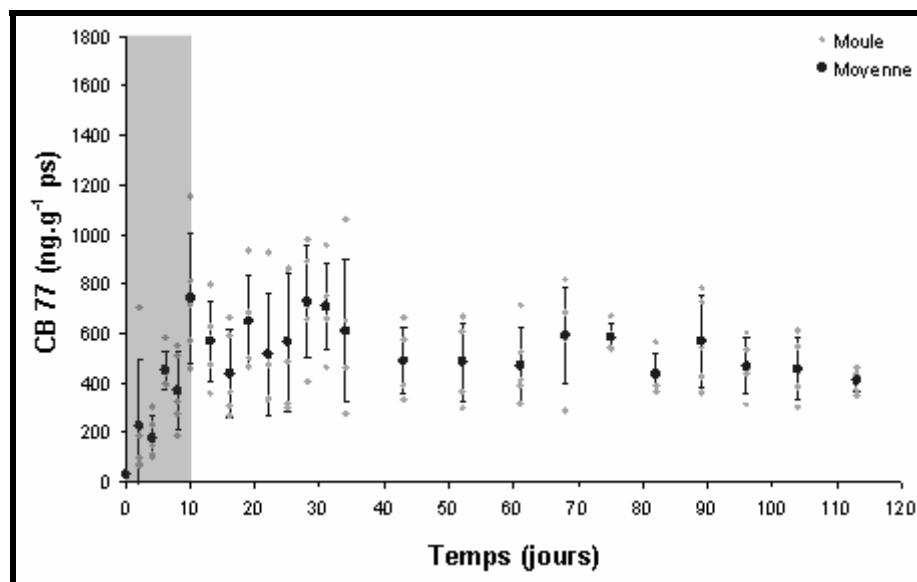


Figure 50 : Cinétique d'accumulation du CB 77 dans les moules ($100 \mu\text{g.j}^{-1}$) ($\text{ng.g}^{-1} \text{ps}$).

Il faut également noter que le rapport de concentration en CB 77 dans la nourriture entre les deux conditions $5 \mu\text{g}$ et $100 \mu\text{g}$ est de l'ordre de 20, alors que le rapport entre la contamination maximale des moules pour les deux conditions à la fin de la période de contamination est de l'ordre de 3,5. La quantité de composé accumulé n'est donc pas directement corrélée à la dose administrée. Plusieurs hypothèses peuvent être formulées pour tenter d'expliquer ce phénomène. Un mécanisme de "protection" des moules peut être envisagé, les moules n'absorbent pas une nourriture trop contaminée. Le CB 77 est en effet un PCB coplanaire, considéré comme PCB "dioxine like". Il fait partie des PCB les plus toxiques. Il est possible que la forte concentration (correspondant à l'administration de 2 mg/kg), bien que loin de la dose de toxicité aiguë (plusieurs grammes par kilos) soit trop élevée pour les moules. De plus, un phénomène de saturation de l'accumulation du CB 77 est une hypothèse qui peut également être envisagée. Un seuil maximal de contamination a pu être atteint lié à deux types de phénomènes, soit les moules ne sont plus à même de stocker le CB 77, soit elles réussissent à l'éliminer de façon efficace à plus forte concentration d'exposition. La concentration de CB 77 dans la moule étant la résultante de la quantité de contaminant ingéré moins la quantité éliminée et/ou métabolisée, une augmentation des mécanismes de dépuración peut conduire à une accumulation de CB 77 moindre.

I.2.5.2. CB 153

I.2.5.2.a. CB 153, 5 μg

Les 150 moules de la condition ont été nourries journalièrement avec 1 g de nourriture contaminée au CB 153, environ $4\,549 \pm 152 \text{ ng.g}^{-1}$, soit une dose de CB 153 d'environ 30 g par jour et par moule. Durant les 10 jours de contamination, la concentration de CB 153 augmente de 47 à 221 ng.g^{-1} ps (Figure 51).

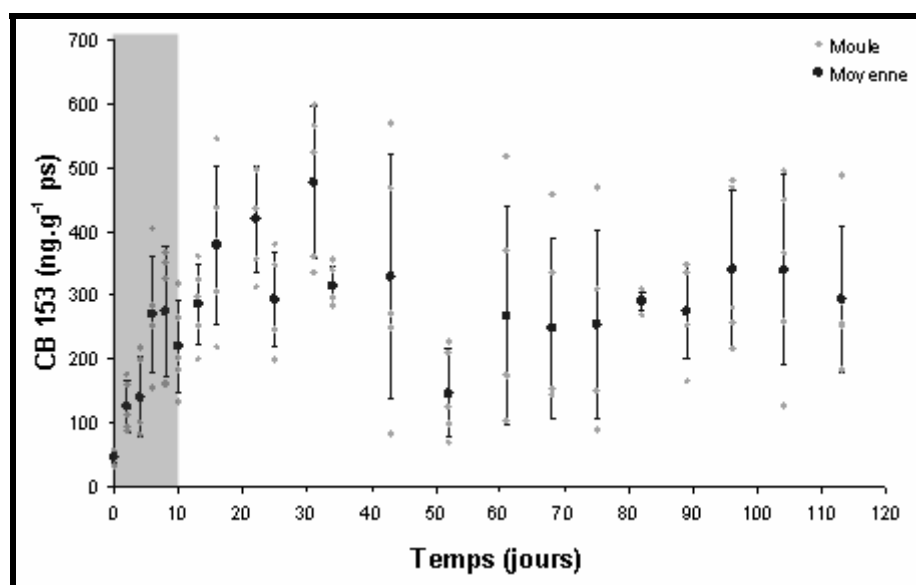


Figure 51 : Cinétique d'accumulation du CB 153 dans les moules ($5\mu\text{g.j}^{-1}$) (ng.g^{-1} ps) ($n=5$).

La concentration en CB 153 la plus importante n'est pas atteinte à la fin de la période de contamination mais à t_{31} ($478 \pm 120 \text{ ng.g}^{-1}$ ps). Ce phénomène est peut être dû simplement à la variabilité individuelle entre les moules et aux aléas de l'échantillonnage qui aurait conduit à prélever les moules les plus contaminées après l'arrêt de la contamination. En effet, cette tendance n'est due qu'à cinq ou six moules plus contaminées que les autres (Figure 51). Il se peut également que cela cache un phénomène particulier non élucidé à ce jour, ou un biais expérimental entraînant la poursuite de la contamination pendant quelques jours. Afin d'éviter au maximum les biais expérimentaux, l'aquarium a été nettoyé, vidé en fin de période de contamination, du charbon actif a été placé dans la filtration pour capter les éventuelles traces de composés restées dans le système. Tous les moyens ont été mis en œuvre pour éliminer toute trace de contamination du système. Cependant un stockage de CB 153 au niveau d'un des compartiments du système expérimental, entraînant la poursuite de la contamination, ne peut pas être totalement exclu. Ce phénomène d'effet retard à l'accumulation a déjà été observé avec ce composé lors de l'exposition d'oursins (*Paracentrotus lividus*) par voie trophique au $^{14}\text{CB 153}$ (Danis *et al.*, 2005), sans réelles explications de la part des auteurs.

Durant la phase de dépuraton, la variabilité individuelle est importante, et ne permet pas d'établir de tendance claire de dépuraton. La concentration moyenne dans les moules au fil du temps est constante, il n'apparaît aucune dépuraton claire. Cette tendance confirme la forte rémanence du composé au niveau environnemental (Kannan *et al.*, 1995).

1.2.5.2.b. CB 153, 100 μg

Les 150 moules de la condition ont été nourries journalièrement avec 1 g de nourriture contaminée au CB 153 à la hauteur de $117\,500 \pm 11\,000 \text{ ng.g}^{-1}$, soit une dose de contaminant d'environ 783 g par jour et par moule. Cette condition fait partie de la phase 1 d'expérimentation, où les moules ont été exposées au contaminant pendant 36 jours. Pendant cette période de contamination, la concentration de CB 153 augmente, passant de 45 à $8\,415 \text{ ng.g}^{-1}$ ps (Figure 52). Les moules accumulent donc le contaminant pendant toute l'exposition, on n'observe pas d'"effet plateau". Durant la période de décontamination, la concentration en CB 153 ne diminue pas. Cette tendance concorde avec celle observée durant la plus faible concentration d'exposition en CB 153, confirmant la rémanence du composé. De plus, le même phénomène de décalage de la concentration maximale après la fin de la période de contamination est également observé. Les concentrations moyennes observées à t_{39} , t_{51} , t_{57} et t_{66} sont supérieures à celle observée à t_{36} ($8445 \pm 4478 \text{ ng.g}^{-1}$) en fin de contamination. Cependant, la variabilité entre les individus est importante, l'analyse individuelle permet de visualiser les différences d'accumulation et de dépuraton de chaque moule. En effet, la variabilité intrinsèque de chaque moule en terme d'efficacité d'accumulation, d'élimination, de métabolisation semble le facteur de variation le plus plausible pour expliquer cette tendance.

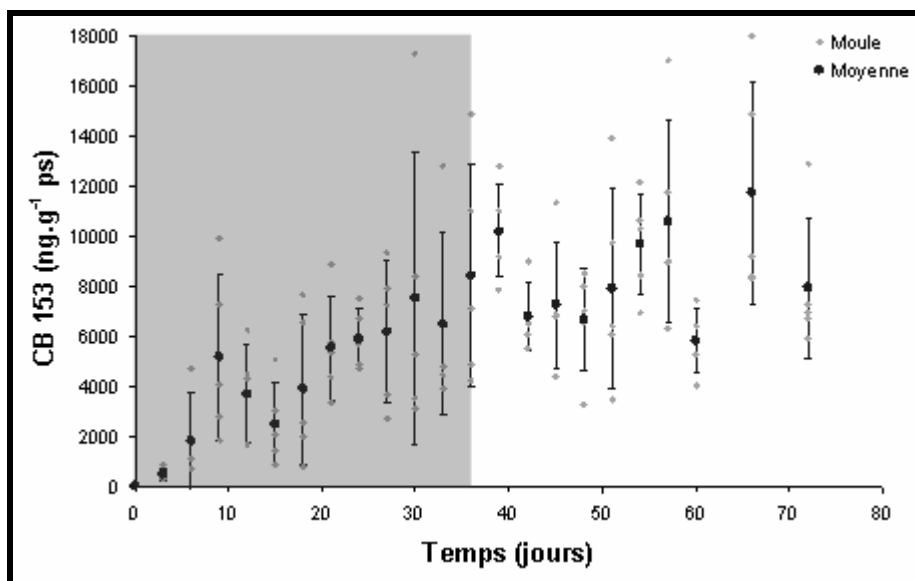


Figure 52 : Cinétique d'accumulation du CB 153 ($100 \mu\text{g.j}^{-1}$) (ng.g^{-1} ps) ($n=5$).

La comparaison directe des données obtenues pour les deux concentrations est rendue difficile par la différence de durée des phases de contamination, 10 jours dans le cas de la plus faible concentration et 36 jours dans le cas de la plus forte concentration. Afin de permettre cette comparaison, la moyenne de la concentration des moules exposées à la plus forte concentration entre t_9 et t_{12} est comparée aux résultats obtenus pour la plus faible concentration à t_{10} . Ainsi la concentration moyenne calculée pour la contamination CB 153 100 μg est de l'ordre de $4\,400 \pm 2\,704 \text{ ng.g}^{-1}$ ps.

Le rapport de concentration en CB 153 dans la nourriture entre les deux conditions 5 μg et 100 μg est de l'ordre de 20 et le rapport entre la contamination maximale des moules au terme de 10 jours de contamination est également de l'ordre de 20. Les phénomènes de différence d'accumulation entre les deux concentrations d'exposition observées dans le cas de CB 77 ne sont pas retrouvés dans le cas du CB 153. Aucun effet de seuil maximal d'accumulation, ne peut être suspecté pour le CB 153 dans le cadre de ces expérimentations. Ces résultats laissent penser que l'augmentation de concentration dans la nourriture est proportionnelle à la quantité de composé accumulée dans les moules et qu'une fois accumulé dans les tissus, le CB 153 est peu ou pas éliminé. Cela confirme la rémanence du composé au niveau environnemental (Kannan *et al.*, 1995).

I.2.5.3. Le pyralène

Dans le cas de la contamination au pyralène, les 150 moules de la condition ont été nourries journalièrement avec 1 g de nourriture contaminée avec un mélange de PCB, seuls les 7 PCB prioritaires (CB 28, CB 52, CB 101, CB 118, CB138, CB 153, CB 180) et le CB 77 ont été suivis pendant cette contamination (Figure 53). La concentration moyenne de la nourriture administrée par jour pour ces composés est de $7\,744 \pm 515 \text{ ng.g}^{-1}$.

Durant la phase d'exposition, si l'on considère la somme des PCB, la contamination des moules augmente de 392 ng.g^{-1} à 877 ng.g^{-1} ps. Il est à noter que le niveau de contamination originelle des moules en PCB est plus élevé que celui des autres expérimentations sur les PCB. En effet, à titre de comparaison, la concentration initiale de CB 153 dans cette exposition est de 134 ng.g^{-1} , alors que la valeur moyenne en CB 153 des moules des autres expositions est de l'ordre de 50 ng. Cette différence de niveau de contamination contribue à masquer la cinétique d'accumulation individuelle des composés. Elle pose également le problème de la difficulté de trouver des animaux non ou peu contaminés pour réaliser des expérimentations avec des niveaux de concentrations environnementales réalistes. La seule solution fiable pour résoudre ce problème serait un

élevage en milieu contrôlé d'une souche de laboratoire, avec toutes les difficultés que cela entraînerait.

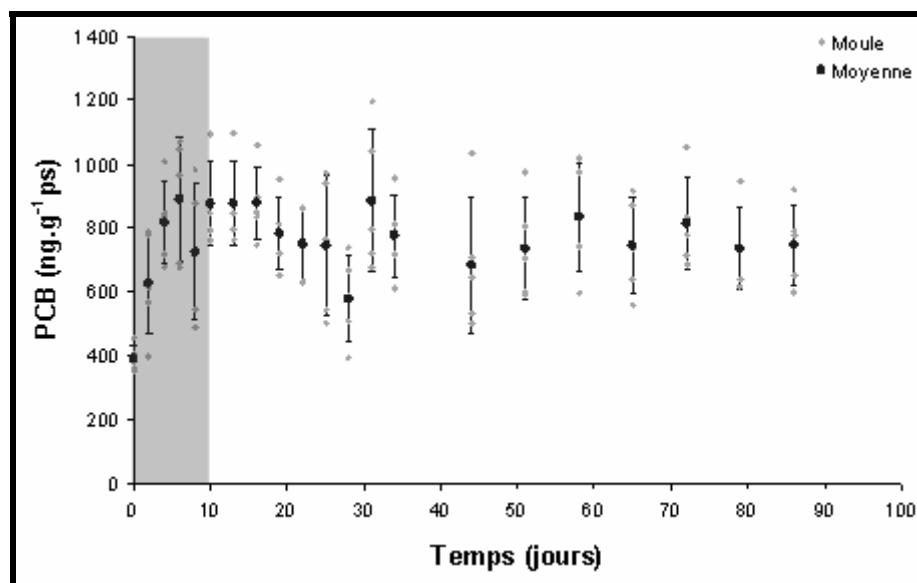


Figure 53 : Cinétique d'accumulation des PCB (somme des PCB analysés) dans le cas d'une exposition au pyralène (n=5).

La Figure 54 montre en détail les résultats obtenus pour chaque congénère analysé. La tendance d'accumulation est plus ou moins claire en fonction des composés considérés. Des composés comme CB 138, 180 et dans une moindre mesure le CB 153, présentent une concentration à t_{10} significativement différente de la concentration initiale. Ces composés sont connus pour être bioaccumulables. Le CB 153 et le CB 138 ne montrent pas de tendance claire de dépuración. Cela confirme la non dépuración du CB 153 par les moules.

Contrairement à la tendance observée pour le CB 153 et CB 138, la concentration du CB 180 diminue durant la période de dépuración, jusqu'à retrouver une valeur proche de la concentration initiale aux alentours de $10 \text{ ng.g}^{-1} \text{ ps}$.

Le CB 77 et CB 118 ne présentent pas de tendance claire d'accumulation. La quantité de composé administrée par moule en CB 77 est faible; environ 3 ng par jour, soit 10 fois moins qu'à la concentration d'exposition la plus faible lorsque le CB 77 est administré seul. Pour le CB 118, la quantité de composé administrée est plus importante : environ 9 ng par jour. Le fait que l'accumulation de ces composés ne peut être visualisée, peut aussi être dû aux mécanismes de dépuración possibles liés à la présence d'atomes de carbones vicinaux non substitués.

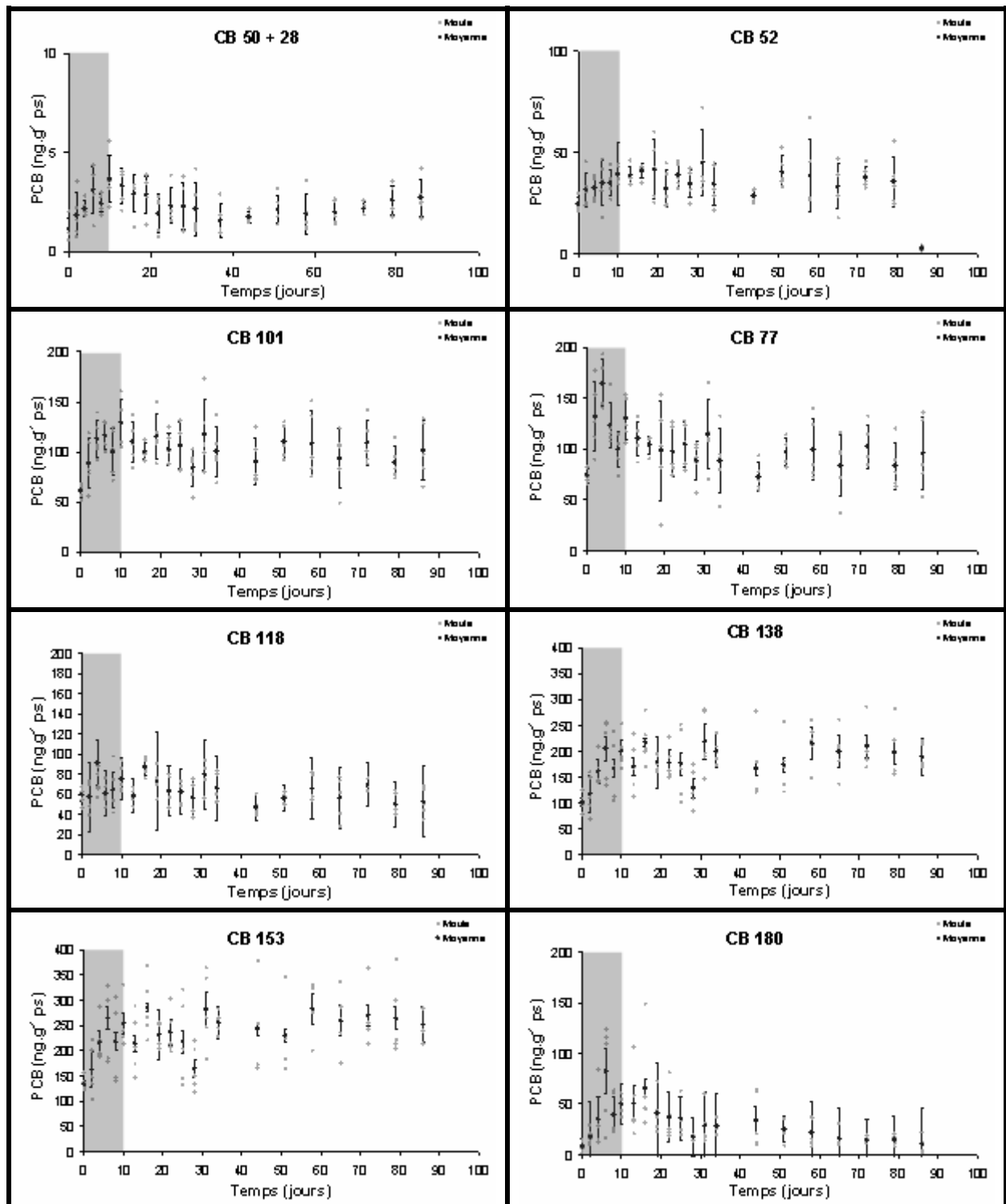


Figure 54 : Cinétique d'accumulation de chaque PCB analysé dans le cas d'une exposition au pyralène.

I.2.6. Contamination par les PBDE

I.2.6.1. BDE 47

I.2.6.1.a. BDE 47, 5 μg

Les 150 moules de la condition ont été nourries journalièrement avec 1 g de nourriture contaminée au BDE 47 ($3\,917 \pm 101 \text{ ng.g}^{-1}$), soit une dose de contaminant d'environ 26 ng par jour et par moule. Pendant cette période de contamination, la concentration de BDE 47 augmente de 0 à 262 ng.g^{-1} ps (Figure 55). Durant la période de décontamination, la concentration en BDE 47 ne diminue pas de façon marquée. Le niveau de contamination dans les moules au terme des 60 jours de dépuración est encore de $155 \pm 60 \text{ ng.g}^{-1}$ ps. Un phénomène d'effet retard similaire à celui observé pour le CB 153 est également mis en évidence pour le BDE 47. Le maximum de contamination est observé après 16 jours d'expérimentation. Le phénomène est, comme dans le cas du CB 153, vraisemblablement lié à la variabilité individuelle d'accumulation des moules. La tendance est tirée vers le haut par cinq moules présentant des concentrations élevées (entre 500 et 600 ng.g^{-1} ps) pour une teneur moyenne de l'ordre de 350 ng.g^{-1} ps. Le BDE 47 démontre un comportement similaire au CB 153 en terme d'accumulation, mais *a contrario* il semble pouvoir être éliminé par les moules durant la phase de dépuración.

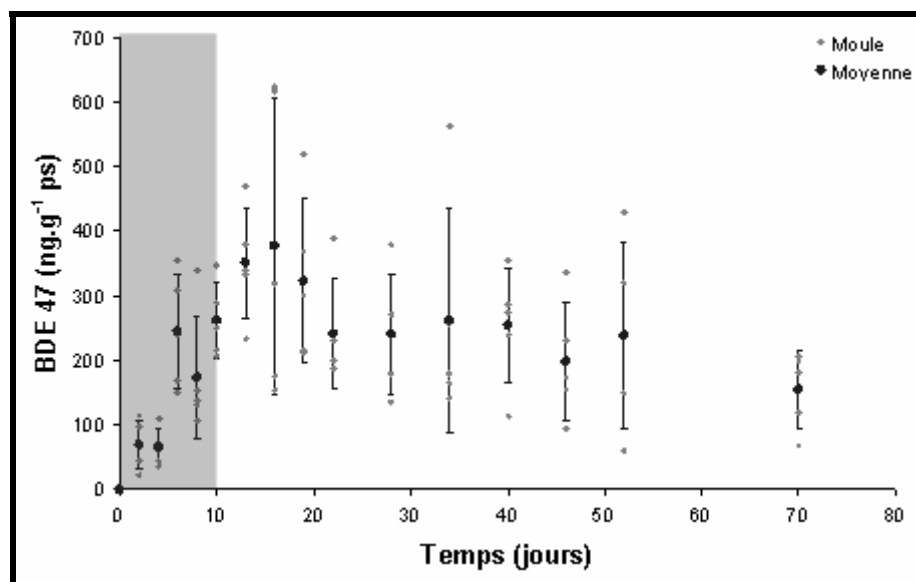


Figure 55 : Cinétique d'accumulation du BDE 47 dans les moules ($5 \mu\text{g.j}^{-1}$) exprimée en ng.g^{-1} ps.

I.2.6.1.b. BDE 47, 100 μg

Les 150 moules de la condition ont été nourries journalièrement avec 1 g de nourriture contaminée au BDE 47 à une concentration de $67\,511 \pm 1977 \text{ ng.g}^{-1}$, soit une dose de contaminant d'environ 450 g par jour et par moule. Pendant cette période de contamination, la

concentration de BDE 47 augmente de 0 à 9 246 ng.g^{-1} ps (Figure 56). Durant la période de décontamination, la concentration en BDE 47 ne diminue pas de façon claire, la valeur au terme des 60 jours de dépuración est encore de l'ordre $7\,600 \pm 4\,000$ ng.g^{-1} ps, ce qui laisse présager une importante rémanence de ce composé dans l'environnement. Il est également intéressant de noter que le rapport entre les deux concentrations de BDE 47 testées est de l'ordre de 20 alors que le rapport entre les concentrations maximales obtenues est de l'ordre de 30. Ceci dénote une plus forte accumulation du BDE 47 dans le cas de l'exposition à la forte concentration. Une explication à ce phénomène peut être la saturation des mécanismes de dépuración ou de métabolisation servant à éliminer le BDE 47 lors de la plus forte concentration d'exposition, conduisant à une accumulation plus importante.

Les résultats obtenus d'après ces expositions au BDE 47 dénotent de la capacité de ce composé à se bioaccumuler. Dans une étude similaire réalisée sur des moules bleues (Gustafsson *et al.*, 1999), le potentiel d'accumulation du PBDE 47 a déjà été démontré. Cependant, dans leurs conditions expérimentales, à la fin de la période de contamination (43 jours), la concentration en PBDE 47 décroît rapidement pour revenir à son niveau initial en moins de 20 jours. Les analyses ont été réalisées sur des pools d'une trentaine d'animaux, ce qui lisse la variabilité individuelle, mais cela ne suffit pas à expliquer la différence de résultats. Cependant, les résultats obtenus dans le cadre de ces travaux présentant une faible élimination du BDE 47 pendant la période de dépuración concordent avec les données environnementales recueillies à ce jour, qui prouvent une rémanence du BDE 47 dans les organismes vivants, notamment chez les bivalves filtreurs comme les moules (Johansson *et al.*, 2006).

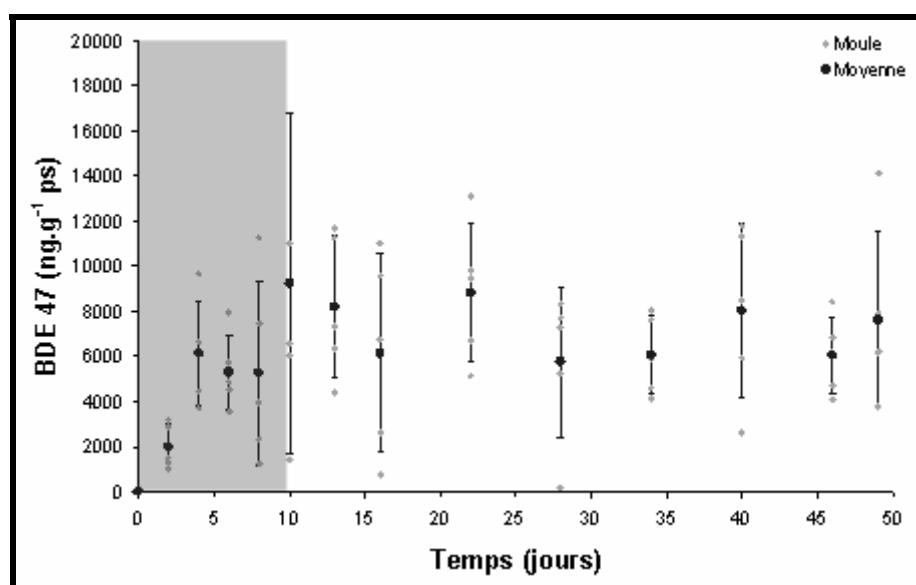


Figure 56 : Cinétique d'accumulation du BDE 47 dans les moules ($100\mu\text{g.j}^{-1}$) exprimée en ng.g^{-1} ps.

1.2.6.2. BDE 153

1.2.6.2.a. BDE 153, 5 μg

Les 150 moules de la condition ont été nourries journalièrement avec 1 g de nourriture contaminée au BDE 153 à une concentration de $2\,753 \pm 680 \text{ ng.g}^{-1}$, soit une dose de contaminant d'environ 18 ng par jour et par moule. Pendant cette période de contamination, la concentration de BDE 153 augmente de 0 à 262 ng.g^{-1} ps (Figure 57). Contrairement aux résultats observés avec le BDE 47, dans le cas de BDE 153, on observe une cinétique de dépuración claire, qui débute dès la fin de la période d'accumulation pour revenir en 60 jours à des valeurs proches des valeurs initiales, de l'ordre d'une dizaine de nanogrammes. Ces résultats concordent avec ceux de Gustafsson et al. (1999), qui démontrent que des moules exposées au BDE 153 pendant 43 jours déparent rapidement. Les moules retrouvent leurs niveaux de contamination initiaux en une vingtaine de jours. Ces résultats concordent avec le fait que le BDE 153 ne fasse pas partie des PBDE retrouvés aux plus fortes concentrations dans l'environnement.

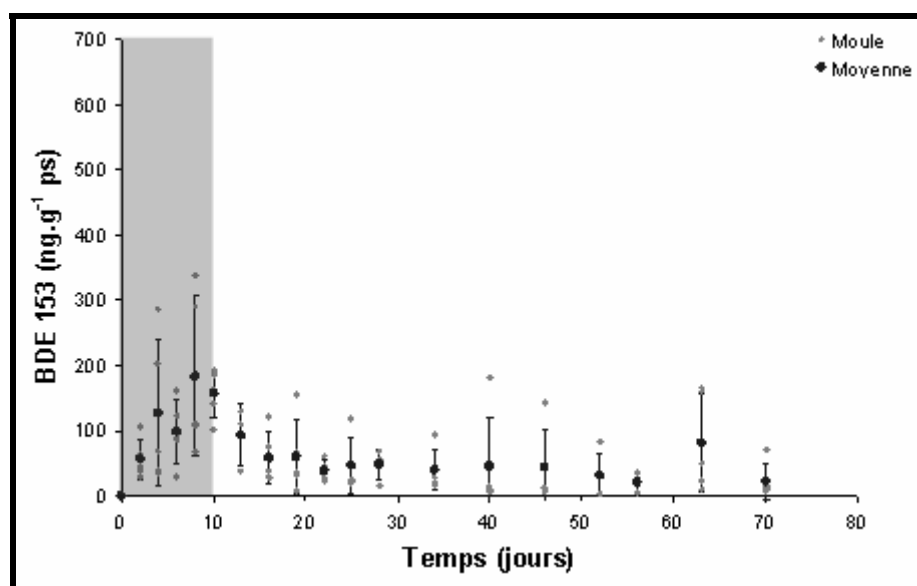


Figure 57 : Cinétique d'accumulation du BDE 153 ($5\mu\text{g.j}^{-1}$) exprimée en ng.g^{-1} ps.

1.2.6.2.b. BDE 153, 100 μg

Pour cette condition, les moules ont été nourries journalièrement avec 1g de nourriture contaminée au BDE 153 à la hauteur de $77\,555 \pm 1979 \text{ ng.g}^{-1}$, soit une dose de contaminant d'environ 450 ng par jour et par moule. Pendant cette période de contamination, la concentration de BDE 153 augmente de 0 à 1924 ng.g^{-1} ps (Figure 58). Le BDE 153 a donc une capacité à être bioaccumulé par les moules. La tendance à la dépuración du BDE 153 est confirmée. En 60 jours de dépuración, la concentration en BDE 153 diminue par 3 et retombe à un niveau d'environ 600 ng.g^{-1} ps. Il serait intéressant de prolonger la phase de dépuración

afin d'observer si après avoir été exposées à ce niveau de concentration, les moules sont capables de dépurier totalement le composé, ou si elles conservent une contamination résiduelle. Le BDE 153 semble être éliminé et métabolisé par les moules, même si les capacités de métabolisation des mollusques sont encore discutées à ce jour. Si l'on considère le rapport des concentrations dans la nourriture entre les deux expositions au BDE 153, il est de l'ordre de 20, alors que le rapport entre les moules les plus contaminées est de l'ordre de 7. L'accumulation est donc moins importante lors de la forte concentration d'exposition, comme dans le cas du CB 77. Les mêmes hypothèses peuvent être avancées, soit un mécanisme de saturation de l'accumulation par les moules, soit la mise en place d'un système de dépuration plus efficace à forte concentration d'exposition qu'à faible concentration.

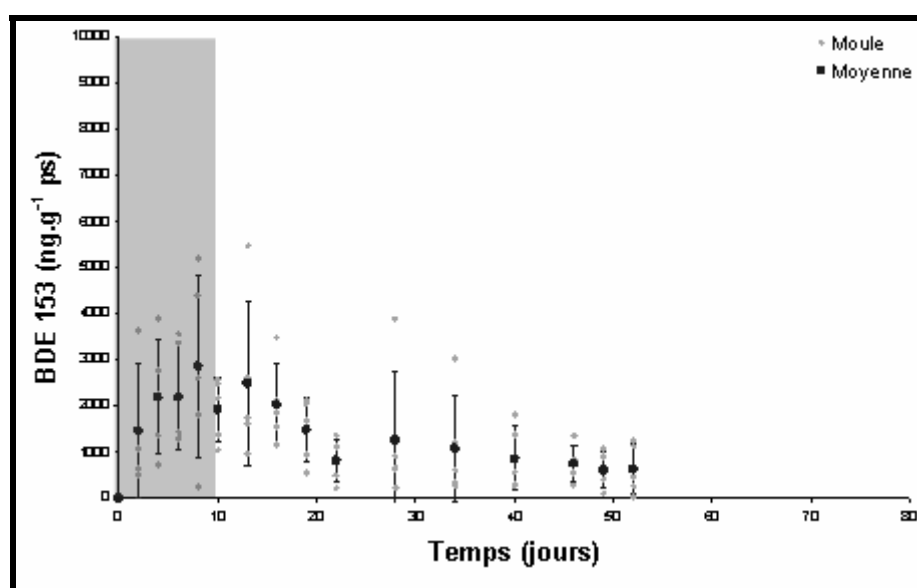


Figure 58 : Cinétique d'accumulation du BDE 153 dans les moules ($100\mu\text{g}\cdot\text{j}^{-1}$) exprimée en $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ ps.

I.2.7. Contamination par les HAP

Trois congénères de HAP (benzo(a)pyrène, chysène, fluoranthène) ont été utilisés pour ces expérimentations de contamination par voies trophiques, à deux concentrations, en tant que molécules modèles de référence.

I.2.7.1. Benzo(a)pyrène

I.2.7.1.a. Benzo(a)pyrène, $5\mu\text{g}$

Les 150 moules de la condition ont été nourries journalièrement avec 1 g de nourriture contaminée au BaP à la concentration de $5\,114 \pm 301\text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$, soit une dose de contaminant d'environ 34 ng par jour et par moule. Pendant cette période de contamination, la concentration de BaP augmente de 0 à $136\text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ ps (Figure 59). Les moules accumulent le benzo(a)pyrène pendant la période de contamination, puis l'éliminent progressivement dès la

fin de la période de contamination. Elles reviennent à un niveau de benzo(a)pyrène équivalent au niveau de départ (quelques nanogrammes) en 50 jours de dépuration. Ces phénomènes de dépuration ont déjà été observés après l'exposition de moules à des marées noires, les moules exposées après suppression des nappes de pétrole retrouvent relativement rapidement des niveaux de concentration en HAP normaux (Sorianoa *et al*, 2006).

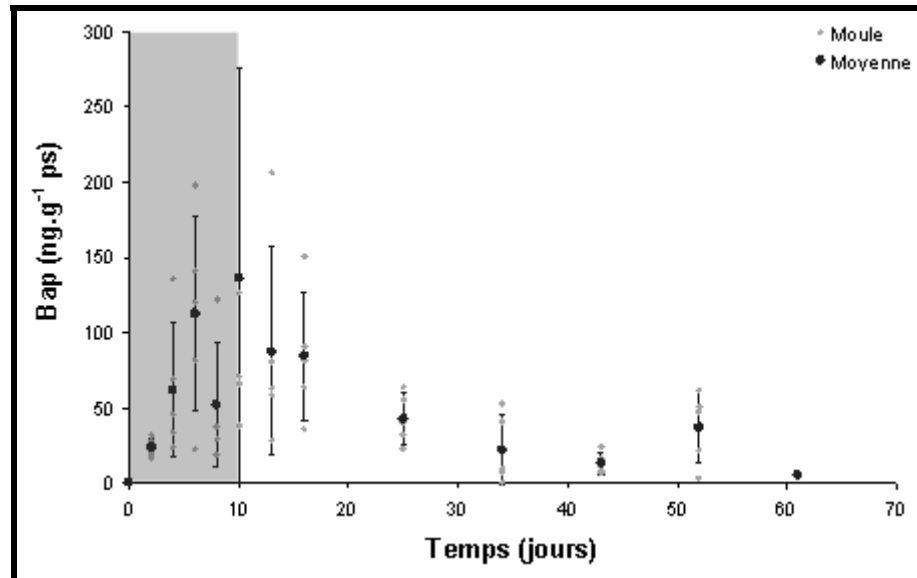


Figure 59 : Cinétique d'accumulation du BaP administré à une concentration théorique de $5\mu\text{g}/\text{j}^1$ exprimé en $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}\text{ ps}$ ($n=5$).

1.2.7.1.b. Benzo(a)pyrène, 100 µg

Cette condition d'exposition a été réalisée sur une période d'accumulation de 36 jours. Durant cette période, les 150 moules de la condition ont été nourries journalièrement avec 2g de nourriture contaminée au benzo(a)pyrène ($105\,700 \pm 1\,100 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$), soit une dose de contaminant d'environ 1 409 ng par jour et par moule. Pendant cette période de contamination, la concentration de benzo(a)pyrène augmente de 0 à $14\,461 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}\text{ ps}$ (Figure 60). Il est intéressant de noter que les écarts de concentration observés entre les moules sont plus importants pendant la phase de contamination que pendant la phase de dépuration. Comme pour la plus faible concentration, les moules accumulent le benzo(a)pyrène pendant la période d'exposition, puis l'éliminent progressivement dès qu'elles sont nourries avec de la nourriture saine. La période de dépuration de 50 jours n'est pas suffisante pour que les moules éliminent l'intégralité du composé, le niveau de contamination final reste de l'ordre de $4000 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}\text{ ps}$.

Pour pouvoir comparer les niveaux de contamination obtenus lors des deux types d'expérimentations, le même calcul que précédemment dans le cas du CB 153 a été réalisé. Les concentrations obtenues dans les tissus à t_9 et t_{10} lors de l'exposition de 36 jours ont été moyennées, afin de les comparer avec celles obtenues à t_{10} dans l'exposition de 10 jours.

Ainsi le rapport de concentration dans la nourriture entre les deux conditions est de 40, alors que le rapport de concentration entre les moules les plus contaminées des deux conditions est de l'ordre de 19.

Comme dans le cas du CB 77 et du BDE 153, l'accumulation est moins importante lorsque la concentration d'exposition augmente. Les mêmes hypothèses peuvent être avancées pour expliquer ce phénomène, soit il existe un mécanisme de saturation chez la moule, soit les mécanismes de dépuración sont plus efficaces à forte concentration qu'à faible concentration d'exposition.

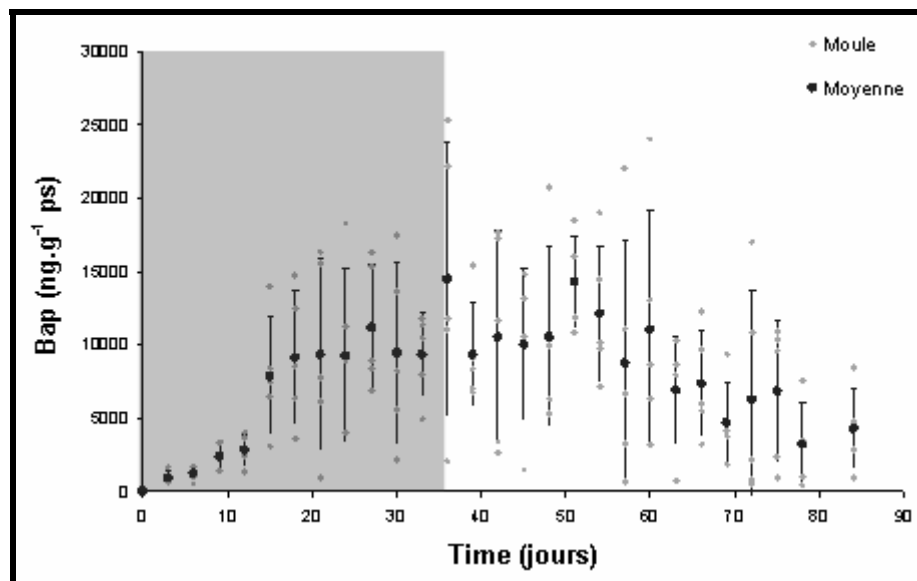


Figure 60 : Cinétique d'accumulation du benzo(a)pyrène ($200 \mu\text{g}/\text{j}^{-1}$) exprimée en $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ ps.

I.2.7.2. Chrysène

I.2.7.2.a. Chrysène, $5 \mu\text{g}$

Les 150 moules de la condition ont été nourries journalièrement avec 1 g de nourriture contaminée au chrysène à la hauteur de $4\,076 \pm 145 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$, soit une dose de contaminant d'environ 27 ng par jour et par moule. Pendant cette période de contamination, la concentration de chrysène augmente de 12 à $64 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ ps (Figure 61). Les moules accumulent le chrysène pendant la période de contamination de 10 jours, puis l'éliminent progressivement dès la fin de la contamination. Elles reviennent à un niveau de chrysène quasi équivalent au niveau de départ en 50 jours de dépuración, aux alentours de $20 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ ps. Au vu de ces premiers résultats, les moules semblent avoir la capacité d'éliminer rapidement les HAP accumulés. La tendance observée pour le chrysène est similaire à celle mis en évidence pour le BaP.

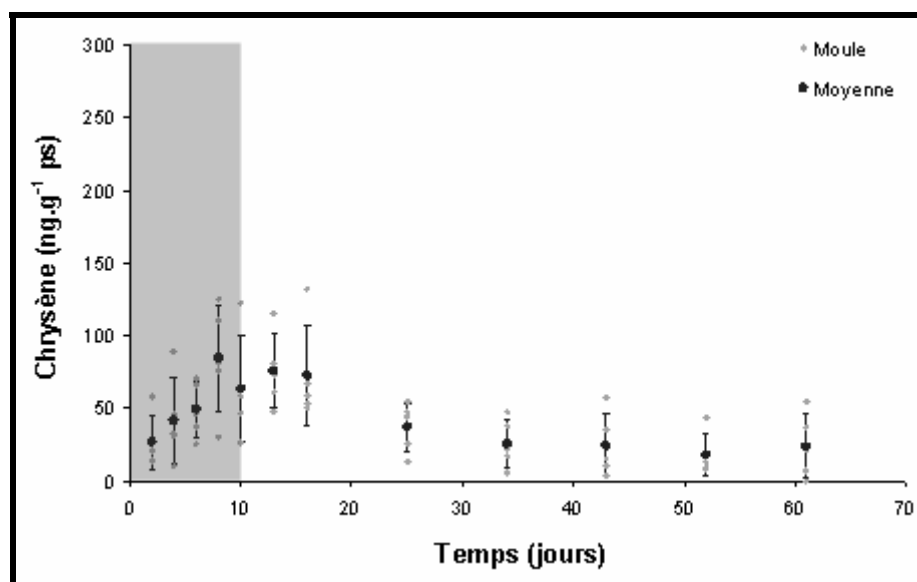


Figure 61 : Cinétique d'accumulation du chrysène administré à une concentration théorique de $5 \mu\text{g}\cdot\text{j}^{-1}$ exprimée en $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ ps ($n=5$).

1.2.7.2.b. Chrysène, 100 μg

Cette condition d'exposition a été réalisée sur une période d'accumulation de 36 jours, durant laquelle 150 moules ont été nourries journalièrement avec 2 g de nourriture contaminée au chrysène à une concentration de $82\,600 \pm 2\,200 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$, soit une dose de contaminant d'environ 1 101 ng par jour et par moule. Pendant cette période de contamination, la concentration de chrysène augmente de 0 à $4137 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ ps (Figure 62). Comme pour la plus faible concentration en chrysène, les moules accumulent le chrysène pendant la période d'exposition, puis l'éliminent progressivement dès qu'elles sont nourries avec de la nourriture saine. La période de dépuración de 50 jours n'est pas suffisante pour que les moules éliminent l'intégralité du composé, la concentration en chrysène se maintient autour de $1\,000 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ ps.

Afin de comparer les niveaux de contamination obtenus dans les moules lors des deux concentrations d'exposition, le même calcul que précédemment a été réalisé. Les concentrations obtenues dans les moules à t_9 et t_{10} lors de l'exposition à la plus forte concentration ont été moyennées afin de les comparer avec celle obtenue à t_{10} dans le cas de la plus faible concentration. Ainsi le rapport entre les deux quantités de chrysène administrées par jour aux moules est de l'ordre de 40 alors que le rapport entre les concentrations dans les moules est de l'ordre de 25. Les hypothèses expliquant cette différence de rapport sont les mêmes que celles avancées précédemment pour le CB 77, le BDE 153 et le BaP.

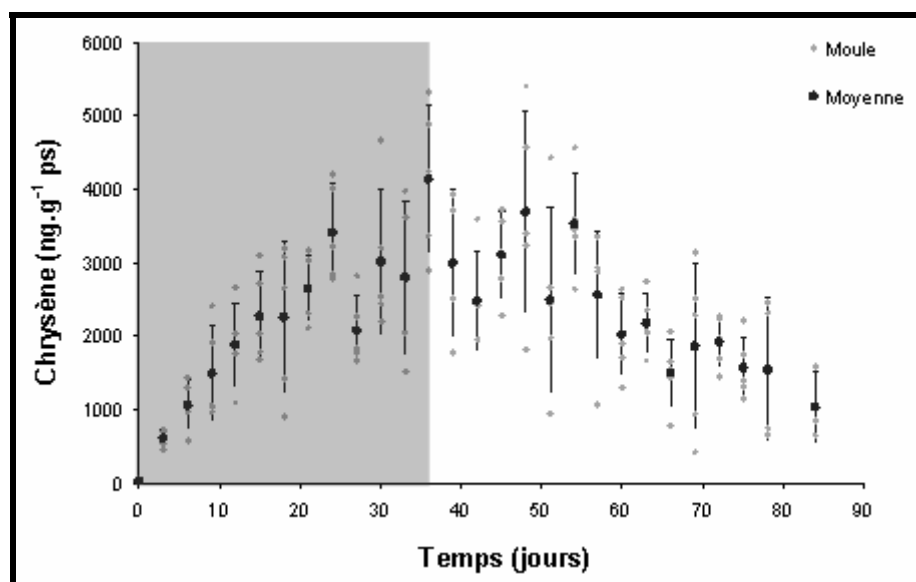


Figure 62 : Cinétique d'accumulation du chrysène administré à une concentration théorique de $200 \mu\text{g.j}^{-1}$ exprimée en $\text{ng.g}^{-1} \text{ps}$.

I.2.7.3. Fluoranthène

I.2.7.3.a. Fluoranthène, $5 \mu\text{g}$

Pour cette condition, les 150 moules ont été nourries journalièrement avec 1 g de nourriture contaminée au fluoranthène à une concentration de $4757 \pm 82 \text{ ng.g}^{-1}$, soit une dose de contaminant d'environ 31 ng par jour et par moule. Pendant cette période de contamination de 10 jours, la concentration du fluoranthène augmente de 9 à $68 \text{ ng.g}^{-1} \text{ps}$ (Figure 63).

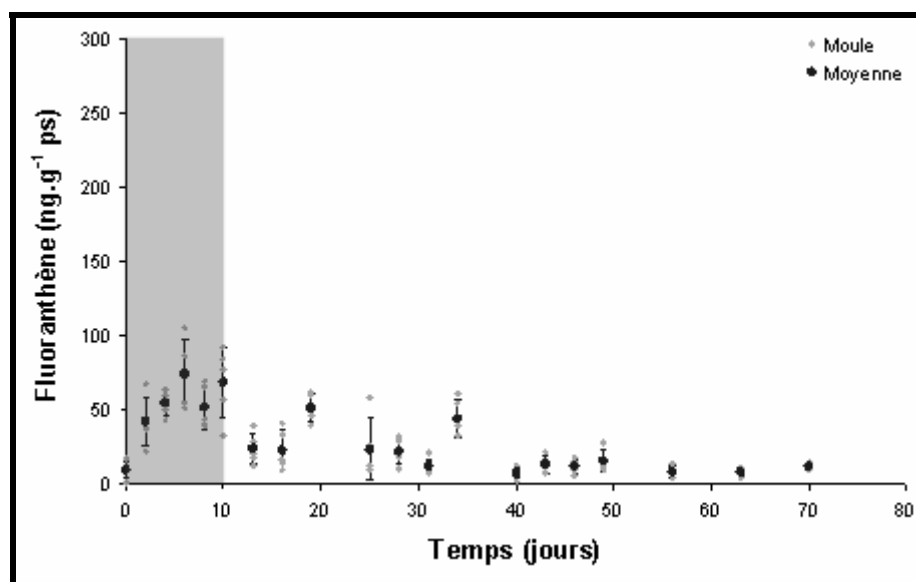


Figure 63 : Cinétique d'accumulation du Fluoranthène administré à une concentration théorique de $5 \mu\text{g.j}^{-1}$ exprimée en $\text{ng.g}^{-1} \text{ps}$ ($n=5$).

Comme pour les autres HAP, les moules accumulent le fluoranthène pendant la période de contamination, la concentration de fluoranthène accumulé par les moules à t_{10} est équivalente à celle du chrysène. Durant la phase de dépuración, les moules éliminent

progressivement le fluoranthène dès la fin de la contamination. Les moules reviennent à leur niveau initial de contamination d'une dizaine de nanogrammes après 30 jours de dépuración, aucune contamination résiduelle n'est observée. Cela confirme les tendances observées dans les moules après une marée noire (Sorianoa *et al*, 2006).

1.2.7.3.b. Fluoranthène, 100 μg

Les 150 moules de la condition ont été nourries journalièrement avec 1 g de nourriture contaminée au fluoranthène à une concentration de $115\,559 \pm 6572 \text{ ng.g}^{-1}$, soit une dose de contaminant d'environ 770 ng par jour et par moule. Pendant cette période de contamination, la concentration du fluoranthène augmente de 9 à 1457 ng.g^{-1} ps (Figure 64). Comme démontré précédemment, les moules éliminent le fluoranthène, mais le temps de dépuración n'est pas suffisant pour qu'elles retrouvent leur niveau de contamination initiale. Leur niveau de contamination diminue jusqu'à atteindre une centaine de nanogrammes par gramme, ce qui correspond au niveau de contamination après deux jours de contamination.

Le rapport entre les deux concentrations de fluoranthène dans la nourriture est de l'ordre de 20 et le rapport entre les niveaux de contamination des moules au bout du dixième jour d'exposition est quasiment du même ordre de grandeur (25). Pour le fluoranthène, ces deux rapports ne sont donc pas foncièrement différents. Dans ce cas, il semblerait qu'aucun mécanisme de saturation ou d'accélération de la dépuración n'apparaisse à la plus forte concentration d'exposition.

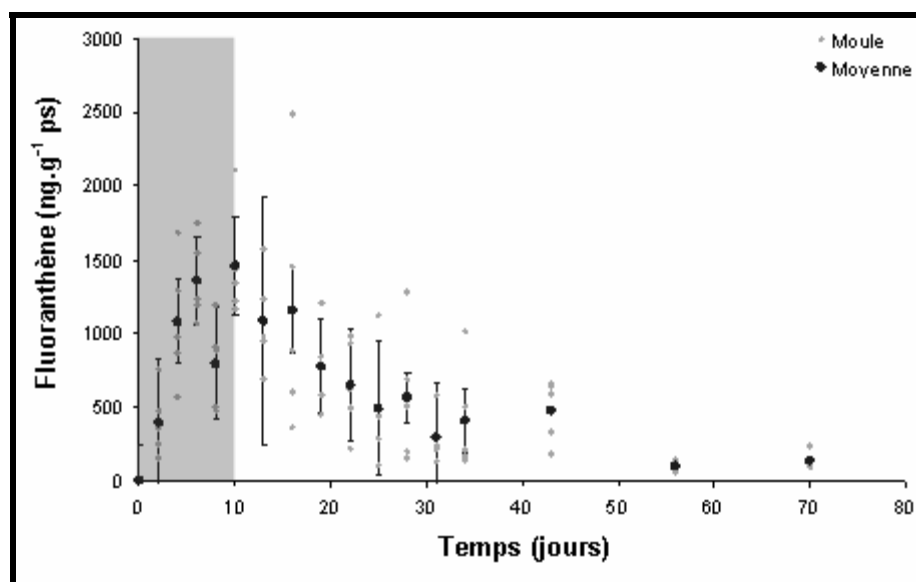


Figure 64 : Cinétique d'accumulation du fluoranthène administré à une concentration théorique de $100 \mu\text{g/j}^{-1}$ exprimée en ng.g^{-1} ps (n=5).

I.2.8. Comparaison de l'accumulation des PCB, des PBDE et des HAP chez la moule.

I.2.8.1. Rapport d'incorporation des composés étudiés

Les pourcentages d'incorporation des composés étudiés dans les tissus de moules ont été calculés Tableau 23 selon la formule suivante :

$$R_i = \frac{Q_{\text{organisme}}}{Q_{\text{tot administrée}}}$$

Où R_i est le rapport d'incorporation du composé étudié à l'instant t (%)
 $Q_{\text{organisme}}$ est la quantité dans l'organisme à l'instant t (ng)
 $Q_{\text{tot administrée}}$ est la quantité totale administrée à l'instant t (ng)

Ces rapports d'incorporation calculés après 10 jours d'exposition sur voie trophique au différents contaminants étudiés (CB 77, CB 153, BDE 47, BDE 153, BaP, chrysène et fluoranthène) oscillent de 6 % à 46 % en fonction des composés et de la concentration d'exposition. Il faut cependant garder à l'esprit que ce pourcentage d'incorporation prend en compte les pertes de composés dues au design expérimental (dilution de la nourriture dans l'eau, accessibilité de la nourriture aux moules), de la capacité d'évitement des moules aux molécules contaminées et de la capacité de dépuración, ce qui conduit à une sous estimation de la capacité réelle d'incorporation des moules.

	Quantité totale administrée par moule pendant 10 jour (ng)	Quantité accumulée par moule après 10 jours (ng)	Rapport d'incorporation du composé (%)
CB 77 5 µg	309 ± 4	120 ± 78	39
CB 77 100 µg	5 952 ± 676	417 ± 145	7
CB 153 5 µg	303 ± 10	135 ± 48	44
CB 153 100 µg	7 833 ± 733	3617 ± 2459	46
BDE 47 5 µg	261 ± 7	52 ± 14	20
BDE 47 100 µg	4 501 ± 132	1849 ± 1849	41
BDE 153 5 µg	184 ± 45	31 ± 7	17
BDE 153 100 µg	4 653 ± 119	385 ± 134	8
BaP 5 µg	341 ± 20	86 ± 68	25
BaP 100 µg	12 684 ± 132	950 ± 304	7
Chrysène 5 µg	272 ± 10	38 ± 26	14
Chrysène 100 µg	9 912 ± 264	593 ± 254	6
Fluo 5 µg	317 ± 5	36 ± 12	11
Fluo 100 µg	7 704 ± 438	554 ± 188	7

Tableau 23 : Pourcentage d'incorporation des composés étudiés par les moules.

Ces pourcentages d'incorporation ont été également calculés pour les composés analysés du pyralène présentant une accumulation significative. Ces rapports calculés durant l'exposition au pyralène vont permettre de comparer le comportement des composés administrés individuellement et en mélange (pyralène).

	Quantité totale administrée par moule pendant 10 jour (ng)	Quantité totale accumulée par moule après 10 jour (ng)	Rapport d'incorporation du composé (%)
CB 101	55	28	51
CB 154 + 77	31	23	75
CB 118	96	7	7
CB 153	115	50	44
CB 138	98	41	42
CB 180	115	17	15
7 PCB	516	174	34

Tableau 24 : Pourcentage d'incorporation des composés du pyralène par les moules.

Le composé présentant le plus fort rapport d'incorporation est le CB 153, molécule connue pour être très fortement bioaccumulable et peu métabolisée (log Kow : 6,9). Le rapport d'incorporation retrouvé dans le cadre du mélange est équivalent à celui retrouvé dans le cadre des expositions individuelles (environ 45 %). La quantité de CB 153 accumulé par les moules semble donc directement proportionnelle à la quantité administrée, sans effet de la concentration en CB 153, ni de l'administration en mélange. Ce phénomène peut se rapprocher du fait que le CB 153 est un composé très rémanent et très difficilement dégradable de par la position des atomes de chlore sur le biphenyle (Kannan *et al.*, 1995).

Ensuite, les rapports d'incorporation les plus élevés sont observés au niveau du BDE 47 (log Kow : 6,2), laissant présager une forte capacité d'accumulation de ce composé dans les réseaux trophiques aquatiques naturels. Les PBDE ont pourtant été synthétisés pour être plus facilement biodégradés que les PCB, et donc *a priori* moins s'accumuler.

Pour les autres composés CB 77, BDE 153, fluoranthène, chrysène et BaP, globalement le pourcentage d'incorporation est toujours plus élevé à la faible dose de contamination qu'à la forte dose. Plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour expliquer cette différence d'incorporation entre la faible et la forte dose d'exposition. Un mécanisme de "protection" des moules peut être envisagé, exposées à des concentrations en contaminant trop élevées, les bivalves ne filtreraient pas en continu ou n'absorbent pas la nourriture trop contaminée. Ce type de phénomène a été mis en évidence lors d'exposition aux métaux par voie dissoute, où des bivalves exposés à des concentrations élevées de contaminants ferment leurs valves, diminuant ainsi leur temps de filtration (Trans *et al.*, 2003). Une autre hypothèse est l'atteinte d'un seuil maximal de contamination qui a pu être atteint lors de fortes concentrations d'exposition. Ce seuil pourrait être lié à deux types de phénomènes, soit une saturation de la capacité de stockage ou d'accumulation des moules, soit une augmentation des mécanismes de dépuración lors de l'exposition aux fortes doses conduisant à une accumulation moindre. Cet effet de la quantité de CB 77 administrée sur la quantité de CB 77

accumulée semble se confirmer par la comparaison des rapports d'incorporation entre le pyralène (CB 77 au sein d'un mélange) et le composé administré individuellement. Plus la quantité administrée est faible, plus le rapport d'incorporation est élevé. Cependant, l'analyse du CB 77 dans le cadre de l'exposition au pyralène est rendue difficile à cause de la coélution analytique du CB 77 avec le CB 154 également présent dans le pyralène.

En ce qui concerne les autres composés analysés dans le cadre de l'exposition au pyralène, le CB 180 présente un rapport d'incorporation de l'ordre de 15 %, alors que ce composé fait partie des composés très difficilement métabolisables, il appartient au groupe 1 défini par Kannan (Kannan *et al.*, 1995) (Composés non métabolisables ne possédant pas d'atomes de carbone vicinaux libres). Le CB 180 fait partie des PCB majoritairement retrouvés dans le biota. Son rapport d'incorporation relativement faible laisse penser que les concentrations importantes retrouvées dans les organismes vivants viennent du fait que le CB 180 ne soit pas ou peu métabolisable et donc pas ou peu éliminé une fois dans l'organisme.

Le CB 101 présente un rapport d'incorporation de plus de 50%. Ce composé appartient au groupe 2 défini par Kannan, métabolisable par CYP 450 2B et présence d'atomes de carbone vicinaux libres en positions méta et para (Kannan *et al.*, 1995). Cependant, dans le cadre de l'exposition au pyralène, il apparaît comme potentiellement rémanent, car il n'est pas ou peu éliminé au terme de la période de déuration.

Le CB 138 appartenant au groupe 3 défini par Kannan (métabolisable par CYP 450 2B possédant des atomes de carbone vicinaux libres en positions ortho et méta) présente un rapport d'incorporation de 42% équivalent à celui retrouvé pour le CB 153. Aucune tendance de déuration claire n'a pu être mise en évidence au cours de l'exposition au pyralène, confirmant la rémanence du CB 138 dans les organismes. Le CB 138, avec le CB 153 et le CB 180, fait partie des PCB majoritaires dans le biota.

Le CB 118 appartient également au groupe 3 (métabolisable par CYP 450 1A et 2B, possédant des atomes de carbone vicinaux libres en position ortho et méta, facilement métabolisable) et contrairement aux autres composés inclus dans les 7 PCB prioritaires (CB 28, CB 52, CB 101, CB 138, CB 153 et CB 180), sa conformation spatiale est de type coplanaire (PCB "dioxine like"). Le CB 118 présente un rapport d'incorporation faible de moins de 10%, ce qui semble confirmer la facilité de dégradation de ce composé. À la vue de ces premiers résultats, la conformation chimique des molécules semble être un paramètre important pour l'explication des phénomènes d'accumulation. Le log Kow des composés étudiés n'est pas suffisant pour prédire leur accumulation.

I.2.8.2. Paramètres toxicocinétiques

Afin de confirmer les interprétations obtenues par les rapports d'intégration, les constantes d'accumulation (k_1) et de dépuration (k_d) ont été calculées grâce à l'outil statistique Crystal ball[®] par E. Alonso et J.S.V. Tarazona (INIA, Madrid). Les résultats obtenus sont présentés Tableau 25. Les constantes ont été calculées d'après les concentrations en contaminants retrouvées dans les moules exprimées ng.g^{-1} ps.

Composés	$C_{\text{nourriture}}$	k_d	k_1
Benzo (a) pyrène	100 $\mu\text{g.g}^{-1}$	0.0203 (0.0053)	5.878 (1.607)
	5 $\mu\text{g.g}^{-1}$	0.0630 (0.0238)	3.117 (2.249)
Chrysène	100 $\mu\text{g.g}^{-1}$	0.0212 (0.0032)	1.528 (0.245)
	5 $\mu\text{g.g}^{-1}$	0.0315 (0.0076)	2.311 (1.006)
Fluoranthène	100 $\mu\text{g.g}^{-1}$	0.0546 (0.009)	1.681 (0.528)
	5 $\mu\text{g.g}^{-1}$	0.0357 (0.0062)	2.049 (0.706)
CB 153	100 $\mu\text{g.g}^{-1}$	Non calculée	Non calculée
	5 $\mu\text{g.g}^{-1}$	0.0018 (0.0017)	6.891 (2.663)
CB 77	100 $\mu\text{g.g}^{-1}$	0.0031 (0.0011)	0.725 (0.292)
	5 $\mu\text{g.g}^{-1}$	0.0056 (0.0018)	4.481 (2.462)
BDE 153	100 $\mu\text{g.g}^{-1}$	0.0326 (0.0086)	4.493 (2.711)
	5 $\mu\text{g.g}^{-1}$	0.0289 (0.0084)	7.898 (3.656)
BDE 47	100 $\mu\text{g.g}^{-1}$	0.0073 (0.0065)	13.55 (9.657)
	5 $\mu\text{g.g}^{-1}$	0.0109 (0.004)	7.123 (2.326)

Tableau 25 : Paramètres toxicocinétiques calculés par E. Alonso et J.S.V. Tarazona (INIA).

Pour plus de lisibilité, les constantes d'accumulation k_1 ont été reportées en fonction du log Kow des composés étudiés Figure 65.

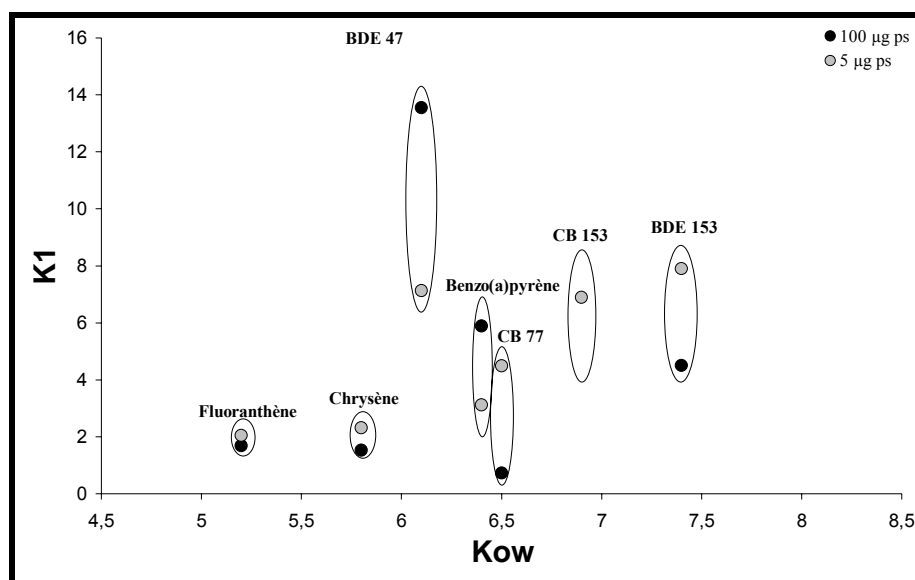


Figure 65 : Constantes d'accumulation k_1 calculées pour les données de contamination des moules exprimées en ng.g^{-1} ps.

Les constantes de dépuration k_d ont été également calculées, les résultats obtenus sont présentés en fonction des log Kow des composés (Figure 66). Le composé présentant la constante de dépuration la plus faible est le CB 153. Cela confirme le fait que les moules n'éliminent pas ou quasiment pas le CB 153 dans le cadre de nos expérimentations.

Cela confirme la forte rémanence de ce composé dans les réseaux trophiques aquatiques, le CB 153 est le PCB majoritairement retrouvé dans le biota.

Le CB 77 présente des constantes de dépuración faibles, les moules éliminent donc ce composé difficilement. Il est d'ailleurs peu retrouvé dans le biota lors des suivis environnementaux.

Le BDE 47 lui aussi présente des constantes de dépuración faibles, mais supérieures à celles calculées pour les PCB étudiés. Le BDE 47, en plus de sa forte capacité d'accumulation, ne semble pas être éliminé aisément par les moules. Cela confirme la forte capacité de rémanence de ce composé dans les réseaux trophiques aquatiques. Le BDE 153 et les HAP étudiés présentent des constantes de dépuración plus élevées, prouvant la capacité des moules à éliminer ces composés.

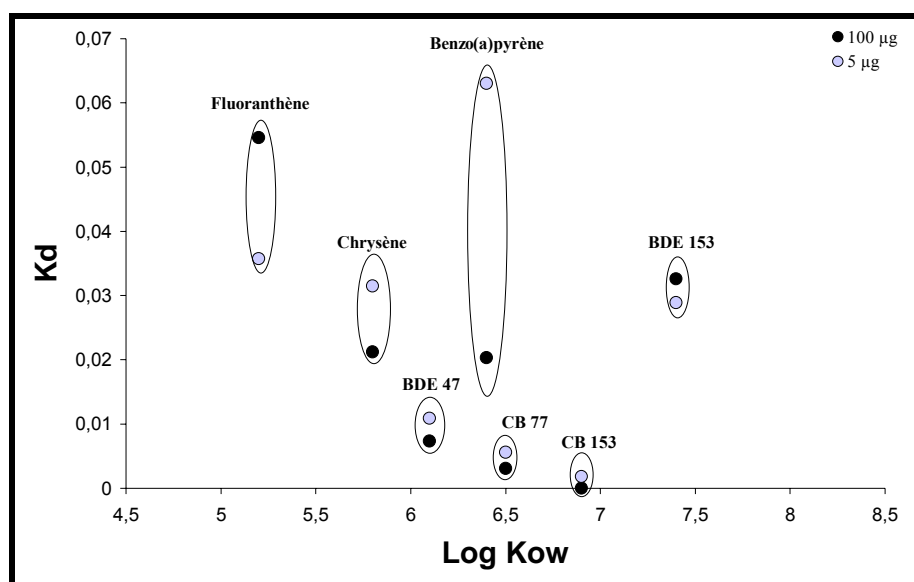


Figure 66 : Constantes de dépuración (k_d) calculées pour les données de contamination des moules exprimées en $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}\text{ ps}$.

Gustafsson *et al.* (1999) ont réalisé une expérimentation similaire sur des moules nourries par des algues contaminées en PCB et PBDE (Figure 67). Leurs résultats mettent en évidence un taux de dépuración du BDE 47 équivalent à celui du BDE 153 alors que nos résultats montrent une nette différence d'efficacité de dépuración entre ces deux composés. Pour une contamination en BDE 47 de 45 jours (à $100\ \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de nourriture par jour), ils observent une dépuración quasi-totale trente jours après l'arrêt de la contamination des moules. Le reste des résultats obtenus est concordant avec les nôtres. Quand on considère la rémanence du BDE 47 dans l'environnement, et notamment dans les moules en milieu naturel, on peut néanmoins penser que le BDE 47 est moins facilement éliminé que le BDE 153 (Johansson *et al.*, 2006). Ces observations environnementales sont en accord avec nos résultats expérimentaux.

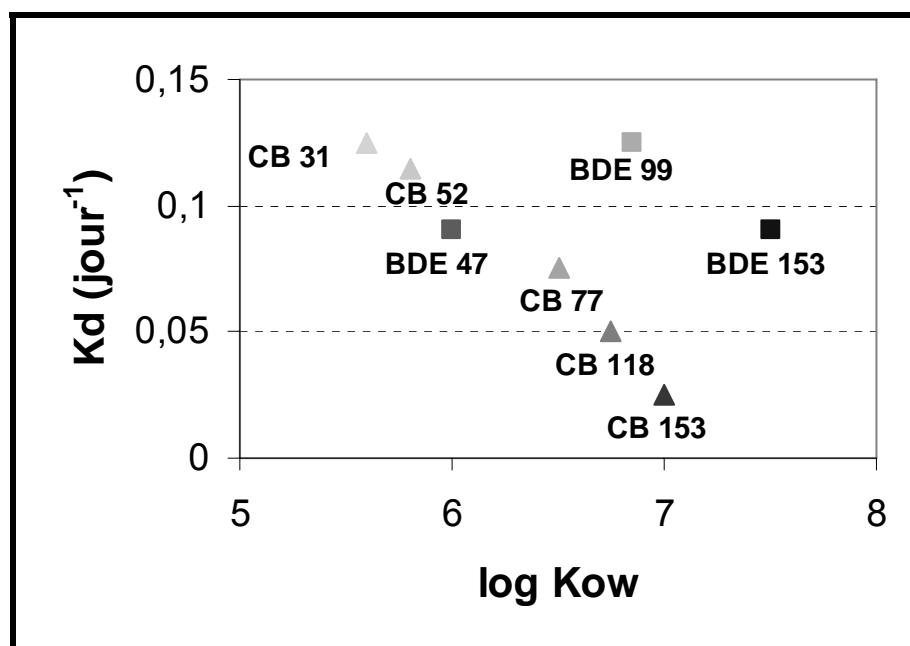


Figure 67 : Constantes de dépuración (k_d) calculées par Gustafson *et al.* (1999).

I.2.8.3. Modélisation

Les données acquises lors des expérimentations d'exposition à des congénères de PCB, PBDE et HAP par voie trophique des moules ont permis à E. Alonzo et J.V. Tarazona (INIA, Madrid) de valider un modèle dynamique permettant d'estimer la bioamplification des substances chimiques toxiques à travers la chaîne alimentaire dans les systèmes aquatiques. Le modèle, réalisé à partir du logiciel Microsoft Excel, simule l'accumulation de contaminants suivant une cinétique de 1^{er} ordre pour chacune des proies et des prédateurs d'un même écosystème. Dans le cadre de cette étude, le modèle a été utilisé comme modèle mono-compartimental. Les résultats obtenus pour les PCB sont présentés Figure 68, les résultats des PBDE Figure 69 et les résultats pour les HAP Figure 70.

Les simulations mathématiques obtenues pour l'ensemble des composés analysés sont en adéquation avec les résultats expérimentaux, que les données obtenues soient exprimées en ng.g^{-1} ps ou en ng.g^{-1} lipide, excepté pour les données du fluoranthène 5 μg exprimées en ng.g^{-1} lipide. Le modèle développé permet donc bien de prévoir l'accumulation des PCB, des PBDE et des HAP dans les moules.

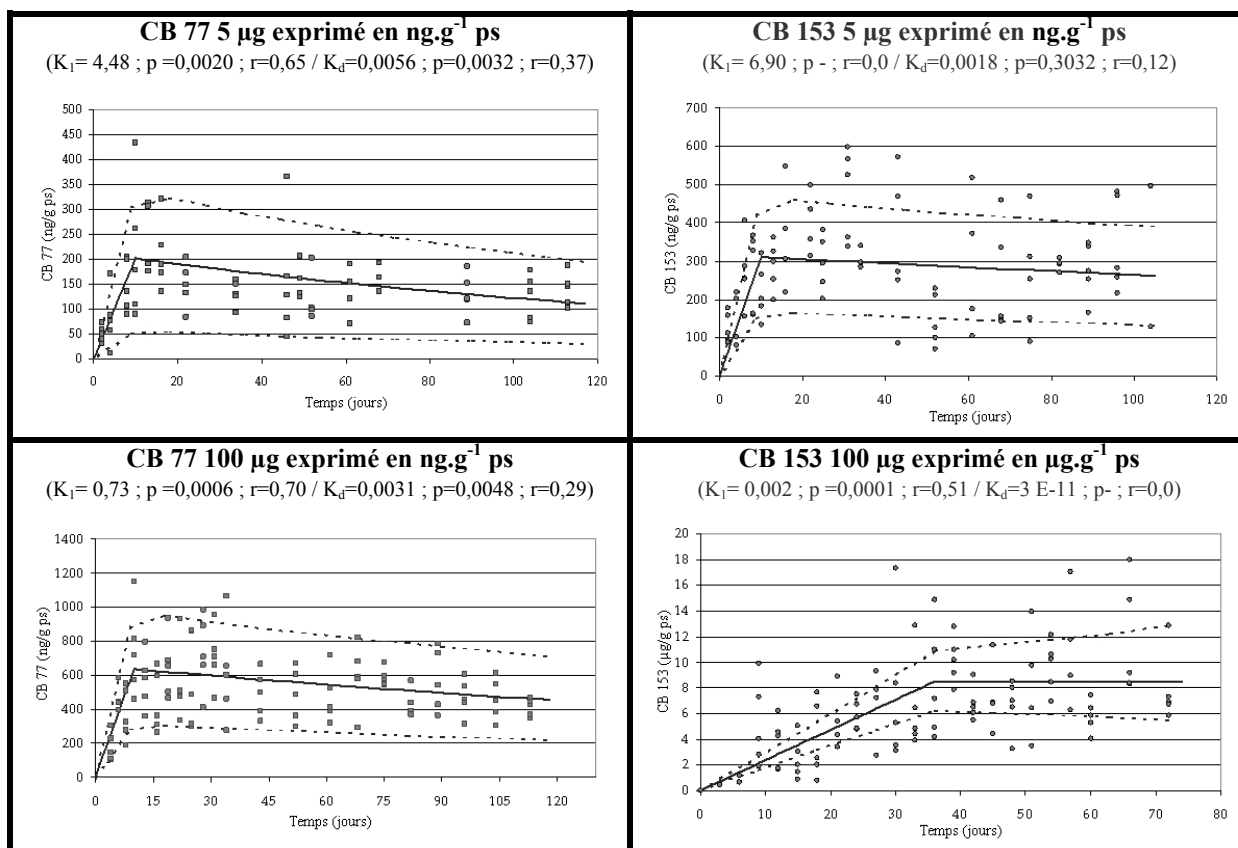


Figure 68 : Représentation des simulations obtenues par le modèle pour les données en PCB des expérimentations dans les moules. La ligne pleine représente la concentration en contaminant estimée par le modèle et les lignes pointillées correspondent aux percentiles estimés (10th et 90th).

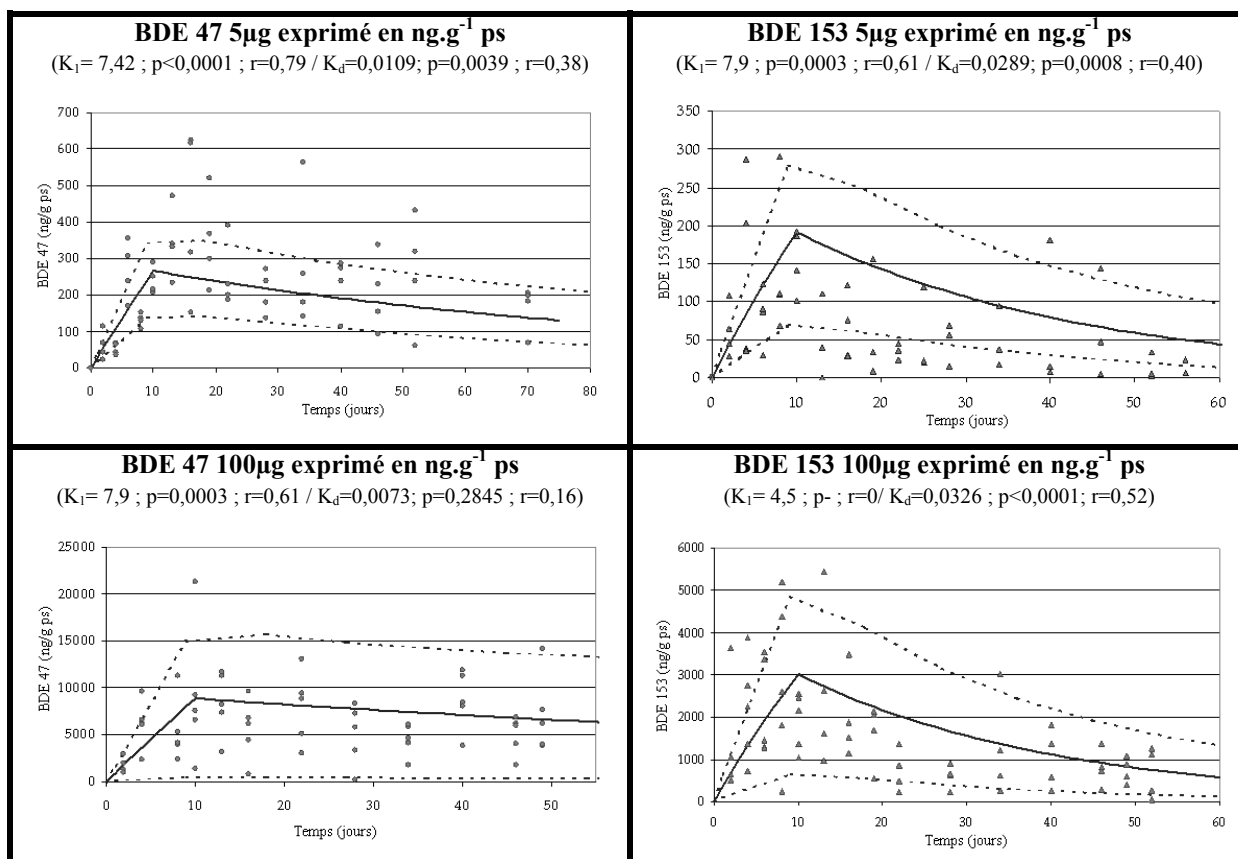


Figure 69 : Représentation des simulations obtenues par le modèle pour les données en PBDE des expérimentations dans les moules. La ligne pleine représente la concentration en contaminant estimée par le modèle et les lignes pointillées correspondent aux percentiles estimés (10th et 90th).

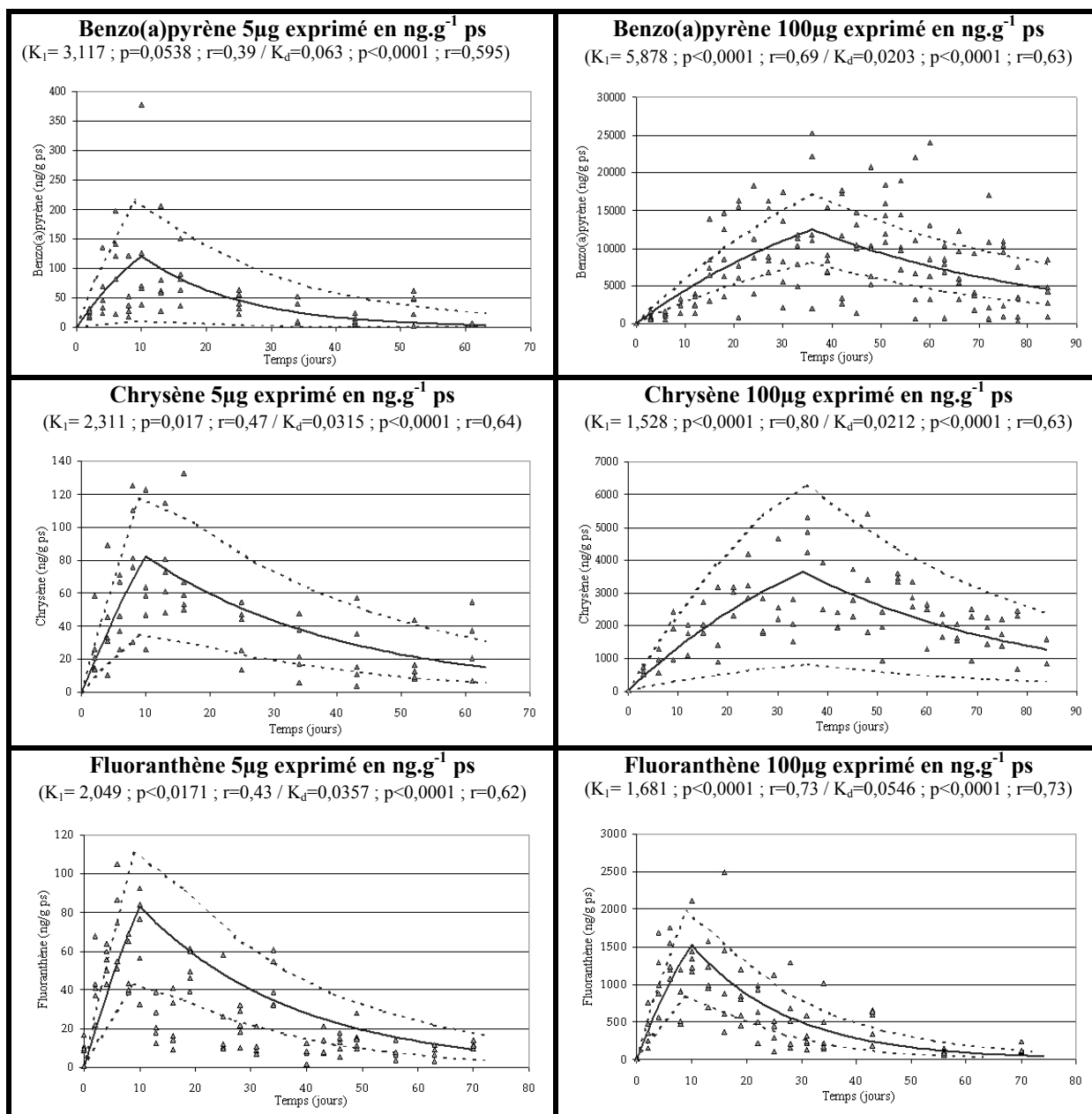


Figure 70: Représentation des simulations obtenues par le modèle pour les données en HAP des expérimentations dans les moules. La ligne pleine représente la concentration en contaminant estimé par le modèle et les lignes pointillées correspondent aux percentiles estimés (10th et 90th).

I.3. Les daurades

I.3.1. Contamination réelle de la nourriture

Les 130 daurades ont été contaminées par chaque contaminant à deux niveaux de concentration, 5 et 100 µg par ration de nourriture. Les résultats de l'analyse des flacons de contrôle réalisée pour caractériser la contamination réelle des aliquotes de nourriture sont présentés Tableau 26.

		Contamination moyenne de la nourriture (ng.g ⁻¹)	Temps de contamination (jours)	Masse de granulés par jour (g)	Quantité de contaminant par daurade et par jour (ng)
CB 77 5µg		1 448 ± 28	10	3	33
CB 77 100 µg		35 214 ± 1737	10	3	812
CB 153 5 µg		1 438 ± 119	10	3	33
CB 153 100 µg		6 710 ± 446	36	7	361
BDE 47 5 µg		1 662 ± 88	10	3	38
BDE 47 100 µg		31 903 ± 1287	10	3	736
BDE 153 5 µg		1 704 ± 90	10	3	39
BDE 153 100 µg		37 103 ± 378	10	3	856
BaP		9 955 ± 1830	36	6	459
Chrysène		8 233 ± 376	36	6	379
Pyralène	CB 50 +28	54 ± 5	10	3	1
	CB 52	350 ± 89	10	3	8
	CB 101	3 083 ± 86	10	3	71
	CB 154 + 77	2 207 ± 98	10	3	50
	CB 118	9 001 ± 350	10	3	210
	CB 153	8 768 ± 1149	10	3	202
	CB 138	9 009 ± 1209	10	3	207
	CB 180	10 430 ± 1336	10	3	240
	Somme 7 pcb	42 902 ± 4008	10	3	990

Tableau 26 : Niveau de contamination de la nourriture administrée aux daurades (n=5).

I.3.2. Contamination de l'eau

Comme dans le cas des moules, le niveau de contamination de l'eau des aquariums a été suivi pendant la période de contamination (Tableau 27). Là encore, on ne peut exclure qu'une infime partie de la contamination se soit réalisée par l'eau.

	t ₀	t _{final/2}	t _{final}
Benzo(a)Pyrène 100 µg	nd	3	3
Chrysène 100µg	nd	2	3
CB 77 5 µg	nd	nd	2
CB 153 5 µg	nd	nd	2
CB 153 100 µg	nd	nd	3
Pyralène	nd	5	6
BDE 47 5 µg	nd	2	2
BDE 47 100 µg	nd	2	3
BDE 153 5 µg	nd	nd	nd
BDE 153 100 µg	nd	nd	nd

Tableau 27 : Niveau de contamination de l'eau exprimé en ng.l⁻¹ pour chaque condition expérimentale (nd < 1 ng.l⁻¹).

I.3.3. Paramètres biométriques des daurades

La taille et le poids des poissons de chaque condition ont été suivis (Tableau 28). Aucune différence significative n'a été mise en évidence entre les poissons d'un même bloc expérimental. Il est aussi important de noter que les poissons ayant servi à mener les expérimentations du benzo(a)pyrène, du chrysène et du CB 153 100 µg sont plus gros que ceux utilisés pour les autres contaminants (respectivement 3/4 g et 1 g).

	t ₀		t ₁₀		t _{final}	
	Taille (mm)	Poids (g)	Taille (mm)	Poids (g)	Taille (mm)	Poids (g)
Témoin 1	48 ± 6	2,1 ± 0,4	63 ± 3	4,6 ± 0,5	81 ± 2	7,9 ± 4,3
BaP 100µg	61 ± 9	3,7 ± 1,0	63 ± 10	4,6 ± 2,4	68 ± 1	4,6 ± 1,1
Chrysène 100µg	60 ± 5	3,5 ± 1,2	62 ± 4	4,0 ± 1,2	83 ± 6	8,5 ± 1,4
Témoin 2	60 ± 3	3,8 ± 1,0	68 ± 2	5,0 ± 0,7	73 ± 7	6,0 ± 2,0
CB 153 100µg	64 ± 4	4,0 ± 1,0	66 ± 4	5,0 ± 1,0	79 ± 9	7,0 ± 2,0
Témoin 3	42 ± 2	0,8 ± 0,2	47 ± 3	1,3 ± 0,2	53 ± 5	2,6 ± 0,1
CB 153 5µg	40 ± 2	0,8 ± 0,1	46 ± 2	1,7 ± 0,7	55 ± 6	2,7 ± 0,7
CB 77 5µg	37 ± 3	0,6 ± 0,2	43 ± 5	1,4 ± 0,5	55 ± 4	2,8 ± 0,5
BDE 47 5µg	39 ± 2	0,8 ± 0,1	43 ± 3	1,3 ± 0,3	60 ± 4	3,5 ± 0,8
BDE 47 100µg	40 ± 1	0,8 ± 0,1	44 ± 6	1,6 ± 0,7	56 ± 2	2,7 ± 0,2
BDE 153 5µg	40 ± 1	0,8 ± 0,1	48 ± 5	1,4 ± 0,4	59 ± 7	3,4 ± 0,9
BDE 153 100µg	39 ± 1	0,8 ± 0,2	44 ± 2	1,2 ± 0,1	59 ± 4	3,3 ± 0,8
Pyralène	38 ± 1	0,8 ± 0,1	46 ± 8	1,4 ± 0,5	61 ± 4	3,8 ± 0,6

Tableau 28 : Données biométriques des daurades utilisées pour les différentes expérimentations (n=5).

Les teneurs lipidiques des daurades au cours des différentes expérimentations sont relativement homogènes (Tableau 29).

	t ₀	t ₁₀	t _{final}
Témoin 1	19 ± 1	26 ± 4	27 ± 2
Benzo(a)pyrène 100 µg	19 ± 1	26 ± 5	31 ± 3
Chrysène 100 µg	19 ± 1	26 ± 5	25 ± 9
Témoin 2	16 ± 2	17 ± 3	17 ± 4
CB 153 100 µg	16 ± 2	16 ± 2	18 ± 5
Témoin 3	15 ± 2	16 ± 1	17 ± 2
CB 153 5 µg	15 ± 2	16 ± 3	17 ± 3
CB 77 5 µg	15 ± 2	16 ± 4	13 ± 4
BDE 47 5 µg	15 ± 2	16 ± 6	11 ± 3
BDE 47 100 µg	15 ± 2	11 ± 3	15 ± 3
BDE 153 5 µg	15 ± 2	16 ± 3	17 ± 3
BDE 153 100 µg	15 ± 2	14 ± 2	15 ± 3
Pyralène	15 ± 2	12 ± 2	15 ± 5

Tableau 29 : Teneur lipidiques des daurades exprimées en % de lipide par gramme de poids sec (n=5).

I.3.4. Niveau de contamination des daurades témoins

Afin d'écarter une contamination d'origine non contrôlée, des aquariums contenant des daurades nourries avec de la nourriture saine ont été mis en place. A intervalle de temps réguliers, cinq daurades ont été prélevées, afin de suivre leur niveau de contamination. Les résultats obtenus lors de ces analyses sont présentés Tableau 30. Les niveaux obtenus pour les daurades témoins excluent toute contamination externe significative. Les résultats obtenus sur les daurades contaminées sont donc bien la résultante de l'expérimentation.

	t_0	$t_{\text{fin de contamination}}$	$t_{\text{fin d'expérimentation}}$
Benzo (a) Pyrène 100µg	nd	nd	nd
Chrysène 100µg	3	2	3
CB 77 5µg	nd	nd	nd
CB 77 100µg	nd	nd	nd
CB 153 5µg	17	17	16
CB 153 100µg	20	14	16
BDE 47 5µg	nd	nd	nd
BDE 47 100µg	nd	nd	nd
BDE 153 5µg	nd	nd	nd
BDE 153 100µg	nd	nd	nd
Pyralène	50	57	53

Tableau 30 : Niveau de contamination des daurades témoins exprimé en ng.g^{-1} ps (nd <1 ng.g^{-1}).

I.3.5. Contamination par les PCB

I.3.5.1. CB 77

I.3.5.1.a. CB 77, 5 µg

Les 130 poissons de la condition ont été nourris avec 3 g de nourriture préalablement contaminée au CB 77 à une concentration de $1\,448 \pm 28 \mu\text{g.g}^{-1}$, soit une dose journalière par poisson de 33 ng de CB 77. Les concentrations en CB 77 corrigées par le taux de croissance dans les daurades sont présentées Figure 71. La correction des concentrations par le taux de croissance des daurades permet de s'affranchir du phénomène de dilution pondéral lié à la croissance des poissons. Une augmentation directe de la concentration en CB 77 est observée après deux jours d'exposition. Ce niveau de contamination se maintient pendant toute la phase de contamination à une valeur moyenne de l'ordre de 300 ng.g^{-1} ps. Seuls trois poissons analysés à t_6 présentent des concentrations de l'ordre de 600 ng.g^{-1} ps, sortant de la tendance générale. Ces résultats prouvent l'intérêt de l'analyse individuelle de chaque poisson, une analyse en pool aurait masqué le phénomène. Pendant la phase de dépuraction, la concentration en CB 77 diminue brutalement à une valeur de 69 ng.g^{-1} ps dès t_{13} soit seulement trois jours après l'arrêt de la contamination. Ce niveau de concentration se maintient relativement constant autour d'une valeur de 50 ng.g^{-1} ps jusqu'à la fin de l'expérimentation à t_{70} .

Les daurades ne retrouvent donc pas leur niveau de contamination initial et semblent conserver un résidu de CB 77 non éliminable en 60 jours de dépuración. Ces résultats semblent démontrer une capacité d'élimination du CB 77 par les daurades.

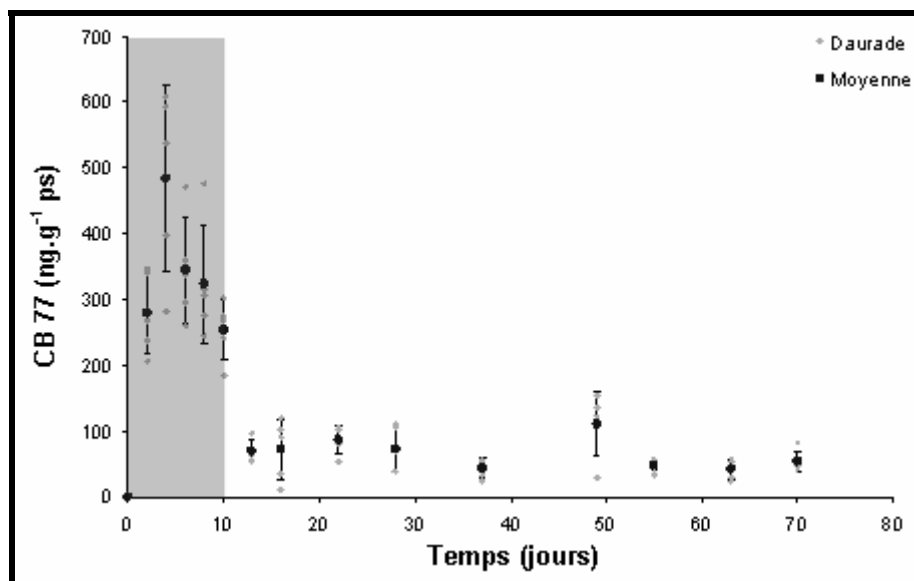


Figure 71 : Cinétique d'accumulation du CB 77 administré à une quantité théorique de $5 \mu\text{g.j}^{-1}$ corrigée par le taux de croissance, exprimée en $\text{ng.g}^{-1} \text{ps}$ ($n=5$).

La Figure 72 montre l'allure de la cinétique d'accumulation lorsque la concentration est exprimée en ng.g^{-1} de lipides. Comme dans le cas des moules, les teneurs lipidiques des daurades sont constantes au cours du temps, de l'ordre de $16 \pm 2\%$ de lipides par gramme de matière sèche. La correction par la teneur lipidique ne modifie pas l'allure de la cinétique d'accumulation et de dépuración du CB 77. Ce type d'expression des résultats en ng.g^{-1} lipides ne sera donc pas reproduit pour illustrer les résultats obtenus au cours des expositions des daurades aux autres contaminants.

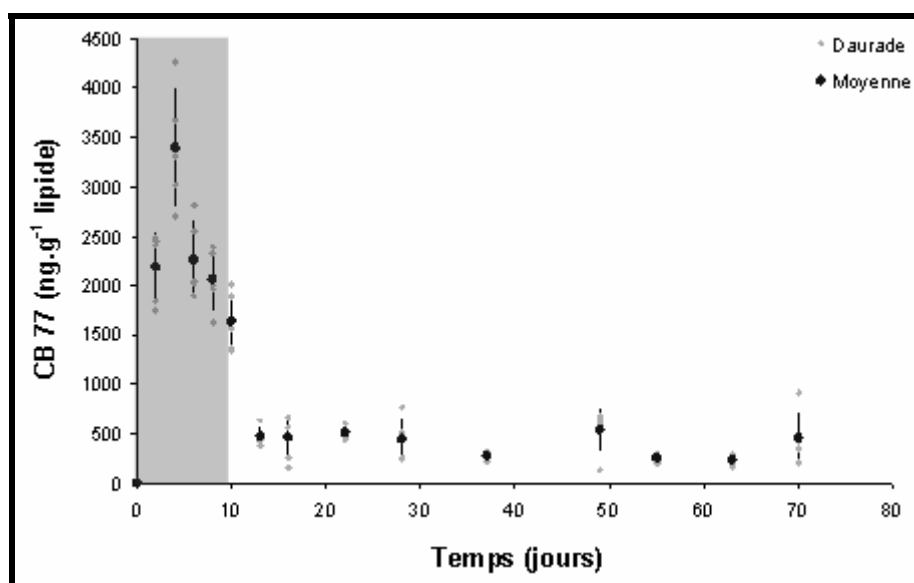


Figure 72 : Cinétique d'accumulation du CB 77 administré à une quantité théorique de $5 \mu\text{g.j}^{-1}$ corrigée par le taux de croissance, exprimée en ng.g^{-1} lipides ($n=5$).

I.3.5.1.b. CB 77, 100 µg

Pour ce niveau de concentration, les poissons ont cessé de s'alimenter au bout du quatrième jour. De plus, une forte mortalité a été observée pour les individus de cette condition et des déformations au niveau des nageoires et de la queue sont apparues chez les daurades (Figure 73). La contamination CB 77 100 µg a été interrompue, aucun résultat d'accumulation n'est présenté ici.

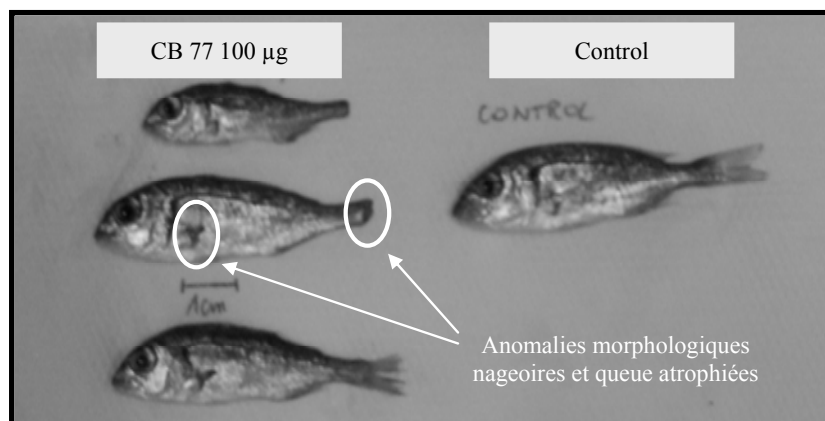


Figure 73 : Anomalies morphologiques au niveau des nageoires et de la queue des daurades exposées au CB 77 100 µg.

I.3.5.2. CB 153**I.3.5.2.a. CB 153, 5 µg**

Pour cette condition, 130 poissons ont été nourris pendant 10 jours avec 3 g de nourriture préalablement contaminée au CB 153 à une concentration de $1\,438 \pm 119 \text{ ng.g}^{-1}$, soit une dose journalière par poisson de 33 ng de CB 153. L'accumulation du CB 153 pendant la phase d'accumulation est régulière, le niveau de contamination des poissons passe de 17 à 1 522 ng. Puis, peu à peu, la concentration dans les poissons diminue après l'arrêt de l'absorption de nourriture contaminée (Figure 74). Cependant, les daurades ne retrouvent pas leur niveau de contamination initial en 60 jours de dépuración. Le niveau de contamination se maintient autour de 300 ng.g^{-1} ps.

Les résultats obtenus confirment les phénomènes d'accumulation du CB 153 observés chez les moules. Cependant, le phénomène d'"effet retard" à l'accumulation observé chez les moules ne se retrouve pas ici. A la vue des résultats, notamment de la décroissance de la concentration du CB 153 pendant la phase de dépuración, et l'absence d'"effet retard" à l'accumulation, il semblerait que les daurades possèdent une certaine capacité d'élimination du CB 153.

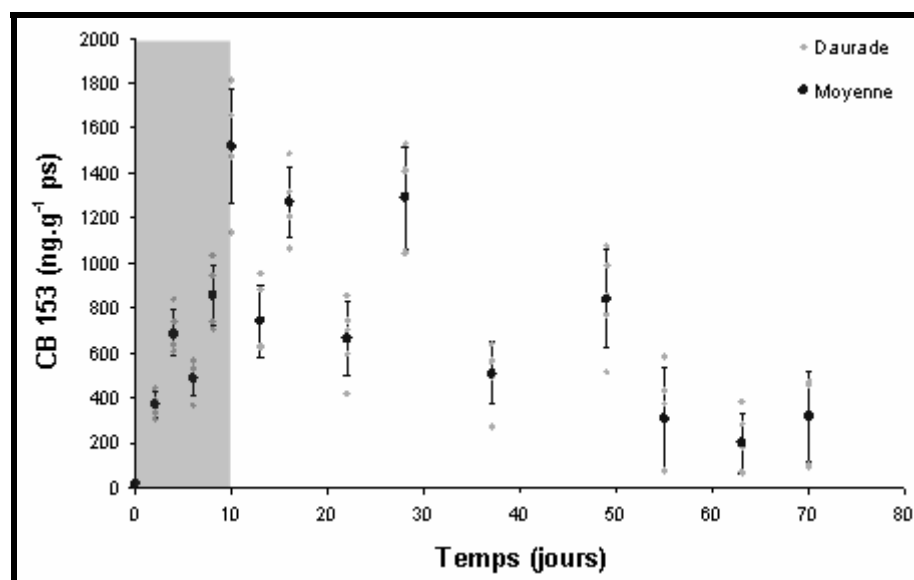


Figure 74 : Cinétique d'accumulation du CB 153 administré à une quantité théorique de $5 \mu\text{g.j}^{-1}$, corrigée par le taux de croissance, exprimée en $\text{ng.g}^{-1} \text{ps}$ ($n=5$).

1.3.5.2.b. CB 153, 100 μg

Pour cette condition, 130 poissons ont été nourris pendant 36 jours par 7 g de nourriture préalablement contaminée au CB 153 à une concentration de $6\,710 \pm 446 \text{ ng.g}^{-1}$, soit une dose journalière par poisson de 361 ng de CB 153. L'accumulation du CB 153 pendant la phase d'accumulation est régulière et progressive comme dans le cas de la faible dose (Figure 75).

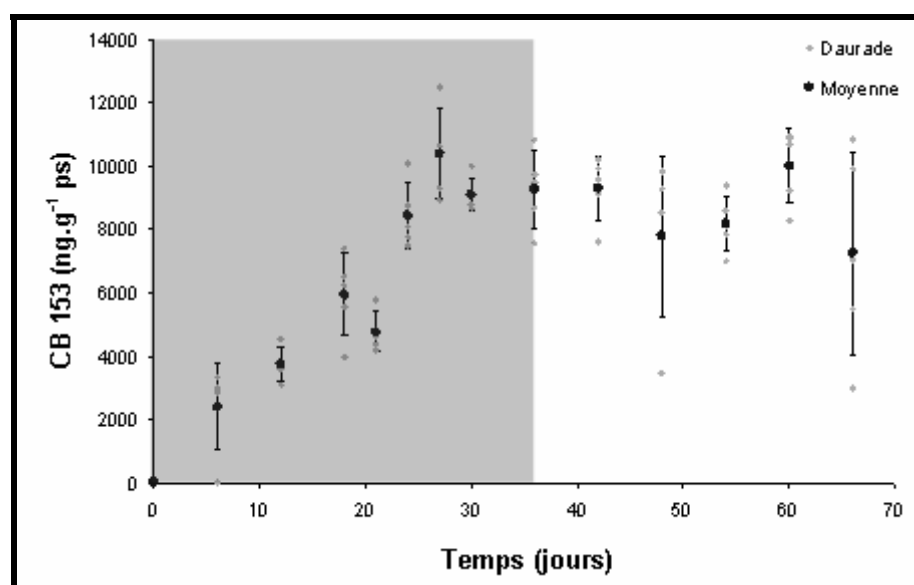


Figure 75 : Cinétique d'accumulation du CB 153 administré à une quantité théorique de $100 \mu\text{g.j}^{-1}$ corrigée par le taux de croissance, exprimée en $\text{ng.g}^{-1} \text{ps}$ ($n=5$).

Le niveau de contamination des poissons passe de 20 à $9\,265 \text{ ng.g}^{-1} \text{ps}$. Durant la phase de déuration, la concentration dans les poissons reste constante aux alentours de $8\,500 \text{ ng.g}^{-1} \text{ps}$, aucune tendance de déuration claire n'est observée. Deux hypothèses peuvent être avancées pour expliquer cette non déuration. Premièrement, le temps de déuration n'est peut être pas

suffisant pour permettre aux daurades d'éliminer le CB 153. Lors de l'exposition à la plus faible concentration, le CB 153 met plus de 40 jours pour amorcer une tendance de dépuración, alors que le temps de dépuración dans l'exposition à la forte concentration de CB 153 n'est que de 30 jours. La deuxième hypothèse plausible est une diminution de la capacité de dépuración du CB 153 à partir d'une certaine concentration dans les tissus. Pour vraiment conclure, il faudrait renouveler l'expérimentation en augmentant le temps de dépuración.

I.3.5.3. Pyralène

Dans le cas de la contamination au pyralène, les 130 daurades de la condition ont été nourries journalièrement avec 3 g de nourriture contaminée avec un mélange de PCB, seuls les 7 PCB prioritaires (CB 28, CB 52, CB 101, CB 118, CB138, CB 153, CB 180) et le CB 77 ont été suivis pendant cette contamination. La concentration moyenne de la nourriture administrée par jour pour ces composés est de $49\,902 \pm 4\,008 \text{ ng.g}^{-1}$. Durant la phase d'exposition, si l'on considère la somme des PCB suivis, le niveau de contamination des poissons augmente de 50 ng.g^{-1} à environ $35\,000 \text{ ng.g}^{-1}$ ps (Figure 76).

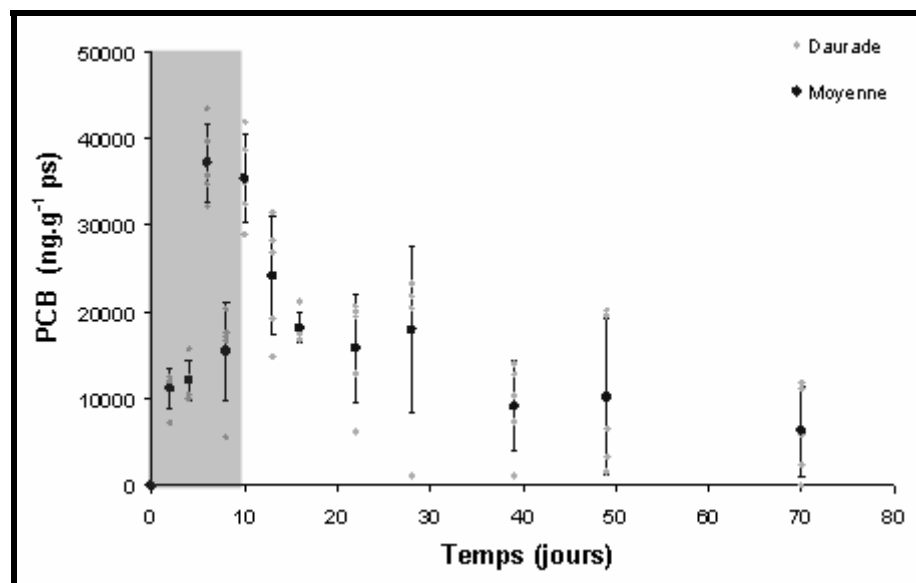


Figure 76 : Cinétique d'accumulation du pyralène corrigée par le taux de croissance exprimée en ng.g^{-1} ps.

Cette augmentation n'est pas linéaire et progressive comme celle observée dans les cas de l'exposition au CB 153 seul. Les cinq poissons prélevés à t_6 montrent des niveaux de contamination élevés après correction par le taux de croissance. En effet, les poissons prélevés à t_4 sont légèrement plus petits que la tendance moyenne alors que les poissons prélevés à t_6 sont légèrement plus gros que la tendance moyenne ($1,5 \pm 0,3 \text{ g}$). Ces deux paramètres couplés induisent un facteur correctif de croissance élevé induisant cette forte contamination observée à t_6 .

La Figure 77 montre en détail les résultats obtenus pour chaque congénère analysé. Les résultats présentés sont corrigés par le taux de croissance, afin de s'affranchir de la dilution pondérale due à la croissance des daurades.

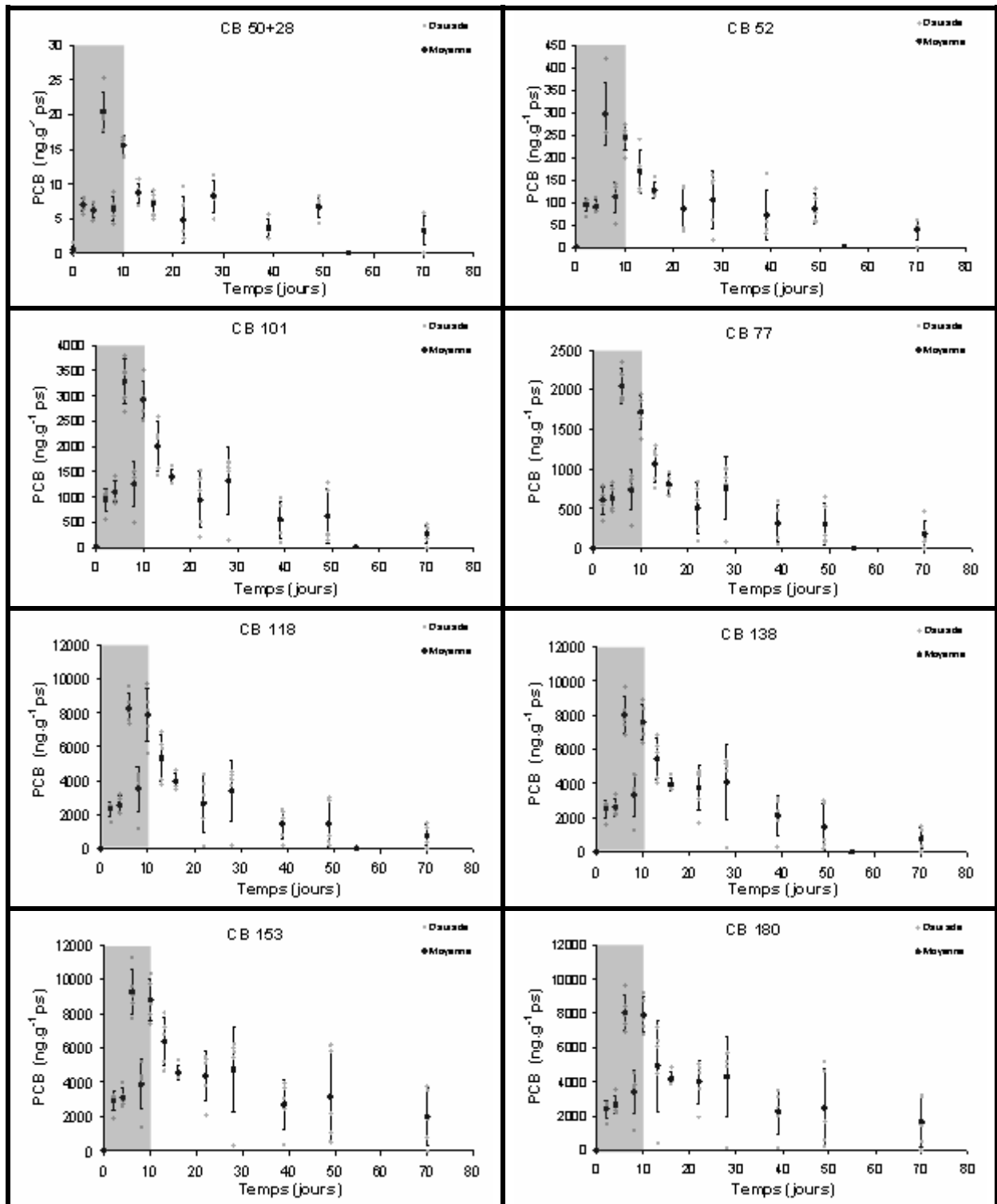


Figure 77 : Cinétique d'accumulation des PCB analysés dans le cadre de l'exposition au pyralène, corrigée par le taux de croissance (n=5).

L'ensemble des composés analysés s'accumule dans les daurades. Le même phénomène d'augmentation de la concentration à t_6 dû à la correction par le facteur de croissance est observé pour l'ensemble des composés individuels. Le CB 28 et CB 52 montrent une tendance d'accumulation moins nette que les autres composés. Ce sont les composés les moins chlorés et donc *a priori* les plus facilement métabolisables (Kannan *et al.*, 1995). De plus, ce sont également les composés les moins présents dans le mélange de pyralène initial, respectivement 0,1 et 1% de la concentration totale analysée dans la nourriture.

La concentration de l'ensemble des composés décroît pendant la phase de dépuración. Lorsque le temps de dépuración excède 60 jours, les daurades semblent capables d'éliminer les PCB. La dépuración est plus ou moins longue à se mettre en place en fonction du composé considéré. A titre d'exemple, la concentration du CB 118 décroît rapidement dès le premier temps de dépuración, alors que pour le CB 153, l'amorce de la dépuración devient claire au bout de 40 jours. Il faut tout de même noter que le CB 153, comme le CB 180, présente toujours des valeurs de l'ordre $2\ 000\ \text{ng.g}^{-1}$ ps au terme de la phase de dépuración.

I.3.6. Contamination par les PBDE

Les daurades ont été exposées à deux concentrations de BDE 47 et de BDE 153.

I.3.6.1. BDE 47

I.3.6.1.a. BDE 47, 5 μg

Pour cette condition, 130 poissons ont été nourris pendant 10 jours avec 3 g de nourriture préalablement contaminée au BDE 47 à une concentration de $1\ 662 \pm 88\ \text{ng.g}^{-1}$, soit une dose journalière par poisson de 38 ng de BDE 47. L'accumulation du BDE 47 pendant la phase de contamination est régulière, hormis 3 poissons qui tirent la tendance vers le haut à t_8 . Le niveau de contamination des poissons passe de 0 à 1 600 ng (Figure 78). Puis, peu à peu, la concentration dans les daurades diminue après l'arrêt de l'absorption de nourriture contaminée, puis semble se stabiliser autour d'un plateau de $250\ \text{ng.g}^{-1}$ ps. Les 60 jours de dépuración ne suffisent pas aux daurades pour retrouver leur niveau de contamination initial, il se maintient aux environs de $250\ \text{ng.g}^{-1}$ ps, soit 15 % du BDE 47 accumulé à t_{10} . Ces résultats laissent penser que les daurades ont une capacité d'élimination du BDE 47.

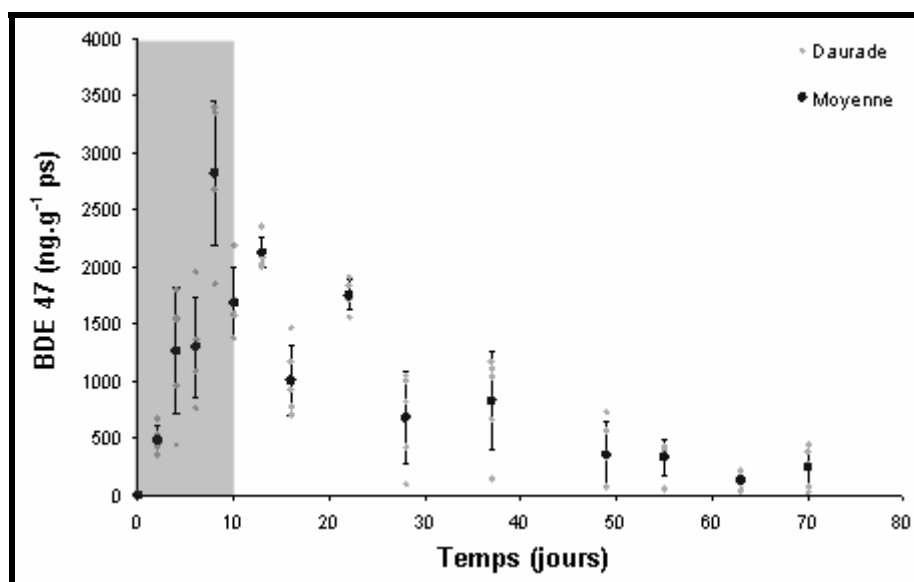


Figure 78 : Cinétique d'accumulation du BDE 47 corrigée par le taux de croissance administré à une quantité théorique de 5 µg.j⁻¹, exprimée en ng.g⁻¹ ps (n=5).

1.3.6.1.b. BDE 47, 100 µg

Pour cette concentration, 130 daurades ont été nourries pendant 10 jours avec 3 g de nourriture préalablement contaminée au BDE 47 à une concentration de 31 903 ± 1287 ng.g⁻¹, soit une dose journalière par poisson de 736 ng de BDE 47. Comme pour la plus faible dose, l'accumulation du BDE 47 est régulière et le niveau de contamination des daurades passe de 0 à 21 450 ± 7 277 ng.g⁻¹ ps (Figure 79). A l'arrêt de l'absorption de nourriture contaminée, la concentration dans les daurades diminue progressivement. Au terme des 60 jours, les daurades ne retrouvent pas leur niveau de contamination initial, mais elles présentent toujours une concentration de 2 500 ng.g⁻¹ ps, soit environ 10 % du BDE 47 accumulé à t₁₀. Ceci confirme la capacité des daurades à éliminer le BDE 47.

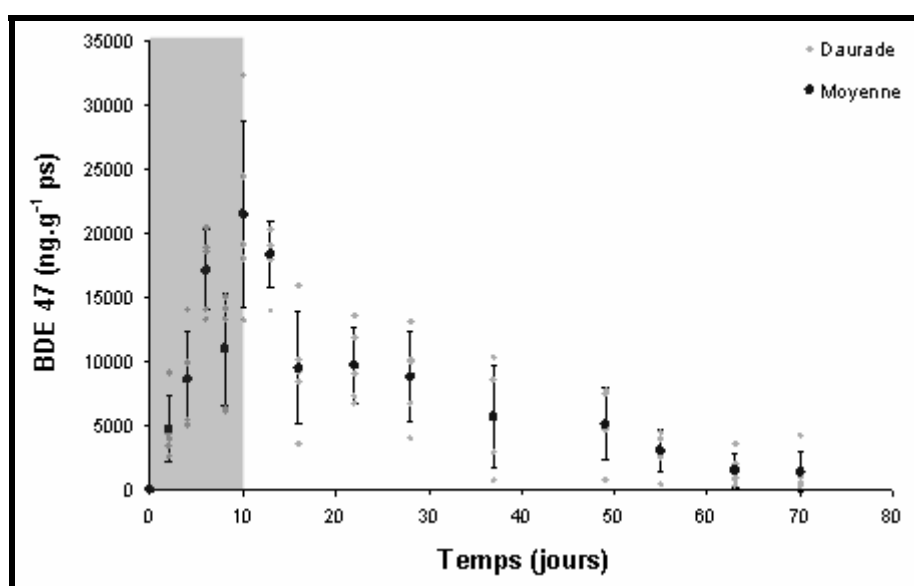


Figure 79 : Cinétique d'accumulation du BDE 47 corrigée par le taux de croissance administré à une quantité théorique de 100 µg.j⁻¹, exprimée en ng.g⁻¹ ps (n=5).

Il est intéressant de noter que les niveaux de BDE 47 obtenus au terme de la phase de contamination sont supérieurs à ceux obtenus durant l'exposition au CB 153, molécule modèle de bioaccumulation. Cela laisse présager une forte capacité de bioaccumulation du BDE 47 dans le milieu naturel.

I.3.6.2. BDE 153

I.3.6.2.a. BDE 153, 5 μg

Pour cette condition, 130 daurades ont été nourries avec 3 g de nourriture contaminée au BDE 153 à une concentration de $1\,704 \pm 90 \text{ ng.g}^{-1}$, soit une dose par jour et par poisson de 39 ng. La cinétique d'accumulation est progressive comme dans le cas du BDE 47, la concentration dans les daurades passe de 0 à $1\,000 \text{ ng.g}^{-1} \text{ ps}$ (Figure 80). Dès l'arrêt de la contamination, la concentration en BDE 153 dans les daurades diminue. La tendance de dépuración est troublée par trois poissons à t_{49} qui présentent des concentrations de l'ordre de $500 \text{ ng.g}^{-1} \text{ ps}$. Au terme de 60 jours de dépuración, les daurades ne retrouvent pas leur niveau de contamination initial, il se maintient autour de 100 ng, mais plus de 90 % du BDE 153 accumulé à t_{10} a été éliminé.

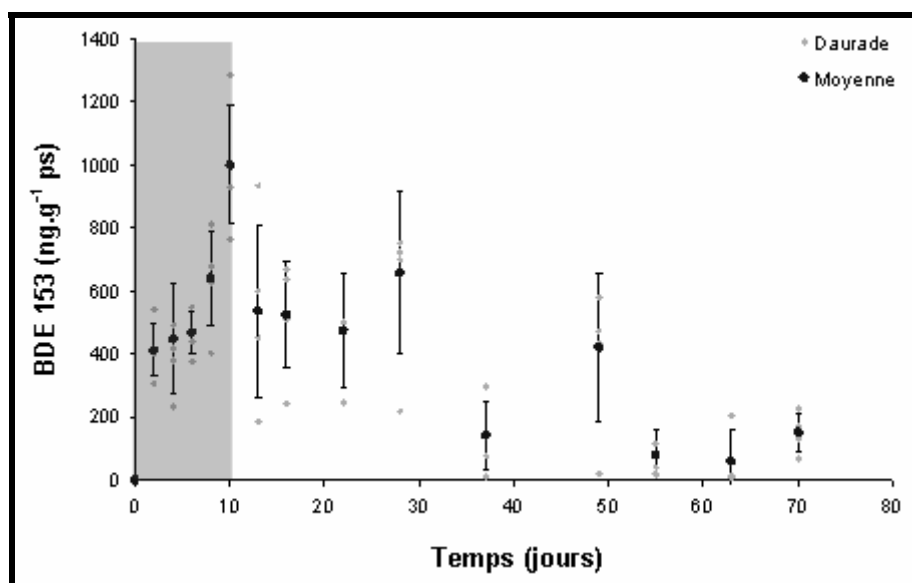


Figure 80 : Cinétique d'accumulation du BDE 153 corrigée par le taux de croissance administré à une quantité théorique de $5 \mu\text{g.j}^{-1}$, exprimée en $\text{ng.g}^{-1} \text{ ps}$ ($n=5$).

I.3.6.2.b. BDE 153, 100 μg

Pour cette concentration de BDE 153, 130 daurades ont été nourries avec 3 g de nourriture contaminée au BDE 153 à une concentration de $37\,103 \pm 378 \text{ ng.g}^{-1}$, soit une dose individuelle journalière de 856 ng. La cinétique d'accumulation est progressive et linéaire, la concentration dans les daurades passe de 0 à $14\,800 \pm 2\,600 \text{ ng}$ (Figure 81). Dès l'arrêt de la contamination, la concentration dans les daurades diminue.

Cependant, au terme de 60 jours de dépuración, le niveau de contamination ne retrouve pas son niveau initial, il se maintient autour de $600 \text{ ng.g}^{-1} \text{ ps}$, soit 5 % de la concentration en BDE 153 à t_{10} .

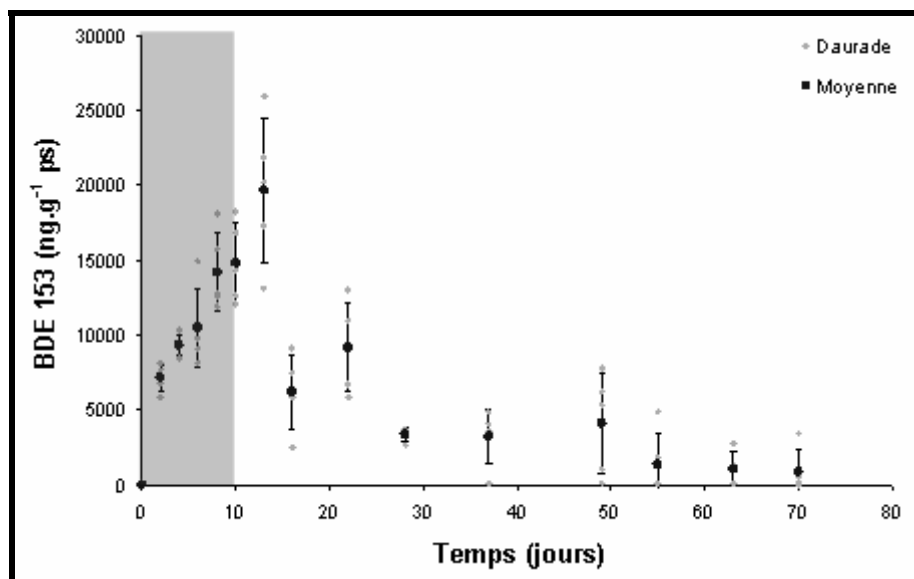


Figure 81 : Cinétique d'accumulation du BDE 153 corrigée par le taux de croissance administré à une quantité théorique de $100 \mu\text{g.j}^{-1}$, exprimée en $\text{ng.g}^{-1} \text{ ps}$ ($n=5$).

I.3.7. Contamination par les HAP

I.3.7.1. Benzo(a)pyrène

Les expositions aux HAP ont été réalisées sur 36 jours. Pour cette condition, 130 daurades ont été nourries avec 6 g de nourriture contaminée au benzo(a) pyrène $9\,955 \pm 1830 \text{ ng.g}^{-1}$, soit une dose par jour et par poisson de 459 ng.

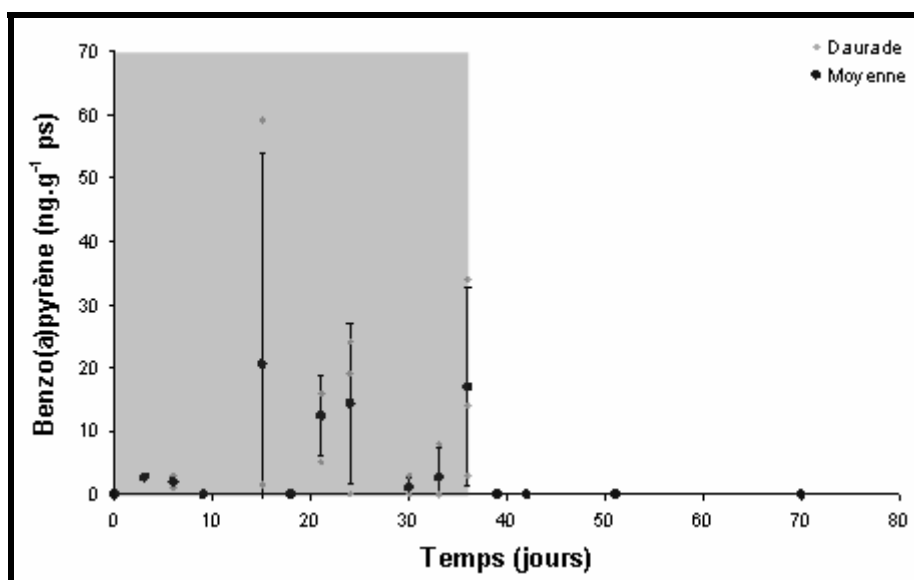


Figure 82 : Cinétique d'accumulation du benzo(a)pyrène administré à une quantité théorique de $100 \mu\text{g.j}^{-1}$ aux daurades ($n=3$).

Aucune accumulation n'est observée chez les daurades exposées au benzo(a)pyrène (Figure 82). Seuls quelques individus présentent des niveaux de contamination significativement différents du niveau de départ pendant la phase de contamination. La concentration la plus élevée atteinte est de l'ordre de 60 ng.g^{-1} . Dès que les daurades sont nourries avec de la nourriture saine, leur concentration retombe au niveau de concentration initial. Ceci laisse supposer que l'intégralité du benzo(a)pyrène ingéré est biotransformée. A la vue des résultats, la correction par le taux de croissance n'a pas été effectuée.

I.3.7.2. Chrysène

Pour cette condition, 130 daurades ont été nourries avec 6 g de nourriture contaminée avec du chrysène à une concentration de $8\,233 \pm 376 \text{ ng.g}^{-1}$, soit une dose par jour et par poisson de 379 ng. Tout comme dans le cas précédent, aucune cinétique d'accumulation claire n'est observée chez les daurades exposées au chrysène (Figure 83). La concentration maximale atteinte est de l'ordre de 200 ng.g^{-1} ps, ce qui est plus que dans le cas du benzo(a)pyrène. Mais, dès que les daurades sont nourries avec de la nourriture saine leur concentration retombe au niveau de la concentration initial. Cela laisse supposer que l'intégralité du chrysène est biotransformée et éliminée.

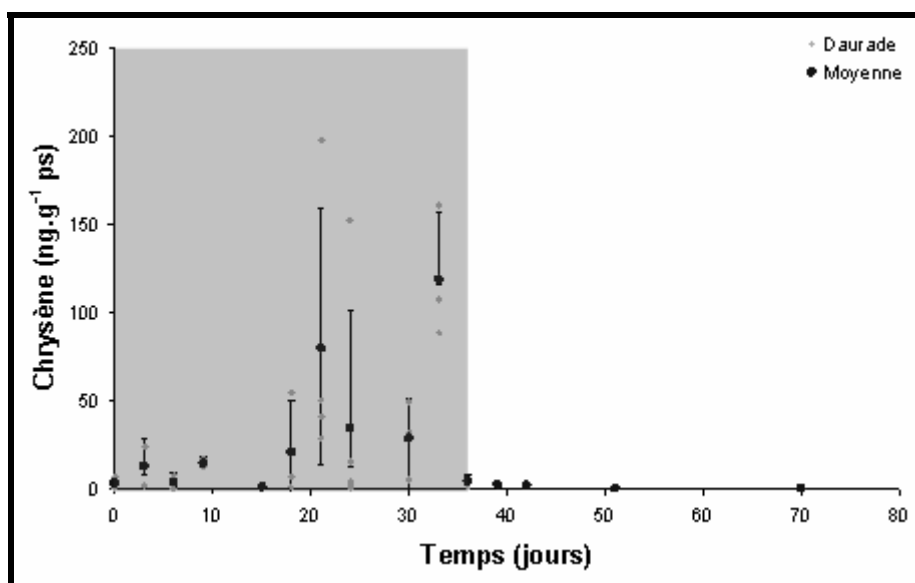


Figure 83 : Cinétique d'accumulation du Chrysène administrée aux daurades à une quantité théorique de $100 \mu\text{g.j}^{-1}$ ($n=3$).

Les résultats observés dans les expérimentations réalisées avec le Chrysène et le Fluoranthène confirment les capacités des daurades à métaboliser et à éliminer les HAP. Suite à ces expérimentations, l'exposition au fluoranthène qui aurait donné des résultats similaires n'a pas été réalisée.

I.3.8. Comparaison de l'accumulation des PCB, des PBDE et des HAP chez la daurade

I.3.8.1. Rapport d'incorporation des composés étudiés

Les pourcentages d'incorporation des composés dans les tissus ont été calculés de la même façon que précédemment pour les composés seuls (Tableau 31) et pour le pyralène (Tableau 32).

	Quantité totale administrée par daurade après 10 j (ng)	Quantité totale accumulée par daurade après 10 j (ng)	Rapport d'incorporation du composé
CB 77 5	330 ± 6	53 ± 9	18
CB 77 100	7043 ± 401	mortalité	mortalité
CB 153 5	288 ± 27	204 ± 48	71
CB 153 100	3613 ± 230	4 200 ± 600	116
BDE 47 5	332 ± 20	351 ± 63	106
BDE 47 100	7300 ± 297	4480 ± 1520	61
BDE 153 5	341 ± 21	183 ± 32	54
BDE 153 100	7421 ± 87	3397 ± 51	46
BaP 100	3584 ± 844	nd	nd
Chrysène 100	2964 ± 87	4 ± 1	0,1

Tableau 31 : Rapport d'incorporation des différents composés testés par les daurades.

	Quantité totale administrée par daurade après 10 j (ng)	Quantité totale accumulée par daurade après 10 jour (ng)	Rapport d'incorporation du composé (%)
CB 28	10 ± 1	4 ± 1	40
CB 52	80 ± 20	68 ± 8	85
CB 101	710 ± 20	878 ± 112	120
CB 154 + 77	509 ± 22	480 ± 12	95
CB 118	2 100 ± 8	2 206 ± 435	105
CB 153	2 020 ± 265	2 462 ± 340	120
CB 138	2 079 ± 278	2 127 ± 290	102
CB 180	2 400 ± 307	2 219 ± 282	92
7 PCB	9 900 ± 925	9 908 ± 1434	100

Tableau 32 : Rapport d'incorporation des différents PCB analysés durant l'exposition au pyralène.

Ces pourcentages oscillent de 100 à 0 % en fonction des composés et de la concentration. De façon générale, on voit que les HAP étudiés (benzo(a)pyrène et chrysène) ne sont pas du tout bioaccumulés par les daurades. Ils sont totalement métabolisés. Ce phénomène a déjà été mis en évidence lors d'exposition de juvéniles de soles à des hydrocarbures (Mazéas, 2004). Différentes études ont mis en évidence la présence chez les organismes marins des enzymes impliquées dans les mécanismes de biotransformation des HAP (Khan *et al.*, 1972; Stegeman et Livingstone, 1998). Ces processus de biotransformation se déroulent principalement au niveau du foie chez les poissons et dans une moindre mesure dans la glande digestive chez les mollusques (Livingstone, 1989). En effet, une fois absorbés par les poissons, les HAP sont principalement acheminés jusqu'au foie, où ils se fixent aux

membranes des cellules en raison de leur hydrophobicité. Ils vont être ensuite biotransformés à l'intérieur des cellules hépatiques, afin de les rendre plus hydrophiles, puis les métabolites vont être excrétés via les voies naturelles.

A contrario, le PCB 153 et le BDE 47 présentent de très forts rapports d'incorporation, supérieur à 60 % pour le BDE, et supérieur à 70% pour le CB 153. Le CB 153 présente même des rapports d'incorporation supérieurs à 100%. Ces rapports d'incorporation supérieurs à 100% sont liés à la variabilité de la préparation de la nourriture contaminée et à la variabilité d'incorporation des poissons prélevés. Ces rapports d'assimilation élevés confirment la tendance observée durant les expérimentations avec les moules. Le pourcentage d'incorporation est, comme chez les moules, plus faible pour la forte dose dans le cas du CB 153 et du BDE 47. Le même type d'hypothèses que dans le cas des moules peut être avancé.

Un mécanisme de "protection" des daurades peut être envisagé, exposées à des concentrations en contaminants trop élevées, l'assimilation du composé serait moindre. Cette différence d'assimilation n'a *a priori* pas eu lieu lors de la prise de nourriture, toute la nourriture distribuée a été absorbée par les daurades. Cependant, on peut envisager l'atteinte d'un seuil maximal d'accumulation qui a pu être limitatif lors de fortes concentrations d'exposition. Ce seuil pourrait être lié à deux types de phénomènes, soit une saturation de la capacité de stockage ou d'accumulation des daurades, soit une augmentation des mécanismes de dépuración lors de l'exposition aux fortes doses conduisant à une accumulation moindre.

Le BDE 153 présente un rapport incorporation d'environ 50%, ce qui laisse penser qu'il est relativement bien métabolisé, ou éliminé par les daurades. Cela peut aussi être dû à une assimilation moindre du BDE 153. En effet, Burreau *et al.* (2004) montrent chez des poissons téléostéens d'eau douce (brochet, perche et gardon) une bioamplification maximale pour les pentaBDE, alors qu'à partir des hexaBDE, la bioamplification est corrélée négativement au degré de bromination. Ces résultats suggèrent que le poids moléculaire, au-delà d'un seuil, va défavoriser l'assimilation des composés, ce qui peut expliquer les différences obtenues pour les rapports d'incorporation, et notamment le rapport d'incorporation plus faible pour le BDE 153 que pour le BDE 47. Un phénomène similaire a également été observé chez les PCB, la bioaccumulation augmenterait avec le nombre d'atomes de chlore jusqu'aux hexaCB, puis diminuerait du fait d'un poids moléculaire trop important (Bernes, 1998).

Par contre, le CB 77 montre un rapport de moins de 20 %, ce qui prouve une faible capacité d'accumulation de ce composé, soit due à une forte métabolisation, soit à une capacité d'accumulation plus faible que celle des autres composés.

Les rapports d'incorporation obtenus pour les daurades sont plus élevés que ceux obtenus pour les moules. L'intégralité de la nourriture administrée a été ingérée directement par les daurades, il n'y a priori pas de facteurs de dilution de la nourriture ou de problème d'accessibilité à la nourriture.

I.3.8.2. Paramètres toxicocinétiques

Afin de confirmer les interprétations obtenues par les rapports d'intégration, les constantes d'accumulation (k_1) et de dépuraction (k_d) ont été calculées grâce à l'outil statistique Crystal ball® par E. Alonso et J.S.V. Tarazona (INIA, Madrid). Ces calculs ont été uniquement réalisés pour les expositions aux PCB et aux PBDE vu le rapport d'incorporation nul des HAP étudiés. Les résultats obtenus sont présentés Tableau 33. Les constantes ont été calculées pour les cinétiques exprimées en $\text{ng.g}^{-1} \text{ps}$.

Composés	$C_{\text{nourriture}}$	Poids sec / lipides	k_d	k_1
CB 153	100 $\mu\text{g/g}$	poids sec	Non calculé	
	5 $\mu\text{g/g}$	poids sec	$0,0077 \pm 0,0032$	$84,66 \pm 9,424$
CB 77	100 $\mu\text{g/g}$	poids sec	Mortalité	
	5 $\mu\text{g/g}$	poids sec	Non calculé	
BDE 153	100 $\mu\text{g/g}$	poids sec	$0,0519 \pm 0,0078$	$66,66 \pm 10,11$
	5 $\mu\text{g/g}$	poids sec	$0,0273 \pm 0,0048$	$64,68 \pm 14,24$
BDE 47	100 $\mu\text{g/g}$	poids sec	$0,0293 \pm 0,0043$	$68,49 \pm 18,39$
	5 $\mu\text{g/g}$	poids sec	$0,0272 \pm 0,0038$	$169,4 \pm 37,61$

Tableau 33 : Paramètres toxicocinétiques calculés par E. Alonso et J.S.V. Tarazona (INIA, Madrid) dans les daurades.

Pour plus de lisibilité, les constantes d'accumulation k_1 ont été reportées en fonction du log Kow des composés étudiés (Figure 84). Les constantes calculées pour les données exprimées en $\text{ng.g}^{-1} \text{ps}$ montrent une capacité d'accumulation similaire pour les trois composés. Le BDE 47 montre, même à la plus faible concentration d'exposition, une constante d'accumulation supérieure à celle du CB 153, confirmant le potentiel d'accumulation de ce composé dans le biota. Par contre, si l'on considère les constantes de dépuraction qui ont été reportées en fonction du log Kow des molécules étudiées dans la Figure 85, les différences entre les composés sont plus nettes. Le CB 153 présente une constante de dépuraction plus faible que les PBDE étudiés. Les daurades élimineraient donc difficilement le CB 153, ce qui confirme encore une fois la forte capacité de bioaccumulation de ce composé. Le composé qui présente ensuite les constantes de dépuraction les plus faibles est le BDE 47, puis vient le BDE 153. En réalité, ce sont les constantes calculées pour l'expérimentation à 100 μg qui diffèrent significativement. Dans ce cadre particulier, les daurades dépurent plus efficacement le BDE 153 que le BDE 47, ce qui n'est pas le cas lors de la faible valeur d'exposition 5 μg .

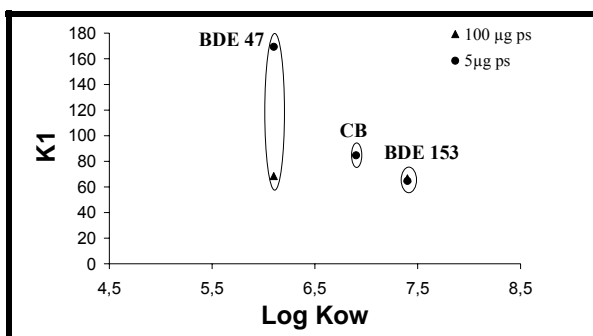


Figure 84 : Constantes d'accumulation k_1 calculées pour les données de contamination des daurades, exprimées en $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ ps.

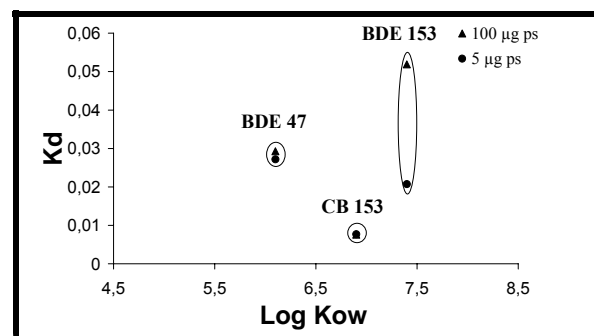


Figure 85 : Constantes de dépuratoin k_d calculées pour les données de contamination des daurades, exprimées en $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ ps.

Burreau *et al.* (2000) ont étudié la distribution du BDE 47 dans les tissus de brochet (*Esox lucius*) par autoradiographie (^{14}C -BDE 47) après une exposition via la nourriture. Le BDE 47 est assimilé très efficacement (>90%), mais il n'est *a priori* pas rapidement métabolisé en composé plus hydrophile. Sa concentration diminue dans la majorité des tissus, sauf dans ceux dont la teneur en lipides est très élevée (foie).

Cette disparité dans l'élimination pourrait justifier nos résultats. Après l'arrêt de la contamination, une baisse sensible de la contamination en BDE 47 est observée, qui pourrait être due à l'élimination des composés accumulés dans les organes les moins lipidiques, alors que les composés accumulés dans les tissus gras s'y retrouvent piégés de façon plus ou moins irréversible. D'autre part, une étude avec des carpes nourries avec de la nourriture contaminée en PBDE et en PCB (Stapelton *et al.*, 2004) a montré que les potentiels de bioamplification du BDE 47 et du CB 153 étaient comparables (respectivement 3,2 et 4,0).

En conclusion, le coefficient de partage Octanol/Eau (Log Kow) ne permet pas de prédire de façon fiable la capacité d'accumulation d'un composé. A titre d'exemple, le BDE 47, ayant une valeur de Log Kow de l'ordre de 6,1 plus faible que celle du BDE 153, présente une plus forte capacité d'accumulation que le BDE 153. La structure chimique en elle-même du composé, son accessibilité à la dégradation abiotique et *a fortiori* biologique conditionnent son devenir dans les réseaux trophiques.

I.3.8.3. Modélisation

Les données acquises lors de ces expérimentations ont également permis à E. Alonzo et J.V. Tarazona (INIA, Madrid) de valider un modèle dynamique permettant d'estimer la bioamplification des substances chimiques toxiques à travers la chaîne alimentaire dans les systèmes aquatiques. Les résultats des simulations obtenues pour les différentes conditions d'exposition des daurades sont présentés (Figure 86).

Aucune simulation de bioaccumulation n'a été réalisée pour les HAP, puisque les expérimentations ont démontré que les HAP ne se bioaccumulent pas dans les daurades. L'accumulation du CB 77 à faible dose est en cours de modélisation, les résultats ne seront donc pas présentés ici. Les simulations mathématiques obtenues pour le CB 153 et les BDE 47 et 153 sont en adéquation avec les résultats expérimentaux. Le modèle développé permet donc bien de prévoir l'accumulation des PCB, des PBDE dans les daurades.

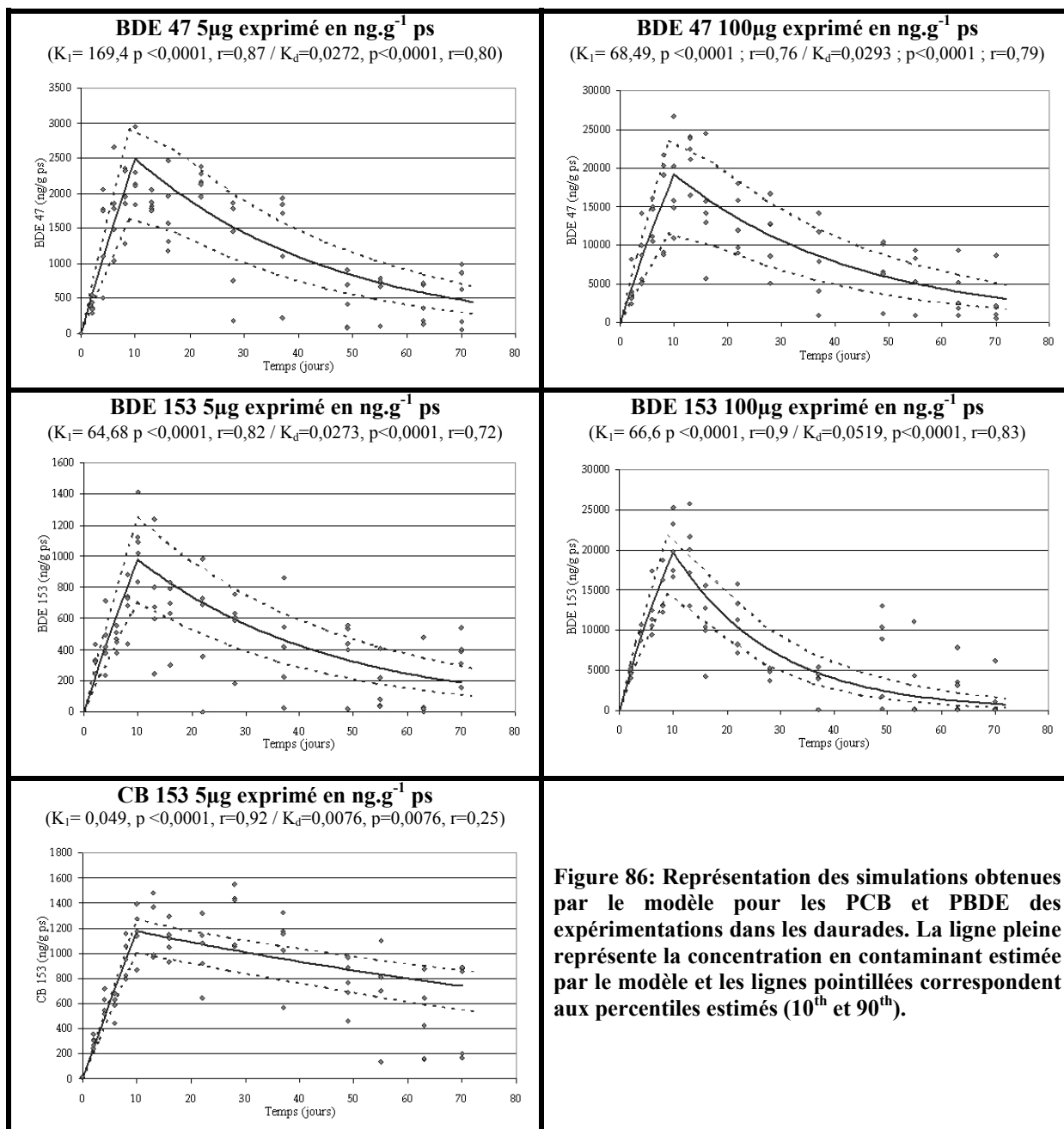


Figure 86: Représentation des simulations obtenues par le modèle pour les PCB et PBDE des expérimentations dans les daurades. La ligne pleine représente la concentration en contaminant estimée par le modèle et les lignes pointillées correspondent aux percentiles estimés (10th et 90th).

I.4. Discussion sur la capacité d'accumulation des composés étudiés

Trois classes de composés ont été étudiées dans ces travaux, les PCB, les PBDE et les HAP. Les HAP sont connus comme étant des molécules métabolisables (Mazéas, 2004). Les mécanismes mis en cause et les produits de métabolisation formés sont bien connus (Kahn *et al.*, 1972 ; Livingston, 1989). Ces composés ont été utilisés ici comme molécules modèles, illustrant les cinétiques de dépuration possible chez les moules et chez les poissons. Les HAP sont constitués de cycles aromatiques non substitués, de conformation plane. Cette conformation permet une interaction forte avec les enzymes de métabolisation. Les enzymes mono-oxygénases à cytochrome P-450 intervenant lors de la phase I de métabolisation les transforment principalement en diols, phénols et des quinones (Mazéas, 2004). En revanche, la conformation spatiale des composés organohalogénés est différente. Leur structure est très encombrée du fait de la substitution des carbones par les atomes de chlore ou de brome. La métabolisation de ces composés est étroitement liée à leur structure moléculaire, aux nombres de substituants halogénés et à leur position sur le cycle aromatique. Pour être facilement biodégradés, les congénères de PCB doivent présenter une paire d'atomes d'hydrogène vicinaux en position méta ou para. L'augmentation du nombre de substitution de chlore en position ortho diminue la vitesse de métabolisation (Boon *et al.*, 1992). Les conformations spatiales des CB 77 et CB 153 sont présentées Figure 87.

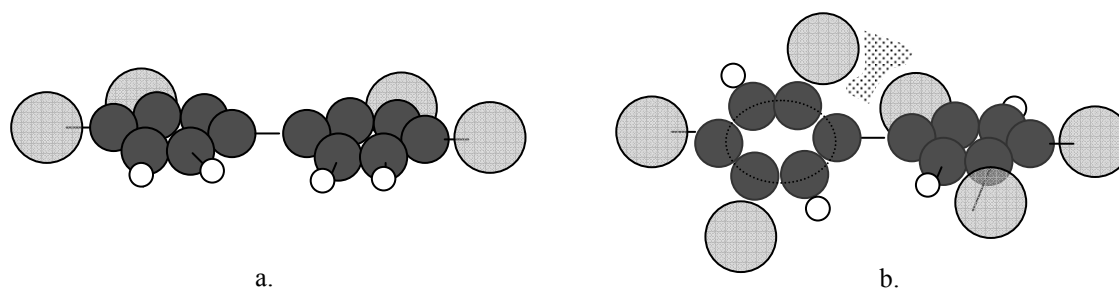


Figure 87 : Conformations spatiales du PCB 77 (a) et du PCB 153 (b). (les atomes de chlore sont représentés en gris clair, de carbone en gris foncé, d'hydrogène en blanc).

Le CB 77 fait partie du groupe 3 de la classification de Kannan (Kannan *et al.*, 1995). Il fait partie des composés ayant des atomes de carbone vicinaux libres en positions ortho et méta et donc métabolisables par le CYP 450 2B. *A contrario*, le CB 153 appartient au groupe 1 de la classification de Kannan, il ne possède pas d'atomes de carbone vicinaux libres et il est donc considéré comme non métabolisable. Les résultats observés lors des expérimentations résultent bien des propriétés physico-chimiques des composés étudiés. Le CB 153 a montré une forte capacité d'accumulation et une faible capacité de dépuration quelle que soit l'espèce considérée, alors que le CB 77, bien que fortement accumulable, dépure plus facilement. Ces résultats expliquent les profils des PCB observés dans les

écosystèmes aquatiques, le CB 153 très rémanent est le composé majoritairement retrouvé dans les réseaux trophiques aquatiques, alors que le CB 77 y est minoritaire.

Dans le cas des PBDE, bien qu'ils aient des structures moléculaires relativement proches de celles des PCB (Figure 88), leur comportement est différent. Le PBDE 47 montre une forte capacité d'accumulation, équivalente, voire supérieure à celle du CB 153. Burreau *et al.* (2004) montrent une bioamplification maximale pour les pentaBDE et une bioamplification corrélée négativement au degré de bromination à partir des hexaBDE. Cela suggère que le poids moléculaire, au-delà d'un seuil, va défavoriser l'assimilation. Cette hypothèse se vérifie avec le BDE 153 qui présente une capacité d'accumulation moindre que le BDE 47. Le PBDE 153 montre également une cinétique de dépuraction inattendue et relativement importante si l'on considère les échelles de lipophilie ($\log K_{ow}$ 7,4). L'efficacité d'accumulation des PBDE apparaît dans ces travaux très nettement supérieure à celle des PCB. Il se peut, comme le suggère de Wit (2002), que des mécanismes de co-transport impliquant notamment des macromolécules, telles que les lipides ou les protéines, ou des mécanismes actifs accélèrent la pénétration des PBDE dans les organismes vivants.

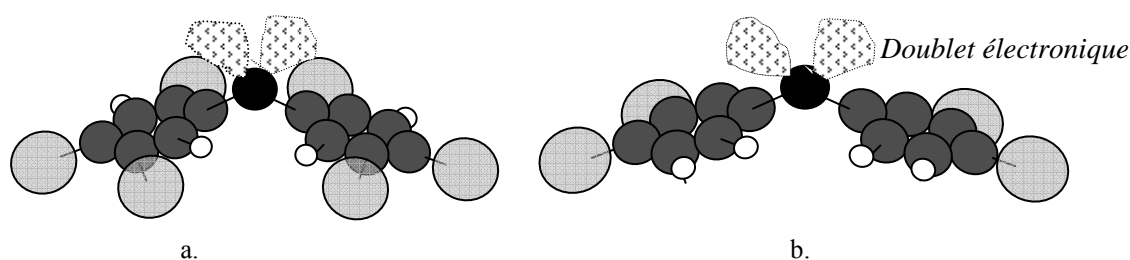


Figure 88 : Conformations spatiales du PBDE 153 (a) et du PBDE 47 (b). (les atomes de brome sont représentés en gris clair, d'oxygène en noir, de carbone en gris foncé, d'hydrogène en blanc).

La différence de comportement entre les deux classes de composés organohalogénés est due à leurs différences structurales. La fonction éther a une forte influence sur la conformation de la molécule du fait du doublet non liant de l'oxygène (Figure 88). Les PBDE, composés non plans, pourraient nécessiter l'intervention d'enzymes différentes de celles entrant en action pour la dépuraction des PCB. D'autre part, le brome est un atome plus volumineux que le chlore et il possède une affinité électronique plus faible d'après la classification périodique de Mendeleïev. La force de la liaison carbone-halogène est influencée par la nature de l'atome substitué, cette liaison nécessite un apport d'énergie moindre pour être rompue que la liaison carbone-chlore, cela pourrait favoriser une débromation oxydante. Cependant, l'effet conjugué du volume des atomes de brome et de la conformation moléculaire induite par la fonction éther pourraient à l'inverse entraver l'approche et l'action des enzymes oxydantes (conformation plus rigide de la molécule), suggérant un mécanisme de dépuraction autre que la débromation oxydante.

Le PBDE 47 est très présent dans les différents compartiments environnementaux et constitue souvent le PBDE majoritaire (entre 50 et 90 %) (de Wit, 2002). Paradoxalement, ce composé est un des PBDE les moins produits et les moins utilisés. Les composés tétraBDE constituent moins de 3 % de la production mondiale en PBDE. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ce paradoxe, l'existence de sources secondaires telles que la débromation des PBDE plus lourds (Hua *et al.*, 2003), la très faible capacité de dépuración de ce composé par les organismes ou sa capacité de bioaccumulation et de bioamplification importante prouvée dans ces travaux et par d'autres auteurs (Stapelton *et al.*, 2004 ; Bureau *et al.*, 2000). La réalité de la contamination environnementale doit être la résultante de ces hypothèses.

II. Etude en milieu naturel

En complément des expérimentations en milieux contrôlés, qui ont permis de caractériser le comportement de composés modèles (CB 77, CB 153, BDE 47 et BDE 153), des études en milieu naturel ont été conduites, afin de comprendre le comportement des PCB et des PBDE au sein des écosystèmes aquatiques. La première approche a été de caractériser le niveau de contamination du compartiment biologique des estuaires français (Seine, Ster, Vilaine, Loire et Gironde) à travers un organisme modèle, le flet (*Platichthys flesus*)

L'étude a ensuite été axée sur l'estuaire de la Gironde, afin de caractériser les niveaux de contamination de la base du réseau trophique pélagique (phase dissoute, particules, copépodes, mysidacés, gammarés et crevettes) et les niveaux de contaminations des poissons de l'estuaire et plus particulièrement de l'anguille européenne.

II.1. Comparaison inter-estuaires des niveaux de contamination

Une comparaison inter-estuaires des niveaux de contamination en PCB et PBDE a été menée à travers un organisme cible, le flet (*Platichthys flesus*). Les muscles et les foies de 10 individus (5 mâles, 5 femelles) ont été prélevés dans les estuaires de la façade atlantique (Seine, Ster, Vilaine, Loire Gironde) et ont été analysés individuellement.

II.1.1. Contamination globale

Ces analyses de niveaux de contamination du flet dans les différents estuaires atlantiques français permettent de situer le niveau de contamination de l'estuaire de la Gironde. Les résultats globaux obtenus pour les concentrations en PCB des muscles de flet sont présentés Figure 89. L'estuaire présentant le plus fort niveau de contamination est l'estuaire de Seine. Cet estuaire, bien qu'en cours de réhabilitation, est encore bien connu pour ses forts niveaux de pollutions chimiques (Loizeau *et al.*, 2001 ; Cachot *et al.*, 2006). Le

niveau de contamination moyen dans les muscles de flets analysés dans cette étude est de l'ordre de $600 \text{ ng.g}^{-1} \text{ ps}$. Juste après l'estuaire de Seine vient l'estuaire de la Gironde avec un niveau de contamination de l'ordre $250 \text{ ng.g}^{-1} \text{ ps}$. Le niveau de contamination est deux fois moins important que celui de la Seine, mais reste important. Les muscles de flet de l'estuaire de Loire présentent des niveaux de contamination deux fois moins importants que ceux observés en Gironde, environ $100 \text{ ng.g}^{-1} \text{ ps}$. La Vilaine, ainsi que le site de référence, présentent des niveaux de contamination faibles, inférieurs à $30 \text{ ng.g}^{-1} \text{ ps}$. Ces différences de niveaux de concentrations ne sont pas imputables à des différences de teneurs lipidiques, l'ensemble des muscles de poissons présente des taux de lipides homogènes variant aux alentours de 5% de lipides par gramme de matière sèche (Tableau 34).

Le détail des concentrations en PCB et PBDE dans le muscle et dans le foie est présenté Tableau 34 et Tableau 35. Le niveau de contamination est plus important dans les foies que dans les muscles. Le foie est un organe de détoxification, lieu de transit et de stockage des contaminants. De plus, chez le flet, le foie présente classiquement une teneur lipidique plus importante que le muscle (respectivement 15 et 5 % de lipide par gramme de matière sèche), ce qui explique l'affinité des POP pour cet organe. Il est intéressant de noter que les foies des flets issus du Ster présentent une teneur lipidique significativement plus importante que ceux des autres poissons échantillonnés. Cependant, ce phénomène n'est pas accompagné d'une hausse du niveau de contamination car le Ster est une zone qui semble préservée en termes de contamination en PCB et PBDE.

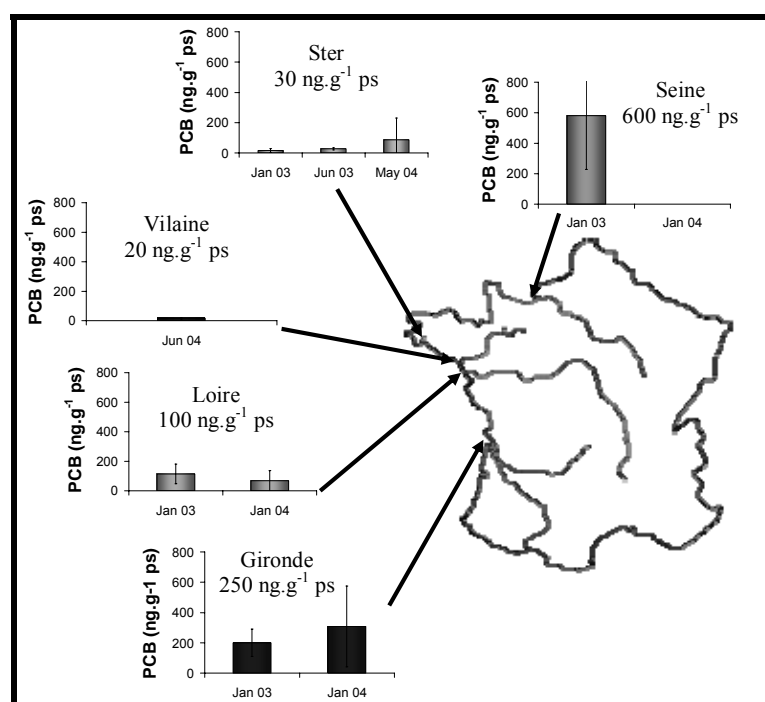


Figure 89 : Contamination des muscles de flets analysés dans les différents estuaires français étudiés (n=5).

		[PCB] (ng.g ⁻¹ ps)	[PBDE] (ng.g ⁻¹ ps)	Longueur (mm)	Poids (g)	Teneur lipidique (%)
Seine	Janvier 03	581 ± 354	17 ± 13	286 ± 26	215 ± 65	5 ± 4
Ster	Janvier 03	16 ± 12	nd	348 ± 59	531 ± 225	3 ± 1
	Juin 03	27 ± 8	nd	349 ± 52	512 ± 200	3 ± 1
	Mai 04	152 ± 145	3 ± 2	315 ± 84	485 ± 315	4 ± 3
Vilaine	Juin 04	16 ± 5	nd	202 ± 10	91 ± 13	2 ± 1
Loire	Janvier 03	115 ± 67	4 ± 2	280 ± 23	252 ± 41	7 ± 2
	Janvier 04	68 ± 69	2 ± 2	276 ± 25	212 ± 53	4 ± 2
Gironde	Janvier 03	200 ± 91	10 ± 5	255 ± 24	147 ± 37	2 ± 1
	Janvier 04	309 ± 267	11 ± 6	-	-	5 ± 2

Tableau 34 : Concentrations en PCB et PBDE dans le muscle des flets analysés (n=10).

		[PCB] (ng.g ⁻¹ ps)	[PBDE] (ng.g ⁻¹ ps)	Longueur (mm)	Poids (g)	Teneur lipidique (%)
Seine	Janvier 03	2128 ± 1435	69 ± 55	286 ± 26	215 ± 65	14 ± 6
Ster	Janvier 03	126 ± 41	3 ± 1	348 ± 59	531 ± 225	42 ± 5
	Juin 03	148 ± 106	2 ± 2	349 ± 52	512 ± 200	50 ± 10
	Mai 04	253 ± 137	7 ± 2	315 ± 84	485 ± 315	46 ± 5
Vilaine	Juin 04	273 ± 223	8 ± 10	202 ± 10	91 ± 13	20 ± 4
Loire	Janvier 03	473 ± 183	16 ± 7	280 ± 23	252 ± 41	15 ± 8
	Janvier 04	414 ± 212	12 ± 7	276 ± 25	212 ± 53	19 ± 7
Gironde	Janvier 03	924 ± 411	61 ± 32	255 ± 24	147 ± 37	14 ± 4
	Janvier 04	355 ± 127	11 ± 5	-	-	9 ± 4

Tableau 35 : Concentrations en PCB et PBDE dans le foie des flets analysés (n=10).

II.1.2. Détail de la contamination par estuaire

II.1.2.1. La Seine

L'estuaire de Seine est connu pour son fort niveau de contamination organique, notamment en PCB (Loizeau *et al.*, 2001). Dans le cadre de cette étude, les flets issus de l'estuaire de Seine sont les plus contaminés. Le détail des niveaux de contamination en PCB et PBDE obtenus en fonction du sexe des poissons est présenté Figure 90. Les niveaux de PBDE trouvés ici dans le muscle concordent avec les niveaux observés par Bragigand (2005), de l'ordre de 10 ng.g⁻¹ ps.

Aucune différence significative de niveau de contamination entre les mâles et les femelles n'a pu être mise en évidence. Les prélèvements ont été réalisés en pleine période de reproduction, les femelles analysées étaient des femelles matures sexuellement dont le développement de la gonade était très avancé, (elles étaient toutes prêtes à pondre). Cependant, aucune différence de niveau de concentration dans les organes étudiés n'a pu être mise en évidence entre les deux sexes. Le phénomène de détoxification des femelles par la ponte n'a pas été mis en évidence ici.

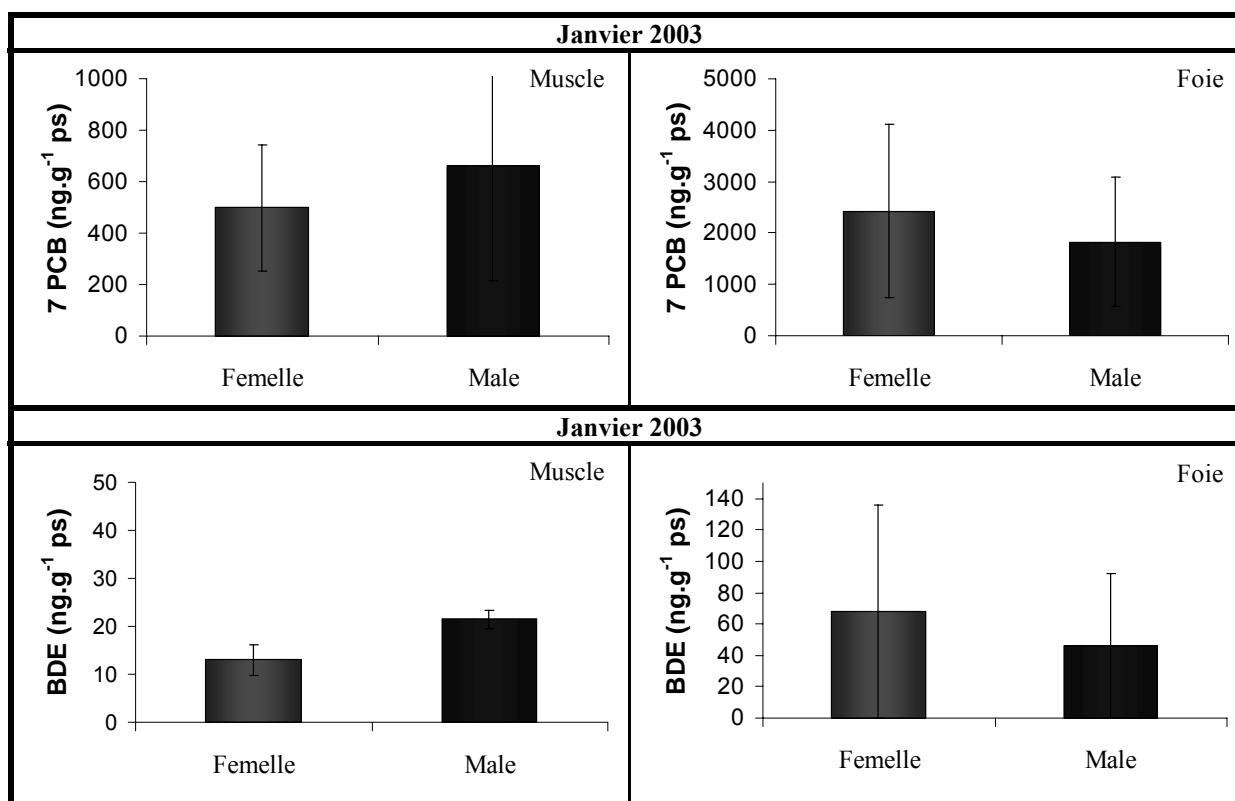


Figure 90 : Niveau de contamination en PCB et PBDE exprimé en ng.g^{-1} de poids sec dans les muscles et les foies des flets prélevés en estuaire de Seine ($n=5$).

II.1.2.2. Le Ster

Le Ster a été choisi comme site de référence à priori peu contaminé. Les résultats obtenus pour les muscles et les foies des flets analysés confirment ce postulat. Seuls les résultats obtenus pour les PCB sont présentés Figure 91. Les niveaux de PBDE sont faibles, de l'ordre de 2 ou 3 ng.g^{-1} ps dans le foie, et aucun PBDE n'a pu être détecté dans le muscle des poissons analysés ($< 1 \text{ ng.g}^{-1}$ ps).

La contamination des muscles en PCB est faible, de l'ordre de 30 ng.g^{-1} ps en moyenne. Le niveau de contamination plus élevé, observé dans le muscle des femelles au mois de mai 2004, est dû à un seul individu présentant un niveau de contamination important (486 ng.g^{-1} ps). Ce poisson n'a vraisemblablement pas passé son cycle de vie dans le Ster, et a dû se contaminer dans d'autres environnements. C'est là d'ailleurs un grand inconvénient du modèle poisson, qui ne passe pas l'intégralité son cycle de vie au même endroit, et qui par conséquent intègre un signal de contamination global de l'ensemble des lieux qu'il a fréquentés. De plus, il faut noter ici l'intérêt de l'analyse individuelle, qui permet de tracer indépendamment la contamination de chaque individu. Le traitement des échantillons en pool n'aurait pas permis d'élucider les causes de la forte teneur en PCB des muscles du mois de mai 2004.

En ce qui concerne les niveaux de contamination du foie, une différence a pu être mise en évidence entre les deux sexes. Le foie des femelles est significativement plus contaminé que celui des mâles quelle que soit la date de prélèvement (Mann-Whitney U, $p = 0,05$).

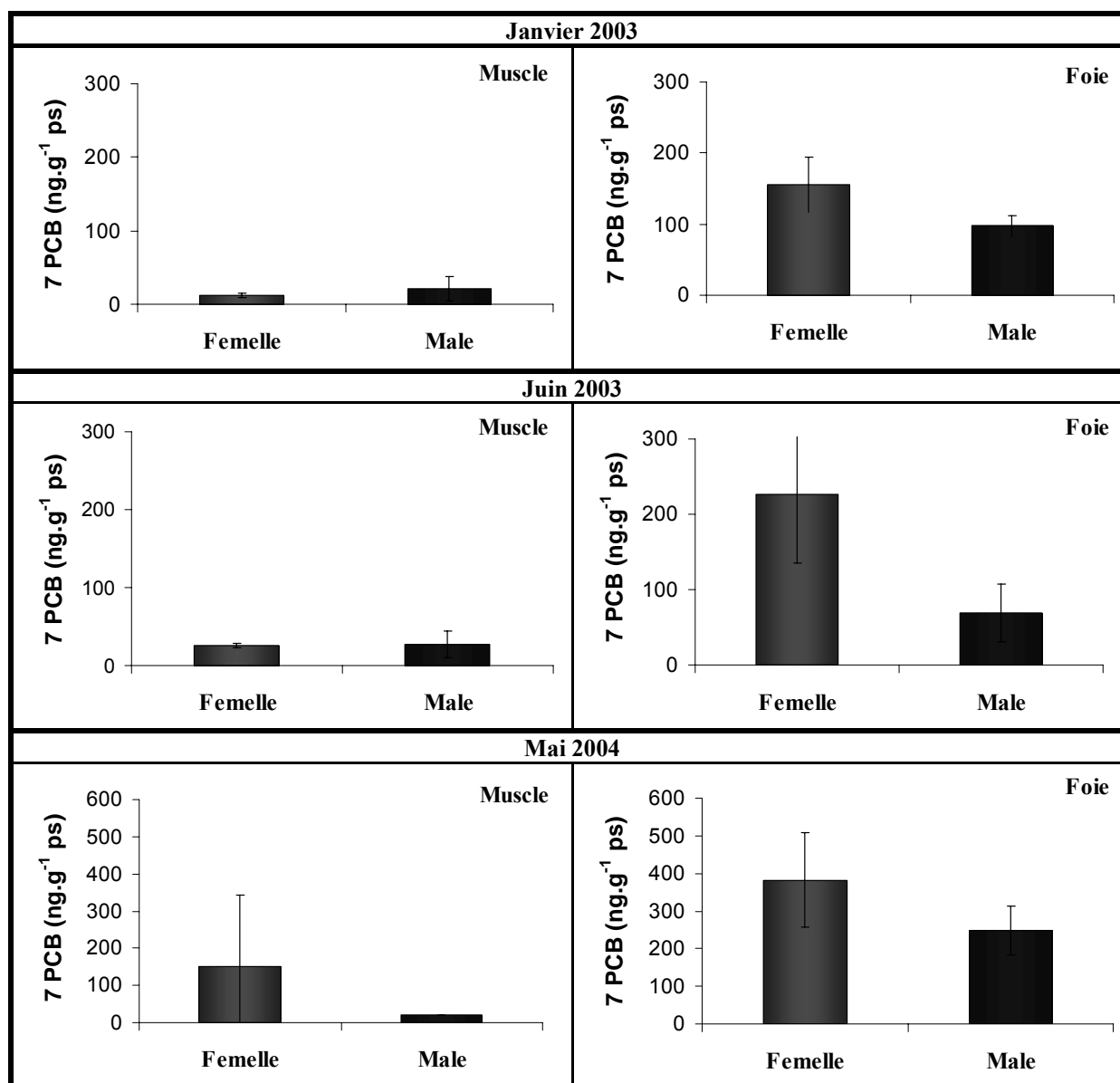


Figure 91 : Niveau de contamination en PCB exprimé en ng.g^{-1} de poids sec dans les muscles et les foies des flets prélevés dans le Ster.

II.1.2.3. La Vilaine

La Vilaine est un estuaire peu industrialisé, essentiellement soumis à une activité agricole, qui présente un niveau de contamination des flets relativement bas, quasi équivalent au niveau de contamination observé sur les poissons du site de référence, le Ster. Les niveaux de contaminations en PCB observés dans les foies et les muscles des poissons des deux sexes sont présentés (Figure 92). Aucune différence statistiquement significative de contamination (Mann-Whitney U, $p = 0,05$) n'a pu être mise en évidence entre les mâles et les femelles. Cependant, les résultats obtenus semblent montrer une contamination moyenne des foies de

femelles plus élevées que celle des mâles. Les PBDE n'ont pas été détectés dans le muscle des poissons analysés, et les foies présentent des niveaux de contamination faibles, $5 \pm 2 \text{ ng.g}^{-1}$ ps environ.



Figure 92 : Niveau de contamination en PCB exprimé en ng.g^{-1} de poids sec dans les muscles et les foies des flets prélevés dans la Vilaine (n=5).

II.1.2.4. La Loire

Les flets issus de la Loire montrent un niveau de contamination global en PCB supérieur à ceux observés pour les poissons de la Vilaine et du Ster, environ 100 ng.g^{-1} ps dans le muscle, et environ 450 ng.g^{-1} ps. Les niveaux de contaminations en PCB et en PBDE observés dans les foies et les muscles des poissons des deux sexes sont présentés Figure 93 et Figure 94.

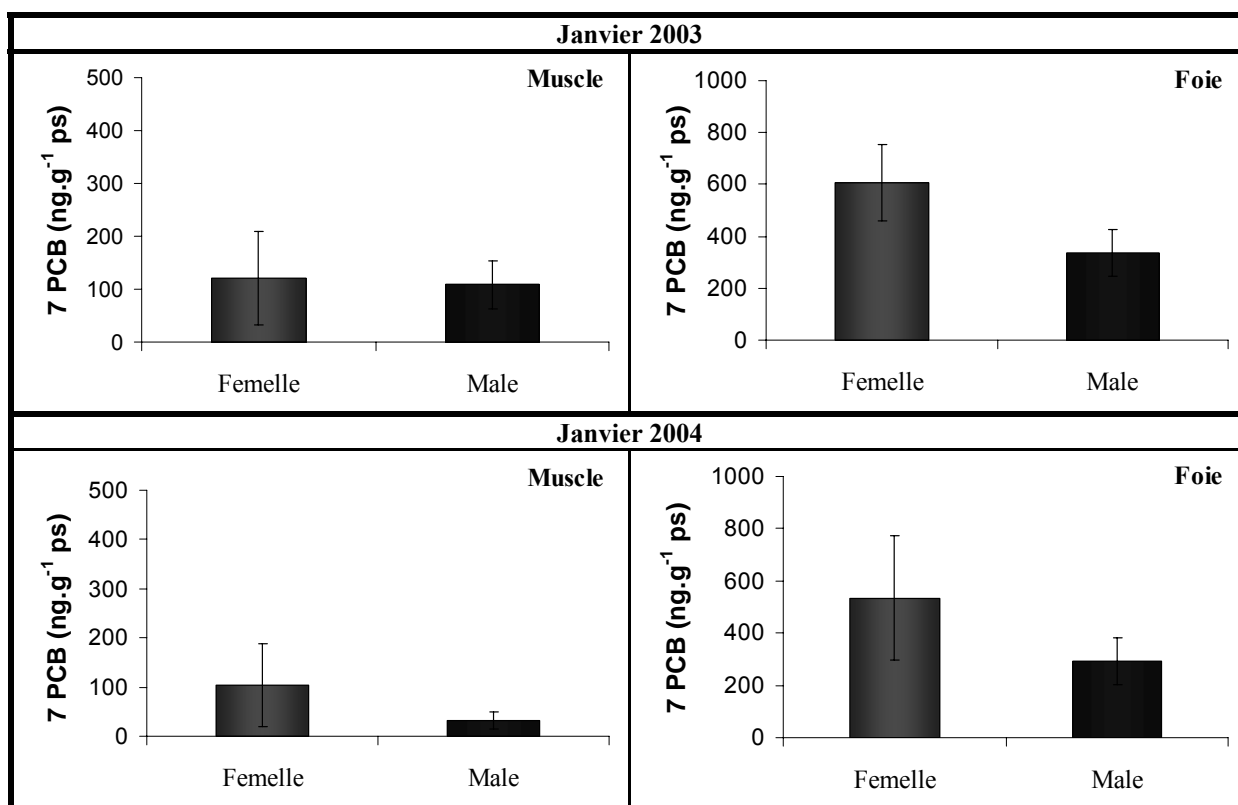


Figure 93 : Niveau de contamination en PCB exprimé en ng.g^{-1} de poids sec dans les muscles et les foies des flets prélevés dans la Loire (n=5).

Comme dans le cas des poissons du Ster, les femelles présentent un niveau de contamination en PCB dans le foie significativement plus important que les mâles (Mann-Whitney U, $p = 0,05$). La différence de contamination en PBDE n'est pas significative pour les périodes échantillonnées. Les niveaux de PBDE retrouvés dans le muscle des flets sont concordants avec les valeurs trouvées par Bragigand (2005) dans des flets de l'estuaire de la Loire.

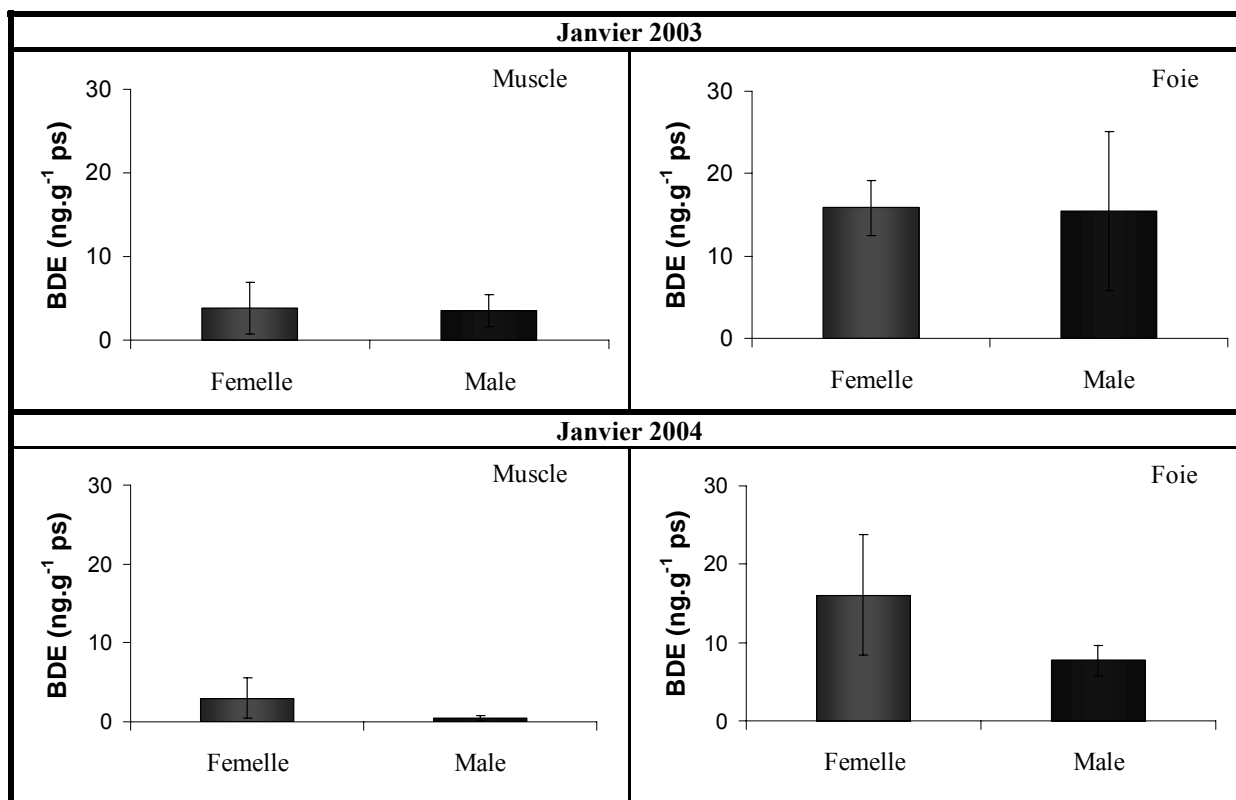


Figure 94 : Niveau de contamination en PBDE exprimé en ng.g^{-1} de poids sec dans les muscles et les foies des flets prélevés dans la Loire (n=5).

II.1.2.5. La Gironde

Les flets issus de l'estuaire de la Gironde présentent le niveau de contamination le plus élevé après les flets pêchés en Seine, soit pour les PCB environ 250 ng.g^{-1} ps dans le muscle et 950 ng.g^{-1} ps dans le foie. Les niveaux de PCB et de PBDE observés dans les foies et les muscles des poissons des deux sexes sont présentés Figure 95 et Figure 96.

Comme déjà observé dans les autres estuaires, les femelles présentent un niveau de contamination en PCB du foie significativement plus important que les mâles (Mann-Whitney U, $p = 0,05$). Cette différence ne se retrouve pas clairement au niveau de la contamination en PBDE.

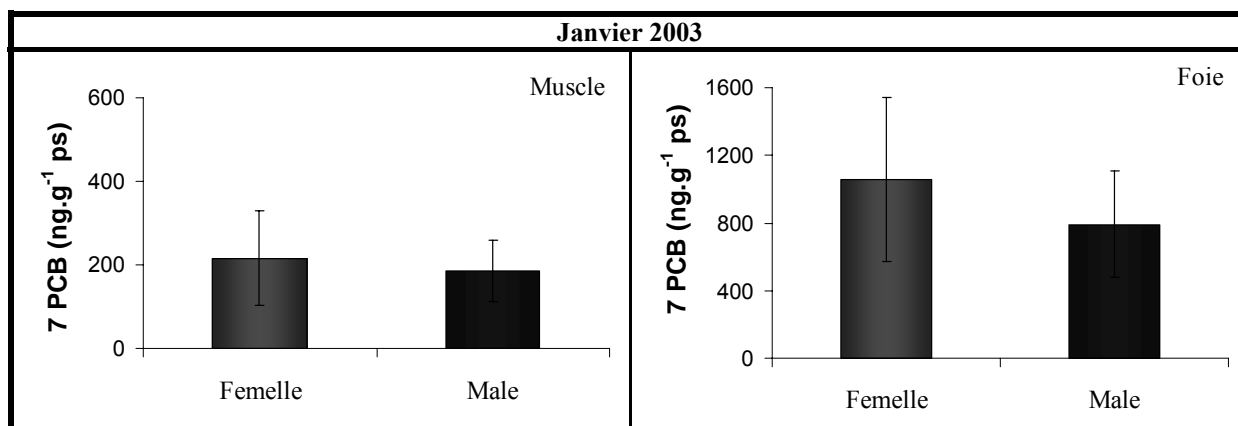


Figure 95 : Niveau de contamination en PCB exprimé en ng.g⁻¹ de poids sec dans les muscles et les foies des flets prélevés dans la Gironde (n=5).

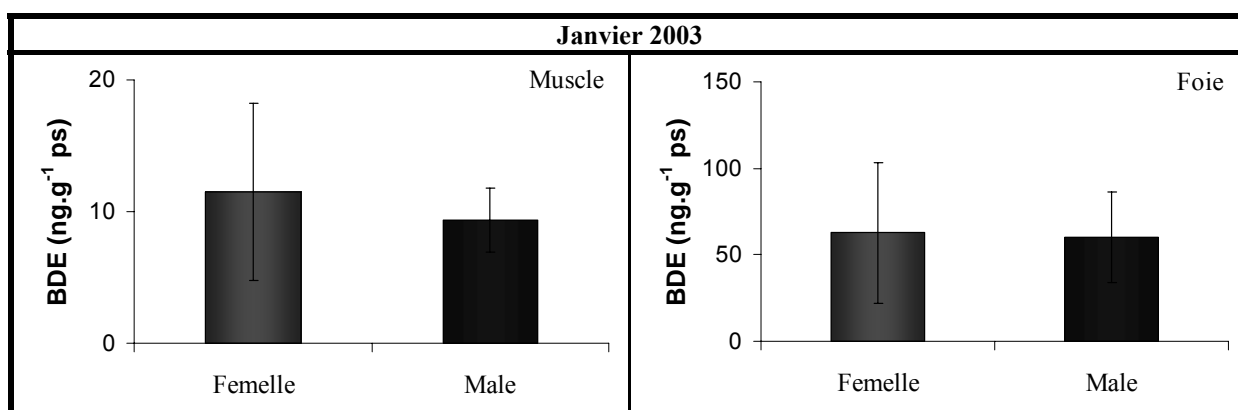


Figure 96 : Niveau de contamination en PBDE exprimé en ng.g⁻¹ de poids sec dans les muscles et les foies des flets prélevés dans la Gironde (n=5).

II.1.3. Discussion sur la contamination du flet dans les grands estuaires français

Le flet a été utilisé comme espèce cible pour évaluer les différences de contamination en PCB et PBDE des principaux estuaires français. Cette espèce s'est révélée être une bonne espèce modèle pour l'accumulation des PCB et des PBDE. Le sexe ne semble pas influencer l'accumulation des PCB et PBDE dans le muscle. *A contrario*, au niveau du foie, les femelles présentent quasi systématiquement une concentration plus élevée que les mâles. Cette différence de concentration n'est pas due à une teneur lipidique différente dans le foie entre les deux sexes, mais peut être liée à la nature des lipides présents. De plus, chez la femelle en période de reproduction, le foie synthétise une protéine de réserve, la vitellogénine qui servira de substance de réserve pour assurer la croissance des œufs une fois fécondés. Il est envisageable que les mécanismes impliqués dans cette synthèse conduisent à une plus forte accumulation des PCB et PBDE dans le foie des femelles.

La différence de contamination entre les individus issus des différentes zones a permis de classer les estuaires étudiés du plus contaminé au moins contaminé. Cette comparaison des niveaux de contamination du flet amène à la conclusion qu'après l'estuaire de Seine,

l'estuaire de la Gironde est l'estuaire qui présente les plus hauts niveaux de contamination en PCB et PBDE. L'estuaire de la Gironde est principalement connu pour sa contamination métallique. Le cadmium a notamment conduit à l'interdiction d'exploitation des bivalves commerciaux dans l'estuaire. Cependant d'après les résultats de cette étude sur les niveaux de contamination du flet, les niveaux de PCB et de PBDE dans le biota semblent également problématiques. En effet, une étude préliminaire, réalisée en 2001 dans l'estuaire de la Gironde, avait déjà mis en évidence une forte disparité des niveaux de contamination entre les différentes espèces étudiées avec, en particulier, des concentrations très élevées mesurées dans le muscle de certaines espèces comme l'anguille européenne (*Anguilla anguilla*) (resp. plus de 800 ng.g⁻¹ ps sur la base des 7 PCB prioritaires suivis comme indicateurs).

Les premières conclusions tirées à partir de ces données préliminaires (publication 3 en annexe), couplées à la comparaison interestuariers réalisée grâce au suivi de contamination des flets, laissent présager des phénomènes de bioamplification importants au sein du réseau trophique de la Gironde. C'est pourquoi l'estuaire de la Gironde a été choisi comme site naturel d'étude pour la compréhension des mécanismes de transfert et d'accumulation des POP dans les réseaux trophiques aquatiques.

II.2. L'estuaire de la Gironde

II.2.1. Etude de la contamination des premiers maillons du réseau trophique estuarien

Afin de comprendre le comportement des PCB et des PBDE dans l'estuaire de la Gironde, le compartiment abiotique et les premiers maillons du réseau trophique estuarien ont été prélevés et leurs niveaux de contamination ont été caractérisés.

II.2.1.1. Variation temporelle de la contamination : suivi mensuel à Pauillac

Un suivi mensuel de la contamination des premiers maillons trophiques de l'estuaire de la Gironde a été réalisé à Pauillac (PK 50 environ) pendant deux années, 2003 et 2004.

II.2.1.1.a. Données physico-chimiques

Au cours de chaque prélèvement, différents paramètres ont été mesurés dans les eaux de surface, la salinité, la température de l'eau et la quantité de matière en suspension (MES). Les prélèvements ont été réalisés avec un pas de temps d'un mois, dans des conditions de marée similaires, sur les deux dernières heures de la marée haute, par des coefficients de marée oscillant de 22 à 78, avec une valeur moyenne de 44 ± 13 . L'ensemble des paramètres physico-chimiques acquis durant les prélèvements est présenté dans le Tableau 36.

		Date de prélèvement	Coefficient de marée	Salinité (psu)	Température (C°)	MES (mg/l)
	Dec	12/12/02	39	2	9	1400
2003	Janv	28/01/03	55	2	10	1499
	Fev	24/02/03	53	3	11	2223
	Mar	24/03/03	67	4	12	1977
	Avril	21/04/03	39	6	14	1479
	Mai	23/05/03	44	6	18	1728
	Juin	24/06/03	44	7	23	879
	Juil	22/07/07	59	9	25	383
	Aout	27/08/03	62	12	27	906
	Sept	23/09/03	48	12	19	725
	Oct	21/10/03	48	10	15	1002
	Nov	18/11/03	37	5	13	1029
	Dec	-	-	-	-	-
2004	Janv	20/01/04	56	2	10	417
	Fev	16/02/04	49	2	11	980
	Mars	17/03/04	46	3	12	700
	Avril	28/04/04	29	4	14	500
	Mai	28/05/04	41	6	16	580
	Juin	7/07/04	78	9	21	1373
	Juil	27/07/04	51	9	23	573
	Aout	24/08/04	48	11	24	606
	Sept	-	-	-	-	-
	Oct	7/10/04	22	5	15	581
	Nov	10/11/04	73	4	12	1591

Tableau 36 : Données physico-chimiques obtenues à Pauillac durant les années 2003 et 2004.

Les Figure 97 et Figure 98 montrent l'évolution de la température, de la salinité et de la quantité de MES des eaux de surface au niveau de Pauillac pendant les deux années étudiées. L'année 2003 a été une année de canicule avec de fortes périodes d'étiage et une forte pénétration des eaux marines (David, 2006c). Durant l'année 2004, les températures observées ont été similaires à celles de l'année 2003, excepté durant les mois d'été, où les températures observées en 2003 ont atteint 27°C au mois d'août contre 24°C en août 2004.

Les salinités observées au niveau de Pauillac varient au cours de l'année, présentant les valeurs les plus basses en hiver pendant les périodes de forts débits du fleuve, et les plus fortes valeurs en été pendant les périodes d'étiage.

La charge en MES est plus importante en moyenne dans les eaux de surface en 2003 qu'en 2004. La valeur moyenne de MES dans les eaux de surface à Pauillac en 2003 est de l'ordre de 1200 mg.l⁻¹, alors qu'en 2004 elle n'est que de l'ordre de 800 mg.l⁻¹.

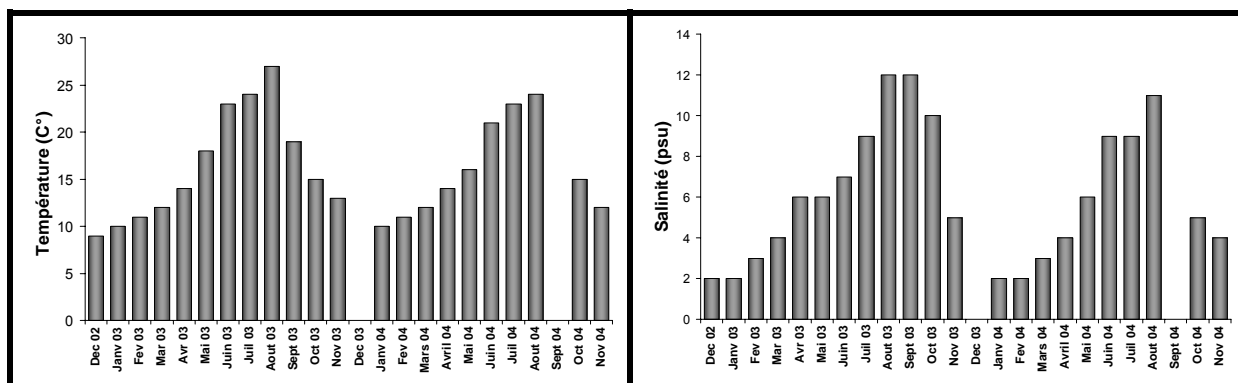


Figure 97 : Données de température et salinité acquises à Pauillac durant les années 2003 et 2004.

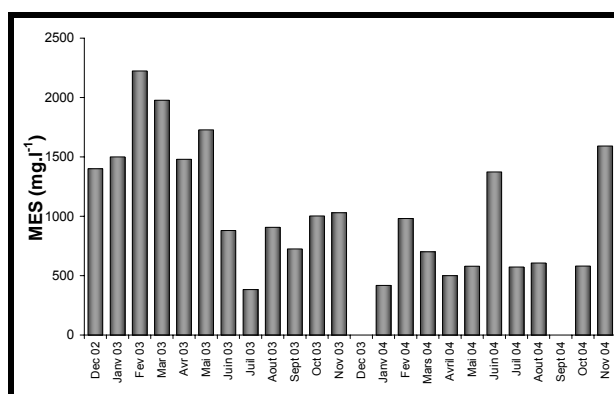


Figure 98 : Matière en Suspension (MES) dans la colonne d’eau à Pauillac durant les années 2003 et 2004 exprimé en $mg.l^{-1}$.

Afin de pouvoir interpréter les résultats en fonction des paramètres hydrologiques du milieu, les données du débit annuel moyen de la Gironde sont présentées dans la Figure 99. Ces données ont été obtenues auprès de la DIREN par l’intermédiaire de G. Oggian.

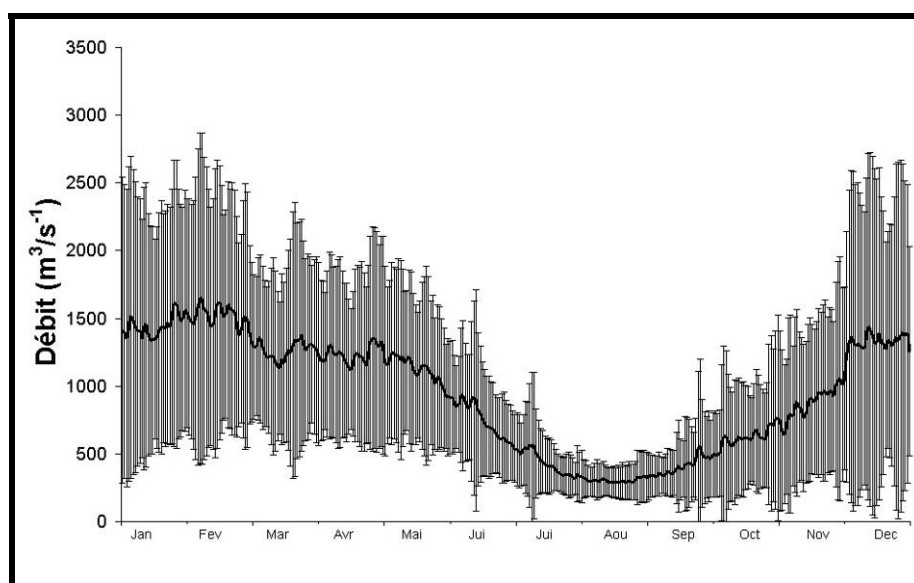


Figure 99 : Débit moyen sur une année de la Gironde calculé sur les données acquises de 1959 à 2005. La courbe noire représente la valeur moyenne et la zone grise la variabilité.

De façon globale, les débits du fleuve diminuent en été pendant les périodes d'étiage à des valeurs aux alentours de $500 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$, alors que pendant les périodes hivernales, les débits sont plus importants, de l'ordre de $1500 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ en moyenne.

Si l'on s'intéresse aux débits observés durant la période d'étude, des périodes d'étiages sont bien observées durant les mois d'été 2003 et 2004. Par contre, les périodes hivernales sont marquées par des épisodes de fortes crues avec des débits supérieurs à $5000 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$. L'année 2003 est marquée par une forte crue de courte durée, environ 6 jours au mois de février 2003. L'année 2004 quant à elle, est marquée par plusieurs fortes crues. Tout d'abord, on observe deux crues hivernales (une fin 2003 de quelques jours et l'autre en janvier-février 2004 d'une durée de 22 jours), puis une crue printanière d'une dizaine de jours, au mois de mai 2004. Ces crues ont pu contribuer à un apport en particules nouvelles provenant de l'amont.

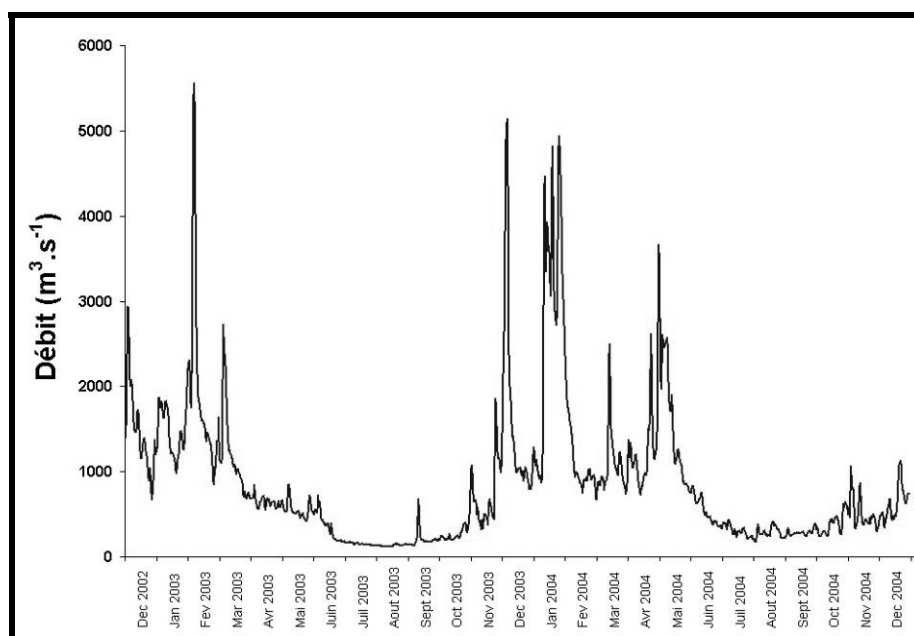


Figure 100 : Débit de la Gironde en 2003-2004 (Données DIREN obtenues grâce G. Oggian).

II.2.1.1.b. Contamination du compartiment abiotique de l'estuaire de la Gironde

Afin de caractériser la contamination du compartiment abiotique, milieu de vie des organismes planctoniques, le niveau de contamination de la colonne d'eau a été mesuré. La Figure 101a. montre le niveau de contamination en PCB de la phase dissoute (eau filtrée sur filtre GFF, $0,7 \mu\text{m}$) et de la phase particulaire exprimée en $\text{ng} \cdot \text{l}^{-1}$. Les écartypes représentent la variabilité analytique obtenue lors de l'analyse des matrices de contrôles (environ 20%).

Le maximum des contaminants est lié à la phase particulaire, seuls 10% environ de la quantité des contaminants quantifiés se retrouvent dans la phase dissoute. Ces résultats concordent avec ceux trouvés par Abarnou (1988) en estuaire de Seine, dans des eaux d'une

turbidité supérieure à 100 mg.l^{-1} . Cette répartition s'explique aisément, d'une part à cause de la quantité importante de MES ($\geq 500 \text{ mg.l}^{-1}$) d'autre part par les propriétés physico-chimique des composés étudiés, qui possèdent des coefficients de partage octanol/eau élevé ($5,5 < K_{ow} < 8,3$) et donc une solubilité faible dans l'eau. La concentration de PCB retrouvée dans les particules est de l'ordre de $35 \pm 25 \text{ ng.l}^{-1}$, alors que celle retrouvée dans la phase dissoute est de $5 \pm 2 \text{ ng.l}^{-1}$. En ce qui concerne les PBDE, aucun PBDE n'a pu être détecté dans la phase dissoute. Les niveaux présents dans la phase particulaire sont proches de la limite de détection (de l'ordre de 1 ng.l^{-1}), seul le PBDE 47 a pu être détecté dans les particules analysées. Les PBDE sont donc présents à un niveau très faible dans le compartiment abiotique de l'estuaire.

L'expression des résultats par gramme de particules permet d'appréhender la contamination de la phase particulaire en termes de contamination du pool nutritif disponible pour les niveaux trophiques supérieurs (Figure 101 b). La contamination moyenne en PCB est de l'ordre de $40 \pm 30 \text{ ng.g}^{-1} \text{ ps}$. La variation de la contamination oscille au cours des deux années d'étude. Les variations ne sont pas similaires d'une année sur l'autre. Si l'on considère l'expression des résultats en $\text{ng.g}^{-1} \text{ ps}$, les niveaux de contaminations plus importants observés dans les particules en 2004, peuvent être liés à l'apport de "nouvelles" particules issues de l'amont du système estuarien, ou de la remobilisation de matériel anciennement fixé sur les berges. Les crues de l'hiver 2003- 2004, ont pu permettre ce type de phénomènes. Il faut garder à l'esprit qu'au niveau de notre site d'étude (Pauillac), les particules présentes sont composées de particules apportées par le fleuve, mais aussi de particules piégées dans le bouchon vaseux qui ont un temps de résidence important dans le système. Il est donc particulièrement délicat de déconvoluer les mécanismes d'apport au niveau de Pauillac par la seule analyse des particules du site.

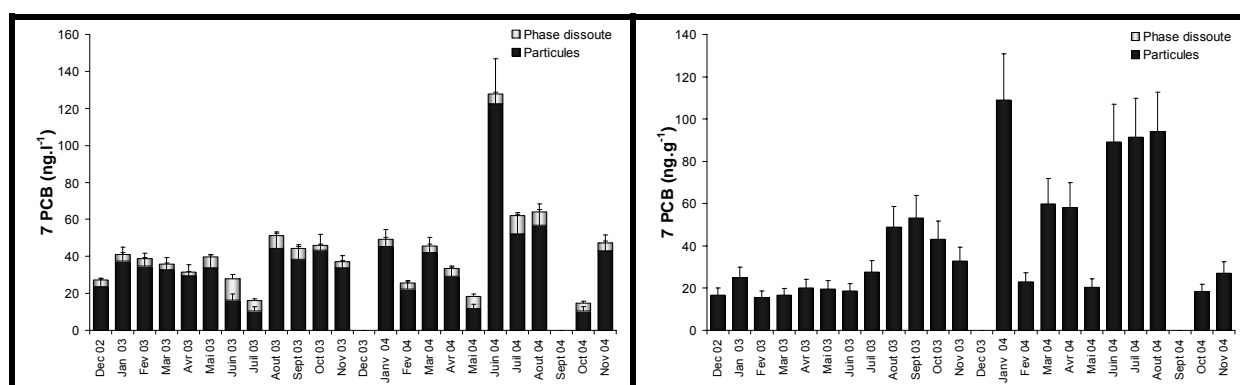


Figure 101 a. : Contamination en PCB de la colonne d'eau de l'estuaire de la Gironde exprimée en ng.l^{-1} .
 b. : Contamination en PCB de la colonne d'eau de l'estuaire exprimée en ng.g^{-1} .

II.2.1.1.c. Contamination des premiers maillons trophiques de l'estuaire de la Gironde

Au cours de chaque prélèvement, les organismes de la petite faune vagile de l'estuaire (copépodes, mysidacés, gammares et crevettes) ont été prélevés, et leur niveau de contamination en PCB et PBDE a été caractérisé. La Figure 102 montre les concentrations obtenues en PCB et PBDE dans les copépodes prélevés à Pauillac en 2003 et 2004, les barres d'erreur correspondent à la variabilité analytique déterminée à partir d'un échantillon contrôle.

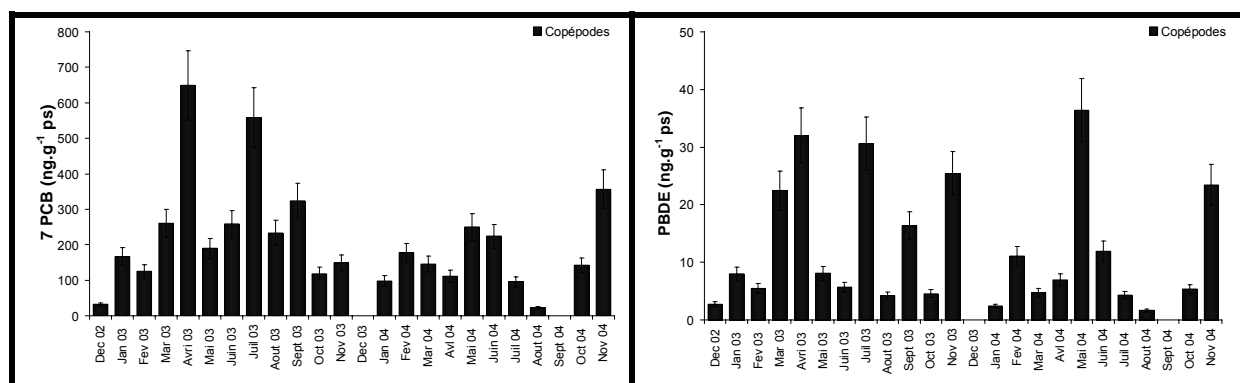


Figure 102 : Suivi de la contamination en PCB et PBDE des copépodes au niveau de Pauillac.

Il faut rappeler que les copépodes ont été analysés dans leur ensemble sans séparation d'espèce, afin de définir un niveau de contamination global. Le niveau moyen de contamination des copépodes en PCB est de 213 ± 152 ng.g⁻¹ ps, alors que la concentration en PBDE est de 13 ± 10 ng.g⁻¹ ps. Les variations mensuelles des niveaux de contamination en PCB sont similaires à celles observées pour les PBDE, mais à des niveaux de contaminations différents. La Figure 103 montre la corrélation entre les concentrations en PCB et en PBDE retrouvés dans les copépodes. L'accumulation des PBDE semble corrélée à celle des PCB, cependant les niveaux de PBDE restent plus faibles, de l'ordre d'un facteur 10 par rapport au niveau de PCB. Un point altère la tendance, durant le mois de mai 2004, où une forte contamination en PBDE (37 ng.g⁻¹), largement supérieure à la moyenne est observée, alors que la concentration en PCB pour ce mois est l'ordre de 250 ng.g⁻¹, très légèrement au dessus de la moyenne. Si l'on supprime ce point de la courbe corrélation, le coefficient de corrélation s'élève à $r^2 = 0,75$.

Cette corrélation entre les niveaux de PCB et de PBDE dans les copépodes, confirme les tendances observées dans les expérimentations en milieu contrôlé, où les PBDE, principalement le BDE 47, ont démontré une forte capacité d'accumulation, équivalente à celle du CB 153. En milieu naturel, les tendances d'accumulation des PCB semblent similaires à celles observées pour les PBDE, le même type de phénomènes doit être impliqué dans les mécanismes d'accumulation de ces deux classes de composés.

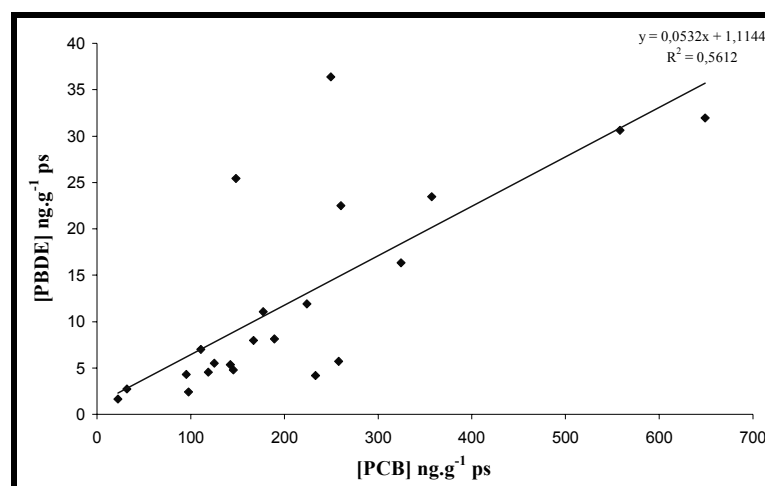


Figure 103 : Corrélation entre les niveaux de contamination en PCB et PBDE dans les copépodes.

Aucune tendance saisonnière précise ne se dégage ici, contrairement aux résultats obtenus en estuaire de Seine (Cailleaud, 2006), qui mettent en évidence une contamination plus importante des copépodes durant la période hivernale, où les adultes sont majoritaires par rapport aux juvéniles. Cependant, dans l'estuaire de Seine, une seule espèce de copépodes domine, *E. affinis*, alors que l'estuaire de la Gironde présente une population mixte de copépodes composée d'*E. affinis* et d'*Acartia* (*A. tonsa* et *A. bifilosa*).

Une répartition des espèces présentes dans l'estuaire durant la période d'échantillonnage est donnée par les travaux réalisés par le LOB au niveau du PK 52 dans l'estuaire de la Gironde par un suivi mensuel (Figure 104) (Quintin *et al.*, 2004 ; Quintin *et al.*, 2005). D'après ces résultats, *E. affinis* domine la population de copépodes exceptés pendant les mois de juillet, août, septembre, octobre 2003, et août, septembre 2004. Durant le premier pic de contamination observé en avril 2003, la population de copépodes est dominée par *E. affinis*, alors que durant le second pic observé en juillet 2003 la population de copépodes est dominée par *Acartia* sp. Il ne semble donc pas que les variations de contamination puissent être imputées aux différences d'espèces présentes dans le milieu.

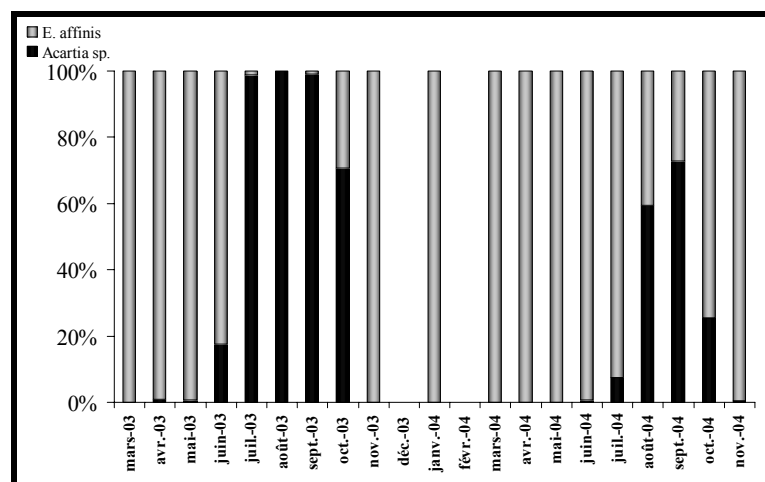


Figure 104 : Composition de la population de copépodes au niveau du PK 52 durant la période étudiée.

La piste de la proportion d'adultes dans la population d'*E.affinis* a aussi été envisagée comme explication des forts niveaux de contaminations observés. En effet, Cailleaud (2006) a mis en évidence dans le cas de l'estuaire de Seine que les plus forts niveaux de contamination dans les copépodes étaient observés en hiver, lorsque la proportion d'adulte est la plus importante. Comme sur la Seine, la proportion d'adulte est plus importante en hiver, mais ceci ne correspond pas aux pics de contamination observés en Gironde.

Aucune corrélation claire entre les niveaux de contaminations observés et la proportion d'adultes n'est donc mise en évidence, dans le cadre de cette étude. Le fonctionnement de l'estuaire de la Gironde semble différent de celui de la Seine.

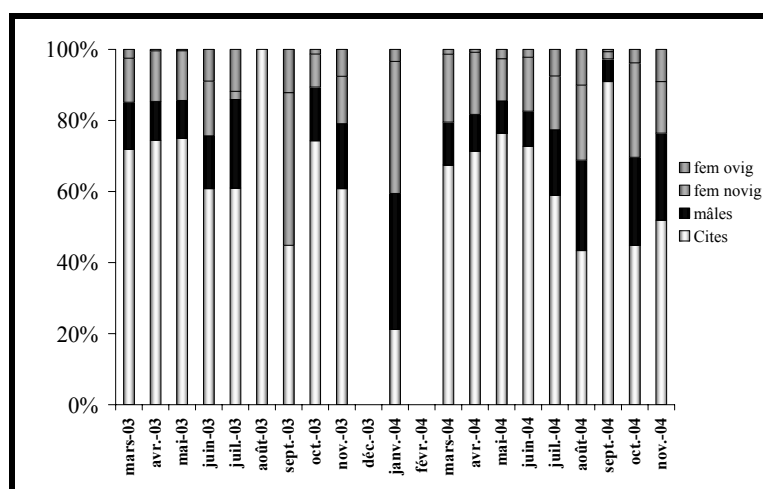


Figure 105 : Proportions d'adultes et de juvéniles observées au niveau du PK 52 durant les deux années d'études (Quintin *et al.*, 2004 ; Quintin *et al.*, 2005).

La Figure 105 présente les abondances estimées des différentes espèces de copépodes au niveau du PK52, dans l'estuaire de la Gironde (Quintin *et al.*, 2004 ; Quintin *et al.*, 2005). Une corrélation semble apparaître entre les pics d'abondance des différentes espèces de copépodes et les pics de contamination. Le pic de contamination en PCB et PBDE du mois d'avril 2003 semble correspondre à la période de production maximale d' *E.affinis*. Le pic de contamination du mois de juillet 2003 semble correspondre à la période de production maximale d'*A.tonsa*. De plus une légère augmentation du niveau de contamination des copépodes est également observée en septembre, ce qui correspond à la fin du pic de production d' *A.biffilosa*.

La tendance semble se confirmer en 2004 avec le pic de production du mois de mai 2004 qui correspond à un niveau de contamination plus élevé que la moyenne. De même, le deuxième pic de production d'*E.affinis* en novembre correspond à une augmentation de la concentration en PCB et PBDE dans les copépodes. L'absence de données de contamination de septembre 04 ne permet pas de confirmer une contamination liée au pic d'abondance d'*Acartia*.

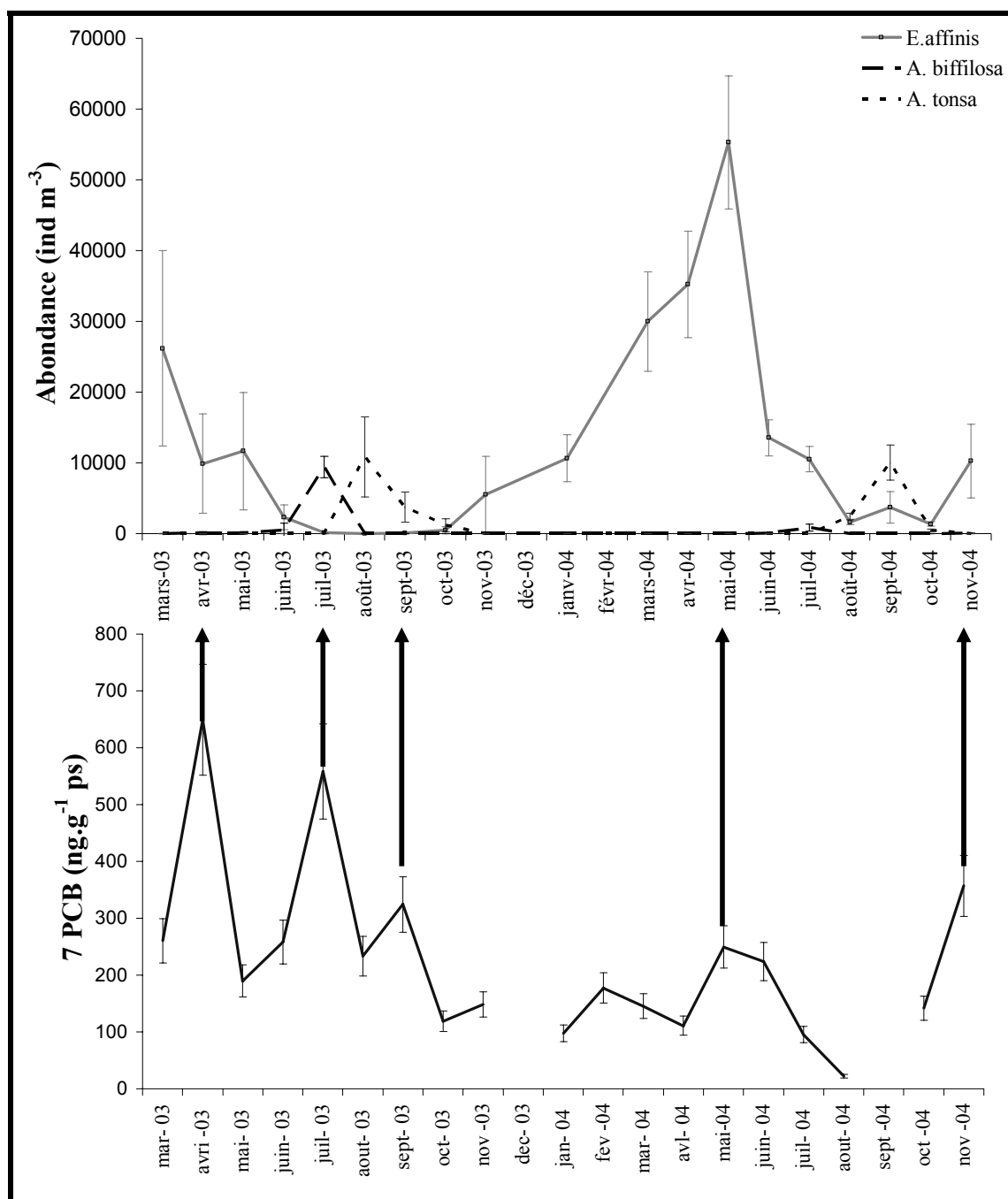


Figure 106 : Abondance des espèces de copépodes au niveau du pk 52 de l'estuaire de la Gironde, corrélée à la contamination en PCB des copépodes.

Les données actuelles ne permettent pas de conclure de façon catégorique sur la corrélation entre l'abondance des copépodes et leur niveau de contamination. Pour conclure définitivement, il serait intéressant pour le futur d'envisager un échantillonnage plus complet sur une année (ou au moins sur les périodes de productions maximales), avec un pas d'échantillonnage resserré (2 ou 4 fois par mois par exemple) et de caractériser la contamination chimique, l'abondance des différentes espèces de copépodes et la répartition en âge sur les mêmes échantillons.

Il serait par ailleurs intéressant de définir le niveau de contamination de chaque espèce de copépodes (*E.affinis*, *A.tonsa*, *A.biffilosa*). Parallèlement à cela, il serait également intéressant de suivre la contamination des copépodes sur un cycle complet de marée avec un prélèvement toutes les heures afin d'être tout à fait certain que les variations de concentrations en PCB et PBDE observées sont bien liées à une variabilité saisonnière, et non à une variabilité tidale. Dans l'état actuel des connaissances, un début d'explication peut être avancé, impliquant un fonctionnement particulier du réseau trophique estuarien qui conduirait durant les pics d'abondance des différentes espèces de copépodes à une forte contamination, mais cela n'explique pas la différence d'intensité de contamination entre l'année 2003 et 2004.

Les niveaux de contamination des mysidacés en PCB et PBDE sont présentés dans la Figure 107. Dans le cadre de ce travail, les mysidacés ont été considérés dans leur ensemble. Les mysidacés analysés sont un pool des deux espèces présentes dans l'estuaire, *N.integer* et *M.slabberi*. Leur niveau moyen de contamination en PCB est de $131 \pm 62 \text{ ng.g}^{-1} \text{ ps}$, alors que leur teneur en PBDE est plus faible, de l'ordre de $6 \pm 4 \text{ ng.g}^{-1} \text{ ps}$. Les niveaux de contamination en PCB et PBDE sont également corrélés.

Là encore, aucune tendance saisonnière claire n'est mise en évidence. On peut noter que le niveau de contamination global des mysidacés est inférieur à celui des copépodes sur les deux ans. Par contre, si l'on ne tient pas compte des deux pics de contamination des mois d'avril et de juillet 03, la contamination moyenne des copépodes tombe à $174 \pm 88 \text{ ng.g}^{-1} \text{ ps}$ et dans ce cas les concentrations entre les deux classes sont comparables.

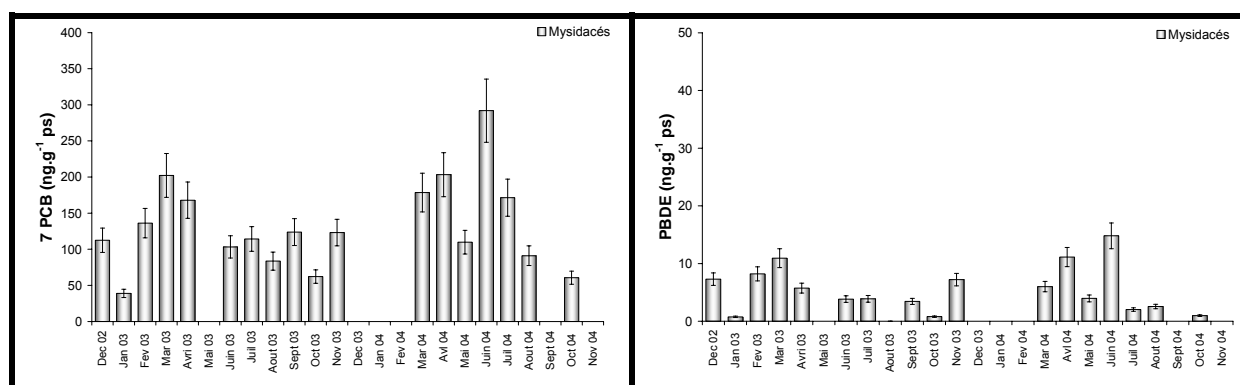


Figure 107 : Suivi de la contamination en PCB et PBDE des mysidacés au niveau de Pauillac.

La répartition des deux espèces de mysidacés aux alentours de Pauillac sur les deux années d'études a été obtenue grâce au suivi réalisé au niveau du PK 52 (Figure 108). *M.slabberi* est majoritaire de juin à novembre sur l'année 2003, alors qu'il est moins présent en 2004, tout en étant majoritaire au mois de mai (75%) et relativement abondant au mois d'août et novembre (> 40%).

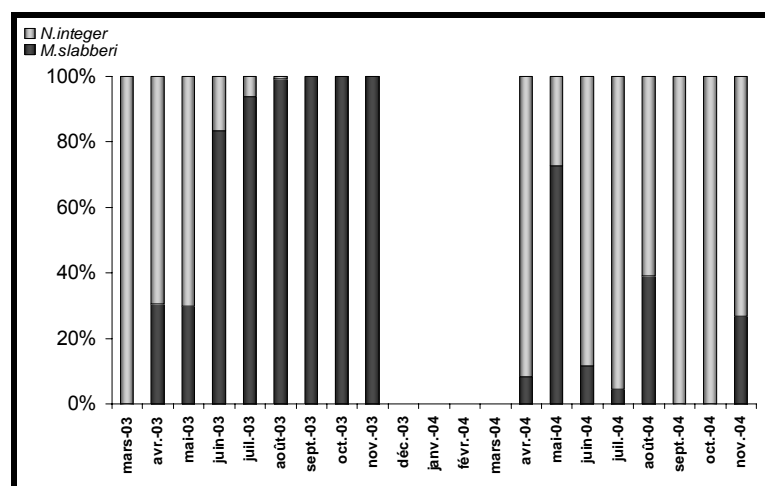


Figure 108 : Composition de la population de mysidacés au niveau du PK 52 durant la période étudiée.

Si l'on observe les résultats de contamination des mysidacés en fonction des générations de mysidacés qui se succèdent, une relation semble se dessiner (Figure 109).

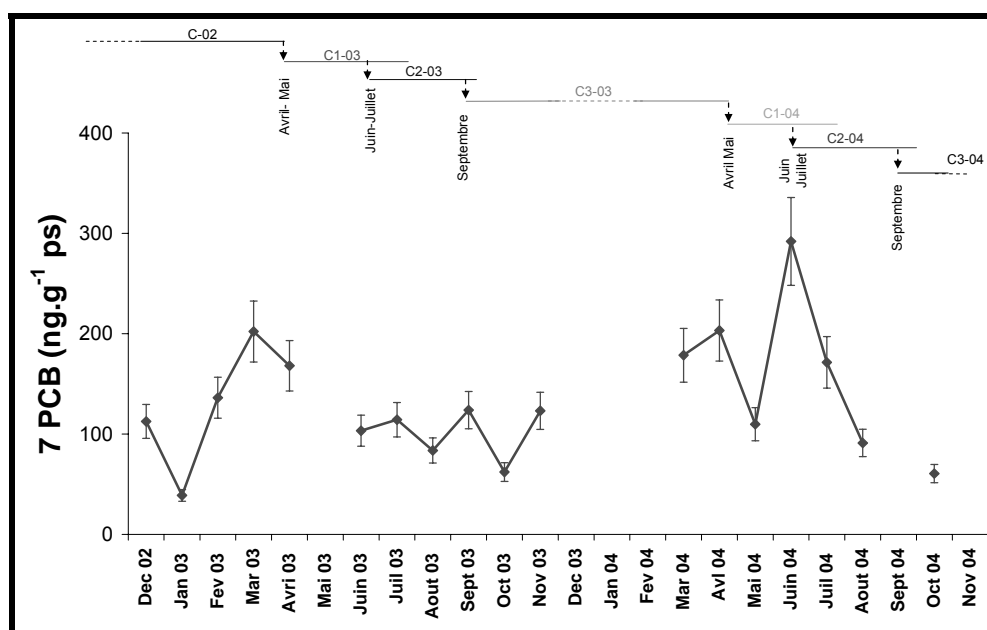


Figure 109 : Contamination en PCB des mysidacés en fonction des différentes cohortes de mysidacés d'après David, 2006c.

Les baisses de niveau de contamination semblent correspondre à l'arrivée d'une nouvelle génération de mysidacés et donc à la disparition de la génération précédente. La tendance est similaire avec les PBDE. Les niveaux les plus importants de contamination semblent apparaître en fin de génération, quand la population compte le maximum d'adultes. Les résultats de contamination semblent donc, dans ce cas, être expliqués par le cycle de vie des organismes. Les adultes, *a priori* exposés aux contaminants pendant une durée plus longue que les juvéniles, seraient plus contaminés. Ceci expliquerait les pics de contamination observés. Lorsque ces adultes meurent, le niveau de contamination global du compartiment

mysidacés diminue, puisque la population est composée de juvéniles *a priori* moins contaminés. Les cycles se succèdent ainsi au cours de l'année. Le niveau de contamination des mysidacés semble donc lié directement à leur cycle de vie. Ces résultats confirment que l'étude des niveaux de contamination d'un organisme ne peut donc pas être découplée de l'étude de son cycle de vie et de son écologie.

Le niveau de contamination des gammares a été également suivi sur les deux années d'étude. Les gammares ont été considérés ici comme un groupe homogène (Figure 110). Leur niveau moyen de contamination en PCB est de $213 \pm 72 \text{ ng.g}^{-1} \text{ ps}$, alors que la concentration en PBDE est de $17 \pm 6 \text{ ng.g}^{-1} \text{ ps}$. La contamination des gammares est du même ordre que celle des copépodes, mais la médiane obtenue pour les concentrations des gammares est supérieure à celle obtenue pour les copépodes (respectivement 200 ng.g^{-1} contre 170 ng.g^{-1}). Le niveau global de contamination des gammares est plus élevé et plus homogène que celui des copépodes.

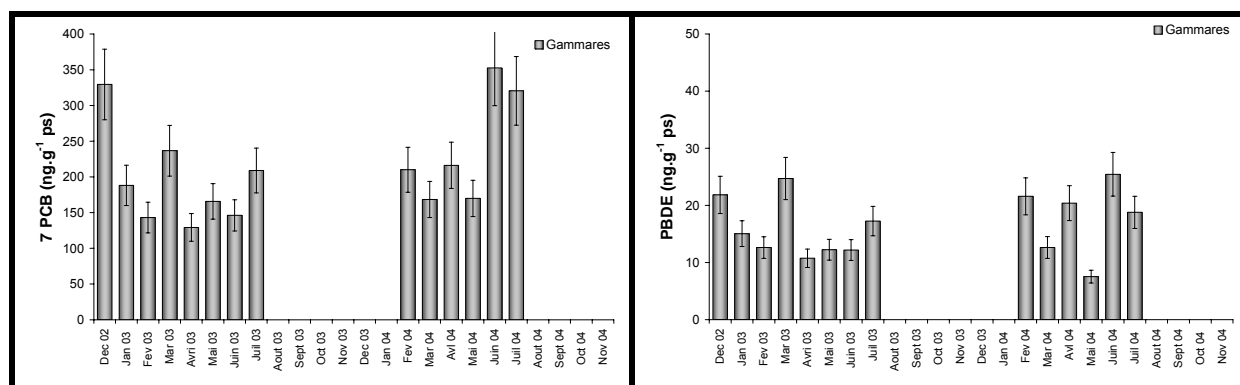


Figure 110 : Suivi de la contamination en PCB et PBDE des gammares au niveau de Pauillac.

Des crevettes ont été également analysées durant ces travaux. Les deux espèces présentes dans l'estuaire ont été analysées séparément, *Palaemon longirostris* et *Crangon crangon*. Le mode d'échantillonnage par filet WP2 n'étant pas particulièrement adapté à ces espèces, la capture sporadique des crevettes qui en a résulté ne donne qu'une indication sur leur niveau de contamination.

Les résultats obtenus pour les crevettes blanches (*P. longirostris*) sont présentés Figure 111. Leur niveau moyen de contamination en PCB est de $89 \pm 19 \text{ ng.g}^{-1} \text{ ps}$, alors que la concentration en PBDE est de $2,3 \pm 1 \text{ ng.g}^{-1} \text{ ps}$. Le niveau de contamination des crevettes blanches est significativement inférieur à celui observé pour les autres organismes de la petite faune vagile étudiés. Les capacités d'élimination des PCB par la crevette blanche ont été mises en évidence par Goerke et Weber (2001) et explique très probablement les faibles teneurs retrouvées dans les crevettes analysées.

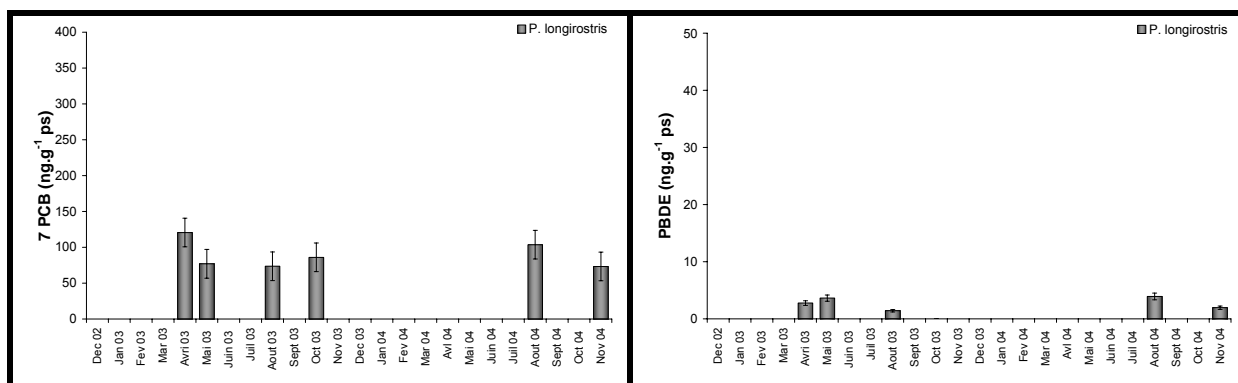


Figure 111 : Suivi de la contamination en PCB et PBDE des crevettes blanches au niveau de Pauillac.

Les niveaux de contamination obtenus pour les crevettes grises (*C. crangon*) sont présentés Figure 112. Leur niveau moyen de contamination en PCB est de 77 ± 78 ng.g⁻¹ ps, alors que la concentration en PBDE est de $3,8 \pm 4,7$ ng.g⁻¹ ps. Le niveau de contamination des crevettes grises n'est pas significativement différent du niveau de contamination des crevettes blanches. Cependant, les écarts de concentration entre les différents mois d'échantillonnage dans le cas des crevettes grises sont importants. En réalité, les niveaux de contamination les plus faibles (PCB : 40 ng.g⁻¹, PBDE : 1 à 2 ng.g⁻¹) correspondent aux prélèvements printaniers et estivaux, contenant de jeunes individus de petites tailles, donc *a fortiori* moins contaminés. *A contrario*, les prélèvements hivernaux contenant des individus adultes présentent des niveaux de concentration plus élevés, de l'ordre de 200 ng.g⁻¹ en PCB et de 10 ng.g⁻¹ en PBDE.

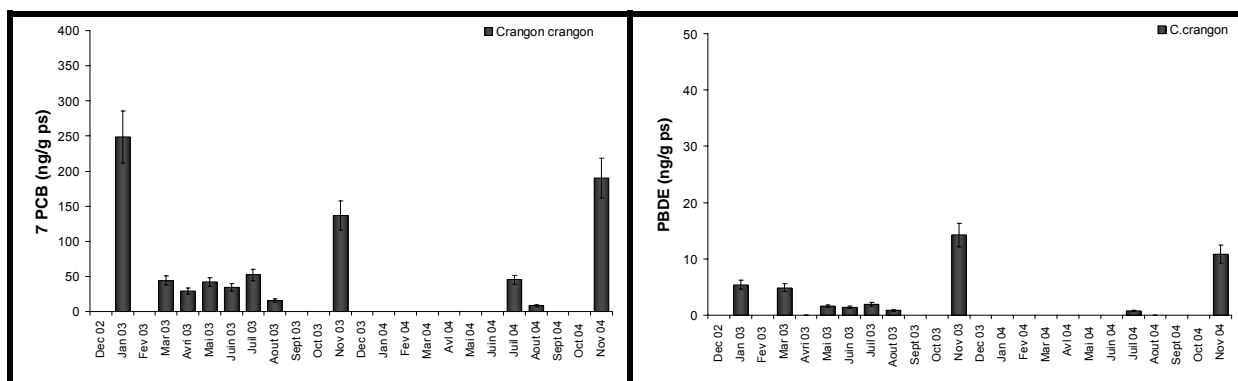


Figure 112 : Suivi de la contamination en PCB et PBDE des crevettes grises au niveau de Pauillac.

II.2.1.1.d. Empreinte de la contamination en PCB et PBDE

La Figure 113 illustre la répartition des différents composés analysés. En ce qui concerne les PCB, une différence significative d'empreinte entre les particules et les compartiments biologiques est observable. La phase particulaire est dominée par des composés tétra et pentachlorés (CB 52, CB 101 et CB 118). Le compartiment biologique est dominé par les composés hexa- et hepta-chlorés. Les crevettes et les mysidacés présentent une part importante de composés hexa et de heptachlorés (CB 138, 153 et 180) (plus de 70%).

L’empreinte des PCB observée pour les crevettes semble confirmer leurs capacités de métabolisation. Elles sont connues pour avoir une capacité de dépuración des composés les moins chlorés (Goerke et Weber, 2001). Les mysidacés présentent le même type d’empreinte que les crevettes, cela laisse supposer que les mysidacés possèderaient des capacités de métabolisation similaires aux crevettes. Cela explique par la même occasion le niveau de contamination faible des mysidacés par rapport aux copépodes.

Pour les PBDE, le composé majoritaire est le BDE 47. Il faut garder en mémoire que dans les particules, les teneurs étant très faibles, seul le BDE 47 a pu être détecté, mais cela n’exclut pas la présence des autres composés en dessous de la limite de détection. Dans les organismes, un deuxième PBDE est quantifié en concentration significative, le PBDE 99. La présence de PBDE 99 dans les organismes illustre le phénomène de bioaccumulation observés classiquement pour les PCB et les PBDE. Le PBDE 99 n’est pas détectable dans le compartiment abiotique, mais il apparaît dans les organismes biologiques. Il a vraisemblablement été accumulé par les organismes durant l’exposition à de très faibles concentrations (non détectables dans le cadre de notre étude). Cela souligne également l’intérêt du suivi de la contamination chimique dans les organismes, qui sont pour les POP des accumulateurs de pollution.

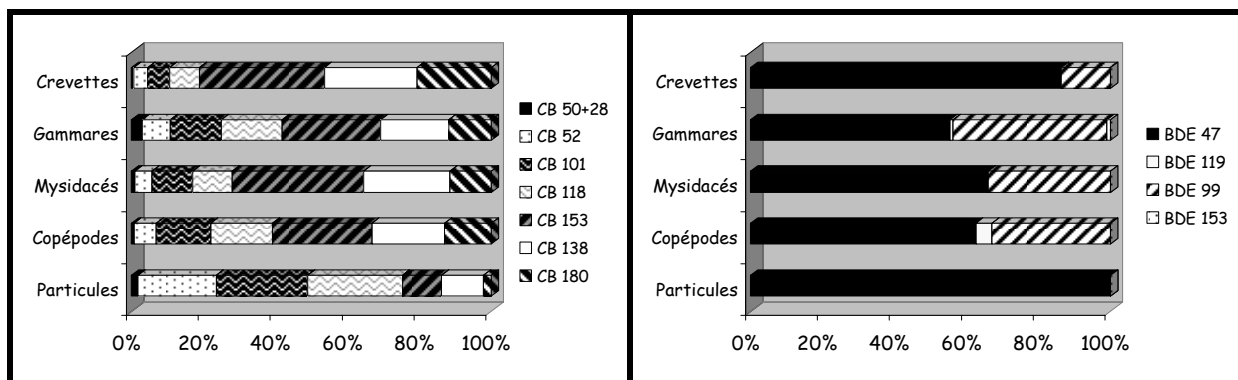


Figure 113 : Empreinte de contamination des premiers maillons trophiques de l’estuaire de la Gironde.

II.2.1.1.e. Synthèse des données obtenues au niveau de Pauillac

La Figure 114 permet de visualiser la contamination globale des différents compartiments étudiés en PCB et la Figure 115 en PBDE. Il est intéressant de noter que les copépodes présentent un niveau de contamination moyen ($220 \pm 50 \text{ ng.g}^{-1} \text{ ps}$) du même ordre de grandeur que celui observé pour les gammares ($210 \pm 72 \text{ ng.g}^{-1} \text{ ps}$), mais supérieur à celui des mysidacés ($130 \pm 62 \text{ ng.g}^{-1} \text{ ps}$). Par contre, le niveau de contamination des crevettes blanches ou grises dans l’estuaire est significativement inférieur à ceux des autres compartiments analysés.

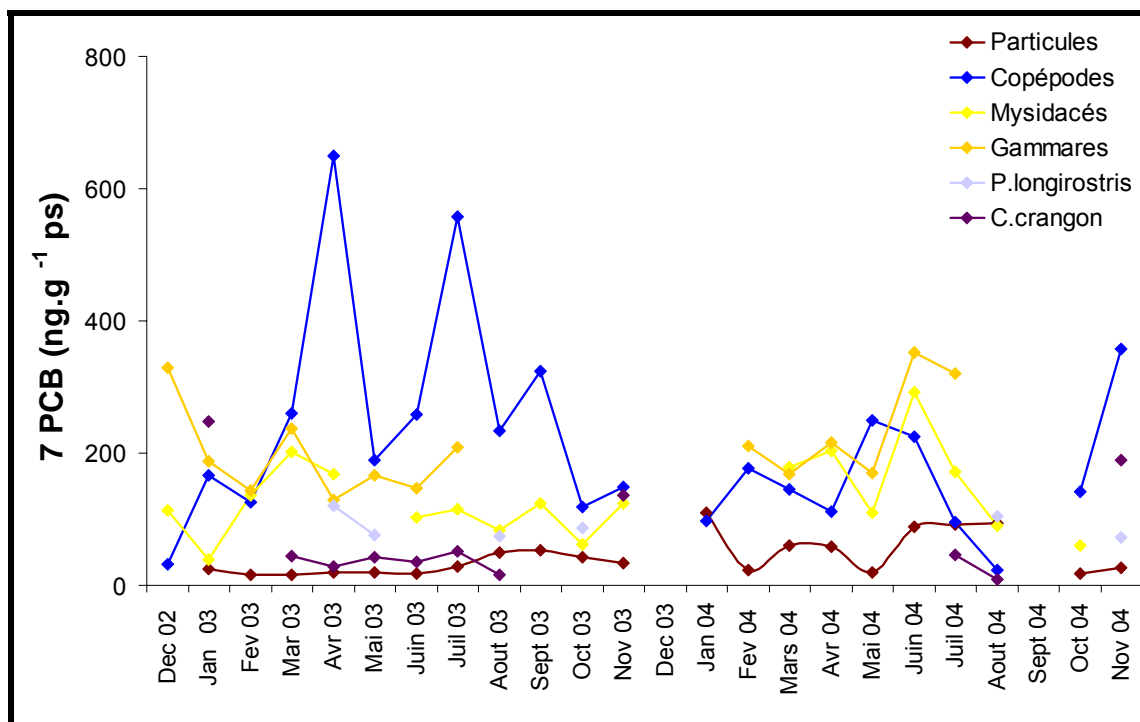


Figure 114 : Synthèse des niveaux de contamination en PCB des premiers maillons du réseau trophique de l'estuaire de la Gironde.

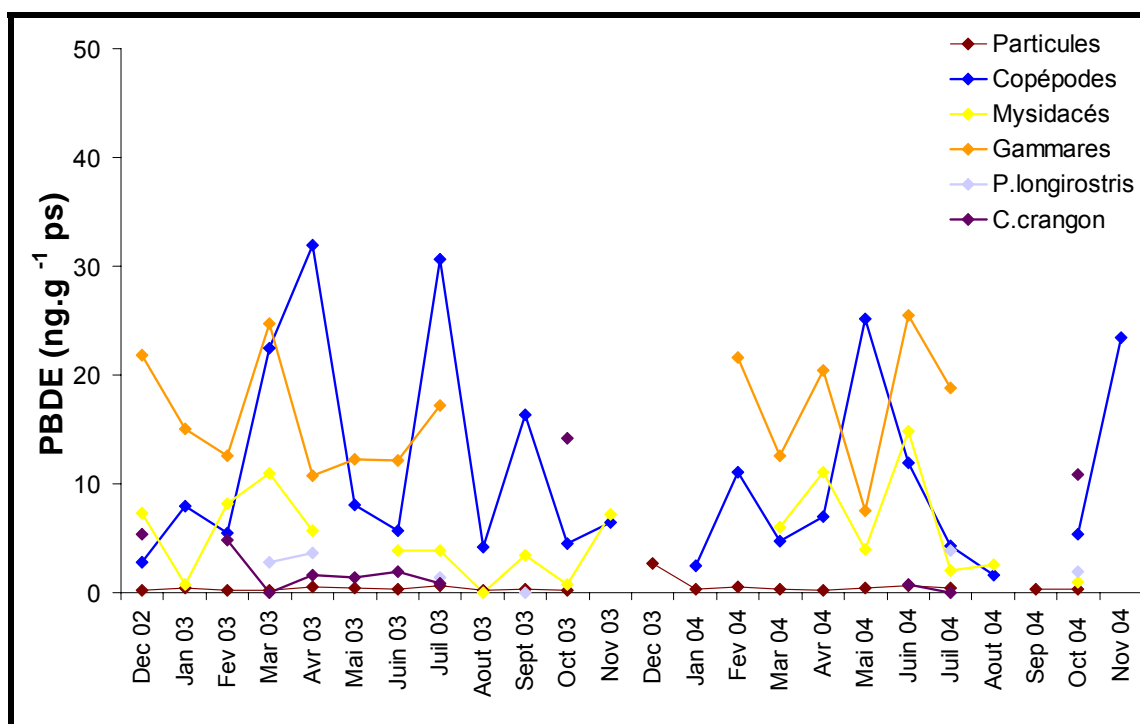


Figure 115 : Synthèse des niveaux de contamination en PBDE des premiers maillons du réseau trophique de l'estuaire de la Gironde.

Il n'a pas été possible de corrélérer les niveaux de contamination des copépodes et des autres organismes étudiés avec des niveaux de contamination du compartiment abiotique. La variation de ces niveaux de contamination pourrait plutôt avoir une origine liée au régime alimentaire ou à une particularité du cycle de vie des espèces.

En effet, le fonctionnement particulier du réseau trophique dans la Gironde, où la matière organique détritique joue un rôle important, faciliterait les mécanismes de transfert de POP au niveau trophique supérieur. La lumière étant un facteur limitant dans l'estuaire, surtout dans la zone du bouchon vaseux, la base du réseau trophique semble constituée par une boucle microbienne, qui contient de nombreux maillons trophiques, facilitant ainsi l'exportation des PCB vers les niveaux supérieurs (Walberg *et al*, 1997). Les phénomènes influençant les variations de contamination des organismes semblent multiples. Les niveaux de PCB et PBDE dans les copépodes semblent liés aux pics d'abondance des différentes espèces des copépodes de l'estuaire et aux pics de production du milieu. La contamination des mysidacés semble elle être influencée de façon directe par le cycle de vie des mysidacés, alors que la contamination des gammares ne présente pas de variations nettes.

II.2.1.2. Variation spatio-temporelle de la contamination : Mission Rétrogir

Afin de compléter l'étude temporelle réalisée sur le site de Pauillac, une étude complémentaire a été réalisée sur l'estuaire de la Gironde afin de définir la variabilité spatio-temporelle des niveaux de contamination des premiers maillons trophiques de l'estuaire de la Gironde. Au total, cinq points de prélèvement ont été suivis d'avril à septembre 2003, dans le chenal de navigation de l'estuaire de la Gironde durant la mission "Rétrogir" en collaboration avec V. David et B.Sautour (UMR EPOC 5805, Station marine d'Arcachon, Université Bordeaux 1).

II.2.1.2.a. Données physico-chimiques

Afin de caractériser au mieux les masses d'eau dans lesquelles les pêches ont été réalisées, la température de l'eau, la salinité et la teneur en Matière en Suspension (MES) ont été mesurées. La profondeur d'eau au niveau des points de prélèvement a été également notée (Figure 35).

	Stations	Date	Profondeur (m)	Température (°C)	Salinité (psu)	[MES] (mg.l ⁻¹)
Avr 03	Pt 3	25/04/2003	12	15,5	16,9	66
	Pt 6	25/04/2003	9	16,7	7,9	320
	PK 40	26/04/2003	7	16,9	0,6	453
Mai 03	Pt 3	08/05/2003	13	16,1	17,6	757
	Pt 6	08/05/2003	11	16,7	9,5	109
	Pk 50	09/05/2003	11	16,5	1,1	593
	Pk 40	09/05/2003	8	16,5	0,2	419
	Pk 30	09/05/2003	10	16,3	0,0	464
Juin 03	Pt 3	13/06/2003	12	21,8	19,4	163
	Pt 6	13/06/2003	11	24,3	9,1	143
	Pk 50	13/06/2003	13	24,8	7,3	158
	Pk 40	14/06/2003	8	24,4	0,9	1046
	Pk 30	14/06/2003	9	24,6	0,5	490
Juil 03	Pt 3	11/07/2003	14	24,0	23,4	113
	Pt 6	11/07/2003	10	26,0	15,3	100
	Pk 50	11/07/2003	15	26,1	10,3	386
	Pk 40	12/07/2003	7	25,6	3,3	789
	Pk 30	12/07/2003	9	25,9	2,0	661
Août 03	Pt 3	29/08/2003	7	24,5	23,9	167
	Pt 6	29/08/2003	8	25,6	14,4	385
	Pk 50	29/08/2003	10	24,8	16,1	85
	Pk 40	30/08/2003	9	24,5	4,9	471
	Pk 30	30/08/2003	10	24,8	3,8	1071
Sept 03	Pt 3	30/09/2003	9	19,7	23,1	167
	Pt 6	30/09/2003	11	20,3	15,8	385
	Pk 50	30/09/2003	11	20,4	16,2	85
	Pk 40	01/10/2003	8	20,0	5,6	471
	Pk 30	01/10/2003	10	19,9	4,2	1074

Tableau 37 : Données physico-chimiques mesurées à chaque point de prélèvement de la mission Retrogir.

II.2.1.2.b. Contamination du compartiment abiotique

La contamination de la phase dissoute est faible. Pour les PCB, le niveau de contamination est équivalent à celui observé dans le cas du suivi de Pauillac ($6 \pm 2 \text{ ng.l}^{-1}$). Aucun PBDE n'a pu être détecté dans la phase dissoute. Les résultats de la contamination de la phase particulaire dans l'estuaire marin sont présentés Figure 116. Seuls les résultats de la contamination en PCB sont présentés ici, les niveaux de PBDE sont très faibles et en dessous de la limite de quantification (de l'ordre de 1 ng.g^{-1}). Les résultats sont représentés en fonction de leur date et point de prélèvement ; les salinités du milieu ont été rajoutées sur la figure pour permettre de caractériser les masses d'eau étudiées. Les teneurs en MES sur cette période sont représentées Figure 117. Globalement, la partie amont correspondant à la zone classique du bouchon vaseux est plus chargée en particules que la zone aval. Le débit moyen de l'estuaire sur cette période est de $344 \pm 220 \text{ m.s}^{-1}$, aucun épisode de crue significatif n'a été observé pendant cette période.

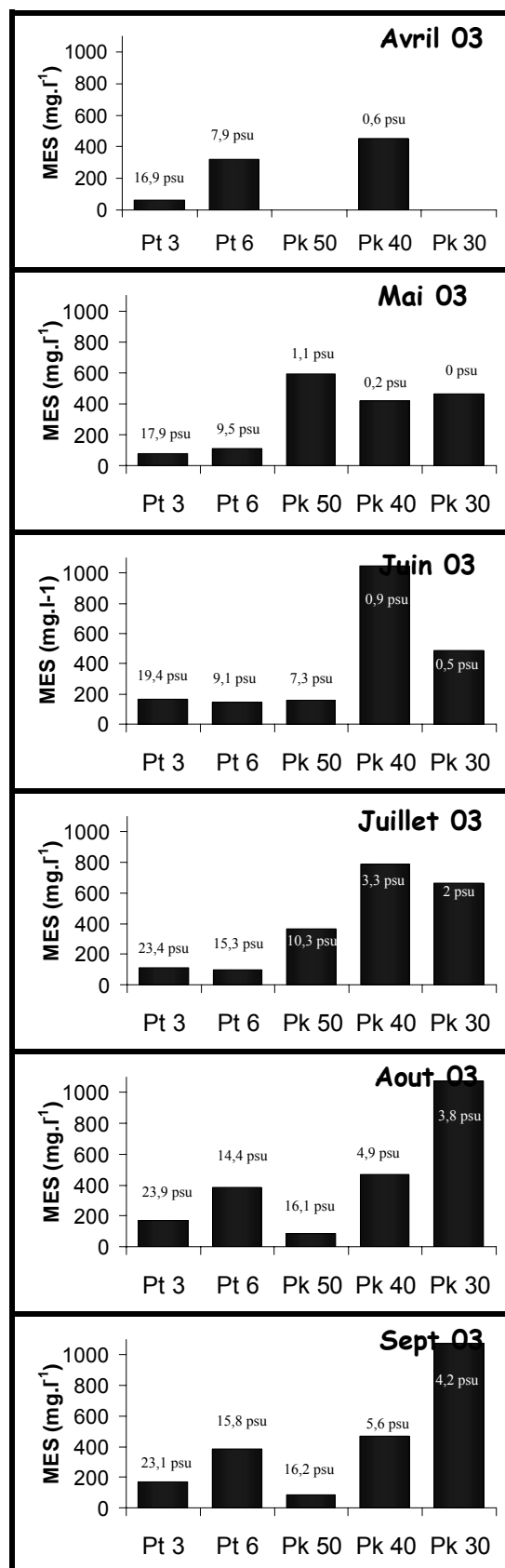
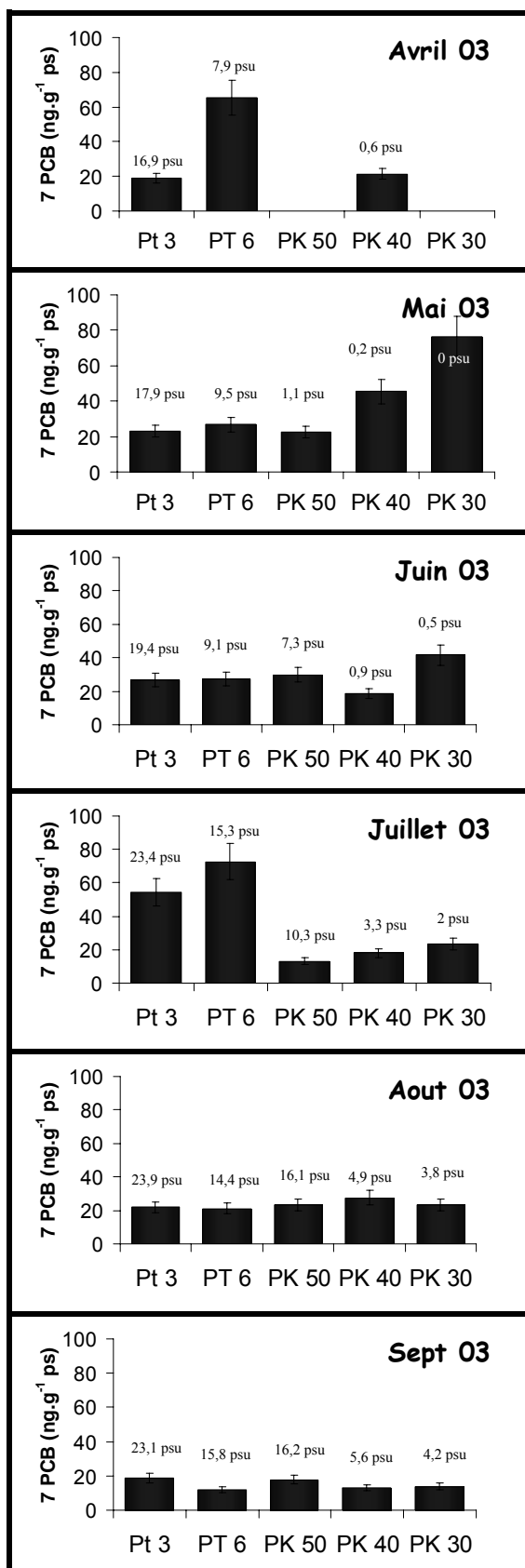


Figure 116: Contamination du compartiment abiotique pour chaque point de prélèvement de la mission Rétrogir exprimée en ng.g⁻¹ps.

Figure 117: Teneur en MES pour chaque point de prélèvement de la mission Rétrogir en mg.l⁻¹.

Le niveau moyen de contamination en PCB de la matière en suspension dans l'estuaire marin est de l'ordre $27 \pm 19 \text{ ng.g}^{-1} \text{ ps}$ sur la période de l'étude (avril 03 à septembre 03). Un niveau de contamination plus élevé est observé durant le mois d'avril 03 au niveau du point 6 ($65 \text{ ng.g}^{-1} \text{ ps}$), en mai 03 au niveau du PK 30 ($76 \text{ ng.g}^{-1} \text{ ps}$) et en juillet 03 sur les points 3 et 6 (respectivement 55 et $72 \text{ ng.g}^{-1} \text{ ps}$). Ces prélèvements réalisés dans le chenal de navigation mettent en évidence une augmentation de la concentration de la phase particulaire à la même période que les pics de contamination observés dans les copépodes à Pauillac (avril et juillet 2003). Cela apporte une corrélation possible entre le niveau de contamination du compartiment abiotique et le compartiment copépode. Si l'on prend en considération le mouvement des masses d'eau dans l'estuaire, soumis notamment aux marées et au débit du fleuve, le lot de particules "contaminé", prélevé et analysé lors de la mission Rétrogir au niveau du PT 6 peut avoir contribué à la contamination des copépodes analysés au niveau de Pauillac. En effet, la salinité du prélèvement réalisé à Pauillac est de 6 psu, alors que celui de la mission Rétrogir d'avril au niveau du PT 6 est de 7,9 psu. Les deux prélèvements réalisés à quelques jours d'intervalles ont pu être réalisés dans la même masse d'eau. Par contre, aucune élévation significative du niveau de contamination dans les particules n'a été mis en évidence à Pauillac en avril 03. Il pourrait donc exister une hétérogénéité de la contamination des particules dans l'estuaire avec des lots de particules plus contaminées que d'autres.

II.2.1.2.c. Contamination des premiers niveaux trophiques

Parallèlement à la caractérisation de la contamination du milieu abiotique, le niveau de contamination des copépodes a été étudié. Afin de bien définir le compartiment copépodes, la caractérisation des espèces dans les échantillons analysés a été réalisée dans le cadre de la thèse de V. David (2006c). Cette répartition est présentée Figure 118. Sur le mois d'avril, *E.affinis* est majoritaire sur tous les points, puis peu à peu, la dominance d'*Acartia* se met en place en venant de l'aval. Ces données concordent avec celle mis en évidence lors du suivi de Pauillac. Ces résultats s'expliquent par le fait qu'*Acartia* possède une zone de répartition plus marine qu'*E. affinis*. Durant l'année 2003, les entrées d'eau marine ont été importantes dans l'estuaire, favorisant *Acartia*.

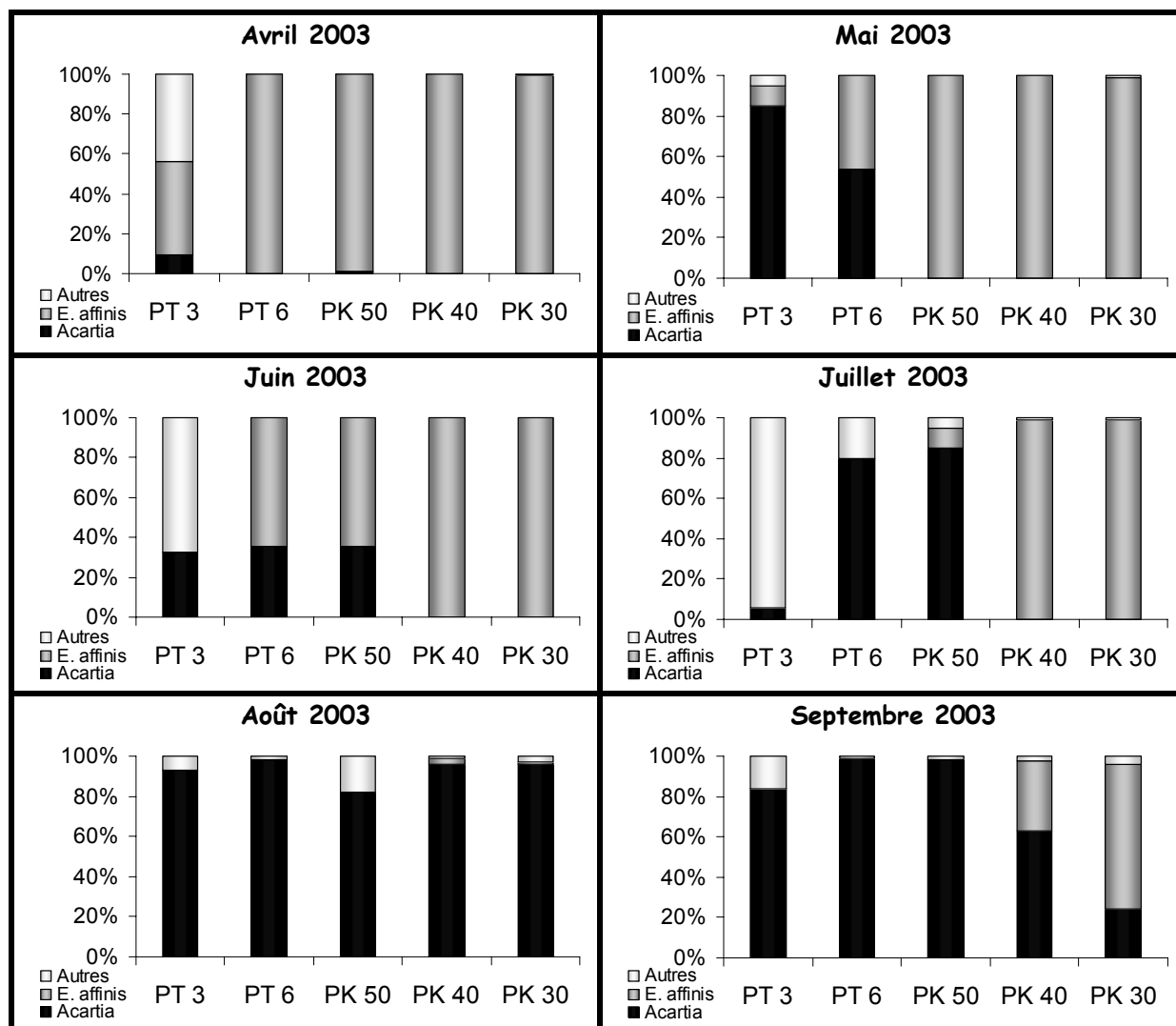


Figure 118 : Espèces de copépodes présentes dans l'échantillonnage : *E.affinis*, *Acartia sp.*, et autres espèces (*Acanthocyclop sp.*, *Temora sp.*, *Calanus sp.*, *Centropages sp.* et autres calanoides) (David, 2006 c).

Les résultats obtenus pour les niveaux de contamination en PCB et PBDE sont présentés Figure 119, pour chaque point de prélèvement. Comme précédemment, la variabilité indiquée correspond à la variabilité du protocole de préparation. Le niveau de contamination moyen des copépodes dans l'estuaire est de $173 \pm 179 \text{ ng.g}^{-1} \text{ ps}$ pour les PCB, et $7 \pm 11 \text{ ng.g}^{-1}$ pour les PBDE. L'écart type observé pour la contamination en PCB est dû à la forte concentration des copépodes en avril au niveau du PT 6. Si l'on enlève cette forte concentration, la valeur moyenne de contamination des copépodes en PCB est de $139 \pm 73 \text{ ng.g}^{-1} \text{ ps}$.

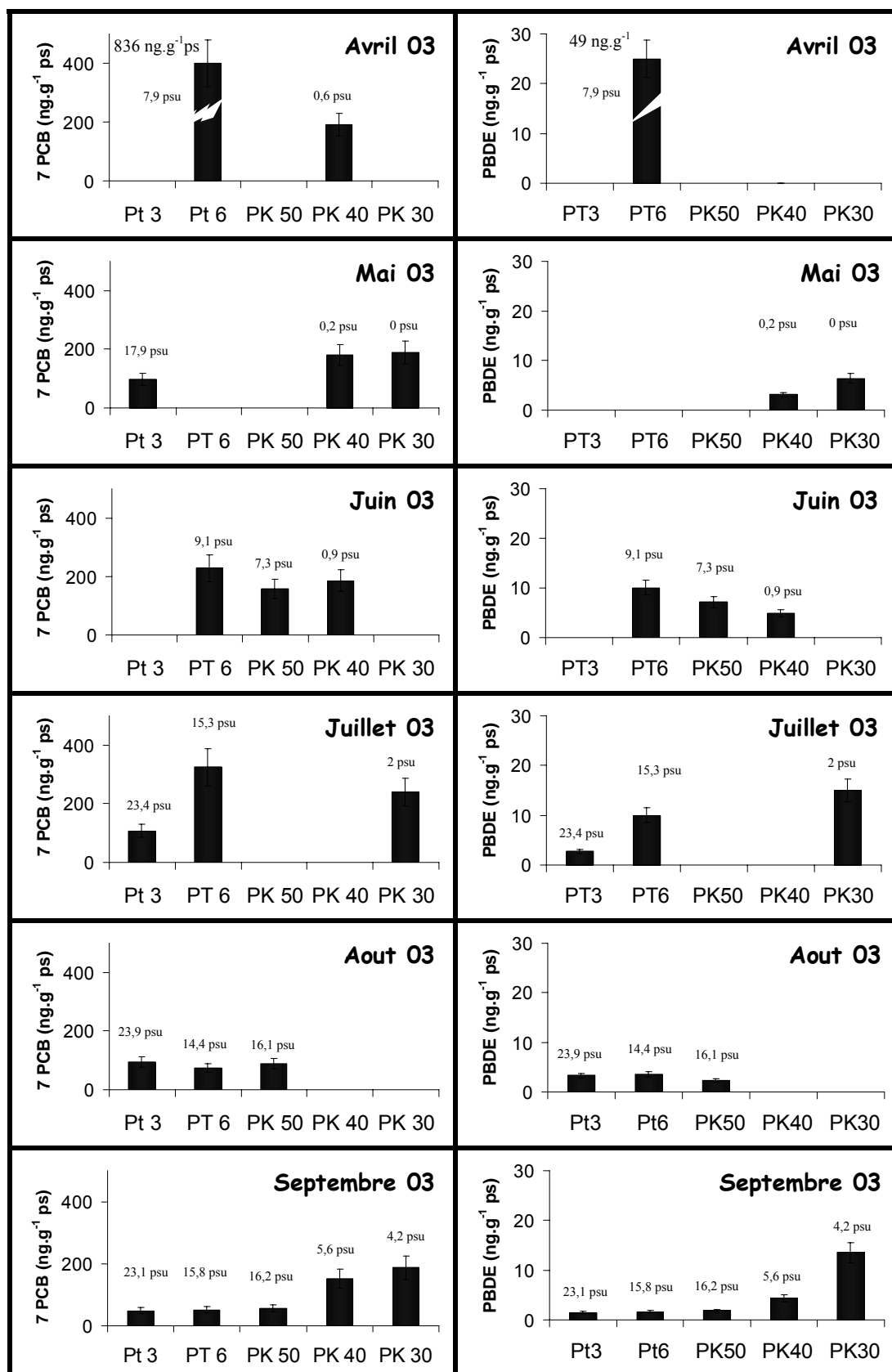


Figure 119 : Contamination des copépodes prélevés à chaque point de prélèvement de la mission Rétrogir exprimée en ng.g⁻¹ps.

Un pic de contamination important (PCB : 836 ng.g⁻¹ et PBDE : 49 ng.g⁻¹) est observable en avril 03 au niveau du point 6 dans une masse d'eau de salinité 8 psu. Ce pic est équivalent à celui mis en évidence dans le suivi de la contamination à Pauillac (650 ng.g⁻¹). Par contre, le pic de contamination observé en juillet 03 sur le suivi à Pauillac ne se retrouve pas aussi clairement, le niveau de contamination en PCB atteint ici est plus faible mais significatif (320 ng.g⁻¹ contre 550 ng.g⁻¹ à Pauillac). De plus, il est intéressant de noter que ces pics de contamination correspondent également à une augmentation de concentration en PCB et PBDE dans les MES (Figure 116). Sous le premier pic de contamination en avril, on retrouve exclusivement l'espèce *E.affinis*, alors que sous le plus petit pic de juillet on trouve essentiellement le genre *Acartia* à 80% (Figure 118). L'explication de ces différences de concentration ne se résume pas une différence d'espèces analysées.

Afin de vérifier l'hypothèse émise suite aux résultats du suivi de la contamination des copépodes à Pauillac, qui associait le pic de contamination aux abondances maximales des différentes espèces de copépodes (*E.affinis*, *A.tonsa* et *A.biffilosa*) (David, 2006 c), les niveaux de contamination des copépodes en PCB ont été reportés Figure 120.

La concordance des deux phénomènes ne semble pas parfaite sur la période échantillonnée. Malgré tout, le pic de contamination d'avril 2003, observé au niveau du point 6, coïncide avec le pic d'abondance d'*E.affinis*.

Ces indices supplémentaires sur la corrélation des deux phénomènes (pic d'intensité des différentes espèces de copépodes et pic de contamination des copépodes) confirment l'intérêt d'un suivi plus poussé à un pas de temps réduit de la contamination des copépodes. Cela confirme également l'intérêt d'une approche globale pluridisciplinaire couplant biologie/géologie/chimie/écologie pour appréhender les phénomènes conduisant à la contamination des copépodes.

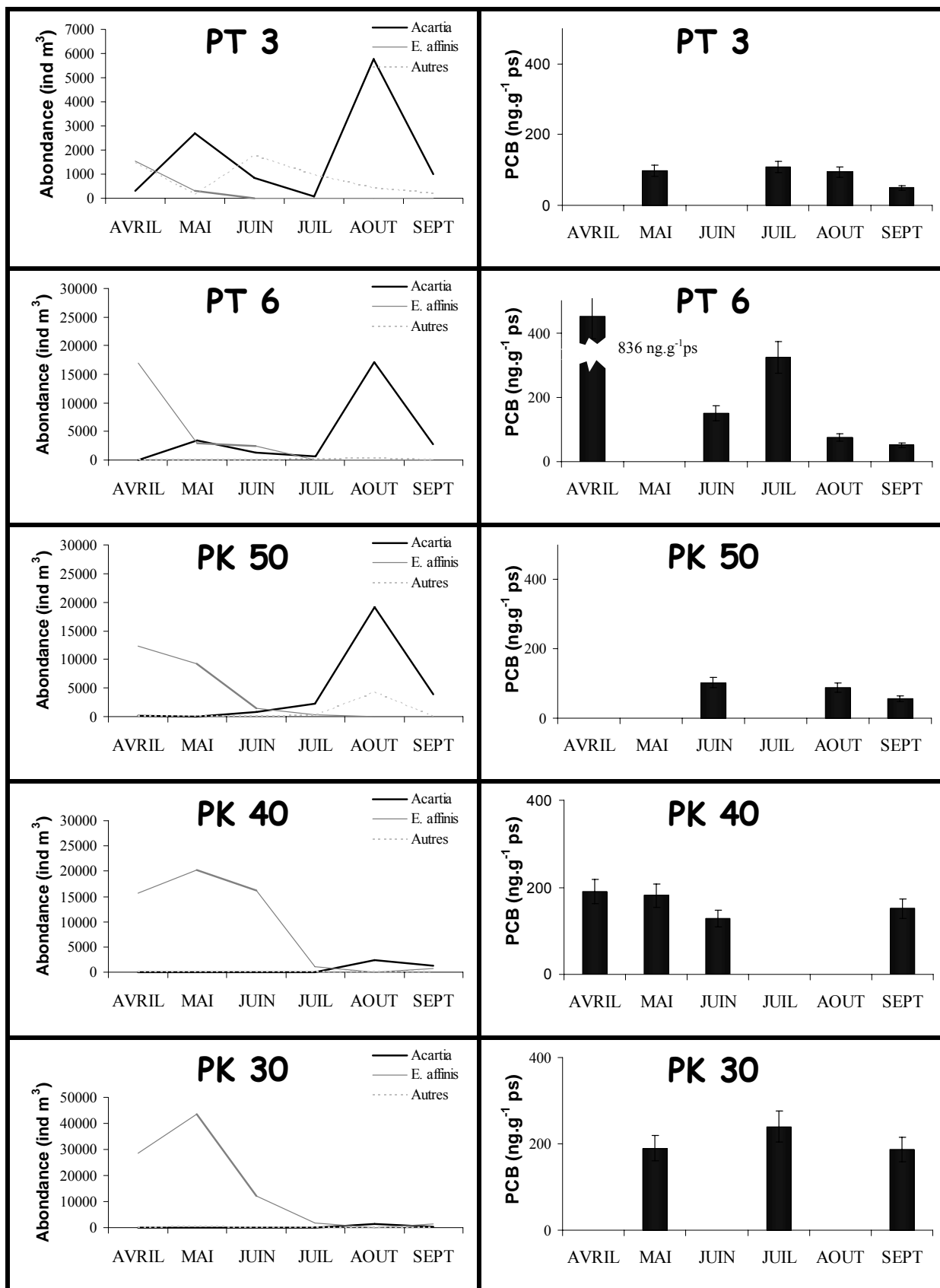


Figure 120 : Abondance et niveaux de contamination des copépodes de l'estuaire de la Gironde durant les prélèvements de la mission Rétrogrir.

Les mysidacés ont été également prélevés. La caractérisation des espèces de mysidacés dans les échantillons analysés a été réalisée dans le cadre de la thèse de V. David (2006c) (Figure 121). Comme observé classiquement, *M. slabberi* est situé plus en aval que *N. integer*. Au fur et à mesure de la montée des eaux salées dans l'estuaire pendant la période d'étiage, *M. slabberi* remonte dans l'estuaire jusqu'à représenter la quasi totalité des mysidacés sur l'ensemble des points étudiés en août et septembre 2003.

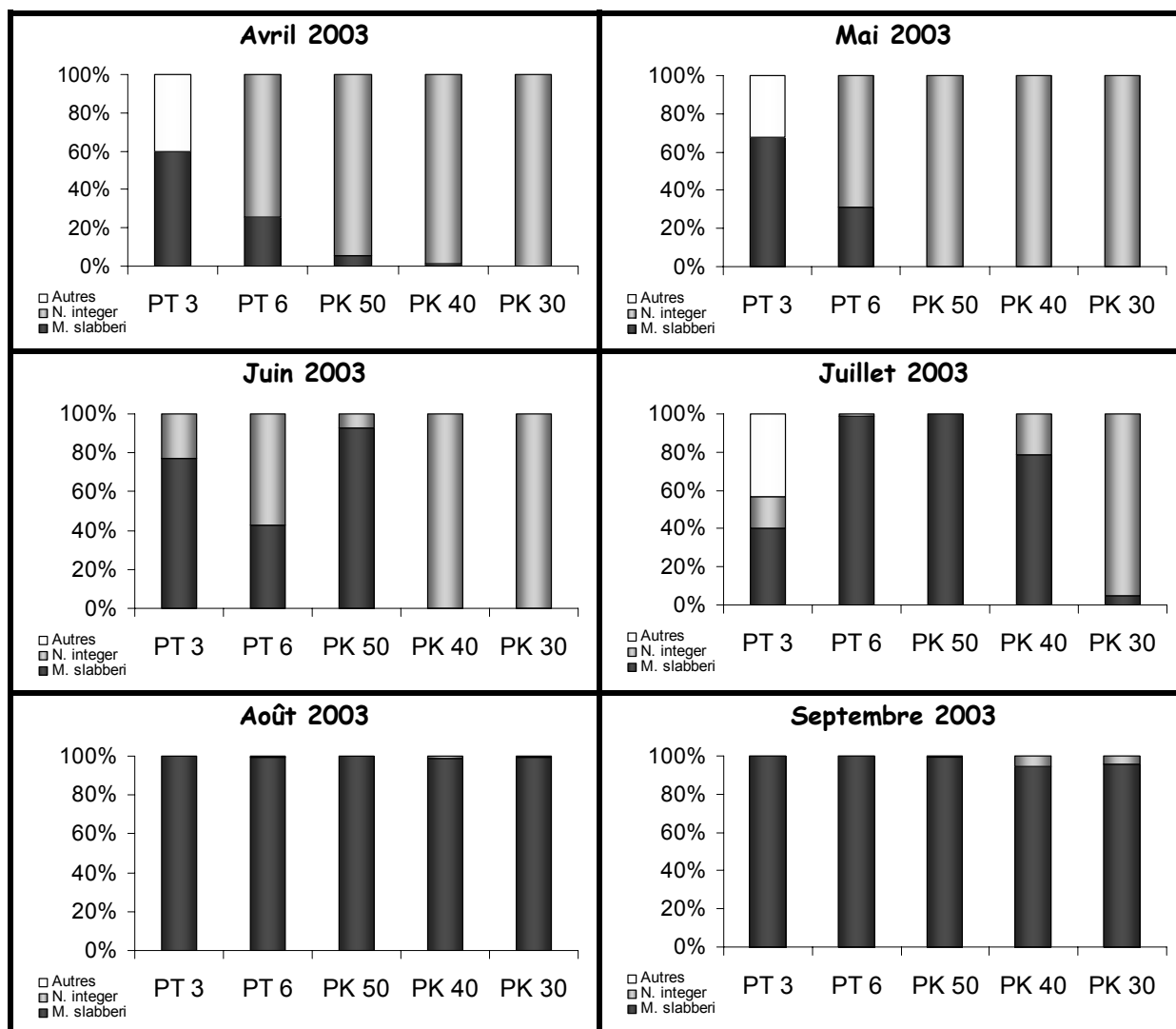


Figure 121 : Espèces de mysidacés présentes dans l'échantillonnage (David, 2006 c).

Les résultats obtenus pour les niveaux de contamination des mysidacés en PCB et PBDE sont présentés Figure 122, pour chaque point de prélèvement. Comme précédemment, la variabilité indiquée correspond à la variabilité mesurée du protocole. Le niveau de contamination moyen des mysidacés dans l'estuaire est de $95 \pm 56 \text{ ng.g}^{-1}$ pour les PCB et $3 \pm 3 \text{ ng.g}^{-1}$ pour les PBDE. Sur l'ensemble des prélèvements, aucune tendance claire ne se dégage. Cependant, des pics de contamination plus élevés sont présents au niveau du PK 40 en avril et juillet 2003 à la fin d'une cohorte de mysidacés, comme cela a déjà été montré au niveau de Pauillac.

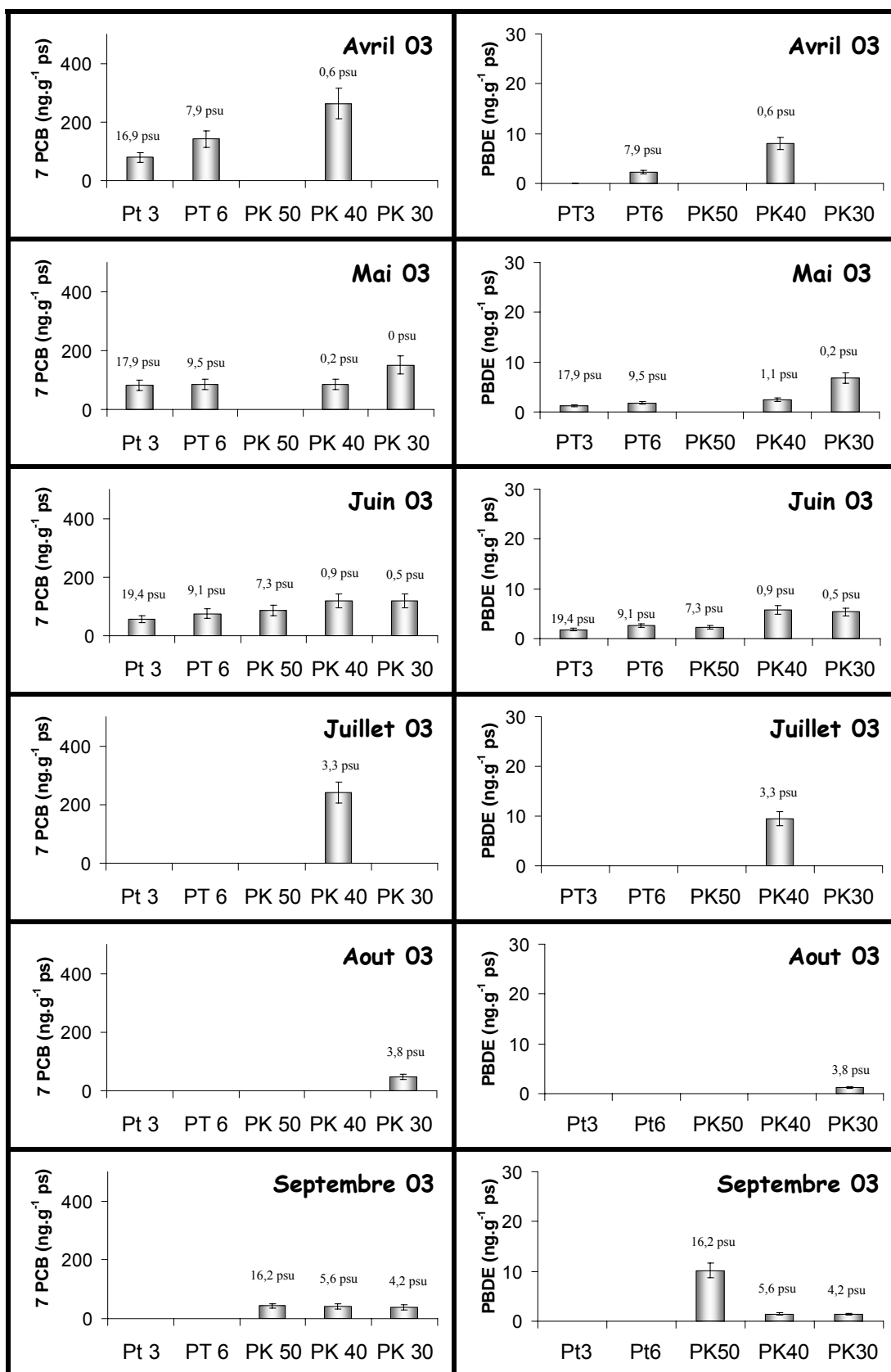


Figure 122 : Contamination des mysidacés prélevés à chaque point de prélèvement de la mission Rétrogir exprimée en ng.g⁻¹ps.

Les résultats obtenus pour les niveaux de contamination des gammars en PCB et PBDE sont présentés Figure 123. Le niveau de contamination moyen des gammars dans l'estuaire est de $158 \pm 45 \text{ ng.g}^{-1}$ pour les PCB et $11 \pm 4 \text{ ng.g}^{-1}$ pour les PBDE. Sur l'ensemble des prélèvements, aucune tendance ne se dégage, le niveau de contamination semble homogène dans le temps.

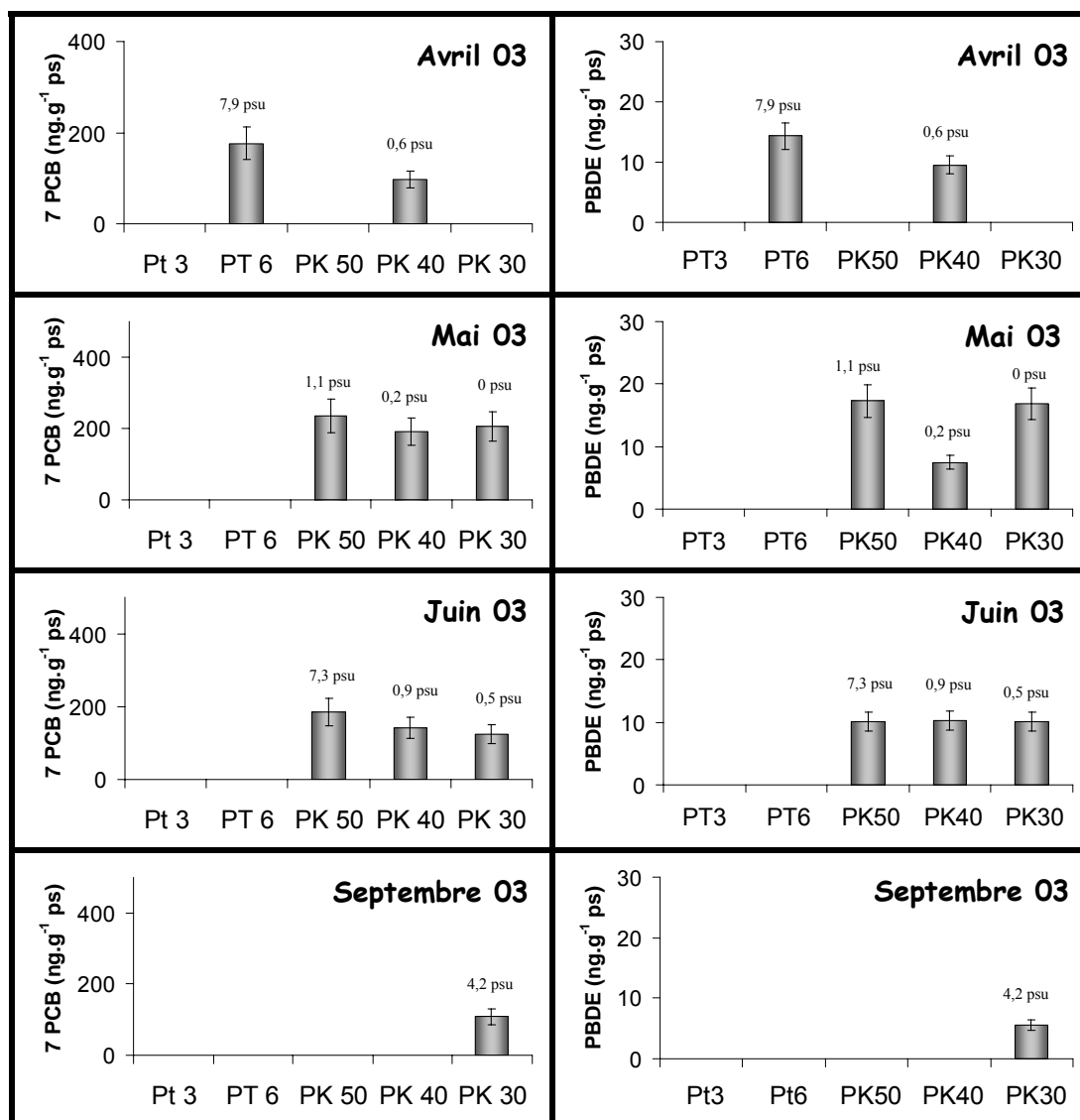


Figure 123 : Contamination des gammars prélevés à chaque point de prélèvement de la mission Rétrogir exprimée en $\text{ng.g}^{-1}\text{ps}$.

Les crevettes blanches, espèce typiquement estuarienne ont aussi été prélevées, leurs niveaux de contamination sont présentés Figure 124. Le niveau de contamination moyen des gammars dans l'estuaire est de $118 \pm 56 \text{ ng.g}^{-1}$ pour les PCB et $5 \pm 3 \text{ ng.g}^{-1}$ pour les PBDE. Sur les échantillons analysés, la contamination des crevettes blanches le long de l'estuaire et dans le temps semble relativement homogène.

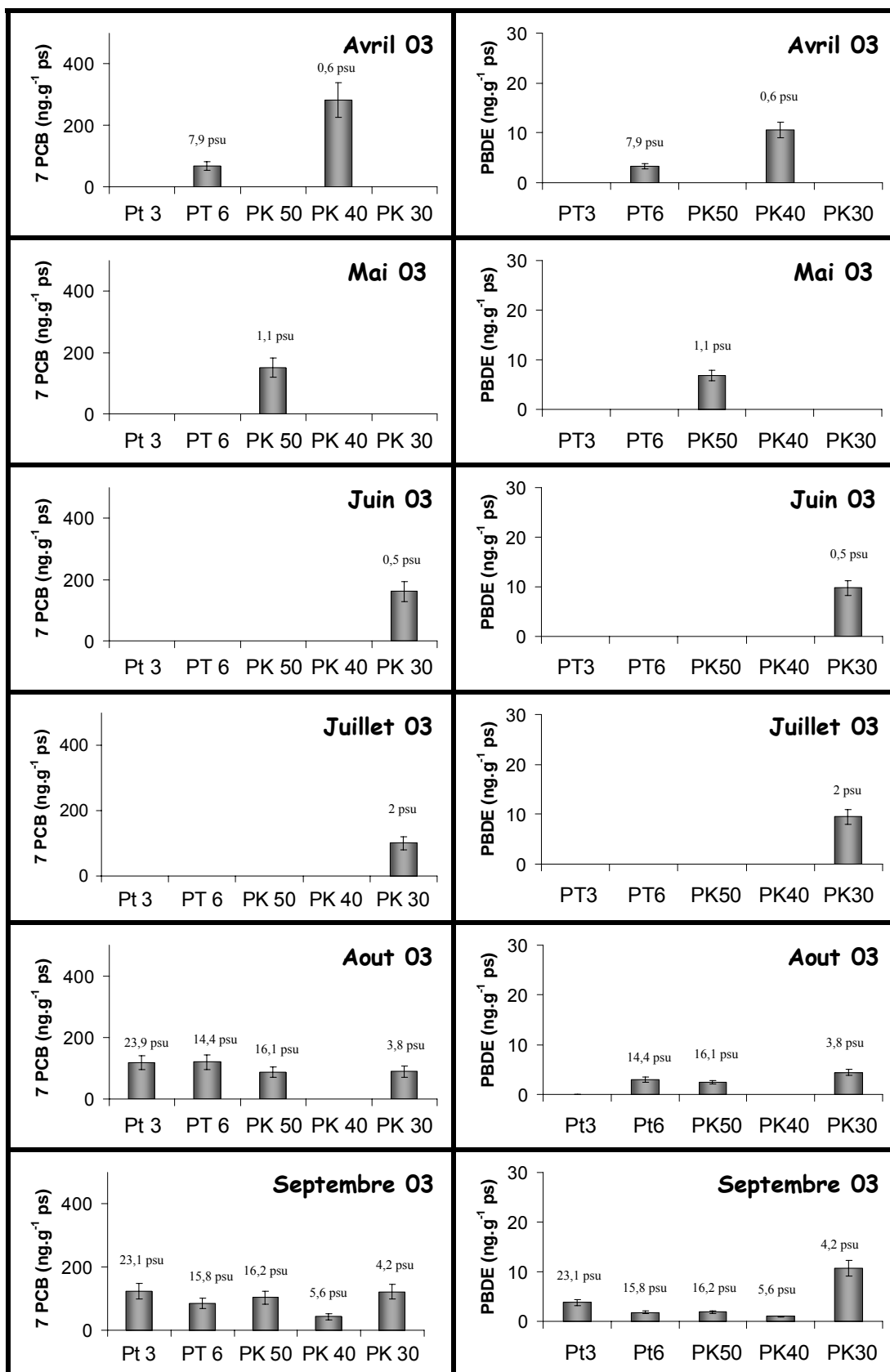


Figure 124 : Contamination des crevettes blanches prélevées à chaque point de prélèvement de la mission Rétrogir exprimée en ng.g⁻¹ ps.

Sur l'ensemble des campagnes de prélèvement, peu de crevettes grises ont été échantillonnées, et dans la majorité des cas les individus échantillons sont de jeunes individus. Les résultats obtenus sont présentés Figure 125. Leur niveau de contamination est de 68 ± 16 ng.g^{-1} pour les PCB et de 2 ± 1 ng.g^{-1} pour les PBDE.

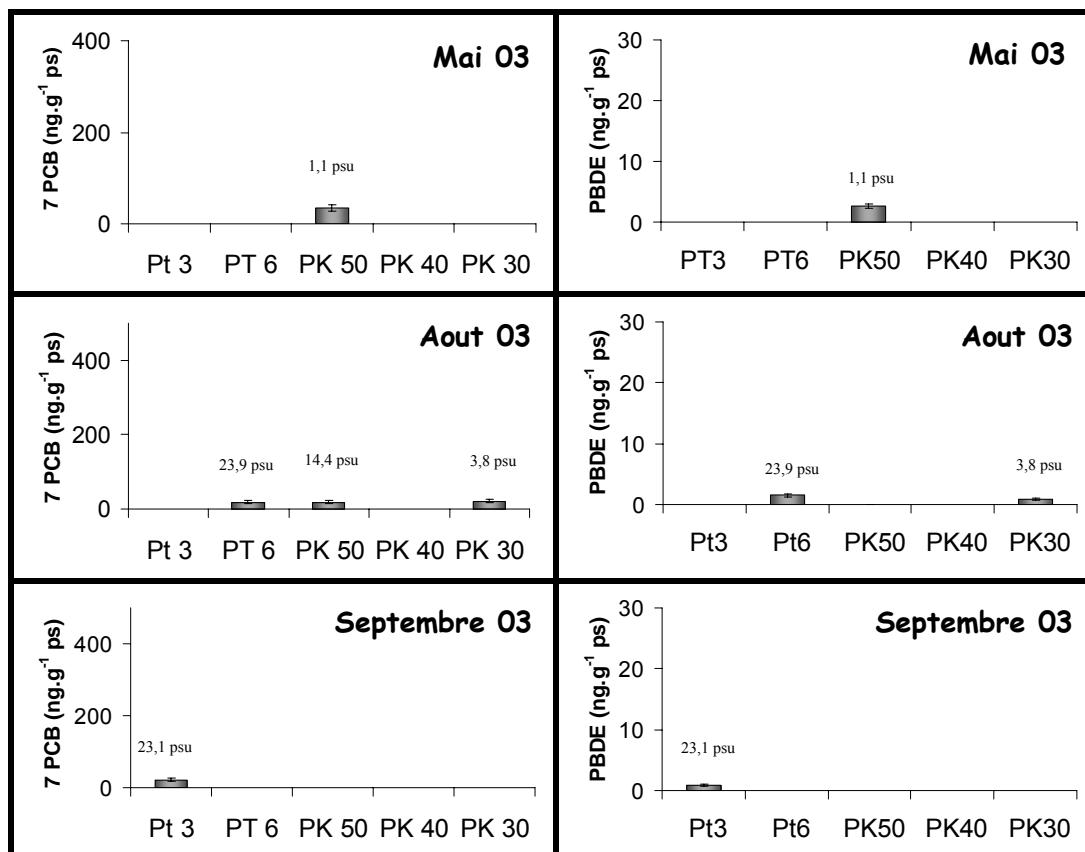


Figure 125 : Contamination des crevettes grises prélevées à chaque point de prélèvement de la mission Rétrogir exprimé en $\text{ng.g}^{-1}\text{ps}$.

II.2.1.3. Synthèse sur la contamination de la base du réseau trophique

La compréhension des liens trophiques entre les espèces étudiées est primordiale à la compréhension des mécanismes de bioaccumulation. La voie trophique étant la voie de contamination principale pour les organismes vivants hétérotrophes (Pompa *et al.*, 2003), il apparaît important et nécessaire de positionner les résultats de contamination en regard avec les relations trophiques des différentes espèces étudiées. Ces relations trophiques ont été définies récemment dans le cadre de la thèse de V. David (2006b).

Dans l'estuaire de la Gironde, les copépodes se nourrissent sur le pool nutritif qui correspond dans cette étude à la phase particulaire. *N. integer* a un régime alimentaire carnivore préférentiellement constitué de microzooplancton, favorisant les nauplii et les larves pour les juvéniles, alors que les adultes ont un régime non sélectif. De son côté, *M. slabberi* a un régime alimentaire essentiellement carnivore, avec seulement 4% du carbone ingéré

d'origine végétale au stade juvénile, et une forte sélectivité pour le microzooplancton (nauplii, larves) (David, 2006 c). Dans l'état actuel des connaissances, les gammares semblent présenter un régime alimentaire omnivore basé sur du matériel détritique, du micro et du mésozooplancton. Ce régime est beaucoup plus varié que celui rapporté dans la littérature (David, 2006 c).

Les niveaux de contamination moyens obtenus dans l'estuaire marin de la Gironde sont présentés dans la Figure 126. Les gammares et les copépodes présentent des niveaux de contamination moyens plus élevés que les autres espèces (environ 200 ng.g^{-1} ps pour les PCB et 14 ng.g^{-1} ps pour les PBDE). Les mysidacés et les crevettes présentent des niveaux de contamination moindres (aux alentours de 100 ng.g^{-1} ps pour les PCB et de moins de 5 ng.g^{-1} ps pour les PBDE), vraisemblablement dus à des capacités d'élimination des POP en évidence par Goerke et Weber (2001).

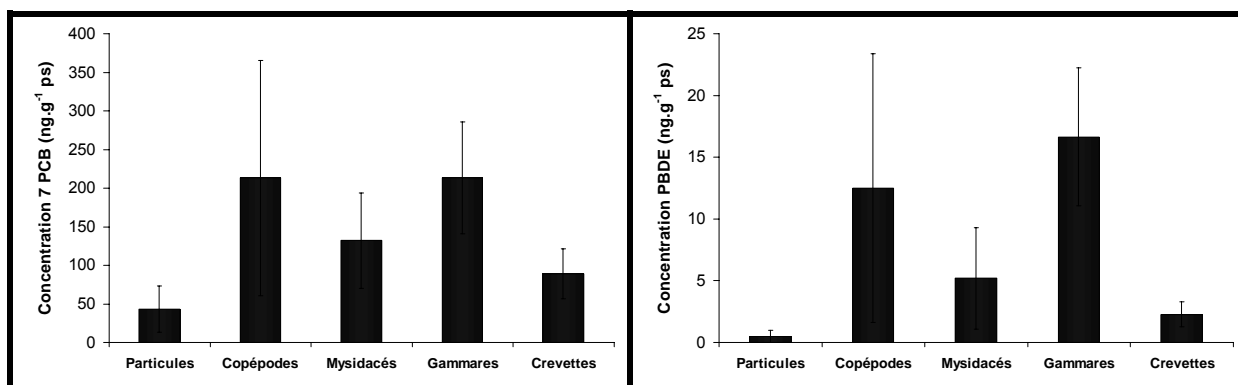


Figure 126 : Niveau de contamination globale des premiers maillons trophiques de l'estuaire de la Gironde exprimé en ng.g^{-1} ps.

Afin de s'affranchir de la différence de teneur lipidique entre les différents compartiments pouvant influencer la contamination en PCB et PBDE, les résultats de contamination ont été exprimés en ng.g^{-1} lipide (Figure 127). Cette correction permet de comparer des niveaux de contamination entre des espèces de constitution et de physiologie différentes (Borga *et al.*, 2005). Malgré la transformation, les copépodes et les gammares restent les espèces les plus contaminées (au alentour de 4500 ng.g^{-1} ps pour les PCB et de moins de 300 ng.g^{-1} ps pour les PBDE).

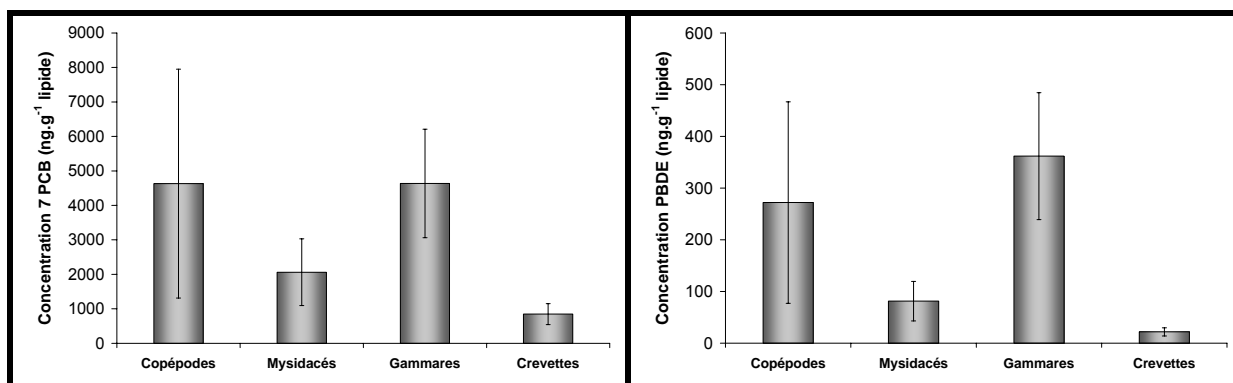


Figure 127 : Niveau de contamination globale des premiers maillons trophiques de l'estuaire de la Gironde exprimé en ng.g^{-1} lipide.

Les facteurs de bioconcentration de la phase dissoute aux compartiments biologiques étudiés ont été calculés et sont présentés Tableau 38.

	PCB	
	BCF l.g^{-1}	BCF l.g^{-1} lipide
Copépodes	43	926
Mysidacés	26	412
Gammarés	43	927
Crevettes	18	169

Tableau 38 : Facteurs de bioconcentration calculés en fonction de la teneur en contaminant exprimée en ng.g^{-1} ps et en ng.g^{-1} lipide.

Les phénomènes de bioconcentration sont clairement mis en évidence par les valeurs de BCF élevées. Le plancton, et en particulier les copépodes calanoïdes, sont connus pour présenter des BCF élevés (Borga *et al.*, 2005). Les copépodes et les gammarés sont les deux groupes qui bioconcentrent le plus les PCB dans l'estuaire de la Gironde. Leur BCF sont du même ordre de grandeur ($\text{BCF} = 43 \text{ l.g}^{-1}$ ou 926 l.g^{-1} de lipides). Les mysidacés et les crevettes bioconcentrent moins les PCB que les copépodes, sans doute parce que les mysidacés et les crevettes présentent des capacités d'élimination des POP.

Afin de mieux appréhender les capacités de bioamplification des différents compartiments biologiques étudiés, les facteurs de bioamplification (BAF) ont été calculés en fonction de la teneur en contaminant dans la colonne d'eau (phase dissoute + particules) exprimée en ng.l^{-1} et de la teneur dans les différents compartiments biologiques exprimée en ng.g^{-1} ps et en ng.g^{-1} lipides (Tableau 39). La matière particulaire est considérée dans ce cas comme un pool nutritif. La teneur en PBDE dans la colonne d'eau a été fixée à 1 ng.l^{-1} pour les calculs.

	PCB		PBDE	
	BAF l.g ⁻¹	BAF l.g ⁻¹ lipides	BAF l.g ⁻¹	BAF l.g ⁻¹ lipides
Copépodes	5	116	12	272
Mysidacés	3	51	5	81
Gammarés	5	115	17	362
Crevettes	2	21	2	22

Tableau 39 : Facteurs de bioamplification calculés en fonction de la teneur en contaminant exprimée en ng.g⁻¹ ps et en ng.g⁻¹ lipide.

Les facteurs de bioamplification (BAF) des MES aux compartiments biologiques prouvent les mécanismes de bioamplification entre le pool nutritif et les espèces étudiées. Les facteurs de bioamplification (BAF) entre les différents compartiments biologiques étudiés ont été calculés Tableau 40.

Proies	Prédateurs	PCB		PBDE	
		BAF (Poids sec)	BAF (Lipides)	BAF (Poids sec)	BAF (Lipides)
Copépodes	Mysidacés	0,6	0,4	0,4	0,3
Copépodes	Gammarés	1	1	1,3	1,3
Copépodes	Crevettes	0,4	0,2	0,2	0,1
Mysidacés	Gammarés	1,6	2,2	3,2	4,5
Mysidacés	Crevettes	0,7	0,4	0,5	0,3

Tableau 40 : Facteurs de bioamplification calculés en fonction de la teneur en contaminant exprimée en ng.g⁻¹ ps et en ng.g⁻¹ lipide.

Seule la valeur du BAF entre les mysidacés et les gammarés permet de conclure qu'il existe un phénomène de bioamplification. Toutes les autres valeurs calculées sont inférieures ou égales à 1, réfutant l'hypothèse de bioamplification entre les espèces. Ce BAF inférieur à 1 est relativement étonnant entre les copépodes et les mysidacés, puisqu'il est maintenant clairement établi que les mysidacés se nourrissent sur le pool de copépodes présents dans l'estuaire (David, 2006 b). Selon les mécanismes de bioamplification classiques observés dans les transferts de POP, un prédateur est plus contaminé que les proies dont il se nourrit, ce qui n'est pas le cas ici. Ce phénomène peut être dû à la capacité des mysidacés à éliminer les PCB, mais cette capacité même si elle a été mise en évidence chez les crevettes (Goerke et Weber, 2001), reste une hypothèse chez les mysidacés.

Une hypothèse expliquant ces niveaux de contamination dans les petits crustacés de l'estuaire de la Gironde serait un fonctionnement particulier du réseau trophique estuarien, basé essentiellement sur le compartiment détritique où la matière organique jouerait un rôle important. La lumière étant un facteur limitant dans l'estuaire, particulièrement dans la zone du bouchon vaseux, la base du réseau trophique semble constituée par une boucle microbienne, qui contient de nombreux maillons trophiques, facilitant ainsi l'exportation des

PCB vers les niveaux supérieurs (Walberg *et al*, 1997), ce qui conduit à la contamination des copépodes et gammarès. Cependant, l'accès à ces organismes microzooplanctoniques est rendu difficile dans le cas de l'estuaire de la Gironde par la forte teneur particulière ($>1 \text{ g.l}^{-1}$). Les mysidacés et les crevettes présenteraient des niveaux moindres de PCB et PBDE grâce à leurs capacités d'élimination.

Malgré tout, le système estuarien est un système complexe où de nombreux phénomènes sont à prendre en compte. Les niveaux de PCB et PBDE dans les organismes semblent également fortement corrélés à leur cycle de vie, ce qui confirme l'intérêt des études intégrées pluridisciplinaires couplant une approche chimie / physiologie / écologie pour comprendre les mécanismes de transfert des POP dans les milieux aquatiques et leur impact sur les consommateurs terminaux.

II.2.2. Etude de la contamination des poissons du réseau trophique estuarien

La contamination de la base de réseau trophique (plancton et petite faune vagile) a été démontrée dans le paragraphe précédent. Ces organismes servent de base alimentaire à beaucoup d'espèces de poissons. Afin d'avoir une empreinte de la contamination de quelques espèces cibles de poissons fréquentant l'estuaire, des analyses ont été réalisées sur des anguilles, des maigres, des soles et des mullets

II.2.2.1. Niveaux de contamination de quelques espèces cibles

Quatre espèces de poissons ont été ciblées et échantillonnées dans l'estuaire de la Gironde, l'anguille européenne (*Anguilla anguilla*), le maigre (*Argyrosomus regius*), la sole (*Solea solea*) et le mullet (*Liza ramada*). Les données biométriques des espèces échantillonnées sont présentées Tableau 41.

	Nombre d'individus	Longueur (mm)	Poids (g)	Lipide (% de matière sèche)	
				Muscle	Foie
Anguille	9	413 ± 127	182 ± 120	37 ± 22	15 ± 5
Maigre	5	344 ± 58	340 ± 159	4 ± 2	24 ± 5
Sole	6	293 ± 35	246 ± 91	1 ± 1	15 ± 5
Mulet	5	228 ± 24	109 ± 42	11 ± 2	29 ± 9

Tableau 41 : Données biométriques des poissons échantillonnés dans l'estuaire de la Gironde.

Les niveaux de contamination moyens obtenus en PCB et en PBDE dans les espèces prélevées sont présentés Tableau 42 et Tableau 43. Si l'on considère la contamination du muscle en ng.g^{-1} ps, le poisson le plus contaminé dans l'estuaire est l'anguille avec un niveau de contamination dans le muscle de $679 \pm 356 \text{ ng.g}^{-1}$ ps de PCB et $54 \pm 44 \text{ ng.g}^{-1}$ ps de PBDE.

C'est également la seule espèce échantillonnée dans le cadre de cette étude à présenter un niveau contamination du muscle équivalent à celui du foie (respectivement $679 \pm 356 \text{ ng.g}^{-1}$ ps et $716 \pm 433 \text{ ng.g}^{-1}$ ps). Cette tendance s'explique par le fait que le muscle d'anguille est un tissu relativement gras ($36 \pm 22 \%$ de lipide par gramme de matière sèche contre $15 \pm 5 \%$ dans le foie dans le cadre de cette étude). Les composés étudiés PCB et PBDE étant particulièrement lipophiles, ils vont donc avoir tendance à s'accumuler dans les tissus les plus gras. Il est intéressant de noter que le niveau de PBDE dans le muscle est significativement plus élevé que celui retrouvé dans les autres espèces (de l'ordre de 50 ng.g^{-1} ps pour l'anguille contre quelques nanogrammes pour les autres espèces étudiées).

Si l'on considère les résultats exprimés en ng.g^{-1} lipides, la différence de niveaux de contamination s'atténue, mais l'anguille reste le poisson le plus contaminé. La normalisation par la teneur lipidique ne suffit pas à expliquer les différences de niveaux de contamination entre les espèces.

	ng.g^{-1} ps		ng.g^{-1} lipide	
	Muscle	Foie	Muscle	Foie
Anguille	679 ± 356	716 ± 433	3562 ± 4907	4999 ± 2808
Maigre	166 ± 20	531 ± 126	1514 ± 215	1899 ± 376
Sole	28 ± 11	365 ± 316	2130 ± 946	2095 ± 1405
Mulet	96 ± 17	508 ± 398	508 ± 398	2008 ± 1287

Tableau 42 : Niveaux de contamination en PCB des poissons analysés exprimée en ng.g^{-1} et ng.g^{-1} lipide.

	ng.g^{-1} ps		ng.g^{-1} lipide	
	Muscle	Foie	Muscle	Foie
Anguille	54 ± 44	15 ± 12	347 ± 558	111 ± 91
Maigre	3 ± 0.6	17 ± 8	32 ± 5	64 ± 31
Sole	1 ± 1	13 ± 10	133 ± 78	79 ± 49
Mulet	3 ± 0.8	15 ± 11	84 ± 42	59 ± 37

Tableau 43 : Niveaux de contamination en PBDE des poissons analysés exprimée en ng.g^{-1} et ng.g^{-1} lipide.

Pour les autres espèces, le profil classique de contamination avec le foie plus contaminé que le muscle est retrouvé. Le foie est l'organe de détoxification par excellence et présente également pour ces espèces une teneur lipidique supérieure à celle observée dans les muscles, expliquant ainsi son plus fort niveau de contamination.

La sole est le poisson le moins contaminé dans le cadre de cette étude. Cela s'explique par deux phénomènes ; premièrement la sole est un poisson maigre dont les tissus contiennent une quantité de lipide faible (de l'ordre de 1% de lipide par gramme de muscle en poids sec), d'autre part, c'est un poisson aux mœurs plus océaniques qu'estuariennes, qui ne se rapproche des côtes qu'en fin d'hiver pour la période de reproduction. Cette espèce n'est donc pas soumise en continu à la contamination de l'estuaire de la Gironde.

Les deux dernières espèces étudiées, le maigre et le mullet, présentent respectivement des niveaux de contamination dans le muscle de l'ordre de $166 \pm 20 \text{ ng.g}^{-1} \text{ ps}$ et de $96 \pm 17 \text{ ng.g}^{-1} \text{ ps}$. Dans le cadre de cette étude, le niveau de contamination en PCB du maigre est plus élevé que celui du mullet. Le niveau de PBDE détecté dans le muscle est faible, de l'ordre de quelques nanogrammes par gramme. Le niveau retrouvé dans le foie est légèrement plus élevé, de l'ordre d'une dizaine de nanogrammes par gramme.

Afin de visualiser l'empreinte de contamination des différentes espèces, la part de chaque PCB par rapport à la somme globale des 7 PCB analysés a été représentée Figure 128. L'ensemble des profils est majoritairement dominé par les composés hexachlorés (CB 153 et CB 138) et heptachlorés (CB 180). Ce profil est le profil de contamination classique mis en évidence chez les poissons téléostéens (Monosson, 2003 ; Ferreira, 2004).

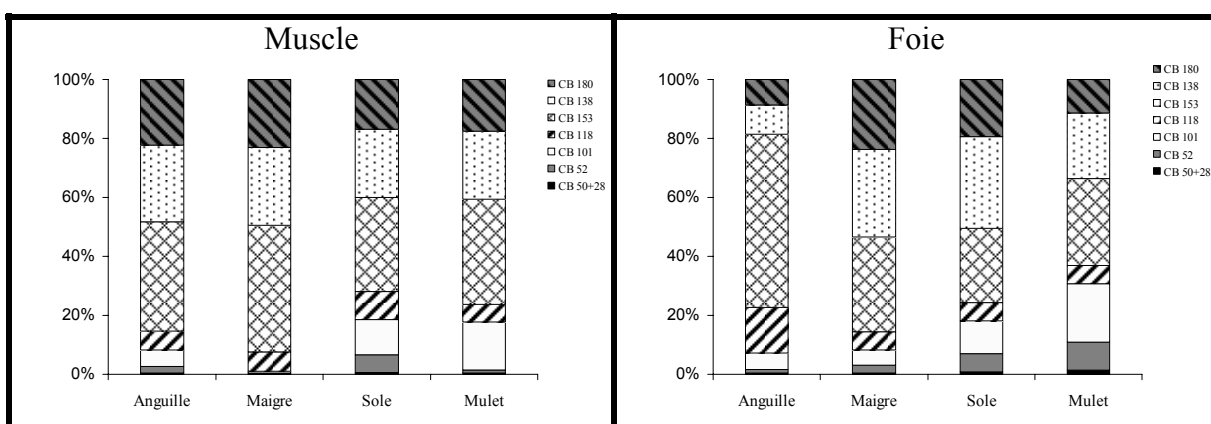


Figure 128 : Empreinte de contamination en PCB dans les organes des poissons étudiés.

Le profil de contamination de la sole et du mullet laisse une place relativement importante aux composés les moins chlorés (environ 20%). Seul le profil de contamination du foie de l'anguille est réellement différent de celui des autres poissons étudiés, la part du CB 118 y est plus importante que chez les autres poissons (de l'ordre de 20%). Cette empreinte particulière avait déjà été mise en évidence lors d'une étude préliminaire en 2003 (publication 3 en annexe).

Là encore, l'anguille se démarque des autres poissons. Une hypothèse plausible pour expliquer cette empreinte est que l'anguille métaboliserait moins le CB 118 que les autres espèces. Ces capacités de métabolisation moindre pourraient également être une explication de son fort niveau de contamination.

Devant les particularités de l'anguille, son importance écologique, économique et devant la mise en évidence de son niveau de contamination important, l'étude du niveau de contamination des anguilles a été menée plus spécifiquement.

II.2.2.2. Cas particulier de l'anguille européenne

L'anguille européenne est une espèce connue pour être très impactée par les polluants organiques persistants tels que les PCB et PBDE (Robinet et Feunten, 2002). Afin de comprendre le niveau de contamination de l'espèce et la dynamique de contamination des anguilles par ces composés dans l'estuaire de la Gironde, des anguilles de différentes tailles ont été analysées, de la civelle à l'anguille argentée en passant par l'anguille jaune. Les niveaux de contamination du foie et du muscle de l'anguille étant équivalents seuls les muscles ont été analysés dans ce suivi.

II.2.2.2.a. Description des anguilles prélevées

Les prélèvements ont été réalisés sur l'ensemble du système fluvio-estuarien de l'estuaire de la Gironde. Au total, 240 anguilles et 17 pools de civelles de 40 individus ont été analysés (Figure 129 et Tableau 44).

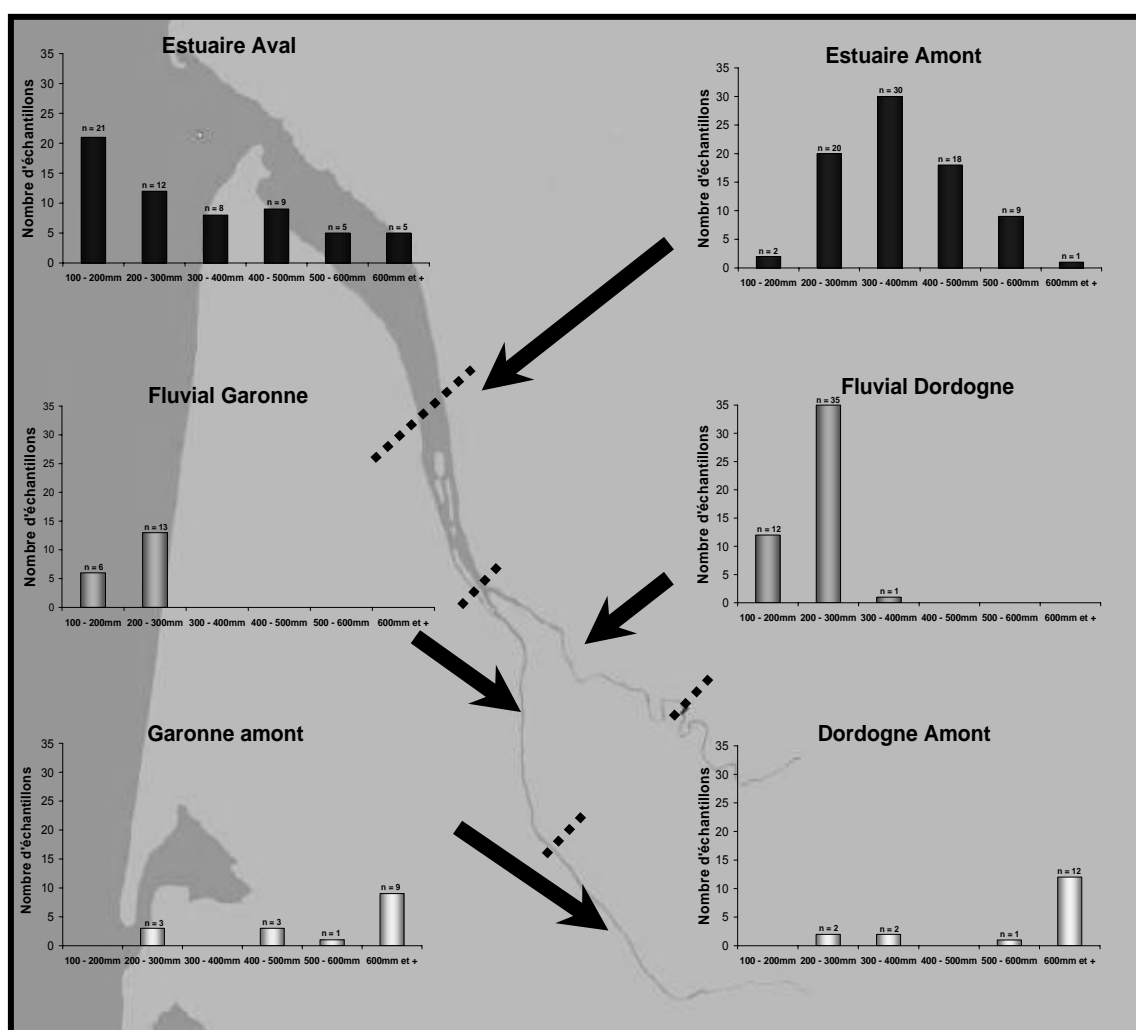


Figure 129 : Récapitulatif des anguilles (à l'exception des civelles) échantillonnées sur les différentes zones explorées et pour les différentes classes de taille ciblées.

	Classe de taille des anguilles prélevées							Total
	Civelle	100 - 200 mm	200 - 300 mm	300 - 400 mm	400 - 500 mm	500 - 600 mm	600 - 700 mm	
Anguilles Estuaire Aval	17	21	12	8	9	5	5	60
Anguilles Estuaire Amont		2	20	30	18	9	1	80
Anguilles Garonne Fluvial	/	6	13	/	/	/	/	19
Anguilles Garonne Amont	/	/	3	/	3	1	9	16
Anguilles Dordogne Fluvial	/	12	35	1	/	/	/	48
Anguilles Dordogne Amont	/	/	2	2	/	1	12	17
Somme des anguilles prélevées	17	41	85	41	30	16	27	257

Tableau 44 : Bilan des anguilles échantillonnées (répartition par zone de capture et par taille).

Dans le détail, 140 anguilles ont été capturées dans l'estuaire salé, en aval du bec d'Ambes. Toutes les classes de tailles sont représentées, de la civelle aux anguilles sub-adultes proches de leur migration de reproduction.

Sur la zone Garonne, 35 anguilles ont été échantillonnées. Les petites classes de tailles (< 300mm) ont surtout été capturées sur la zone fluviale, alors que les anguilles de plus grosses tailles sont surtout issues de la zone Garonne amont.

Sur la zone Dordogne, 65 anguilles ont été capturées. Les anguilles de petites tailles ont été essentiellement capturées sur la zone fluviale, alors que les grosses anguilles sont exclusivement issues de la zone amont. Les seules anguilles argentées échantillonnées (une dizaine d'individus) ont été prélevées en amont du barrage de Tuilières, sur la Dordogne.

L'échantillonnage sur l'estuaire marin est globalement homogène et représentatif des différentes classes de tailles. Par contre, l'échantillonnage n'a pas permis de capturer les individus des classes de taille supérieure à 300 mm dans la zone fluviale.

II.2.2.2.b. Données biométriques et teneurs lipidiques

Les 240 anguilles prélevées sur le système fluvio-estuarien de la Gironde présentent une distribution taille / poids relativement complète, malgré une disparité de l'échantillonnage en fonction des zones, toutes les classes de tailles sont représentées (Figure 130).

D'une façon générale, l'échantillonnage provenant de l'estuaire salé présente une diversité de taille plus importante que celui de l'estuaire doux. Les civelles analysées proviennent exclusivement de l'estuaire marin.

Les anguilles prélevées dans la zone de l'estuaire salé se répartissent sur toutes les classes de tailles ciblées. Les individus provenant de l'estuaire amont ont une longueur moyenne de 368 mm (± 102) pour un poids moyen de 114 g (± 95) et celles provenant de l'estuaire aval ont une longueur moyenne de 312 mm (± 162) pour un poids moyen de 97 g (± 140).

Les anguilles de l'estuaire fluvial ont des distributions de taille assez étroites pour lesquelles seules les petites tailles sont représentées dans nos échantillons. Cette disparité dans les classes de taille est due aux aléas de l'échantillonnage, qui est une réelle difficulté actuellement. Les anguilles prélevées dans l'estuaire fluvial de la Dordogne ont une longueur moyenne de 216 mm (± 45) et un poids moyen de 17 g (± 8), alors que celles échantillonnées plus amont présentent une taille moyenne de 637 mm (± 203) pour un poids moyen de 731 g (± 324). Les anguilles issues de l'estuaire fluvial de la Garonne ont une longueur moyenne de 211 mm (± 42) pour un poids moyen de 16 g (± 9), alors que celles prélevés plus amont présentent une taille moyenne de 553 mm (± 192) et un poids moyen de 512 g (± 184).

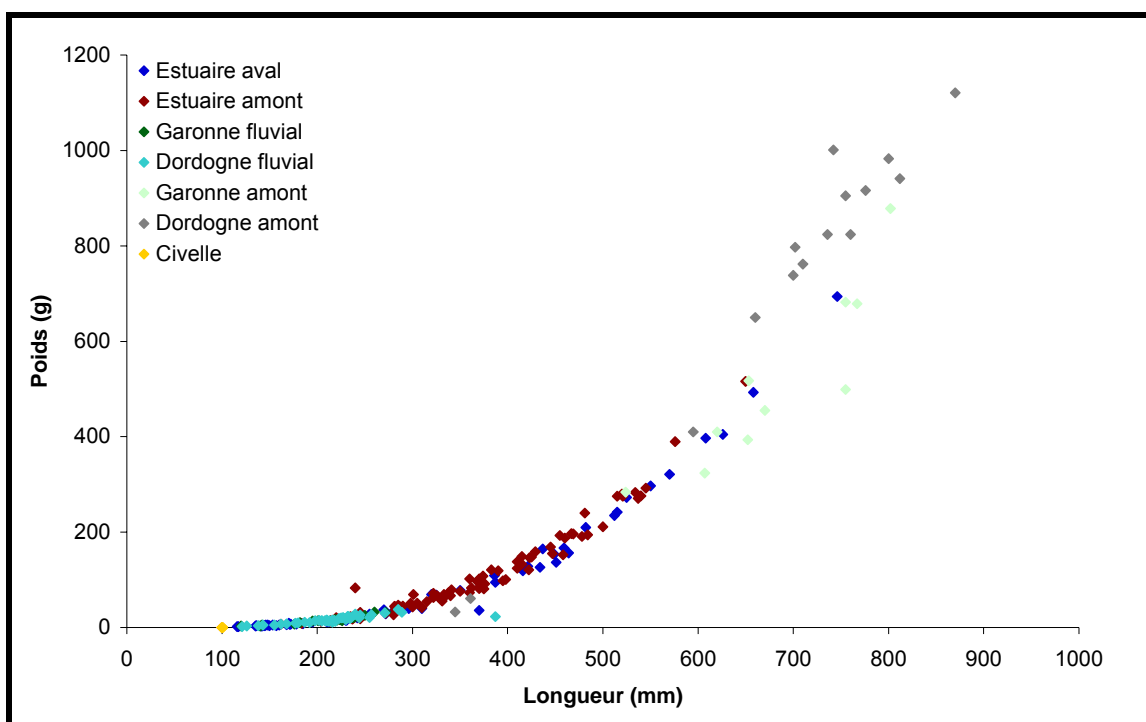


Figure 130 : Courbe de distribution taille (mm) / poids (g) des anguilles échantillonnées sur l'ensemble du système fluvio-estuarien de la Gironde.

Il est également intéressant de noter que globalement la teneur lipidique des anguilles augmente avec la taille (Figure 131). Cependant, ces deux données ne sont pas complètement corrélées, une variabilité relativement importante de la teneur lipidique apparaît pour les individus de taille supérieure à 300 mm, sans doute liée au sexe, au stade de maturation et au régime trophique des individus.

L'ensemble des anguilles échantillonnées est constitué d'anguilles jaunes à l'exception d'une dizaine d'anguilles argentées échantillonnées au niveau du barrage en Dordogne amont. Ces individus correspondent aux points gris entourés Figure 131.

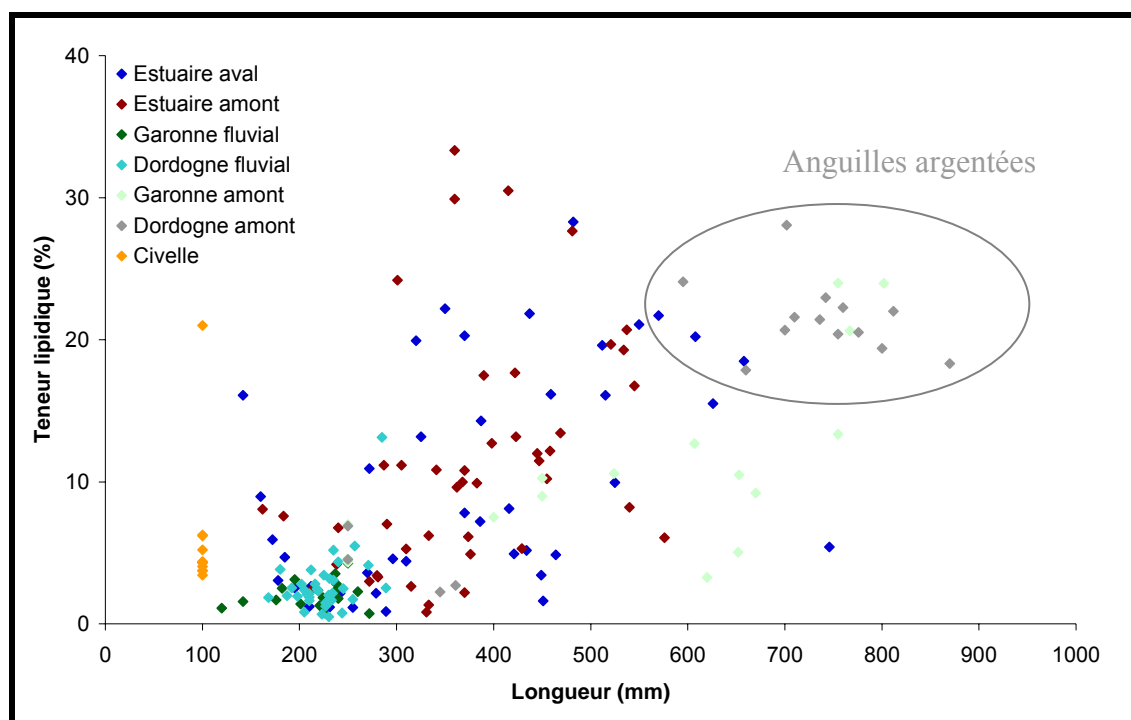


Figure 131 : Courbe de corrélation de la taille (mm) en fonction de la teneur lipidique du muscle d'anguille exprimée en pourcentage de lipides par rapport au poids humide.

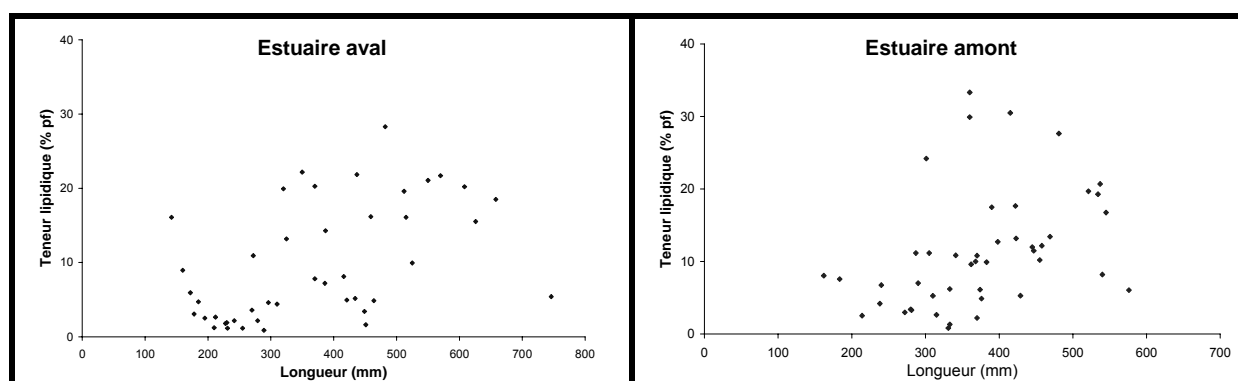


Figure 132 : Corrélation de la taille en fonction de la teneur lipidique du muscle d'anguille exprimé en pourcentage de lipides par rapport au poids frais pour les deux zones de l'estuaire marin.

Si l'on considère les deux zones de l'estuaire salé, où le maximum des individus a été capturé, la tendance est similaire à celle obtenue avec l'ensemble des données (Figure 132). La teneur lipidique n'est pas directement corrélée avec la taille des anguilles. Le stade de maturité et les paramètres individuels de chaque anguille doivent jouer sur la teneur lipidique.

II.2.2.2.c. Niveau de contamination global des muscles d'anguilles

Les premiers résultats confirment le fait que globalement, la contamination en PCB et PBDE du muscle d'anguille augmente avec la taille des anguilles (Figure 133 et Figure 134).

En ce qui concerne les PCB, les niveaux d'imprégnation vont de 20 ng.g⁻¹ ps pour les civelles à plus de 3 399 ng.g⁻¹ ps pour l'anguille la plus contaminée (calcul sur les 7 PCB indicateurs). Cette anguille très fortement contaminée par rapport aux autres anguilles étant la seule dans son genre, elle a été sortie du jeu de données afin garder des résultats homogènes.

Si l'on considère maintenant les teneurs en PBDE des muscles d'anguilles analysés, les niveaux vont de 1 à plus de 147 ng.g⁻¹ ps pour l'anguille la plus contaminée (calcul sur la somme des PBDE analysés). Cette anguille très contaminée issue de la zone Dordogne amont déjà exclue des données PCB sera également sortie du jeu de données pour les données PBDE. Aucune corrélation claire entre la taille des anguilles et le niveau de contamination en PCB ou PBDE n'est mise en évidence sur l'ensemble des individus échantillonnés.

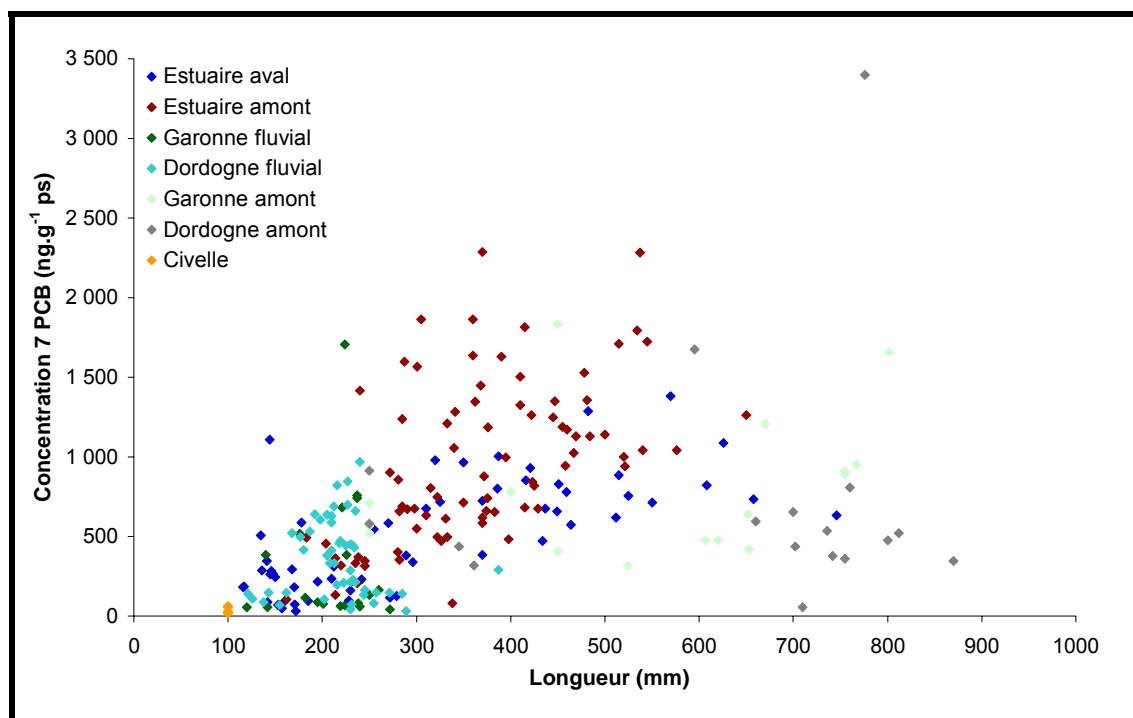


Figure 133 : Contamination en PCB (somme des 7 PCB indicateurs) du muscle des anguilles du système fluvio-estuarien exprimée en ng.g⁻¹ de poids sec en fonction de leur taille.

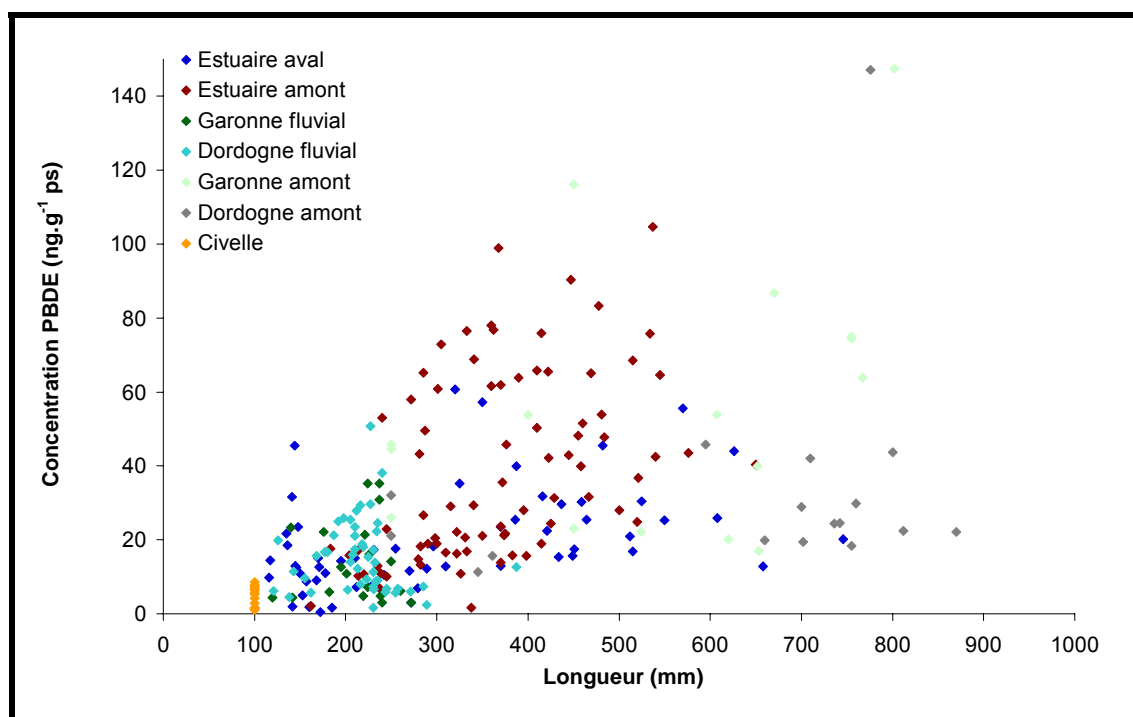


Figure 134 : Contamination en PBDE du muscle des anguilles du système fluvio-estuarien exprimée en ng.g⁻¹ de poids sec en fonction de leur taille.

Afin d'affiner l'échelle géographique d'observation, le même type de corrélation taille/contamination a été réalisé dans les deux zones de l'estuaire salé où toutes les classes de tailles sont représentées : l'estuaire amont et l'estuaire aval. La Figure 135 illustre les niveaux en PCB et la Figure 136 les niveaux en PBDE.

Dans le cas de l'estuaire aval, abstraction faite de deux individus hors tendance, la corrélation entre la taille des individus et la concentration en PCB est significative, cependant ce n'est pas le cas en ce qui concerne les PBDE (Figure 136).

Dans le cas de l'estuaire amont, la corrélation taille/contamination n'est pas significative, même si d'une façon générale l'augmentation de taille conduit à l'augmentation de la concentration en PCB. Il semble intéressant de regrouper les anguilles par classe de taille afin d'interpréter les données de contaminations.

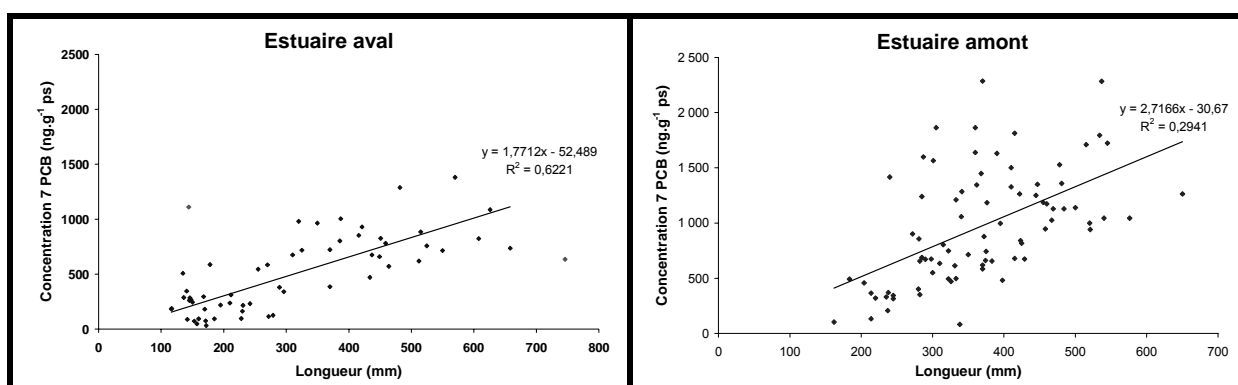


Figure 135 : Contamination en PCB (somme des 7 PCB indicateurs) du muscle des anguilles des deux zones de l'estuaire salé exprimé en ng.g^{-1} de poids sec en fonction de leur taille.

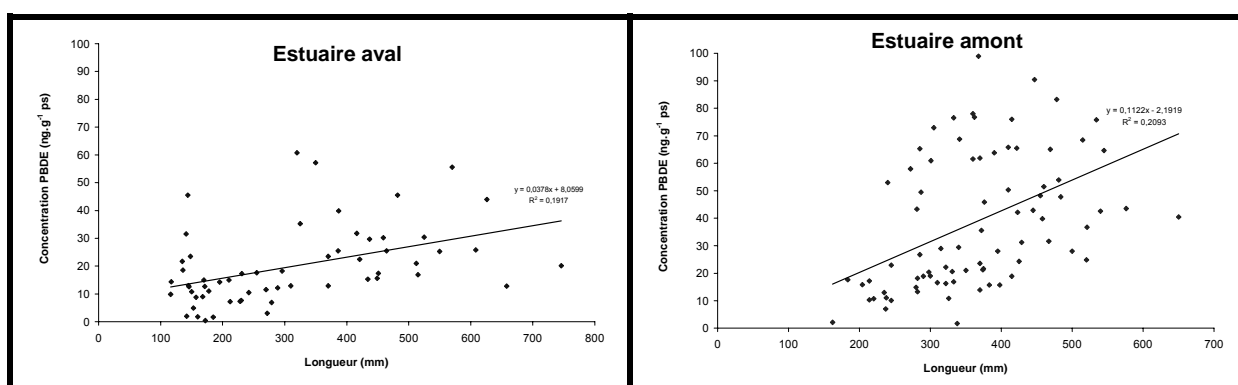


Figure 136 : Contamination en PBDE du muscle des anguilles des deux zones de l'estuaire marin exprimé en ng.g^{-1} de poids sec en fonction de leur taille.

II.2.2.2.d. Niveau de contamination par classes de taille

L'accumulation des PCB et des PBDE dans le muscle d'anguille en fonction de la taille des individus échantillonnés est présentée Figure 137 et Figure 138.

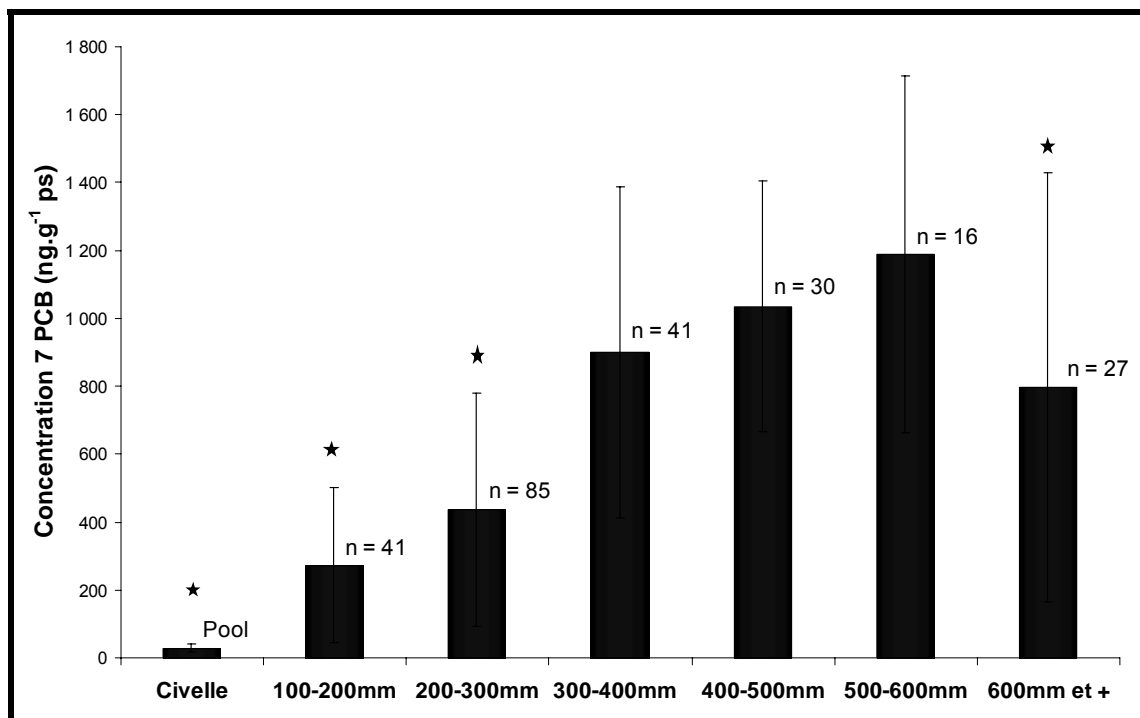


Figure 137 : Concentration en PCB dans le muscle d'anguille (ng.g⁻¹ ps) dans les différentes classes de taille (★ différence significative, Mann-Whitney U p=0,05).

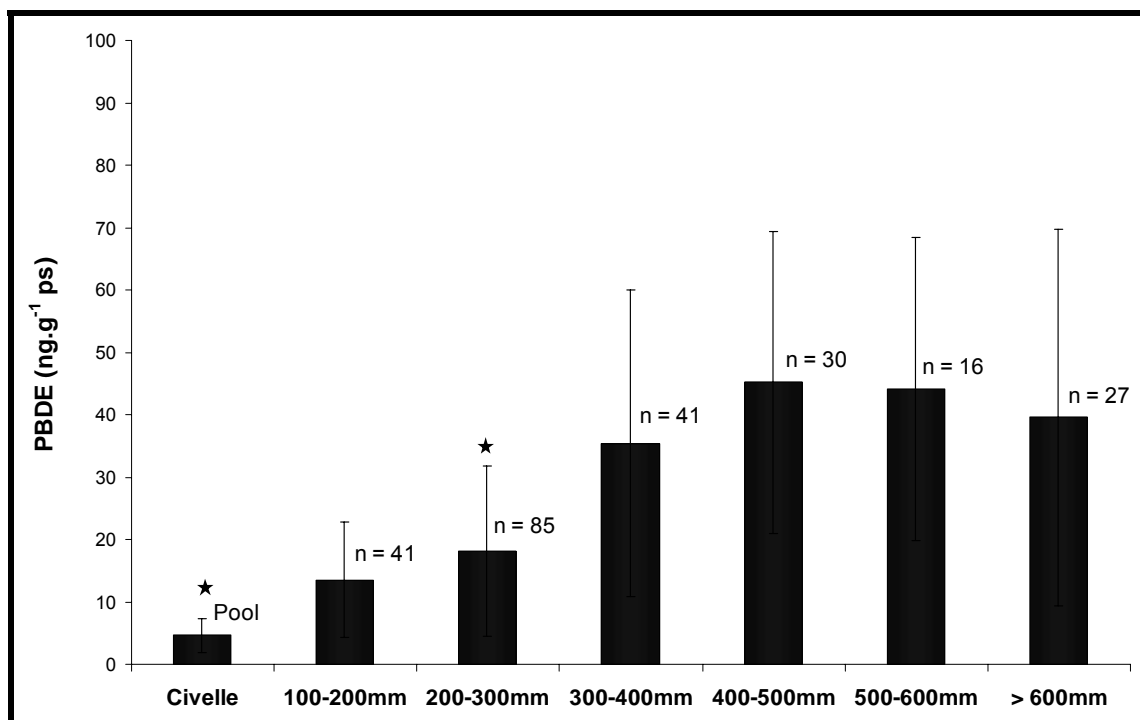


Figure 138 : Concentration en PBDE dans le muscle d'anguille (ng.g⁻¹ ps) dans les différentes classes de taille (★ différence significative p=0,05).

Globalement, le niveau de contamination semble augmenter avec la taille. La concentration augmente nettement, et de façon significative (Mann-Whitney U, $p=0,05$), dès que les civelles passent au stade de petites anguillettes. Cette tendance est très marquée dans le cas des PCB, moins dans le cas de PBDE. Ce phénomène semble lié au cycle biologique de l'anguille. Lorsque les larves leptocéphales arrivent aux abords du plateau continental, elles cessent de s'alimenter et se métamorphosent en civelle. La civelle pénètre alors dans les hydrosystèmes continentaux où elle recommence à s'alimenter. Elle se transforme alors en anguillette. La reprise d'alimentation correspond à l'augmentation de contamination observée chez les petites anguillettes jaunes. Cette augmentation de concentration se poursuit de façon plus ou moins nette en fonction de la taille. Les différences sont significatives entre les classes de taille jusqu'à la classe 300-400mm.

Il est intéressant de noter la décroissance significative du niveau de contamination en PCB pour les anguilles de taille supérieure à 600mm. Cette décroissance peut s'expliquer par différentes hypothèses. Premièrement, les anguilles de plus de 600mm sont majoritairement issues des zones amont. Elles peuvent être issues de zones moins contaminées. Deuxièmement, ces anguilles de tailles supérieures à 600 mm sont majoritairement des anguilles argentées, en phase de maturation sexuelle, qui ont cessé de s'alimenter et vivent sur leurs réserves. Elles doivent remobiliser leur réserves graisseuses pour obtenir l'énergie nécessaire à leur migration, à la maturation des gonades. A ce stade commence le transfert des réserves de l'anguille vers les ovocytes. Cette remobilisation des graisses entraîne une remobilisation des contaminants, les PCB sont sans doute remobilisés du muscle vers les gonades et à terme les œufs et la larve (Robinet et Feunten, 2002). Ce phénomène pourrait contribuer à la "détoxification" du muscle en faveur de la gonade chez les femelles argentées. Il est cependant étonnant qu'un phénomène équivalent ne s'observe pas au niveau des PBDE. En effet, aucune décroissance significative de la concentration en PBDE des anguilles de plus de 600 mm n'est observée.

La tendance d'augmentation de la concentration en PCB en fonction de la taille et donc du niveau de maturation semble se confirmer au vu des résultats détaillés. Cependant, la tendance est plus ou moins claire selon les zones (Figure 139 et Figure 140).

Au niveau de l'estuaire aval, seule la différence de concentration entre les classes de tailles 200-300 et 300-400 est statistiquement significative (Mann-Whitney U, $p=0,05$). La contamination des anguilles de 300 à 600 mm semble stable. Cependant, une légère diminution de la contamination en PCB dans le muscle d'anguilles de plus de 600 mm est à noter, même si le nombre d'échantillons pour cette classe de taille n'est pas suffisant pour conclure. Au niveau de l'estuaire amont, la tendance d'accumulation semble plus progressive.

Le niveau de contamination est significativement différent entre les trois premières classes de taille, puis le niveau de contamination en PCB se maintient. En ce qui concerne les autres zones, la disparité de l'échantillonnage ne permet pas de dégager de réelle tendance par rapport à l'influence de la taille des anguilles.

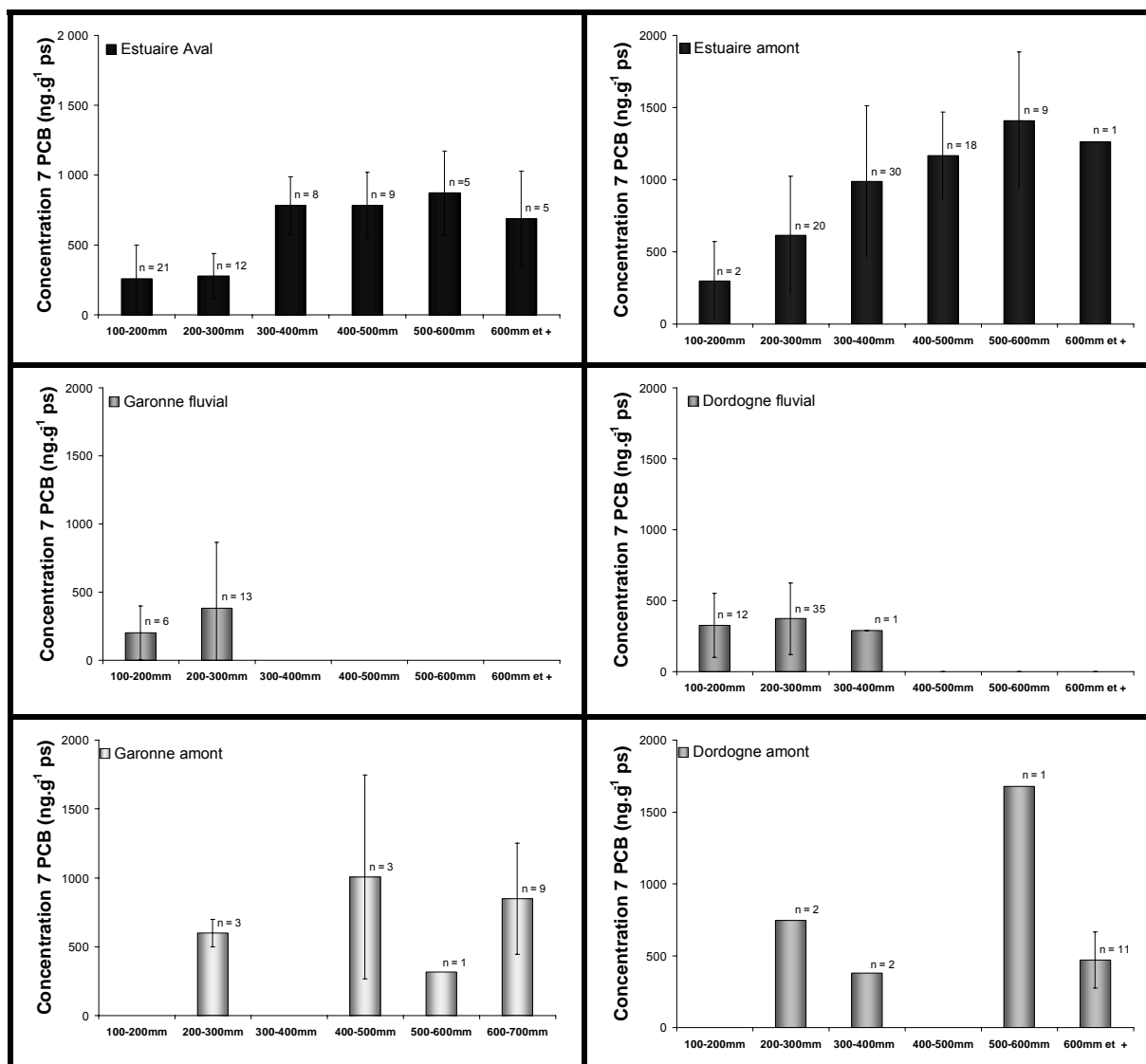


Figure 139: Concentration en PCB dans le muscle d'anguille (ng.g^{-1} ps) dans les différentes classes de taille prélevées en fonction des différentes zones ciblées.

Pour les PBDE, le schéma global est similaire à celui des PCB. La tendance d'accumulation est plus nette dans le cas de l'estuaire amont, mais beaucoup moins dans les autres zones (Figure 140). De la même façon que pour les PCB, une différence significative a pu être mise en évidence entre les classes de taille 200-300 et 300-400 mm pour les zones de l'estuaire salé (Mann-Whitney U, $p = 0,05$). Cette différence de concentration est également mise en évidence pour l'estuaire amont entre les classes de taille 300-400 et 400-500 mm. Pour les autres zones, comme dans le cas des PCB, la disparité de l'échantillonnage ne nous permet pas de conclure sur l'influence de la taille des anguilles sur leur niveau de contamination.

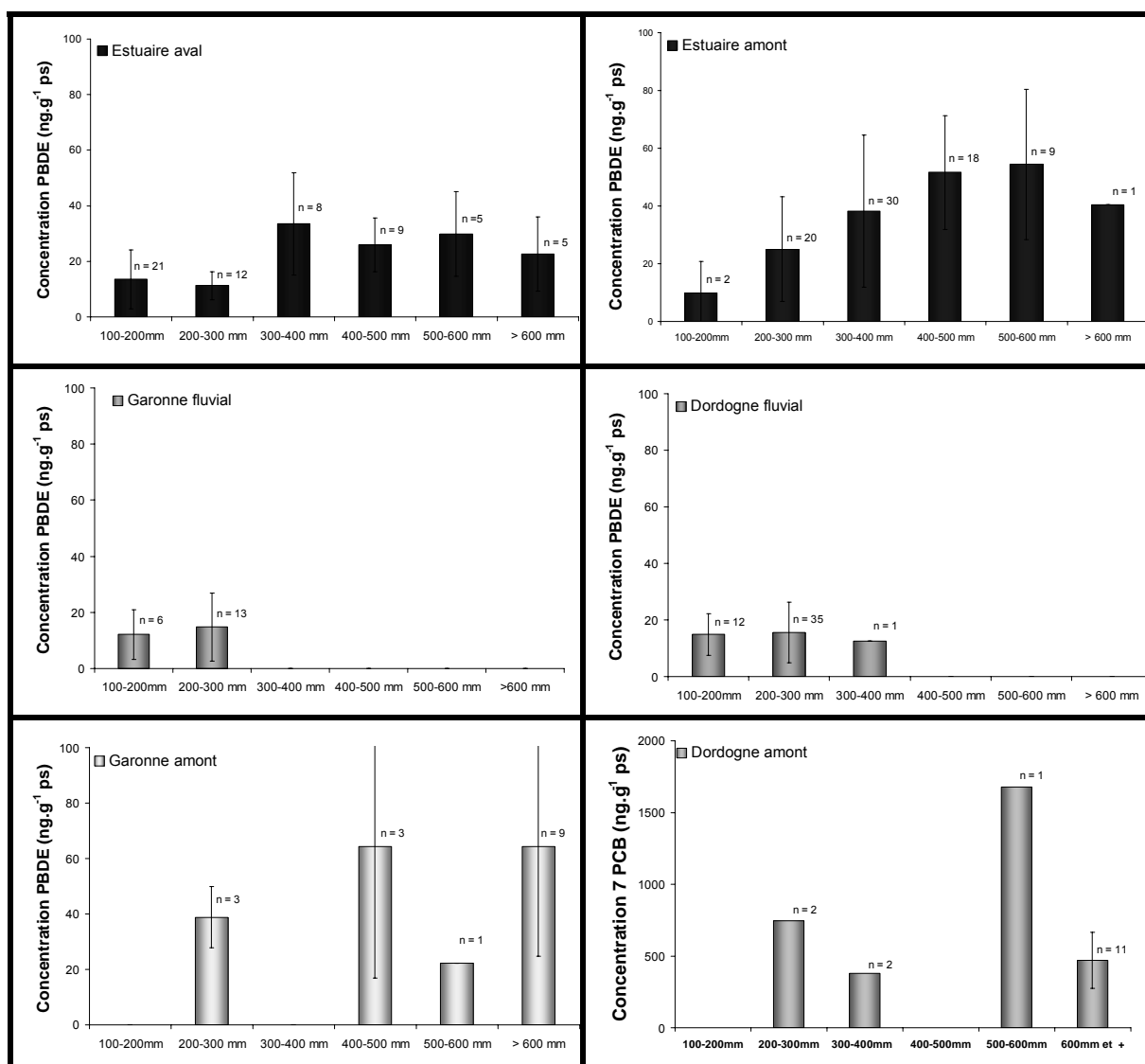


Figure 140 : Concentration en PBDE dans le muscle d'anguille (ng.g^{-1} ps) dans les différentes classes de taille prélevées en fonction des différentes zones ciblées.

II.2.2.2.e. Niveau de contamination par zone

Afin de pouvoir comparer les niveaux de contamination en PCB et PBDE entre les différentes zones, la contamination des différentes classes de tailles a été représentée pour chaque zone Figure 141 et Figure 142.

Si l'on considère les mêmes classes de tailles dans différentes zones, les anguilles de l'estuaire aval sont moins contaminées que celles issues de l'estuaire amont. La différence est significative quelque soit la classe de taille et le contaminant considéré, mis à part pour la classe de taille 100-200 mm. Le faible nombre d'individus dans les grandes classes de taille ne permet cependant pas de conclure de façon catégorique. De plus, la disparité de l'échantillonnage dans les zones plus aval ne permet pas d'établir de différence significative dans les niveaux de contamination de ces zones.

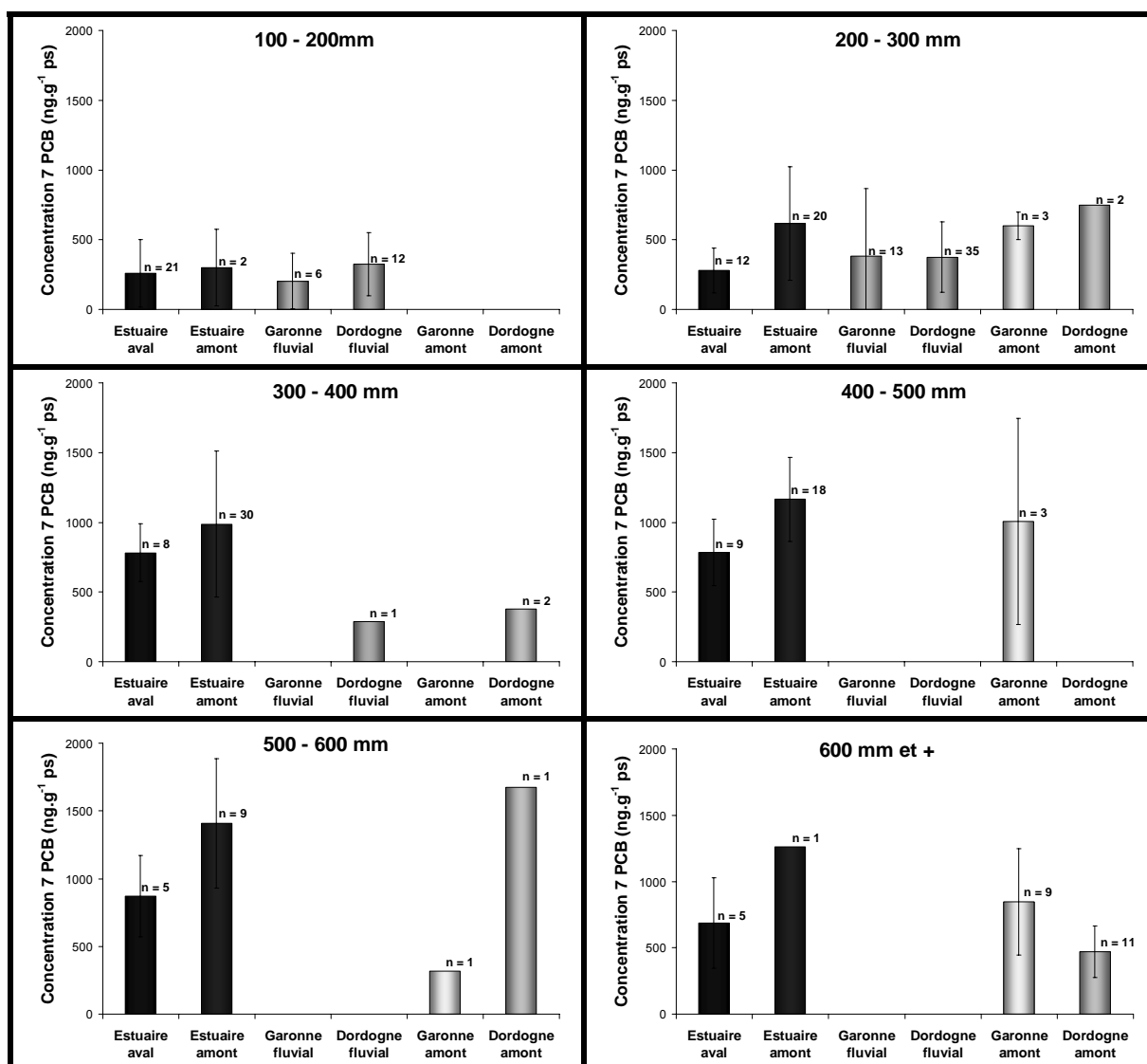


Figure 141 : Concentration en PCB dans le muscle d'anguille ($\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ ps) dans les différentes zones ciblées.

Ces résultats confirment le fort niveau de contamination en PCB des anguilles de l'estuaire de la Gironde et plus particulièrement de celle issues de l'estuaire amont. La contamination des anguilles est étroitement liée à leur nourriture. La voie alimentaire est la voie de contamination majoritaire des PCB et PBDE. Le régime alimentaire particulier de l'anguille en Gironde, basé essentiellement sur des petits crustacés, pourrait favoriser cette contamination. Le fonctionnement particulier de l'estuaire de la Gironde, avec un réseau trophique basé sur la matière détritique, semble conduire à des niveaux de contamination relativement élevés dans la petite faune vagile, niveaux de contamination qui se répercutent par la suite dans les consommateurs terminaux comme l'anguille.

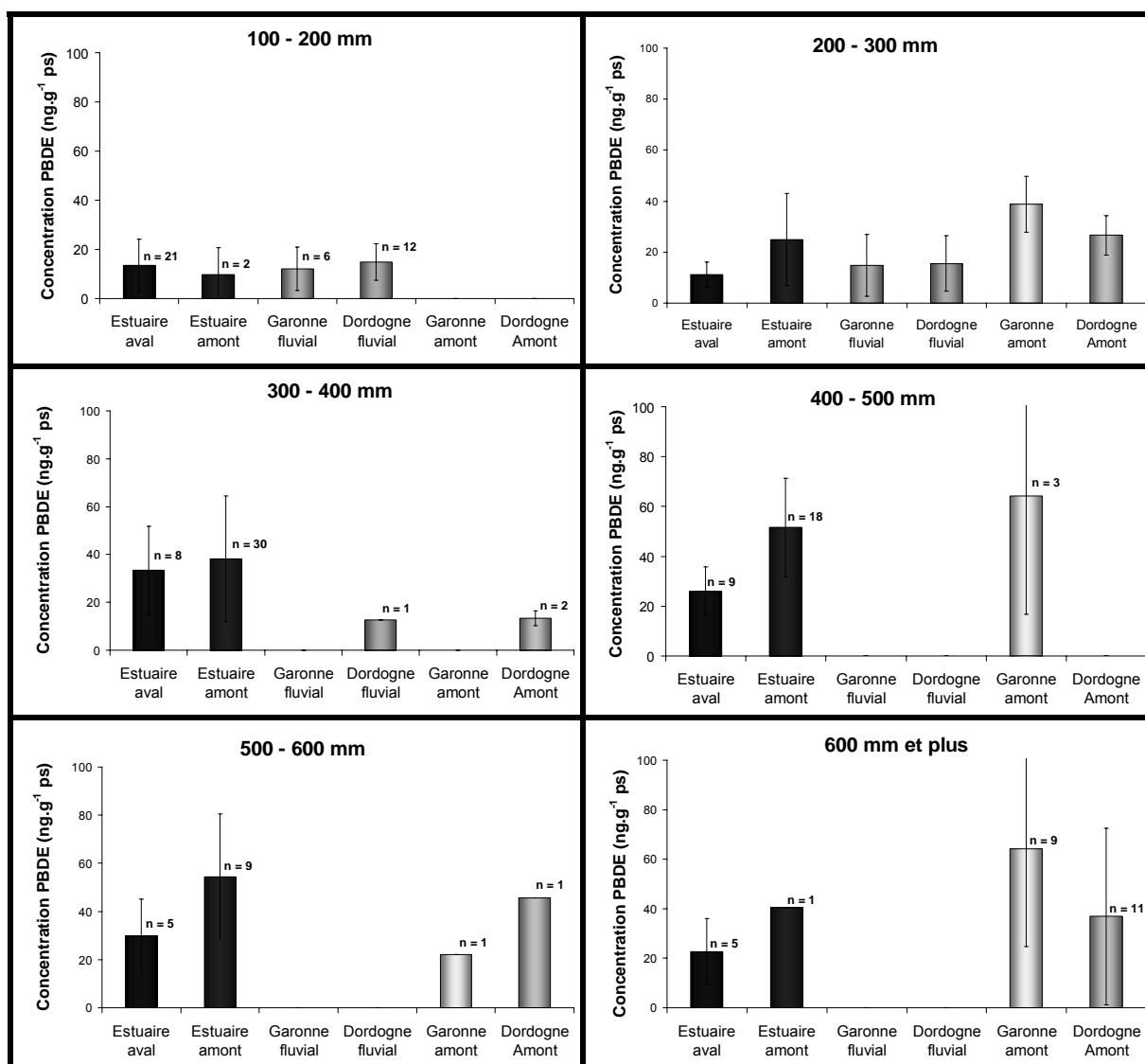


Figure 142 : Concentration en PBDE dans le muscle d'anguille (ng.g⁻¹ ps) dans les différentes zones ciblées.

II.2.2.2.f. Niveaux de contamination exprimée en ng.g⁻¹ de lipides

Les PCB et les PBDE sont des composés lipophiles (log Kow >5) facilement accumulables dans les tissus chargés en graisse. La contamination en PCB et PBDE des anguilles est donc liée à la teneur lipidique des individus analysés. Afin de s'affranchir de la variabilité, les résultats de contamination ont été exprimés en ng.g⁻¹ de lipide. La contamination des différentes classes de taille est illustrée dans la Figure 143.

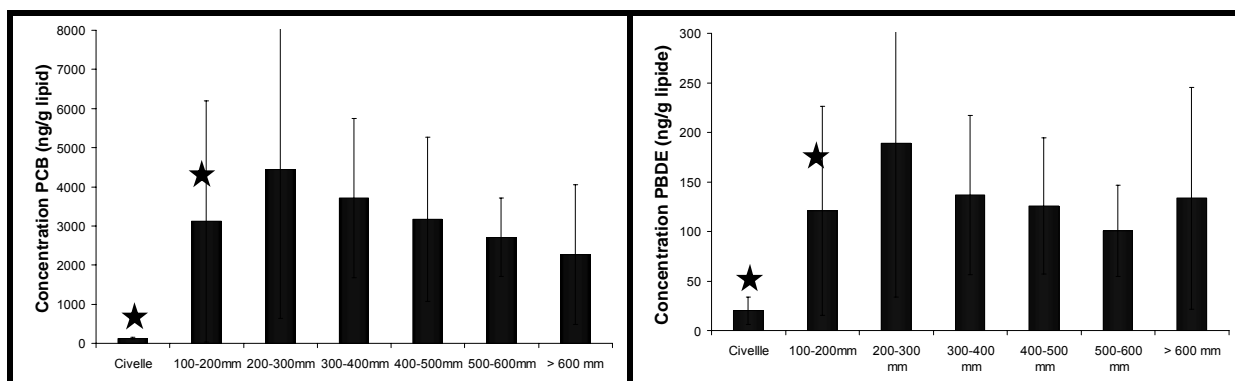


Figure 143 : Niveaux de contamination des muscles d'anguilles exprimés en ng.g^{-1} de lipide.

Ces résultats mettent à nouveau en évidence la différence significative de contamination entre les civelles et les anguilles jaunes. Il est intéressant de noter que la teneur en lipides des civelles est du même ordre que celle des jeunes anguilles jaunes de moins de 300 mm, respectivement 19 % et 13% (Tableau 45). La différence de concentration entre les civelles et les jeunes anguillettes ne peut donc pas être due à une différence de teneur lipidique, mais semble bien être la résultante de la reprise d'alimentation des anguillettes. La voie trophique est donc bien la voie majoritaire d'accumulation.

	Civelle	100-200mm	200-300mm	300-400mm	400-500mm	500-600mm	> 600mm
Teneur lipidique (%)	19 ± 2	12 ± 6	13 ± 10	31 ± 18	41 ± 20	45 ± 15	41 ± 17

Tableau 45 : Teneurs lipidiques moyennes des différentes classes d'anguille analysées exprimées en pourcentage de matière sèche.

La différence de contamination entre les classes de taille 100-200 et 200-300 mm est également significative. Ensuite, le niveau de contamination des classes de taille supérieures se maintient tout comme le taux de lipides des muscles d'anguilles.

II.2.2.2.g. Profil de composés analysés

Si l'on s'intéresse à maintenant la distribution des 7 PCB prioritaires, en ramenant la concentration de chaque congénère sur la somme des PCB, les civelles présentent une empreinte de contamination très différente des anguilles (Figure 144). Leur empreinte est caractérisée par une forte proportion de PCB peu chlorés (nombre de chlore inférieur ou égal à 5). Cette empreinte peut être due à plusieurs phénomènes. Elle peut être la résultante de la contamination parentale, quasi exclusivement de la mère. En effet, l'ovocyte amène la quasi-totalité des réserves à l'oeuf et par conséquent, il doit être le principal vecteur de contamination. Ces mécanismes ont été prouvés chez de nombreuses espèces. Il a été établi que chez certaines espèces d'oiseaux, de poissons et de crustacés, le transfert des PCB dans les œufs est globalement inversement proportionnel au degré de chloration (Bargar *et al.*, 2001), les composés les moins chlorés étant a priori plus facilement transmis à l'œuf que les PCB les plus chlorés (Fonds *et al.*, 1995 ; Verreault *et al.*, 2006).

Une autre hypothèse à ne pas négliger est une différence de voie de contamination entre les civelles et les anguilles. Durant sa traversée de l'Atlantique, la larve leptocéphale va se nourrir et donc se contaminer par voie trophique, voie majoritaire de contamination pour les POP. Par contre, arrivée à proximité du talus continental, elle cesse de s'alimenter. La seule voie de contamination est alors la voie directe. On peut supposer que l'empreinte de contamination reflète le passage direct des composés de la phase dissoute à la larve. Ce type de mécanisme conduit à une empreinte de contamination similaire à celle de l'eau dominée par les composés les moins chlorés. Il est vraisemblable que l'empreinte en PCB des civelles soit la résultante de ces deux phénomènes.

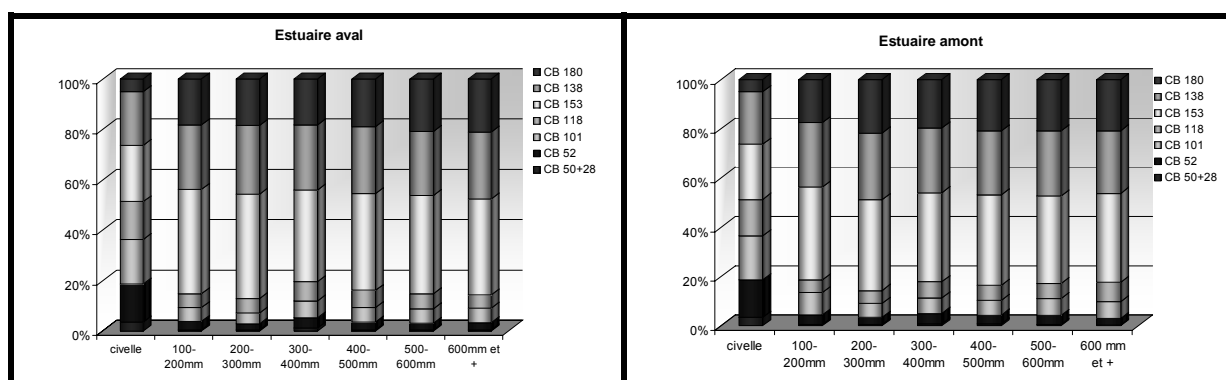


Figure 144 : Rapport de chaque congénère sur la somme des 7 PCB prioritaires exprimé en pourcentage en fonction des classes de taille échantillonnées pour les deux zones de l'estuaire marin.

Si l'on s'intéresse à la distribution des PBDE, en ramenant la concentration de chaque congénère sur la somme des PBDE, les civelles et les jeunes anguillettes présentent une empreinte de contamination différente des anguilles (Figure 145).

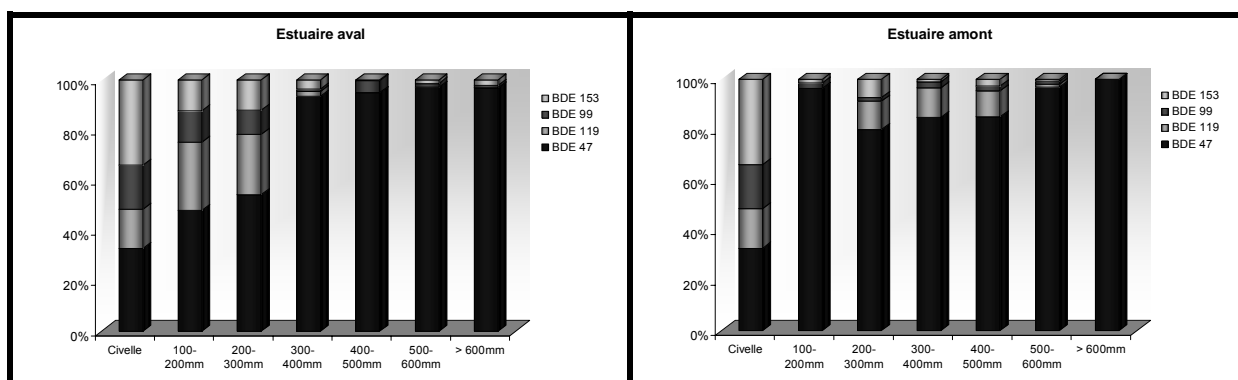


Figure 145 : Rapport de chaque congénère sur la somme des PBDE analysés exprimé en pourcentage en fonction des classes de taille échantillonnées pour les deux zones de l'estuaire marin.

Les civelles et les jeunes anguillettes de l'estuaire aval sont caractérisées par une proportion de BDE 99, 119 et 153 supérieure à celle des anguilles jaunes plus âgées. Ce changement d'empreinte est lui aussi sans doute lié à la reprise d'alimentation des anguillettes, mais le maintien de l'empreinte caractéristique des civelles sur les anguillettes de l'estuaire aval est étonnante. Il faut garder à l'esprit que la classe 200 – 300 mm de l'estuaire amont ne contient que 2 individus et la tendance mise en évidence pour ces deux individus n'est pas forcément représentative. De plus, cette différence peut être due à une source d'alimentation différente entre les deux zones, entraînant une contamination différente ou une différence de métabolisation entre les anguillettes de ces deux zones.

Pour le reste des anguilles jaunes, le congénère dominant est le BDE 47 connu pour être un composé rémanent dans les organismes biologiques. Il représente plus de 80% des congénères analysés. Cela concorde avec les résultats mis en évidence lors des cinétiques d'accumulation chez les daurades qui montraient une capacité d'accumulation du BDE 47 équivalente à celle du CB 153. Il est intéressant de noter que les concentrations en BDE 47 dans les anguilles sont corrélées avec les concentrations en CB 153. Cela confirme, comme dans la corrélation observée dans le cas des copépodes, que les phénomènes conduisant à l'accumulation des PCB et des PBDE semblent du même ordre.

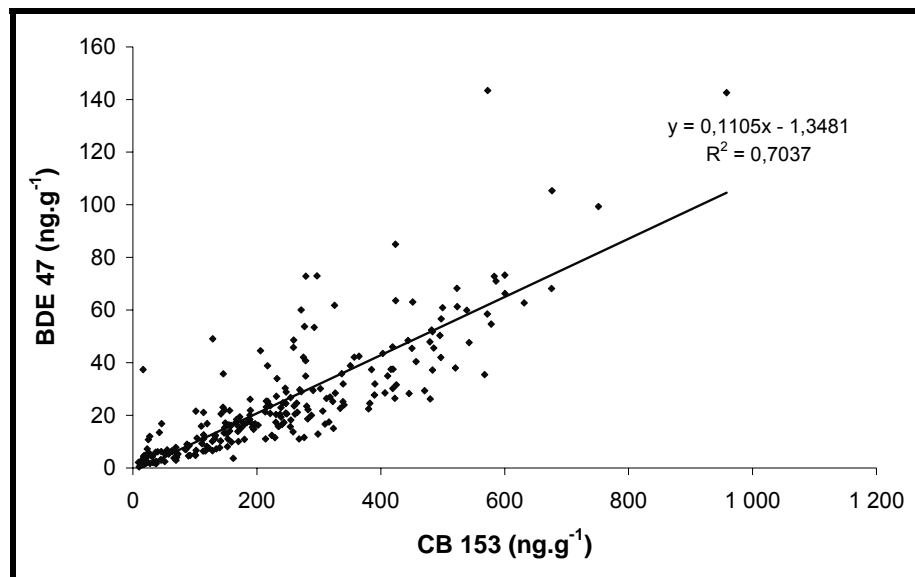


Figure 146 : Corrélation des concentrations de BDE 47 et de CB 153 dans le muscle d'anguille.

Il est également intéressant de noter l'évolution du rapport de concentration de deux PCB particuliers, le CB 118 et le CB 153 (Figure 147). En effet, le CB 118 est connu pour être métabolisable par un complexe enzymatique particulier, le cytochrome P450 1A, car il présente de atomes de carbones vicinaux non substitués en chlore. A l'opposé, le CB 153 est un PCB très peu dégradé et par conséquent peu dégradé, il est considéré comme un marqueur de contamination.

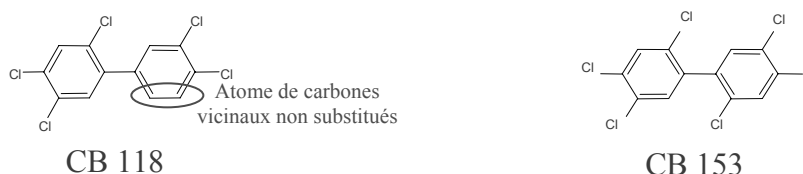


Figure 147 : Formule chimique du CB 118 et CB 153.

Ce rapport CB 118/153 évolue en fonction de l'espèce, de son niveau trophique et de sa capacité de métabolisation. Globalement, il diminue du compartiment abiotique au biota puis des premiers trophiques aux niveaux supérieurs. D'après les premiers résultats, il est intéressant de noter les différences de valeur de ce rapport entre les civelles (environ 0,8) et les restes des anguilles adultes ou sub-adultes (environ 0,3) (Figure 148).

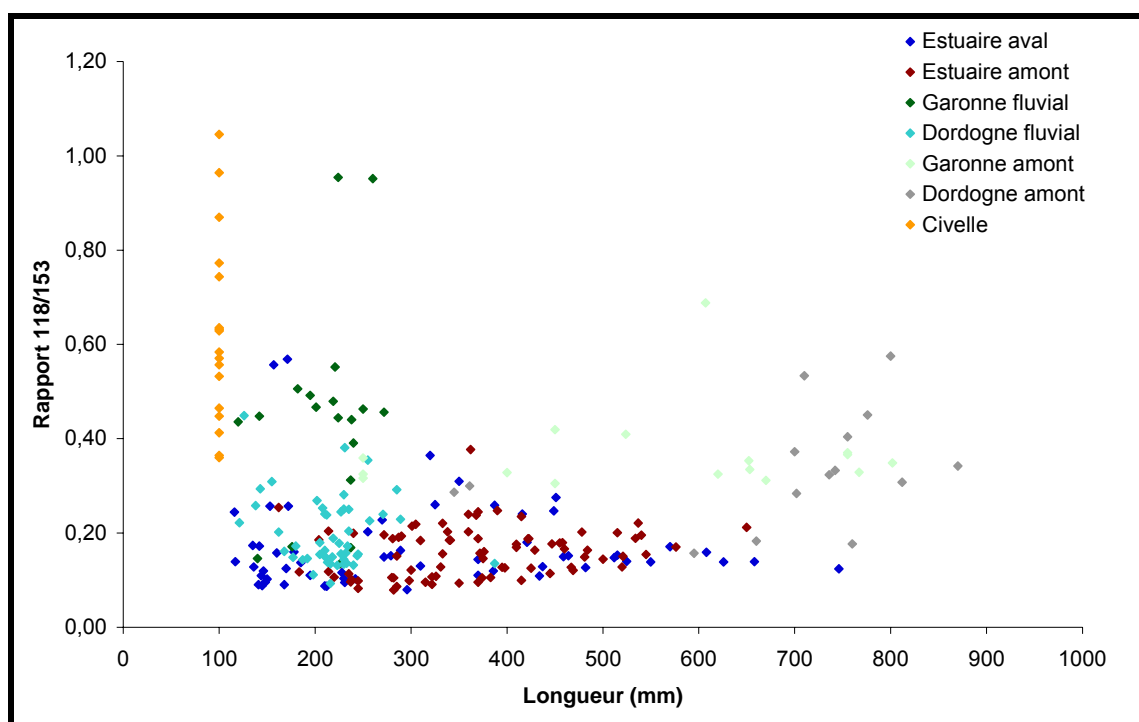


Figure 148 : Rapport CB 118/153 dans le muscle d'anguille en fonction de leur taille et de leur lieu de capture.

De plus, on remarque également une différence notable de cette valeur entre les anguilles de la Garonne et celle issue du reste du système fluvio-estuarien (Figure 149). Il serait intéressant de creuser plus avant cette question par un échantillonnage plus important dans cette zone, d'autant plus que l'on n'observe pas de différence significative de contamination en POP entre la Garonne et la Dordogne dans le cadre de cette étude. Cette différence peut être due à une différence de régime trophique des anguilles dans les différentes zones ou à une différence de physiologie ou de métabolisation.

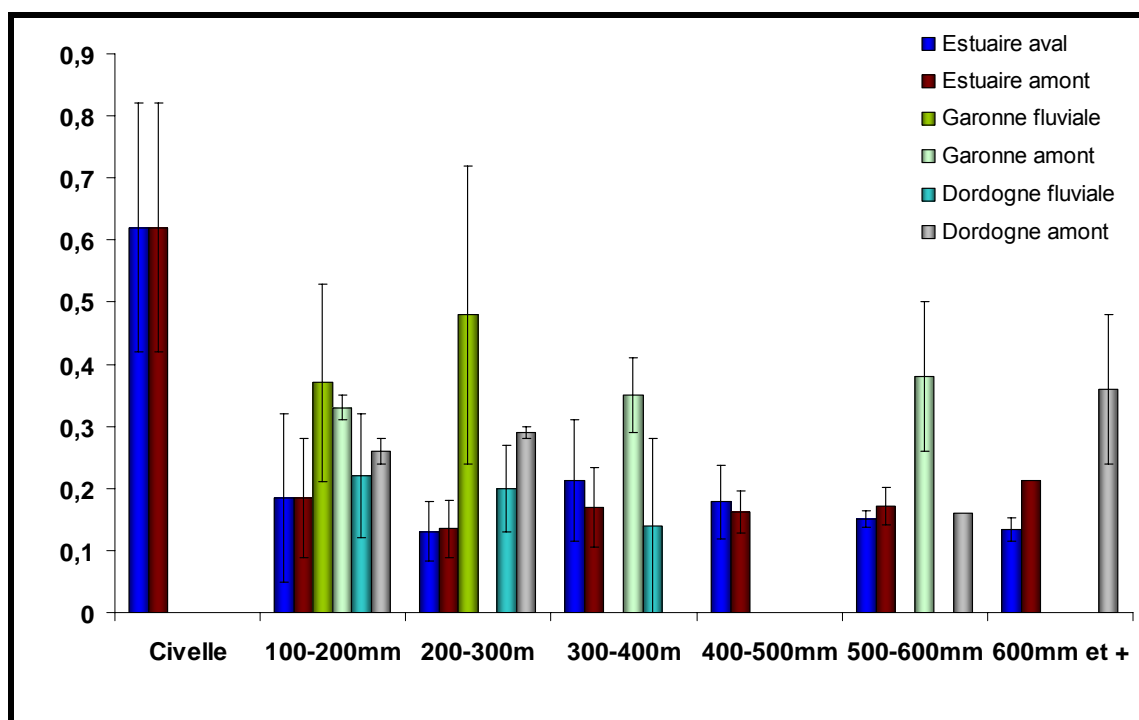


Figure 149 : Rapport CB 118/153 dans le muscle d'anguille en fonction des classes de taille échantillonnées et de leur lieu de capture.

II.2.2.2.h. Conclusion sur la contamination de l'anguille européenne

Cette étude prouve le fort niveau de contamination des anguilles de l'estuaire de la Gironde en PCB et démontre également la contamination en PBDE qui reste cependant relativement faible. La voie majoritaire de contamination des PCB et des PBDE est la voie trophique. L'origine de la contamination des anguilles se trouve donc dans leur alimentation. Des résultats récents sur les réseaux trophiques de l'estuaire de la Gironde (Pascaud, 2006) établissent le régime trophique des anguilles en fonction de leur classe de taille sur les deux zones de l'estuaire salé (Figure 150).

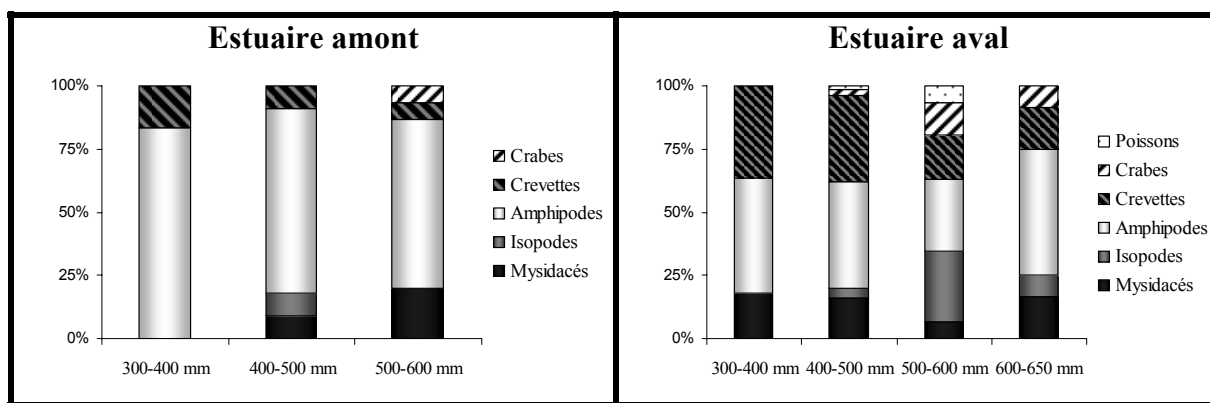


Figure 150 : Importance relative de chaque catégorie de proie dans le bol alimentaire de l'anguille européenne (Pascaud, 2006).

Sur la zone amont, le bol alimentaire est largement dominé par les gammarès qui sont, comme il a été démontré précédemment, parmi les espèces étudiées présentant le plus fort niveau de contamination ($\approx 213 \pm 72 \text{ ng.g}^{-1} \text{ ps}$). Sur la zone aval, les anguilles se nourrissent également de gammarès, mais la part de crevettes et de mysidacés (respectivement $88 \pm 32 \text{ ng.g}^{-1} \text{ ps}$ et $131 \pm 62 \text{ ng.g}^{-1} \text{ ps}$) est plus importante que dans la part amont. De plus, leur bol alimentaire est plus varié et agrémenté de crabe et de poissons. La différence de comportement alimentaire entre les anguilles de l'estuaire aval et celle de l'estuaire amont peut contribuer à expliquer la contamination plus importante des anguilles de l'amont.

Afin de visualiser les mécanismes d'accumulation entre l'anguille et ses proies principales, les facteurs de bioamplification (BAF) entre les proies et le prédateur ont été calculés en fonction de la concentration en $\text{ng.g}^{-1} \text{ ps}$ et en $\text{ng.g}^{-1} \text{ lipides}$ (Tableau 46).

Proies	Prédateurs	PCB		PBDE	
		BAF (Poids sec)	BAF (Lipides)	BAF (Poids sec)	BAF (Lipides)
Mysidacés	Anguille	4,9	1,7	5,1	2
Crevettes	Anguille	7,3	4,3	11,6	7,4
Gammarès	Anguille	3,1	0,8	1,6	0,5

Tableau 46 : Facteurs de bioamplification calculés en fonction de la teneur en contaminant exprimé en $\text{ng.g}^{-1} \text{ ps}$ et en $\text{ng.g}^{-1} \text{ lipide}$.

Les valeurs de BAF obtenues pour les concentrations exprimées en $\text{ng.g}^{-1} \text{ ps}$, montrent un phénomène de bioamplification de l'ensemble des proies vers l'anguille, que ce soit pour les PCB ou pour les PBDE. Les BAF les plus faibles sont observés entre les gammarès et l'anguille, alors que les BAF les plus élevés sont observés lorsque la proie considérée est la crevette.

Par contre, si l'on considère les BAF calculés à partir de la concentration exprimée en fonction de la teneur lipidique, les phénomènes de bioamplification ne sont plus aussi marqués. La teneur lipidique des organismes joue un rôle important dans les phénomènes

d'accumulation et de transfert des polluants organiques persistants, mais aussi dans l'expression des résultats. En ce qui concerne la contamination de l'anguille, il serait intéressant d'aller vers de l'expérimentation en milieu contrôlé, afin de définir les paramètres d'accumulation et de dépuración des PCB et des PBDE et leur impact sur l'individu, le rôle des lipides et d'extrapoler au milieu naturel à la grande échelle sur les populations.

En effet, les polluants organiques sont suspectés d'être l'un des cofacteurs de déclin de l'espèce (Robinet et Feunten, 2002). Le problème de la contamination de l'anguille par les POP n'est pas local, mais mondial. Le Tableau 47 illustre les niveaux de contamination en PCB des anguilles pour d'autres environnements en France et dans d'autres pays. La contamination des anguilles de différentes classes de taille de l'estuaire aval et de l'estuaire amont a été comparée aux quelques valeurs trouvées dans la littérature.

Localisation géographique	Nombre d'individus analysés	Longueur moyenne (mm)	Poids moyen (grammes)	Concentration (ng/g pf)	Source
Pologne Lac Druglin Duzy	5	510	217	2	Greenpeace (2005)
Irlande Lac Furnace	6	460	96	4	Greenpeace (2005)
France Nantes	5	370	88	5	Greenpeace (2005)
Irlande Newport	6	270	177	5	Greenpeace (2005)
France Estuaire marin de la Gironde	17 (pool 40 ind))	Civelles	0,3	6	Cette étude
France carmargue Lagon de Vaccarès La capellière	18	-	-	8,88	Roche <i>et al.</i> (2000)
Pays bas Canl Harinxma	2	380	107	16	Greenpeace (2005)
France carmargue Lagon de Vaccarès Canal de Fumemorte	16	-	-	22	Roche <i>et al.</i> (2000)
France Etan de Thau	5	470	178	29	Greenpeace (2005)
France carmargue Lagon de Vaccarès péninsule de Mornès	19	-	-	32	Roche <i>et al.</i> (2000)
Etats Unies rivière Conhansey, NJ (1)	5	560	330	40	Ashley <i>et al.</i> (2003)
Espagne Mino	4	440	152	54	Greenpeace (2005)
République tcheque Elbe proche Prague	2	520	249	66	Greenpeace (2005)
Belgique Canal Charleroi	4	580	415	97	Greenpeace (2005)
Italy Lac Bracciano	2	570	374	120	Greenpeace (2005)
Espagne Ebro	5	360	84	123	Greenpeace (2005)
France Estuaire marin de la Gironde	41	100-200	6	123	Cette étude
France Estuaire marin de la Gironde	85	200-300	24	124	Cette étude
Angleterre Tamise	5	590	474	136	Greenpeace (2005)
Angleterre rivière wey	12	-	-	165	Gazzard (1993)
Pays Bas Canal noordzee	2	390	113	165	Greenpeace (2005)
République Tcheque Elbe proche allemagne	2	470	166	184	Greenpeace (2005)
Allemagne Weser	5	570	308	196	Greenpeace (2005)
France camargue Lagon de Vaccarès Canal de Fumemorte	7	-	200	207	Roche <i>et al.</i> (2002)
Hollande Lac Gaasperplas	16	470	142	237	Van der Oost (1996)
Hollande Amsterdam Diemerzeedijk	10	480	198	246	Van der Oost (1996)
Etats Unies Rivière Passaic, NJ (1)	4	500	-	250	Ashley <i>et al.</i> (2003)
France Estuaire marin de la Gironde	41	300-400	75	278	Cette étude
Etats Unies rivière Delaware en dessous de Trenton NJ (1)	6	560	360	290	Ashley <i>et al.</i> (2003)
France camargue Lagon de Vaccarès La capellière	5	-	72	313	Roche <i>et al.</i> (2002)
Allemagne Elbe	5	590	378	327	Greenpeace (2005)
France Estuaire marin de la Gironde	30	400-500	161	346	Cette étude
Allemagne Rhin	5	600	326	381	Greenpeace (2005)
France Estuaire marin de la Gironde	27	600 et +	685	413	Cette étude
France Estuaire marin de la Gironde	16	500-600	288	414	Cette étude
Hollande Enclosed IJ	10	490	183	462	Van der Oost (1996)
Italy Rome	5	360	374	483	Greenpeace (2005)
Hollande Port Americain	10	500	201	536	Van der Oost (1996)
Etats Unies Baie de Raritan, NJ (1)	4	430	190	550	Ashley <i>et al.</i> (2003)
Allemagne Maine	5	680	579	566	Greenpeace (2005)
Hollande Volgermeerpolder	10	620	414	584	Van der Oost (1996)
Hollande Nieuwe Meer	10	460	134	773	Van der Oost (1996)
Etats Unies Rivière Hudson à Athens (1)	5	500	170	900	Ashley <i>et al.</i> (2003)
Pays bas	2	400	126	1512	Greenpeace (2005)
Etats Unies Rivière Hudson à GW bridge (1)	5	550	300	2000	Ashley <i>et al.</i> (2003)
Etats Unies Rivière Hudson à Newburgh (1)	5	600	430	3865	Ashley <i>et al.</i> (2003)

Tableau 47 : Niveau de contamination de l'anguille européenne dans le monde d'après la littérature scientifique.

Il apparaît d'après l'analyse du Tableau 47 que les anguilles de l'estuaire de la Gironde et des bassins versants Dordogne et Garonne montrent un niveau de contamination en PCB remarquable par rapport aux autres sites français et européens pour lesquels il existe des informations. La tendance observée lors de l'analyse des flets issus des différents estuaires français se confirme, les poissons de l'estuaire de la Gironde présentent une contamination en PCB relativement importante. Il aurait été intéressant d'obtenir des données du niveau de contamination en PCB des anguilles de Seine, mais aucune valeur n'a pu être trouvée. Ces niveaux de contamination et leurs potentiels effets associés (perturbateurs endocriniens essentiellement) posent le problème de la pérennité de l'espèce.

Parallèlement à l'impact de ces contaminants sur les espèces, la question de l'impact sur l'homme reste posée, même si aucune étude épidémiologique ne peut relier avec certitude une exposition alimentaire à un problème de santé (Ross, 2004). Au niveau français, l'AFSSA (Avis 8/04/2003) préconise une Dose Journalière Tolérable (DJT) à $0,01\mu\text{g}/\text{kg}/\text{j}$ basée sur les 7 PCB classiquement considérés comme indicateurs, et qui ont été analysés dans cette étude. Si l'on considère cette DJT, un homme de 75 kg peut consommer $5,25\mu\text{g}$ par semaine ($0,01\mu\text{g} \times 75 \text{ kg} \times 7\text{j}$). L'anguille étant un poisson consommé couramment sur les bords de la Gironde, les quantités d'anguilles consommables en une semaine sans excéder la dose hebdomadaire tolérable (DHT) de PCB préconisée par l'AFSSA ont été calculées en gramme (Tableau 48).

En résumé, la consommation de civelles ne pose aucun problème, puisque sur les bases du calcul, 1 kg de civelle par semaine peut être consommé sans dépasser la DHT. Par contre la consommation d'anguille pose clairement problème à la lumière de nos calculs, et cela dès les premières classes de taille. D'après la concentration globale des anguilles de l'estuaire marin (toute classe de taille confondue), on ne peut pas, en l'état actuel de la contamination, consommer plus de 28 g d'anguille par semaine sans dépasser la DHT.

L'anguille est donc fortement contaminée dans l'estuaire de la Gironde et selon la fréquence à laquelle elle est consommée, ces niveaux de contamination pose à long terme la question d'un impact sanitaire sur les consommateurs. Ces niveaux de contamination sont la résultante d'une contamination chronique du milieu et sans doute du fonctionnement du réseau trophique de l'estuaire, basé essentiellement sur du matériel détritique, qui conduit à une contamination significative de la petite faune vagile.

		Concentration des 7 PCB prioritaires (ng.g ⁻¹ poids frais)	Quantité d'anguille consommable par semaine (g)
Estuaire aval	Civelle	5 ±2	1050
	100-200mm	160 ±149	33
	200-300mm	85 ±36	62
	300-400mm	259 ±103	20
	400-500mm	285 ±117	18
	500-600mm	356 ±96	15
	600mm et +	271 ±136	19
Estuaire amont	Civelle	5 ±2	1050
	100-200mm	87 ±78	60
	200-300mm	163 ±118	32
	300-400mm	296 ±224	18
	400-500mm	407 ±198	13
	500-600mm	472 ±183	11
	600mm et +	555	9
Garonne fluviale	100-200mm	77 ±101	68
	200-300mm	94 ±122	56
	300-400mm	-	-
	400-500mm	-	-
	500-600mm	-	-
	600mm et +	-	-
Dordogne fluviale	100-200mm	98 ±38	54
	200-300mm	88 ±59	60
	300-400mm	67	78
	400-500mm	-	-
	500-600mm	-	-
	600 mm et +	-	-
Garonne amont	100-200mm		
	200-300mm	167 ±23	31
	300-400mm	-	-
	400-500mm	298 ±209	18
	500-600mm	-	-
	600 mm et +	389 ±197	13
Dordogne amont	100-200mm		
	200-300mm	218 ±79	24
	300-400mm	117 ±31	45
	400-500mm	-	-
	500-600mm	720	7
	600mm et +	276 ±308	19

Tableau 48 : Quantités d'anguilles consommables en une semaine sans excéder la DJT (grammes).

Cette étude a permis de définir le niveau de contamination moyen des anguilles de l'estuaire de la Gironde. Les civelles présentent un niveau de contamination bas de l'ordre de 28 ± 12 ng.g⁻¹ ps pour les PCB et 5 ± 2 ng.g⁻¹ ps pour les PBDE alors que les anguilles sont plus contaminées. Le niveau moyen de contamination en PCB des anguilles, toutes classes de tailles et toutes zones confondues, est de l'ordre de 650 ± 509 ng.g⁻¹ ps pour les PCB et de 28 ± 24 ng.g⁻¹ ps pour les PBDE.

Ce niveau de contamination est différent selon la classe de taille considérée. Globalement, il augmente avec la taille et l'âge de l'individu jusqu'à l'argenture. Les mécanismes possibles de remobilisation des POP au moment de l'argenture pouvant expliquer la diminution du niveau de POP dans les anguilles de grandes tailles n'ont pas été étudiés ici.

Le niveau de contamination des différentes zones étudiées reste élevé mais il apparaît des disparités. Il semblerait que les anguilles de l'estuaire amont soient plus contaminées que celles de l'estuaire aval et des zones fluviales. Malheureusement, l'échantillonnage ne nous permet pas de conclure de façon catégorique sur les niveaux de contamination des parties fluviales, vu le faible nombre d'individus collectés sur ces zones. A priori la voie de contamination majoritaire de l'anguille dans le système est la voie trophique, la voie dissoute est minoritaire. Le régime trophique peut expliquer partiellement les différences de contamination observées. Les anguilles échantillonnées sur la zone aval de l'estuaire salé se nourrissent sur des proies moins contaminées (crevettes par exemple) que celles échantillonnées en estuaire amont, qui se nourrissent d'amphipodes (essentiellement des gammares). Cependant, il faut garder à l'esprit que l'anguille est une espèce mobile et que son lieu de capture n'est pas nécessairement le lieu où elle a passé sa vie. Il pourrait être intéressant de corrélérer les résultats de contamination avec des données de vie propre à chaque anguille (histoires de vie des anguilles par microchimie par exemple).

Les niveaux de contamination obtenus dans le cadre de cette étude ont été comparés avec les résultats de contamination présents dans la littérature. Les anguilles de l'estuaire ne présentent pas des niveaux de contamination aussi élevés que les anguilles de l'Hudson (plus de 2000 ng.g⁻¹ pf) historiquement très fortement contaminée par les PCB, mais les niveaux de contamination restent élevés en comparaison avec le reste des données européennes et françaises et peuvent poser un problème sanitaire selon l'avis de l'AFSSA (Avis 8/04/2003).

Conclusion

L'objet de cette thèse était d'étudier les phénomènes d'accumulation, de dépuración et de transfert des contaminants organohalogénés (PCB et des PBDE) au sein des écosystèmes aquatiques.

Dans un premier temps, les travaux ont donc porté sur le développement de procédures d'analyses simples, rapides et efficaces permettant l'analyse quantitative des PCB et des PBDE dans les matrices biologiques complexes. Pour chaque classe de composés étudiés, des composés individuels particuliers ont été ciblés, pour les PCB (CB 28, CB 52, CB 101, CB 118, CB 138, CB 153 et CB 180) et pour les PBDE (BDE 47, BDE 99, BDE 119, BDE 153 et le BDE 190). Le développement de procédures d'extraction et d'analyse associant des techniques d'extraction (MAE et ASE) à des purifications efficaces ont permis d'obtenir des limites de détection compatibles avec l'analyse d'échantillon biologique (environ 1 ng.g^{-1} ps) et d'augmenter considérablement le nombre d'échantillons traités par jour et par manipulateur, rendant ainsi aisément possible un suivi environnemental de grande envergure.

Dans un deuxième temps, ces techniques d'extraction ont permis de conduire une étude en milieu contrôlé des phénomènes d'accumulation et de dépuración des PCB et des PBDE sur trois espèces cibles (*Isochrysis galbana*; *Mytilus edulis* et *Sparus aurata*) nécessitant l'analyse de plus de 2500 échantillons biologiques. Cette étude a permis de caractériser les cinétiques d'accumulation et de dépuración en milieux contrôlés de composés modèles (CB 77, CB 153, BDE 47, BDE 153, chrysène, benzo(a)pyrène, fluoranthène). Pour la première fois dans ce type d'étude, la variabilité individuelle a été mise en évidence au sein d'une même espèce. L'influence de la structure chimique (PCB coplanaire ou non, degré de substitution, substitution Cl/Br, différence structurale ...), de la lipophilie ($\log K_{ow}$) et de l'espèce biologique considérée a été étudiée. Il été confirmé que le CB 153, de par sa structure globulaire et la position de ses atomes de chlores sur le cycle biphényle, présente un fort potentiel de bioaccumulation chez les espèces étudiées et *a contrario* un faible potentiel de dépuración. Le CB 77, PCB coplanaire, présente quant à lui une capacité d'accumulation plus faible et une capacité d'élimination plus importante. En ce qui concerne les PBDE, il a été mis en évidence que le BDE 47 présente des capacités d'accumulation équivalentes, voire légèrement supérieures au CB 153 dans les espèces étudiées, ce qui explique sa rémanence dans les écosystèmes aquatiques. Ceci confirme également que le $\log K_{ow}$ n'explique pas à lui seul le comportement d'un xénobiotique au sein d'un écosystème aquatique et de son réseau trophique. Ce jeu de donnée a également servi à calibrer un modèle de bioaccumulation développé par E. Alonso et R.S.J. Tarazona (Laboratoire d'Ecotoxicologie, INIA, Institut pour l'agriculture et la recherche agroalimentaire, Madrid).

Dans un troisième temps, les phénomènes de transfert des PCB et des PBDE ont été étudiés en milieu naturel. Le suivi de la contamination en PCB et PBDE de flets (*Platichthys flesus*) issus de différents estuaires français (Ster, Seine, Vilaine, Loire et Gironde) a souligné la forte contamination des flets issus de l'estuaire de la Gironde (250 ng.g⁻¹ ps en moyenne dans le muscle). La contamination du réseau trophique pélagique de l'estuaire de la Gironde a été étudiée de façon plus approfondie. Les niveaux de contamination en PCB et en PBDE des différents niveaux du réseau trophique ont été caractérisés. Le compartiment abiotique présente effectivement un niveau de contamination faible (particule 40 ng.g⁻¹ps) alors que le compartiment planctonique et les petits crustacés associés présentent des niveaux plus élevés (copépodes : PCB = 220 ± 50 ng.g⁻¹ ps / PBDE = 13 ± 10 ng.g⁻¹ ps; mysidacés : PCB = 130 ± 62 ng.g⁻¹ ps / PBDE = 13 ± 10 ng.g⁻¹ ps ; gammare: PCB = 210 ± 72 ng.g⁻¹ ps / PBDE = 17 ± 6 ng.g⁻¹ ps ; crevettes blanches : PCB = 90 ± 20 ng.g⁻¹ ps / PBDE = 3 ± 1 ng.g⁻¹ ps ; crevettes grises : 80 ± 20 ng.g⁻¹ ps / PBDE = 3 ± 1 ng.g⁻¹ ps). Ces niveaux de contamination et leurs variations semblent liés au cycle de vie des espèces, à leur régime trophique et à leur physiologie intrinsèque. Ainsi, il semblerait que contrairement à ce qui est observé en estuaire de Seine, les niveaux de contaminations maximales des copépodes soient atteints pendant les pics d'abondance des espèces présentes (*E. affinis*, *A. tonsa*, *A. biffilosa*). Ceci reste bien sûr à confirmer, mais il semblerait que le réseau trophique de l'estuaire de la Gironde basé sur le compartiment détritique conduise à ce phénomène particulier.

Une des perspectives de ce travail serait d'étudier plus avant ces phénomènes à la base du réseau trophique. Un suivi sur le terrain avec un pas de temps de prélèvement plus restreint devrait permettre de déconvoluer les phénomènes. Dans ce suivi, il semblerait intéressant de caractériser les niveaux de contamination en fonction des espèces des copépodes (*E. affinis*, *A. tonsa*, *A. biffilosa*) et des mysidacés (*N. integer* et *M. slabberi*) considérées, de l'abondance de chaque espèce au cours du temps, du sexe ratio, de l'abondance des juvéniles ainsi que de tous les paramètres classiques (température, MES, COD, chlorophylle...). Il semble également intéressant d'envisager un suivi de la contamination au cours d'un cycle de marée, afin de définir la variabilité tidale du niveau de contamination des organismes. Il serait également intéressant de coupler cette étude terrain avec une expérimentation en milieu contrôlé afin de définir si à niveau de contamination égale le type de ressources trophiques disponibles (cellules algales ou bactéries) influence le taux d'accumulation chez les prédateurs.

Après la caractérisation de la base du réseau trophique, le niveau de contamination de quelques espèces de poissons présentes dans l'estuaire a été réalisé (anguille, maigre, sole et mulot). Ces résultats ont confirmé la forte contamination des anguilles de l'estuaire de la

Gironde en PCB. Le niveau de contamination des anguilles de l'estuaire de la Gironde a été caractérisé sur 240 anguilles et 17 pools de civelles. Les civelles présentent un niveau de contamination bas de l'ordre de $28 \pm 12 \text{ ng.g}^{-1}$ ps de PCB et $5 \pm 2 \text{ ng.g}^{-1}$ ps de PBDE alors que le niveau moyen de contamination en PCB des anguilles, toutes classes de tailles et toutes zones confondues, est de l'ordre de $650 \pm 509 \text{ ng.g}^{-1}$ ps pour les PCB et de $28 \pm 24 \text{ ng.g}^{-1}$ ps pour les PBDE.

Les résultats obtenus mettent clairement en évidence que la contamination de l'anguille par les POP commence dès les premiers stades de l'anguille jaune. Dès que les civelles commencent à se réalimenter, leur concentration en POP augmente de façon significative, prouvant par là même que la voie majoritaire de contamination est la voie trophique. Ensuite, globalement le niveau de contamination augmente jusqu'à l'argenteure. Il semblerait qu'à ce moment, des mécanismes particuliers résultant de la maturation des anguilles et de la remobilisation des graisses influencent les niveaux de contamination des POP dans les muscles. De plus, à ce stade, les anguilles cessent de s'alimenter, mais ces phénomènes n'ont pas été étudiés plus avant.

La voie de contamination majoritaire de l'anguille dans le système estuarien est la voie trophique, la voie dissoute est minoritaire. Le régime trophique semble expliquer partiellement les différences de contamination observées. Les anguilles échantillonnées sur la zone aval de l'estuaire salé se nourrissent sur des proies moins contaminées (crevettes par exemple) que celle échantillonnées en estuaire amont, qui se nourrissent d'amphipodes. Cependant il faut garder à l'esprit que l'anguille est une espèce mobile et que son lieu de capture n'est pas nécessairement le lieu où elle a passé sa vie. Il pourrait être intéressant de corrélérer les résultats de contamination avec les histoires de vie des anguilles.

Les résultats de contamination en PCB des anguilles de l'estuaire de la Gironde ont été comparés avec les résultats de contamination présents dans la littérature. Les anguilles de l'estuaire de la Gironde ne présentent pas des niveaux de contamination aussi élevés que les anguilles de l'Hudson (plus de 2000 ng.g^{-1} pf) historiquement très fortement contaminée par les PCB, mais les niveaux de contamination reste élevés en comparaison avec le reste de données européennes et françaises. Il serait là encore intéressant de mener des études en milieux contrôlés afin de définir les mécanismes d'accumulation des POP par les anguilles mais également d'appréhender les effets de ces contaminants chez l'anguille à l'échelle individuelle, afin d'extrapoler sur les effets sur les populations naturelles.

En dehors de l'impact pour l'espèce elle-même, ce fort niveau de contamination peut également poser soucis en terme de consommation humaine, car l'anguille est un poisson traditionnellement consommé sur les bords de la Gironde. En 2003, l'AFSSA a émis un avis

sanitaire (Avis 8/04/2003) qui préconise une Dose Journalière Admissible (DJT) à 0,01µg/kg/j basée sur les 7 PCB classiquement considérés comme indicateurs. Si l'on considère cette DJT, un homme de 75 kg peut consommer environ 20 grammes d'anguilles par semaine.

Les niveaux de contamination élevés mis en évidence dans les organismes de l'estuaire de la Gironde et confirmés par le suivi inter estuaires sur les flets soulignent la particularité de cet estuaire et illustrent les comportements de contaminants rémanents dans ce système. Ainsi on peut craindre qu'outre les PCB et les PBDE caractérisés dans cet environnement, des composés aux propriétés similaires soit également présents à des concentrations significatives (composés perfluorés, nonyphénols...).

Une autre des perspectives de ce travail serait d'étudier les métabolites des PCB et des PBDE. Ces métabolites sont majoritairement responsable de la toxicité des PCB et PBDE et ils sont potentiellement bioaccumulables. La compréhension des mécanismes de métabolisation est nécessaire pour mieux appréhender le devenir des PCB et PBDE. Il faudrait également appréhender l'impact de cette contamination sur les organismes à l'échelle individuelle et éventuellement à l'échelle de la population. Ce type d'étude n'est envisageable qu'à travers une approche pluridisciplinaire couplant la chimie, la biologie et l'écologie à travers des allers-retours : expérimentation en milieu contrôlé/milieu naturel.

Bibliographie

Abarnou A (1998)

Les polychlorobiphényles (PCB) en Baie de Seine. Rapport IFREMER, DERO 88-06-EL, pp99.

Afssa (2003)

Avis de l'Afssa sur l'existence d'une corrélation significative entre les teneurs dans différents congénères de PCB. 8/04/2003, 8pp.

Ahn MY, Filley TR, Jafvert CT, Nies L, Hua I, Bezares-Cruz J (2006)

Photodegradation of Decabromodiphenyl Ether Adsorbed onto Clay Minerals, Metal Oxides, and Sediment. *Environmental science and technology*, 40, 215-220.

Andersson O, Blomkvist G (1981)

Polybrominated aromatic pollutants found in fish in Sweden. *Chemosphere*, 10, 1051-1060.

Anonyme (1984a)

Rapport de synthèse et programme quinquennal anguille. Rapport Groupe National Anguille 60p (Min Agriculture, Environnement, Recherche).

Anonyme (1984b)

Rapport thématique sur l'anguille. Groupe National Anguille, 218p (Min Agriculture, Environnement, Recherche).

Aoki Y (2001)

Polychlorinated Biphenyls, Polychlorinated Dibenzop-dioxins, and Polychlorinated Dibenzofurans as Endocrine Disrupters-What We Have Learned from Yusho Disease. *Environmental Research*, 86, 2-11.

Ashley JTF, Horwitz R, Steinbacher J C, Ruppel B (2003)

Comparison of congeneric PCB patterns in American eels and striped bass from the Hudson and Delaware River estuaries. *Marine Pollution Bulletin*, 46, 1294-1308.

Bahn A, Bialik O, Oler J, Houten L, Landau E (1980)

Health assessment of occupational exposure to polybrominated biphenyls (PB) and polybrominated biphenyloxide (PBBO). Report ISS 560/6-80-001, Office of pesticides and toxic substances, US EPA, Washington, D.C. (NTIS n° PB81-159675).

Ballschmitter K, Zell M (1980)

Analysis of polychlorinated biphenyls (PCB) by glass capillary gas chromatography. Composition of technical Aroclor and Clophen PCB mixtures. *Fresenius Zeitschrift für Analytische Chemie*. 302, 20-31.

Bargar TA, Scott GI, Cobb GP (2001)

Maternal transfer of contaminants: case study of the excretion of three polychlorinated biphenyl congeners and technical-grade endosulfan into eggs by white leghorn chickens (*Gallus domesticus*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20, 61-67.

Bernes C (1998)

Persistent organic pollutants. Monitor 16. Swedish Environmental Protection Agency, 152pp.

Bodin N (2005)

Contamination des crustacés décapodes par les composés organohalogénés. Etude détaillée de la bioaccumulation des PCB chez l'araignée de mer *Maja brachydactyla*. Thèse de doctorat, Université de Bretagne Occidentale, Brest, France, 327pp.

Boon J P, Everaarts JM, Hillebrand MTJ, Eggens ML, Pijnenburg J, Goksøyr A (1992)
Changes in levels of hepatic biotransformation enzymes and haemoglobin levels in female plaice (*Pleuronectes platessa*) after oral administration of a technical polychlorinated biphenyl mixture (Clophen A40). *The Science of The Total Environment*, 114, 113-133.

Borga K, Gabrielsen GW, Shaare JU (2001)
Bioaccumulation of organochlorines along Barents Sea food chain. *Environmental pollution*, 113, 187-198.

Borga K, Fisk AT, Hargrave B, Hoekstra PF, Swackhamer D, Muir DCG (2005)
Bioaccumulation Factors for PCBs Revisited. *Environmental Science and Technology*, 39, 4523-4532.

Borja J, Taleon DM, Aurasenia J, Gallardo S, (2005)
Polychlorinated biphenyls and their biodegradation. *Process biochemistry*, 40, 1999-2013.

Bragigand V (2005)
Recherches écotoxicologiques sur les retardateurs de flamme bromés dans les écosystèmes estuariens (Estuaires de Loire et de Seine). Thèse de doctorat, Faculté de Pharmacie, Nantes, France, 250 pp.

Braune B, Muir D, DeMarch B, Gamberg M, Poole K, Currie R, Dodd M, Duschenko W, Eamer J, Elkin B (1999)
Spatial and temporal trends of contaminants in Canadian Arctic freshwater and terrestrial ecosystems: a review. *The Science of the Total Environment*, 230, 145-207.

Braune BM, Outridge PM, Fisk AT, Muir DCG, Helm PA, Hobbs K, Hoekstra PF, Kuzyk ZA, Kwan M, Letcher RJ (2005)
Persistent organic pollutants and mercury in marine biota of the Canadian Arctic: An overview of spatial and temporal trends. *Science of the Total Environment*, 351, 4-56.

Buckman AH, Brown SB, Hoekstra PF, Solomon KR, Fisk AT (2004)
Toxicokinetics of three polychlorinated biphenyl technical mixture in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23, 1725-1736.

Buckman AH, Wong CS, Chow EA, Brown SB, Solomon KR, Fisk AT (2006)
Biotransformation of polychlorinated biphenyls (PCBs) and bioformation of hydroxylated PCBs in fish. *Aquatic Toxicology*, 78, 176-185.

Burreau S, Bromana D, Orn U (2000)
Tissue distribution of 2; 20; 4; 40-tetrabromo[14C]diphenyl ether ([14C]-PBDE 47) in pike (*Esox lucius*) after dietary exposure ± a time series study using whole body autoradiography. *Chemosphere*, 40, 977-985.

Burreau S, Zebuhr Y, Broman D, Ishaq R (2004)
Biomagnification of polychlorinated biphenyls (PCBs) and polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) studied in pike (*Esox lucius*), perch (*Perca fluviatilis*) and roach (*Rutilus rutilus*) from the Baltic Sea. *Chemosphere*, 55, 1043-1052.

Burreau S, Zebühr Y, Broman D, Ishaq R (2006)
Biomagnification of PBDEs and PCBs in food webs from the Baltic Sea and the northern Atlantic Ocean. *Science of The Total Environment*, 366, 659-672.

Cachot J, Geffard O, Augagneur S, Lacroix S, Le Menach K, Peluhet L, Couteau J, Denier X, Devier MH, Pottier D, Budzinski H (2006)

Evidence of genotoxicity related to high PAH content of sediments in the upper part of the Seine estuary (Normandy, France). *Aquatic Toxicology*, 79, 257-267.

Cailleaud, K (2006)

La qualité de l'eau en Estuaire de Seine. Analyse pluridisciplinaire de la contamination organique via l'utilisation du modèle animal, *Eurytemora affinis*: Etude in situ et expérimentale. Thèse de doctorat, Université Bordeaux 1, Talence, France.

Carté B, Faulkner J (1981)

Polybrominated diphenyl ethers from *Dysidea chlorea* and *Phyllospongia foliascens*. *Tetrahedron*, 37, 2335-2239.

Cravedi M, Narbonne JF (2002)

Données récentes sur l'évaluation des dangers liés à la présence de PCB dans l'alimentation. Rapport AFSSA, 52pp.

Danis B, Cotret O, Teyssié JL, Bustamante P, Fowler SW, Warnau M (2005)

Bioaccumulation of PCBs in the sea urchin *Paracentrotus lividus*: seawater and food exposures to a ¹⁴C-radiolabelled congener (PCB#153). *Environmental Pollution*, 135, 11-16.

Darnerud PO (2003)

Toxic effects of brominated flame retardants in man and wildlife. *Environment International*, 29, 841-853.

Daverat F, Elie P, Lahaye M (2004)

Microchemistry contribution to a first approach to a diversity of life histories of eel from the lower part of the Gironde Garonne Dordogne watershed. *Cybiurn*, 28, 83-90.

David V, Sautour B, Chardy P, Leconte M (2005)

Long-term changes of the zooplankton variability in a turbid environment: The Gironde estuary (France). *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 64, 171-184.

David V, Chardy P, Sautour B (2006 a)

Fitting a predator-prey model to zooplankton time-series data in the Gironde estuary (France): Ecological significance of the parameters. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 67, 605-617.

David V, Sautour B, Galois R, Chardy P (2006 b)

The paradox high zooplankton biomass-low vegetal particulate organic matter in high turbidity zones: What way for energy transfer. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 333, 202-218.

David V (2006 c)

Dynamique spatio-temporelle du zooplancton dans l'estuaire de la Gironde et implications au sein du réseau trophique planctonique. Thèse de doctorat, Université Bordeaux 1, Talence, France 267 pp.

De Boer J, Wester PG, Rodriguez DP, Lewis WE, Boon JP (1998)

Polybrominated biphenyls and diphenyl ethers in sperm whales and other marine mammals-a new threat to ocean life?. *Organohalogenen Compounds*, 35, 383-386.

De Boer J, de Boer K, Boon JP (2000)

Polybrominated biphenyls and diphenylethers. *New Types of Persistent Halogenated Compounds*, 3, 61-95.

Dekker W (2003)

Eel stocks dangerously close to collapse. ICES newsletter, 40.

De Voogt P, Wells DE, Reutergårdh L, Brinkman UATH (1993)

Biological activity, determination and occurrence of planar, mono- and di-ortho PCBs. Dans "Environmental analytical Chemistry of PCBs", édité par J. Albaigés, Gordon and Breach Sciences Publishers, 151-196.

De Wit CA (2002)

An overview of brominated flame retardants in the environment. Chemosphere, 46, 583-624.

Durif C, Elie P (2004)

Morphological discrimination of the silvering stages of the European eel. In (Casselman, J. & Cairns, D., eds). Bethesda, Maryland: American Fisheries Society Symposium.

Durif C, Dufour S, Elie P (2005)

The silvering process of the European eel: a new classification from the yellow resident stage to the silver migrating stage. Journal of fish Biology, 66, 1025-1043.

Edeline E, Dufour S, Briand C, Fatin D, Elie P (2004)

Thyroid status related to migratory behavior in *Anguilla anguilla* glass eels. Marine Ecology Progress Series, 282, 261-270.

Elie P (2001)

La vie de l'anguille. La Lettre de Sea-River N° 12.

Erickson MD (1997)

Analytical Chemistry of PCBs second edition, chez Lewis CRC press New York 667pp. 1997.

Eriksson P, Viberg H, Jakobsson E, Orn U, Fredriksson A (1999)

PBDE 2,2',4,4',5,5' pentabromodiphenyl ether, causes permanent neurotoxic effects during a defined period of neonatal brain development. Organohalogen Compounds, 40, 333-336.

Eriksson J, Green N, Marsh G, Bergman A (2004)

Photochemical Decomposition of 15 Polybrominated Diphenyl Ether Congeners in Methanol/Water. Environmental science and technology, 38, 3119-3125.

Evans K, Hindell M, Hince G (2004)

Concentrations of organochlorines in sperm whales (*Physeter macrocephalus*) from Southern Australian. Marine Pollution Bulletin, 48, 486-503.

Ferreira M, Antunes P, Gil O, Vale C, Reis-Henriques MA (2004)

Organochlorine contaminants in flounder (*Platichthys flesus*) and mullet (*Mugil cephalus*) from Douro estuary, and their use as sentinel species for environmental monitoring. Aquatic Toxicology, 69, 347-357.

Fisk AT, Hoekstra PF, Borgå K, Muir DCG (2003)

Correspondence. Marine Pollution Bulletin, 46, 522-524.

Focant JF, Pirard C, Douny C, Scippo ML, De Pauw E, Maghuin-Rogister G (2002)

Le point, trois ans après, sur « la crise belge de la dioxine » Impact probable sur la santé de la population belge. Annale de Médecine Vétérinaire, 146, 321-327.

Fonds M, Casal E, Schweizer D, Boon JP, Van der Veer HW (1995)

Effects of PCB contamination on the reproduction of the dab *limanda limanda* l. under laboratory conditions. Netherlands journal of sea research, 34, 71-79.

Furue M, Uenotsuchi T, Urabe K, Ishikawa T, Kuwabara M (2005)

Overview of Yusho. Journal of Dermatological Science Supplement, 1, 3-10.

Focant JF, Pirard C, Douny C, Scippo ML, De Pauw E, Maghuin-Rogister G (2002)

Le point, trois ans après, sur « la crise belge de la dioxine » Impact probable sur la santé de la population belge. Annale de Médecine Vétérinaire, 146, 321-327.

Goerke H, Weber K (2001)

Species-specific elimination of polychlorinated biphenyls in estuarine animals and its impact on residue patterns. Marine Environmental research, 51, 131-149.

Goksøyr A, Förlin L (1992)

The cytochrome P-450 system in fish, aquatic toxicology and environmental monitoring. Aquatic toxicology, 22, 287-311.

Gray JS (2002)

Biomagnification in marine systems: the perspective of an ecologist. Marine Pollution Bulletin, 45, 46-52.

Greenpeace Technical Note 12/2005/October 2005

Santillo D, Johnston P, Labunska I, Brigden K (2005)

Swimming in chemicals, widespread presence of Brominated flame retardants and PCB in eels from rivers and lakes in European countries.

Gustafsson K, Björk M, Burreau S, Gilek M (1999)

Bioaccumulation Kinetics of brominated flame retardants (Polybrominated diphenyl ethers) in blue mussels (*Mytilus edulis*). Environmental Toxicology and Chemistry, 18, 1218-1224.

Hakk H, Letcher R J (2003)

Metabolism in the toxicokinetics and fate of brominated flame retardants. Environment International, 29, 801-828.

Handayani D, Edrada RA, Proksch P, Wray V, Witte L, Van Soest RWM, Kunzmann A, Soedarsono R (1997)

Four new bioactive polybrominated diphenyl ethers of the sponge *Dysidea herbacea* from West Sumatra, Indonésia. Journal of natural product, 60, 1313-1316.

Hoff RM, Strachan WM, Sweet CW, Chan CH, Shackleton M, Bidleman TF, Brice KA, Burniston DA, Cussion S, Gatz DF *et al.* (1996)

Atmospheric deposition of toxic chemicals to the Great Lakes: A review of data through 1994. Atmospheric Environment, 30, 3505-3527.

Holm G, Norrgren L, Andersson T, Thuren A (1993)

Effects of exposure to food contamination with PBDE, PCN or PCB on reproduction, liver morphology and cytochrome P450 activity in the three-spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus*. Aquatic Toxicology, 7, 33-50.

Holmqvist N, Stenroth P, Berglund O, Nystrom P, Olsson, Jellyman D, McIntosh AR, Larsson P (2006)

Low level of persistent organic pollutants (POPs) in New zeland eels reflect isolation from atmospheric sources. Environmental pollution, 141, 532-538.

Horsberg E, Martinsen B, Varma K (2004)

The disposition of 14 C-florfenicol in Atlantic salmon (*Salmo salar*). Aquaculture, 122, 97-106.

Hua I, Kang N, Jafvart CT, Fabrega-Duque JR (2003)

Heterogenous photochemical reactions of decabromodiphenyl ether. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 22, 798-804.

Iwasaki T, Miyazaki W, Takeshita A, Kuroda Y, Koibuchi N (2002)

Polychlorinated biphenyls suppress thyroid hormone-induced transactivation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 299, 384-388.

Jensen S (1966)

Report of a new chemical hazard. *New Scientist*, 32, 612.

Jensen S, Johnels A, Olsson M, Otterlind G (1969)

DDT and PCB in marine animals from Swedish waters. *Nature*, 224, 247.

Johansson I, Moisan K, Guiot N, Truquet I, Munsch C, Tronczynski J (2004)

Levels and trends of organohalogen compounds in mussels from the Seine estuary in 1981-2003. *Organohalogen Compounds*, 66, 1844-1852.

Johansson I, Héas-Moisan K, Guiot N, Munsch C, Tronczyński J (2006)

Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in mussels from selected French coastal sites: 1981–2003. *Chemosphere*, 64, 296-305.

Kajiwara N, Kannan K, Muraoka M, Watanabe M, Takahashi S, Gulland F, Olsen H, Giesy JP (2001)

Organochlorine pesticides, polychlorinated biphenyls, and butyltin compounds in blubber and livers of stranded California sea lions, elephant seals, and harbor seals from coastal California, USA. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 41, 90-99.

Kannan N, Tanabe S, Tatsukawa R (1988)

Toxic potential of non-ortho and mono-ortho coplanar PCBs in commercial PCB preparations: "2,3,7,8-T4CDD toxicity equivalences factors approach". *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 41, 267-276.

Kannan N, Reusch TBH, Schulz-Bull DE, Petrick G, Duinker JC (1995)

Chlorobiphenyls: Model compounds for metabolism in food chain organisms and their potential use as ecotoxicological stress indicators by application of the metabolic slope concept. *Environmental Science and Technology*, 29, 1851-1859.

Khan MAQ, Coello W, Khan AA, Pinto H (1972)

Some characteristics of the microsomal mixedfunction oxidase in the freshwater crayfish. *Cambarus*. *Life Science*, 11, 405-415.

Kierkegaard A, Bignert A, Sellström U, Olsson M, Asplund L, Jansson B, de Wit CA (2004)

Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and their methoxylated derivatives in pike from Swedish waters with emphasis on temporal trends, 1967–2000. *Environmental Pollution*, 130, 187-198.

Korhonen M, Mannio J, Vartiainen T, Porvari P (1997)

Concentrations of selected PCB congeners in pike (*Esox lucius*, L.) and arctic char (*Salvelinus alpinus*, L.) in Finland. *Chemosphere*, 34, 1255-1262.

Larsen B, Bowadt S, Tilio R (1993)

Congener specific analysis of 140 chlorobiphenyls in technical mixtures on five narrow-bore GC columns. Dans "Environment Analytical Chemistry of PCBs" Édité par J. Albaigés, Gordon and Breach Sciences Publishers, 3-24.

Lang V. (1992)

Review: Polychlorinated biphenyls in the environment. *J. Chromatogr.*, 595, 1-43.

Law RJ, Alae M, Allchin CR, Boon JP, Lebeuf M, Lepom P, Stern GA (2003)

Levels and trends of polybrominated diphenylethers and other brominated flame retardants in wildlife. *Environment International*, 29, 757-770.

Law RJ, Allchin CR, de Boer J, Covaci A, Herzke D, Lepom P, Morris S, Tronczynski J, de Wit CA (2006)

Levels and trends of brominated flame retardants in the European environment. *Chemosphere*, 64, 187-208.

Legler J, Brouwer A, (2003)

Are brominated flame retardant endocrine disruptor?. *Environment International*, 29, 879-885.

Livingstone DR (1989)

Cytochrome P-450 and oxidative metabolism in molluscs. *Xenobiotica*, 1041-1062.

Lobry J, Mourand L, Rochard E, Elie P (2003)

Structure of fish assemblages: a comparison of European estuaries perspectives. *Aquatic living resources*, 16, 47-58.

Loizeau V, Abarnou A, Cugier P, Jaouen-Madoulet A, Le Guellec AM, Menesguen A (2001)

A model of PCB Bioaccumulation in the Sea Bass food web from the seine estuary (Eastern English Channel). *Marine pollution Bulletin*, 43, 242-255.

Mackay D (1980)

Solubility, partition coefficients, volatility and evaporation rates. *The handbook of environmental chemistry* Vol. 2, Section A, Reaction and Processes Ed O.hutzinger, Springer Verlag 31-45.

Mackay D, Fraser A (2000)

Bioaccumulation of persistent organic chemicals: mechanisms and models. *Environmental Pollution*, 110, 375-391.

Masuda Y, Schechter A, Pöpke O (1998)

Concentrations of PCBs, PCDFs and PCDDs in the blood of Yusho patients and their toxic equivalent contribution. *Chemosphere*, 37, 1773-1780.

Mazeas O (2004)

Evaluation de l'exposition des organismes aux hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) dans le milieu marin par le dosage des métabolites de HAP. Thèse de doctorat, Université Bordeaux 1, Talence, France, 456 pp.

Mc Donald SJ, Kennicutt MC, Liu H, Safe SH (1995)

Assessing aromatic hydrocarbon (PAH) exposure in antarctic fish captured near Palmer and Mc Murdo stations, Antartica. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 29, 232-240.

Mc Kinney JD, Waller CL (1994)

Polychlorinated Biphenyls as Hormonally active Structural analogues. *Environmental Health Perspectives*, 102, 290-297.

Mhiri C, Tandeau de Marsac N (1997)

Réhabilitation par les microorganismes de sites contenant du pyralène : problématique et perspectives d'étude. Bulletin de l'Institut Pasteur, 95, 3-28.

Monosson M, Stegeman J.J. (1991)

Cytochrome P450E (P450IA) induction and inhibition in winter flounder by 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl : Comparison of response in fish from Georges Bank and Narragansett Bay. Environmental Toxicology and Chemistry, 10, 765-774.

Muir D, Savinova T, Savinov V, Alexeeva L, Potelov V, Svetochev V (2003)

Bioaccumulation of PCBs and chlorinated pesticides in seals, fishes and invertebrates from the White Sea, Russia. The Science of the Total Environment, 306, 111-131.

Navas JM, Segner H (1998)

Antiestrogenic activity of anthropogenic and natural chemicals. Environmental Science and Pollution Research, 5, 75-82.

Nelson DR (1999)

Cytochrome P450 and the individuality of species. Archive of Biochemistry and Biophysics, 369, 1-10.

Newsted JL, (2003)

Effect of light, temperature, and pH on the accumulation of phenol by *Selenastrum capricornutum*, a green alga. Ecotoxicology and Environmental Safety, 59, 237-243.

Norstrom RJ, Letcher RJ (1996)

Role of biotransformation in bioconcentration and bioaccumulation. Annex I in Biotransformation in environmental risk assesment. a SETAC Workshop Noordwijkerhout, the Nederlands. Sijm, De Bruijn, De voogt et De wolf (eds). 28 April-May 1996.

OCDE (1973)

Décision recommandation du conseil concernant la protection de l'environnement par un contrôle des diphényles, C (73) 1/ Final.

OCDE (1987)

Décision recommandation du conseil concernant de nouvelles mesures de protection de l'environnement par un contrôle des diphényles polychlorés, C (87) 2/Final.

Pascaud S (2006)

Les Relations trophique : Elements de structuration des peuplements ichtyologiques en milieu estuarien. Application à l'estuaire de la Gironde. Thèse de doctorat, Université Bordeaux1, Talence, France, 361pp.

Pierard C (1995)

Détermination des composés polychlorobiphenyles dans l'environnement sédimentaire marin et estuarien. Thèse de doctorat, Université Bordeaux 1, Talence, France, 226pp.

Pompa G, Caloni F, Fracchiolla ML (2003)

Dioxin and PCB contamination of fish and shellfish: assesment of human exposure. Review of the international situation. Veterinary Research Communications, 27, 159-167.

Quintin J.Y. (coord.) et al., 2004

Surveillance écologique du site du Blayais, année 2003. Rapp. IFREMER RST DYNECO/VIGIES/04, mars 2004, 220 p.

Quintin J.Y. (coord.) et al., (2005)

Surveillance écologique du site du Blayais, année 2004. Rapp. IFREMER RST DYNECO/VIGIES/05, mars 2005, 214 p.

Rahman F, Langford HK, Scrimshaw MD, Lester JN (2001)

Polybrominated diphenyl ether (PBDE) flame retardants. *The Science of the Total Environment*, 275, 1-17.

Riget F, Dietz R, Vorkamp K, Johansen P, Muir D (2004)

Levels and spatial and temporal trends of contaminants in Greenland biota: an updated. *Science of the Total Environment*, 331, 29-52.

Robinet T., Feunten E. (2002)

Sublethal effects of exposure to chemical compounds: a cause for the decline in Atlantic eels? *Ecotoxicology*, 11, 265-277.

Roche H, Buet A, Ramade F (2002)

Relationships between persistent organic chemicals residues and biochemical constituents in fish from a protected area: the French National Nature Reserve of Camargue. *Comparative biochemistry and physiology part C. Toxicology and pharmacology*, 133, 393-410.

Roche H, Buet A, Jonot O, Ramade F (2000)

Organochlorine residues in European eel (*Anguilla anguilla*) crucian carp (*Carassius*) and catfish (*Ictalurus nebulosus*) from Vaccarès lagoon (French Nature reserve of Camargue) - effects on some physiological parameters. *Aquatic toxicology*, 48, 443-459.

Rodriguez-Grau J, Venables BJ, Fitzpatrick LC, Goven LC, Goven AJ, Cooper EL (1989)

Suppression of secretory rosette formation by PCBs in *Lumbricus terrestris*: an earthworm assay for tumoral immunotoxicity of xenobiotics. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 8, 1201-1207.

Romana LA (1994)

Les grands estuaires français. *Equinoxe*, 47-48.

Roos A, Greyerz E, Olsson M, Sandegren F (2001)

The otter (*Lutra lutra*) in Sweden: population trends in relation to Σ DDT and total PCB concentrations during 1968–99. *Environmental Pollution*, 111, 457-469.

Ross G. (2004)

The public health implications of polychlorinated biphenyls (PCBs) in the environment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 59, 275-291.

Safe SH (2001)

The Handbook of Environmental Chemistry Vol.3 Part L, Endocrine Disruptor Part 1 Chap 8 Springer 2001.

Sager D, Girard D, Nelson D (1991)

Early postnatal exposure to PCBs: Sperm function in rats. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 10, 737-746.

Sautour B, Castel J (1995)

Comparative spring distribution of zooplankton in three macrotidal European estuaries. *Hydrobiologia*, 311, 139-151.

Sawyer T, Safe S (1982)

PCB isomers and congeners: Induction of aryl hydrocarbon hydroxylase and ethoxyresorufin-O-deethylase enzyme activities in rat hepatoma cells. *Toxicology Letters*, 13, 87-94.

Schantz SL (1998)

Developmental exposure to polychlorinated biphenyls impairs learning and memory in primates and rodents. *Neurotoxicology and Teratology*, 20, 349-356.

Schulz DE, Petrick G, Duinker JC (1989)

Complete characterization of polychlorinated biphenyl congeners in commercial Aroclor and Clophen mixtures by multidimensional gas chromatography-electron capture detection. *Environmental Science and Technology*, 23, 852-859.

Sharma R, Kodavanti PRS (2002)

In Vitro Effects of Polychlorinated Biphenyls and Hydroxy Metabolites on Nitric Oxide Synthases in Rat Brain. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 178, 127-136.

Shaw SD, Brenner D, Bourakovsky A, Mahaffey CA, Perkins CR (2005)

Polychlorinated biphenyls and chlorinated pesticides in harbor seals (*Phoca vitulina concolor*) from the northwestern Atlantic coast. *Marine Pollution Bulletin*, 50, 1069-1084.

Sijm D (1995)

Algal density dependant bioconcentration factors of hydrophobic chemicals. *Chemosphere*, 31, 4001-4012.

Sjödin A, Patterson DG, Bergman Å (2003)

A review on human exposure to brominated flame retardants-particularly polybrominated diphenyl ethers. *Environment International*, 29, 829-839.

Solé M, Livingstone DR (2005)

Components of the cytochrome P450-dependent monooxygenase system and 'NADPH-independent benzo[a]pyrene hydroxylase' activity in a wide range of marine invertebrate species. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C. Toxicology & Pharmacology*, 141, 20-31.

Sorbe JC (1979)

Systématique et écologie des amphipodes gammaridés de l'estuaire de la Gironde. *Cahiers de biologie marine*, 1979, 43-58.

Soriano J, Viñasa L, Franco M, González JJ, Ortíz L, Bayona JM, Albaigés J

Spatial and temporal trends of petroleum hydrocarbons in wild mussels from the Galician coast (NW Spain) affected by the Prestige oil spill. *Science of the Total Environment*, 370, 80-90.

Sottolichio A, Castaing P (1999)

A synthesis on seasonal dynamics of highly-concentrated structures in the Gironde estuary. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences. Earth and Planetary Science*, 329, 795-800.

Stapleton H, Letcher RJ, Li J, Baker JE (2004)

Dietary accumulation and metabolism of polybrominated diphenyl ethers by juvenile carp (*Cyprinus carpio*). *Environmental toxicology and chemistry*, 23, 1939-1946.

Stegeman JJ, Livingstone DR (1998)

Comparative Biochemistry and Physiology, part C, 121, 1-412.

Storelli MM, Marcotrigiano GO (2003)

Levels and congener pattern of polychlorinated biphenyls in the blubber of the Mediterranean bottlenose dolphins *Tursiops truncatus*. *Environment International*, 28, 559-565.

Tanabe S, Tatsukawa R (1986)

Distribution, behaviour and load of PCBs in the oceans. J.S. Waid (ed). PCBs and the environment Vol.1. CRC Press Boca Raton, Florida, pp. 143-161.

Tillit DE, Ankley GT, Giesy JP, Ludwig JP, Kurita-Matsuba H, Vaughn Weseloh D, Ross PS, Bishop CA, Sileo L, Stromborg KL, Larson J, Kubiak TJ (1992)

Polychlorinated biphenyl residues and egg mortality in double-crested cormorants from the Great Lakes. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 11, 1281-1288.

Tomy G, Palace VP, Halldorson T, Braekevelt E, Danell R, Wautier K, Evans B, Brinkworth L, Fisk A T (2004)

Bioaccumulation, Biotransformation and biochemical effects of brominated diphenyls ether in juvenile lake trout (*Salvelinus namaycush*). *Environmental Science and Technology*, 38, 1496-1504.

Tran D, Fournier E, Durrieu G, Massabuau JC (2003)

Copper detection in the asiatic clam *Corbicula fluminea*: optimum valve closure response. *Aquatic Toxicology*, 65, 317-327.

Tranchant J (1995)

Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse, 4^{ème} édition, chez Masson, 700pp.

Uenotsuchi T, Nakayama J, Asahi M, Kohro O, Akimoto T, Muto M, Shimizu K, Katayama I, Kanzaki T, Kanagawa Y (2005)

Dermatological manifestations in Yusho: correlation between skin symptoms and blood levels of dioxins, such as polychlorinated dibenzofurans (PCDFs) and polychlorinated biphenyls (PCBs). *Journal of Dermatological Science Supplement*, 1, 73-80.

Umeda G, Nakajima H, Yatsuki K (1978)

Some problems on health effects of polychlorinated biphenyls. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 1, 437-446.

Van der Oost R, Opperhuizen A, Satumalay K, Heida H, Vermeulen NPE (1996)

Biomonitoring aquatic pollution with feral eel (*Anguilla anguilla*) Bioaccumulation: Biota/sediment ratios of PCBs, OCPs, PCDDs and PCDFs. *Aquatic toxicology*, 35, 21-46.

Van der Oost R, Beyer J, Vermeulen NPE (2003)

Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 13, 57-149.

Verreault J, Villa RA, Gabrielsen GW, Skaare JU, Letcher RJ (2006)

Maternal transfer of organohalogen contaminants and metabolites to eggs of arctic-breeding glaucous gulls. *Environmental pollution*, 144, 1053-1060.

Ville P, Roch P, Cooper EL, Masson P, Narbonne JF (1995)

PCBs increase molecular-related activities (lysozyme, antibacterial, hemolysis, proteases) but inhibit macrophage-related functions (phagocytosis, wound healing) in earthworms. *Journal of Invertebrate Pathology*, 65, 217-224.

Walberg P, Bergqvist PA, Andersson A (1997)

Potential importance of protozoan grazing on the accumulation of polychlorinated biphenyls (PCBs) in the pelagic food web. *Hydrobiologia*, 357, 53-62.

Wang JS (1998)

Accumulation and depuration of aqueous and dietary PCB (Aroclor 1254) by striped bass. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 60, 104-111.

Wania F, Mackay D (1993)

Global fractionation and cold condensation of low volatility organochlorine compounds in polar regions. *Ambio* 22, 10-18.

Watanabe I, Tatsukawa R (1989)

Anthropogenic brominated aromatics in the Japanese environment. *Proceedings, Workshop on Brominated Aromatic Flame Retardants*, Swedish National Chemicals Inspectorate, pp. 63-71. Solna, Sweden, 24-26 October 1989

Watanabe I, Sakai SI (2003)

Environmental release and behaviour of brominated flame retardants. *Environment International*, 29, 665-682.

Wolska L, Zygmunt B, Namienik J (2003)

Organic pollutants in the Odra river ecosystem. *Chemosphere*, 53, 561-569.

Yang CY, Yu ML, Guo HR, Lai TJ, Hsu CC, Lambert G, Guo YL (2005)

The endocrine and reproductive function of the female Yucheng adolescents prenatally exposed to PCBs/PCDFs. *Chemosphere*, 61, 355-360.

Zhu LY, Hites RA (2003)

Determination of Polybrominated Diphenyl Ethers in Environmental Standard Reference Materials. *Analytical chemistry*, 75, 6696-6700.

Annexes

Annexe 1

Fast and efficient extraction methods for the analysis of persistent organohalogenated pollutants in biological matrices

N. Tapie, H. Budzinski* and K. Le Ménach.

Laboratoire de Physico-Toxico Chimie des systèmes naturels (UMR 5472 CNRS),
Université Bordeaux 1, 341 cours de la Libération 33405 Talence, France.

* Corresponding author: h.budzinski@lptc.u-bordeaux1.fr

Abstract

This paper describes and validates fast and simple extraction methods for the determination of Persistent Organohalogenated Pollutants (POPs) such as PolyChlorinated Biphenyls (PCBs) and PolyBrominated Diphenyl-Ethers (PBDEs) in biological matrices. Two extraction techniques were compared: Microwave Assisted Extraction (MAE) and Accelerated Solvent Extraction (ASE). Four protocols were tested and final analyses were performed by GC/ECD. The first protocol consists in a microwave extraction coupled with two steps of purification. The second one was similar to the first one, but ASE replaced MAE. The third protocol coupled extraction/purification by ASE combined with final purification on an silica gel column. The last protocol was an extraction by MAE combined with purification on an acidic silica gel column. The protocols were tested on different matrices: spiked matrix, certified matrix (SRM 2977, WMF 01) and natural matrices (Crustacean and Fish). All the protocols showed good performance in terms of recovery and reproducibility. Moreover the two last protocols showed promising results in terms of applicability to natural matrices as they required a minimum of sample handling, and a minimum of solvent and time. They allowed handling at least 24 samples per day and could be easily used for routine analysis.

Keywords: Accelerated Solvent Extraction, Microwave assisted extraction, PCB, PBDE.

Introduction

Persistent organohalogenated pollutants (POPs) such as PolyChlorinated Biphenyls (PCBs) and PolyBrominated Diphenyl Ethers (PBDEs) are known as ubiquitous environmental contaminants. Great efforts have been made to find the major sources and introduction pathways of these compounds in the environment, and to determine their levels in biotic and abiotic compartments. Due to matrix complexity, several steps of pre-treatment for natural samples are mandatory: extraction, purification and identification/quantification.

Several techniques have been used to extract these compounds. Soxhlet extraction was the traditional method used for extraction of POPs [1], but this method usually requires large amounts of solvent as well as a lot of time to be efficient. A mandatory step for Soxhlet extraction is automation. In this respect the commercial equipment called Soxtec System is the more widespread device in the field of automated Soxhlet as it performs extraction with similar precision as conventional Soxhlet, but with a significant saving of time. This method was invented in the early 70's and commercialized in 1982 [2]. Another alternative to Soxhlet is ultra-sound extraction also called "sonication", that has been applied for the extraction of organic compounds from various matrices [2] [3] [4]. Soxhlet extraction and sonication are very general and not so specific and they require purification steps before analysis [5].

Therefore, there were replaced by modern extraction techniques, less time and solvent consuming. The first of these new techniques appeared almost 20 years ago in the form of supercritical fluid extraction (SFE) [6] [7]. More recently two other new techniques have been introduced: microwave-assisted extraction (MAE), and accelerated solvent extraction (ASE).

Microwaves allow materials to read rapidly at high temperatures [8], however microwave ovens appeared only recently in analytical laboratories. Current applications of microwave extraction for pollutants started in the middle 90's [9]. MAE speeds up extraction by using microwaves to heat solvent mixed with the sample in order to extract analytes from the matrix into the solvent. However it is necessary to purify the extract before analysis [10].

On the other hand, ASE also known as pressurized fluid extraction (PFE) or pressurized liquid extraction (PLE) is the most recent solid sample extraction method [11] [12] [13] [14]. ASE accelerates the traditional extraction process by using solvent at high temperatures. Pressurization is applied to the sample extraction cell to maintain the heated solvent in a liquid state during the extraction. After heating, the extract is flushed from the sample cell into a vial for further analytical steps. The major advantage of this technique is the ability to combine extraction and clean up [15] [16] [17] [18] [19].

Both ASE and MAE have become the most widely used extraction techniques for environmental solid samples [5] [20].

The present work compares classical approaches coupling Microwave Assisted Extraction (MAE) and post-purification (using sulphuric acid and liquid chromatography on silica) [10] [21] with a combined procedure using pre-purification and Assisted Solvent Extraction (ASE).

Two types of contaminants (PCBs and PBDEs) have been analysed in different matrices: a spiked sample of trout muscle (*Oncorhynchus mykiss*), a certified matrix (SRM 2977 (mussel tissues, *Perna perna*, from Guanabara Bay, Brazil) provided by the NIST (Gaithersburg, MD, USA), and two natural samples [a pool of small crustaceans (*Neomysis integer* and *Mesopodopsis slabberi*) and a pool of muscle of eel (*Anguilla anguilla*)].

2. Experimental

2.1. Chemicals

The pestinorm dichloromethane was purchased from Accros Organics (Noisy le Grand, France). Pentane was obtained from Atlantic Labo (Bruges, France), sulphuric acid Sharlau (95-98% extra pure) and iso-octane Sharlau were purchased from ICS (Gradignan, France).

The silica gel (0.063-0.2 mm, Merck) was purchased from VWR international (Strasbourg, France). Silica was cleaned with dichloromethane before acid silica gel preparation. The acid silica gel was prepared by mixing 600 g of silica gel and 400 g of sulphuric acid over night at 200°C [16]. Sodium sulphate was obtained from Sigma Aldrich (Saint Quentin fallavier, France, purity 99%). The ultra pure water was purified by elution through a cartridge Elix[®]/Rios[™] system (Millipore, Saint Quentin en Yveline, France).

The standard reference material SRM 2962 (chlorinated biphenyl congeners in 2,2,4, trimethylpentane) was provided by the National Institute of Standards and Technology (NIST, Gaithersburg, MD, USA). Individual solutions of PBDE (BDE 47, BDE 99, BDE 119, BDE 153) were purchased from Cambridge Isotope Laboratories (CIL USA, purity 99%). SRM 2962 and individual solutions of PBDE were used for calibration. CB 30, CB 130, CB 155, 198 were used as internal standards. CB 30, CB103, CB 155, CB 198 were delivered as neat crystals by Promochem (Molsheim, France, Purity 99 %). Octachloronaphthalene (OCN) was used as syringe standard and purchased from Ultra scientific (North Kingstown, USA, Purity 95%).

2.2. Sample material

To study matrix effect, three types of matrix were analysed: first, a natural matrix (trout muscle) spiked with standard solutions (SRM 2262, individual solutions of PBDE); secondly two certified matrices, SRM 2977 provided by the NIST (Gaithersburg, MD, USA) and WMF 1 provided by Wellington Laboratories (Irgny, France) and thirdly two natural matrices, muscle of eels and a pool of mysids. All matrices were freeze-dried and grounded before extraction procedure.

The spiked matrix (muscle of trout) was spiked with a mixture of PCB congeners (SRM 2262) and with individual solutions of PBDE. In detail, 7 seven prior PCBs were studied (CB 28, CB 52, CB 101, CB 118, CB 138, CB 153, CB 180) and five PBDEs (BDE 47, BDE 99, BDE 119, BDE 153, BDE 190) were studied. 0.5 g of homogenised freeze dried matrix were spiked with 50 µl of a solution of SRM 2262 diluted by 10, and 20 µl of each individual solution of PBDE ($\approx 700 \text{ ng.g}^{-1}$) in order to obtain nominal concentrations of approximately 10 ng.g^{-1} .

In order to validate extraction procedures, two certified matrices were tested. The SRM 2977 (mussel tissues, *Perna perna*, from Guanabara Bay, Brazil), is certified for PCB concentrations but not for PBDE. Reference values for BDE were obtained from Zhu and Hites (2003). WMF 01 (fish tissue) is certified for PBDE concentration, but not for the 7 prior PCBs.

Two natural matrices were finally used to test extraction procedures in the case of natural samples from variable amounts of lipids. On the one hand, a pool of mysids (about 7% of lipids taking into account the dry weight), caught in the Gironde estuary (south west coast of France) was analysed, and on the other hand muscle of eels (*Anguilla anguilla*) caught in the Gironde Estuary was also tested as a high fat container matrix (more than 40 % of lipids taking into account the dry weight).

2.3. GC analyses

Analyses were performed on an HP 5890 series II gas chromatograph (Hewlett-Packard, Avondale, MA) coupled to a ⁶³Ni electron capture detector (ECD). A capillary column HP5-MS (Agilent Technologies, Massy, France) was used (60 m × 0.25 mm × 0.25 µm) for PCB and PBDE analyses. Helium (He, 5.6 quality, Linde Gas, Toulouse, France) was used as carrier gas at a flow rate of 1 ml.min^{-1} and nitrogen (N₂, 5.0 quality, Linde Gas, Toulouse, France) was used as make up gas 60 ml.min^{-1} . Temperature program was the following: 80°C for 2 min, $10^\circ\text{C.min}^{-1}$ to 200°C, 200°C for 2 min and 2°C.min^{-1} to 320°C and 320 during 20 min.

PCBs (CB 28, 52, 101, 118, 138, 153 and 180) and PBDEs (BDE 47, 99, 119, 153 and 190) were quantified in relation to internal standards (CB 30, CB 103, CB 155, CB 198). Octachloronaphthalene was used as syringe standard. The response factors of the different compounds were measured by injecting a mixture of standard reference material (SRM 2262) individual solutions of PBDE, internal standards and syringe solutions.

2.4. Extraction procedures tested

Four extraction procedures were tested in triplicate for each matrix. Blank experiments (complete procedure without matrix) were performed. Analysed concentrations were corrected taking into account blank values. The internal standards (CB 30, CB 103, CB 155 and CB 198) were gravimetrically added to the matrix prior to extraction (100 μ l of iso-octane solution). A syringe standard (Octachloronaphthalene) was gravimetrically added at the end of the extraction purification step before analysis (30 μ l of iso-octane solution) in order to calculate the percentage of recovery of internal standards.

Extraction conditions for ASE have not been individually optimised for each method, but have been chosen from a comprehensive reference list which covers some of the most important articles published on POP extraction [11] [12] [16] [22]. Concerning MAE conditions they have been derived from methods already published by the laboratory [10] [21].

2.4.1. Microwave assisted extraction and liquid-liquid purification with sulphuric acid (MAE)

The first protocol (MAE) consists of a microwave assisted extraction with dichloromethane coupled with a liquid-liquid purification with sulphuric acid, and finally a last step of purification on a silica gel column. This protocol has been validated and is classically used in the laboratory [20]. Internal standards are gravimetrically added to 0.5 g of dry material. Then, Microwave Assisted Extraction is performed at 30 W for 10 min using dichloromethane (30 ml) (maxidigest MX 4350, Prolabo). Dichloromethane has been chosen due to its ability to absorb microwaves and to extract persistent organic pollutants; moreover dichloromethane can easily be removed during reconcentration steps [23]. Finally, the organic extract is filtered, and purified by shaking 5 times with sulphuric acid (5 \times 10 ml). Organic and acid phases are separated and the purified organic extract is neutralised with ultra pure water, then dried with anhydrous sodium sulphate. The extract is concentrated under a gentle flow of nitrogen before a second purification on silica gel (particle size 0.063-0.2mm) [10]. PCBs and PBDEs are eluted with 3 \times 5ml of a mixture pentane/ dichloromethane (90:10 v/v). The extract is concentrated, transferred to isooctane and syringe standard is gravimetrically added before analysis by GC/ECD. This protocol allows to handle 6 samples (1 blank and 5 samples) per day and per operator.

2.4.2. Accelerated solvent extraction and liquid-liquid purification with sulphuric acid (ASE)

The second protocol (ASE) is a single extraction performed on an ASE 200 System (Dionex, Voisins le Bretonneux, France). This particular protocol follows exactly the pattern explained above except for the microwave assisted extraction that has been replaced by a accelerated solvent extraction. The parameters used during the extraction procedure are listed in Table 1. The packing of extraction cell, (11ml) can be seen in Figure 1. The matrix (0.5 g) is weighed and mixed with glass pearls in the cell. Internal standards are added directly in the collection vials to avoid contamination and memory effects. Organic extracts are collected in the vials and treated with the same steps of purification as before. First, purification is performed by shaking 5 times with sulphuric acid, then the extract is neutralised with ultra pure water and dried before being purified on silica gel (particle size 0.063-0.2mm). The

extract is concentrated, then transferred to isooctane and the syringe standard is added before analysis by GC/ECD. This protocol allows to handle 8 samples (1 blank and 7 samples) per day and per operator.

2.4.3. Microwave assisted extraction with clean up on acid silica gel column (MAE Acid)

The third protocol mixes microwave extraction with purification on acid silica gel column (**MAE Acid**). First, 0.5 g of material are weighed. Internal standards are added gravimetrically. Then, microwave assisted extraction is performed at 30 W for 10 min using dichloromethane (30 ml). The organic extract is filtered, reconcentrated to a few μl in isooctane, and purified on acid silica gel column (about 2 g) using the same column as previously. Analytes are eluted with $3 \times 5\text{ml}$ of a mixture pentane/ dichloromethane (90:10 v/v). The extract is concentrated, transferred to isooctane and syringe standard is added before analysis by GC/ECD. This protocol allows to handle 24 samples (1 blank and 23 samples) per day and per operator. A skilled operator can manage 32 samples (1 blank and 31 samples).

2.4.4. Accelerated solvent extraction with online acid purification and a clean up on acid silica gel column (ASE Acid)

The fourth protocol (**ASE Acid**) is an extraction-purification performed by the ASE 200 System (Dionex, Voisins le Bretonneux, France). The parameters used during the extraction procedure are the same as previously in Table 2. The packing of extraction cell (22 ml) can be seen in Figure 1. First, acid silica gel (5g) is added in the extraction cell and then matrix (0.5 g) is introduced, mixed with glass pearls. After extraction, the sample is collected and reconcentrated using a Vacuum Evaporation Systems (Rapidvap Labconco, Kansas city, USA) to a few μl in isooctane. Then, the extract is purified on acid silica gel column; PCBs and PBDEs are eluted with $3 \times 5\text{ml}$ of a mixture pentane/ dichloromethane (90:10 v/v). The extract is concentrated, transferred to isooctane and the syringe standard is added before analysis by GC/ECD. This protocol allows to handle 24 samples (1 blank and 23 samples) per day and per operator.

3. Results and Discussion

3.1. Extraction of spiked matrix

PCB and PBDE concentrations obtained above were compared to reference values. Reference values are calculated from real nominal theoretical concentration (introduced by spiking the matrix, muscle of trout in this particular case) Standard deviations are obtained by the mean value of compounds added to muscle trout (gravimetric data). Levels of spike are about 10 ng per compound (Table 2). Recoveries for individual PCBs and PBDEs calculated from spiked values are presented in Figure 2. Each result represents the average value calculated from three replicates. Typical relative standard deviations are show in Figure 2 and Table 2.

Recovery percentages of analysed PCBs and PBDEs are higher than 70%. Analyses in triplicate underlined analytic variability. For the majority of compounds this variability is about 15%, but could reach 30 % for CB 118 and CB 52. Moreover, important recoveries (about 120 %) could be observed for CB 28 probably due to chromatographic interference. The last two tested protocols (ASE Acid and MAE Acid) show the best percentages of recoveries, more than 80%. The detection limits of the developed protocol ($S/N = 3$) ranged from 0.8 to 1.2 ng.g^{-1} for PCBs and from 1.1 to 2.6 ng.g^{-1} for PBDEs. We can also underline the fact that both protocols permit to manage more samples than the other protocols. Both protocols at this step can be considered reliable and usable for laboratory environmental monitoring.

3.2. Extraction of certified reference material

3.2.1. SRM 2977 (NIST, Gaithersburg, MD, USA)

In order to confirm that the last two protocols can be considered reliable and usable in laboratory, SRM 2977 was extracted by both new protocols, ASE Acid and MAE Acid process and by our reference protocol MAE. Extraction by ASE protocol was not realised in this case. Extraction process by Accelerated Solvent Extractor without purification on line is longer than extraction by Microwave extraction and not more efficient. Quantitative results obtained for individual PCBs and PBDEs in SRM 2977 are shown Table 3. For all tested protocols, the percentages of recoveries are calculated from certified value and are presented in Figure 3. All recoveries are higher than 80 % for all compounds and for all protocols. The Analyses were carried out in triplicate to underline analytic variability, this variability being uniform, around 10%. We can still notice overestimation of CB 28, due to coelution with CB 50. No indicative values of concentration are given for CB 50 in the case of SRM 2977 to corrected the reference value of CB 28. The results obtained for BDE 47 are in the same order as results presented by Zhu and Hites [24]. However, the results obtained for BDE 99 are slightly more important than the results present by Zhu and Hites [24] but are nevertheless very comparable. No traces of BDE 119, 153 and 190 were found.

3.2.2. WMF 01 (Wellington Laboratories, Irigny, France)

In order to confirm the robustness of these protocols for PBDE, another matrix certified for PBDE (WMF 01, Wellington Laboratories, Irigny, France) was analysed. WMF 01 was extracted by new protocols (ASE Acid and MAE Acid processes) and by our reference protocol MAE. The quantitative results obtained for individual PBDE in WMF 01 are shown in Table 4. For all tested protocols, the percentages of recoveries are calculated from certified value and are presented in Figure 4. All recoveries are satisfactory, about 100% for BDE 47 and 99. For BDE 153 the percentage of recovery is about 80 %. Analytical variability is uniform, around 10% for all compounds and for all protocols.

3.3. Extraction of natural matrices

In order to test the applicability of these protocols to environmental monitoring, they have been tested on natural matrices.

3.3.1. Mysids

A pool of mysids (small crustaceans) has been chosen as low fat container matrix, less than 10% in weight of lipids taking into account the dry weight. In this case the four protocols have been applied in order to confirm their potential. The quantitative results obtained are shown in Table 5. All analysed PCBs are found with classical patterns of PCBs in biota, dominated by CB 153 and CB 138. All protocols show similar results. To estimate the new protocol ASE, ASE Acid and MAE Acid, PCB and PBDE concentrations have been compared with MAE process. The percentages of recoveries have been calculated and are presented in Figure 5. The percentages of recoveries vary between 90 and 120 % on average. Analytical variability calculated from analyses carried out in triplicate for each protocol oscillates between 5 and 20 % with an average value around 10%. All tested protocols show satisfactory results. Organic extracts before injection are clear and limpid and lead to chromatogram without interferences which permits to conclude that the last two tested protocols are reliable and usable for low fat container matrices such as crustaceans.

3.3.2. Eels

The muscle of eels has been chosen as high fat container matrix, more than 40% in weight of lipids taking into account the dry weight. This matrix has been chosen to test the efficiency of the purification steps of each protocol. Lipids pose classically a problem in

purification steps. All protocols have been applied in order to confirm their robustness. Quantitative results obtained are shown in Table 6.

The purification step of the MAE Acid protocol is not efficient for this type of matrix. The final organic extract is not sufficiently clear and limpid for GC/ECD injection. During the last step of concentration before injection, the organic extract has taken a viscous texture, probably due to lipids, not totally eliminated during purification steps. In this respect, no result for MAE Acid protocol can be obtained: more purification steps are necessary since the final extract is too fat to be injected in GC/ECD. This protocol MAE Acid is not efficient for high fat container matrix. For the other protocols, all analysed PCBs have been found with idiosyncratic patterns of PCBs in the biota, dominated by CB 153 and CB 138. In order to estimate the new protocols ASE and ASE Acid, PCB and PBDE concentrations have been compared with our reference protocol: MAE. The percentages of recoveries have been calculated and are presented in Figure 6. Percentages of recoveries oscillate between 90 and 120 %. Analytical variability calculated from analyses were carried out in triplicate for each protocol, oscillate between 5 and 20 % with an average value around 10%. The ASE Acid protocol shows promising results for PCB and PBDE extraction from high fat container matrix. Organic extracts obtained after purification steps and final reconcentration are clear and limpid, and permit an injection in GC/ECD.

3.4. Control Cards

To test the robustness of the MAE Acid protocol and ASE Acid protocol, both natural matrices were used as internal reference matrices during each series of sample analyses for laboratory environmental monitoring. The mysids were used as reference for the MAE Acid protocol and eel muscle for the ASE Acid protocol. The Results obtained for each matrix presented in term of recovery (calculated from the mean value of concentration) are shown Figure 7 for mysids and for eels. MAE acid performed over a periode of 10 month shows a variability of about 15 % for PCB and PBDE concentrations in mysids. MAE Acid is robust for analyses of PCB and PBDE in low fat container matrix such as crustacean. ASE acid performed over the same period shows a variability of about 15 % for PCB in eels. The Variability for BDE in this case is about 20%. The ASE Acid is robust for analyses of PCB and PBDE in high fat container matrix such as eel.

4. Conclusion

The four tested protocols are reliable and usable for PCB and PBDE analyses in biological matrices. The last two tested protocols show promising results in terms of results and saving time and solvent. The MAE Acid protocol that coupled microwave assisted extraction with purification on acid silica gel column, permits to handle 24 to 32 samples per day from extraction to GC/ECD injection but should be reserved to low fat container matrices.

The second promising protocol is ASE Acid. This protocol coupled an on-line purification with purification on acid silica gel column, and presents good performance in terms of recovery and reproducibility on high fat container matrix (more than 40% lipids taking into account the dry weight). The extraction/purification by ASE permits to eliminate interfering compounds (such as lipids, proteins, pigments...) that are hydrolysed and oxidized by sulphuric acid. The second purification on chromatographic column is more efficient with the combined effect of acid silica gel and chromatographic separation. This protocol permits to handle 24 samples par day.

Moreover it could be interesting to continue to develop this type of extraction techniques with on line purification in order to be free of the second purification. Sample purification is the better way to obtained best results in terms of detection limits for POP analyses in environmental studies.

Acknowledgements

This work was supported by CEFIC LRI project. Gis Ecobag, SMIDDEST, ORQUE and Région Aquitaine are also thanked for their financial support.

References

- [1] J. De Boer, *Chemosphere*, 17 (1988) 1803.
- [2] M.D. Luque de Castro, L. Garcia-Ayuso, *Anal. Chim. Acta*, 369 (1998) 1.
- [3] F. Sun, D. Littlejohn, M.D. Gibson, *Anal. Chim. Acta*, 364 (1998) 1.
- [4] J. Evans, R.H. Kaake, M.H. Orr, H. Watwood, *J. oil Contaminat.*, 7 (1998) 589.
- [5] J. De Boer, R.J. Law, *J. Chromagr. A*, 1000 (2003) 223.
- [6] J.R. Dean, *Trends Anal. Chem.*, 9 (2000) 9.
- [7] M. Zougagh, M. Valcarcel, A.Rios, *Trends Anal. Chem.*, 23 (2004) 5.
- [8] A. Abu-Samra, S.J. Morris, S. R. Koirtyohann, *Anal. Chem.*, 8 (1975) 1475.
- [9] C.S. Eskilsson, E. Björklund, *J. Chromatogr. A*, 902 (2000) 227.
- [10] S. Thompson, H. Budzinski, *Anal. Chem.*, 76 (2000) 49.
- [11] P. Suchan, J. Pulkrabová, J. Hajlová, V. Kocourek, *Anal. Chim. Acta*, 520 (2004) 193.
- [12] E. Bjorklund, T. Nilsson, *Trends Anal. Chem.*, 19 (2000) 7.
- [13] Y. Abrha, D. Raghavan, *J. Hazard. Mater.*, 80 (2000) 147.
- [14] K.D. Wenzel, A. Hubert, M. Manz, L. Weissflog, W. Engewald, G. Schuurmann, *Anal. Chem.*, 70 (1998) 4827.
- [15] R. Draisci, C. Marchiafava, E. Ferretti, L. Palleschi, G. Catellani, A. Anastasio, *J. Chromatogr. A*, 814 (1998) 187.
- [16] A. Müller, E. Björklund, C. Von Holst, *J. Chromatogr. A*, 925 (2001) 197.
- [17] J.L. Gomez-Ariza, M. Bujalance, I. Giraldez, A. Velasco, E. Morales, *J. Chromatogr. A*, 946 (2002) 209.
- [18] S. Sporning, E. Bjorklund, *J. Chromatogr. A*, 1040 (2004) 155.
- [19] E. Bjorklund, S. Sporning, K. Wiberg, P. Haglund, C. Von Holst, *Trends Anal. Chem.*, 25 (2006) 318.
- [20] S. Thompson, H. Budzinski, P. Garrigues, J.F. Narbonne, *Mar. Pollut. Bull.*, 38 (1999) 655.
- [21] H. Budzinski, M. Letellier, S. Thompson, K. Le Menach, *Anal. Chem.*, 367 (2000) 165.
- [22] J. De Boer, W.P. Cofino, *Chemosphere*, 46 (2002) 625.
- [23] M. Letellier, H. Budzinski, J. Bellocq, J. Connan, *Organic Geochemistry*, 30 (1999) 1353.
- [24] L. Y. Zhu, R.A. Hites, *Anal. Chem.*, 75 (2003) 6696.

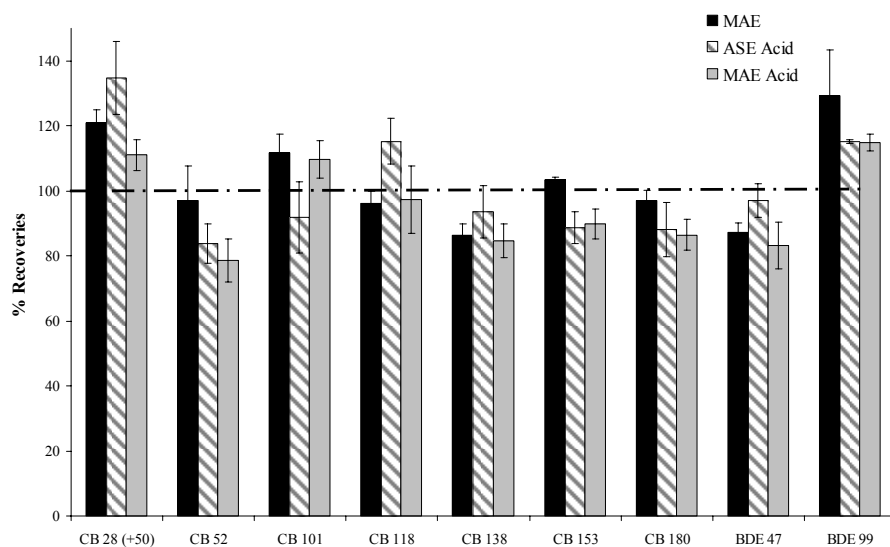


Figure 3 : Recoveries of PCBs and PBDEs in SRM 2977 obtained by the tested protocols (n=3).

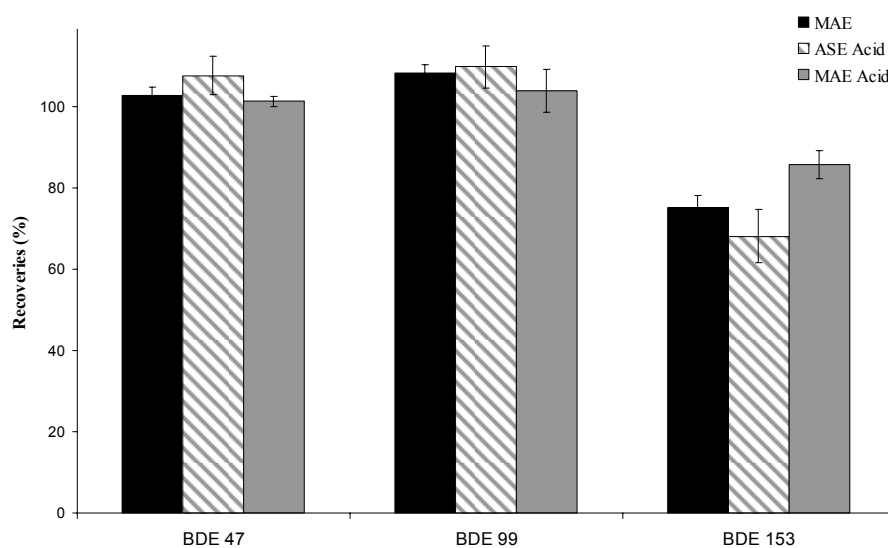


Figure 4 : Recoveries of PBDEs in certified matrix WMF 1 (Fish) obtained by the tested protocols (n=3).

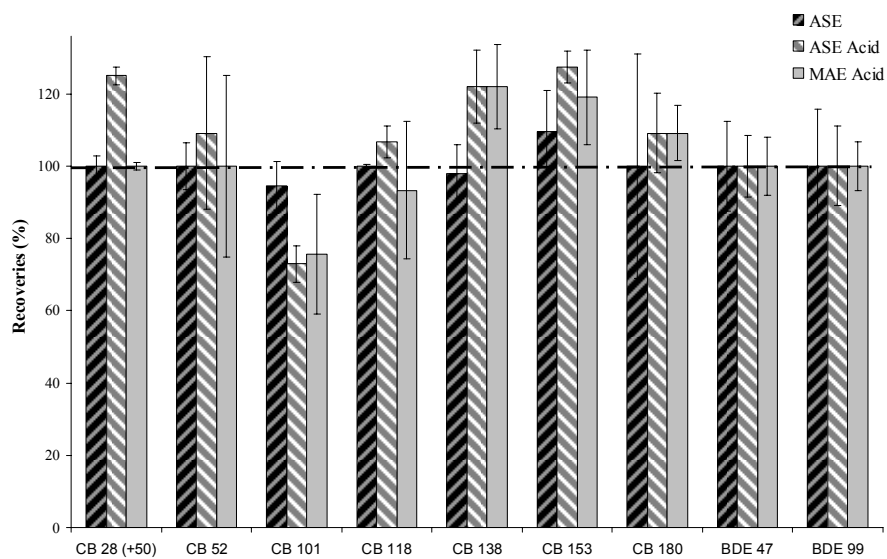


Figure 5 : Recoveries of PCB and PBDE for mysids compared to MAE protocol (n=3).

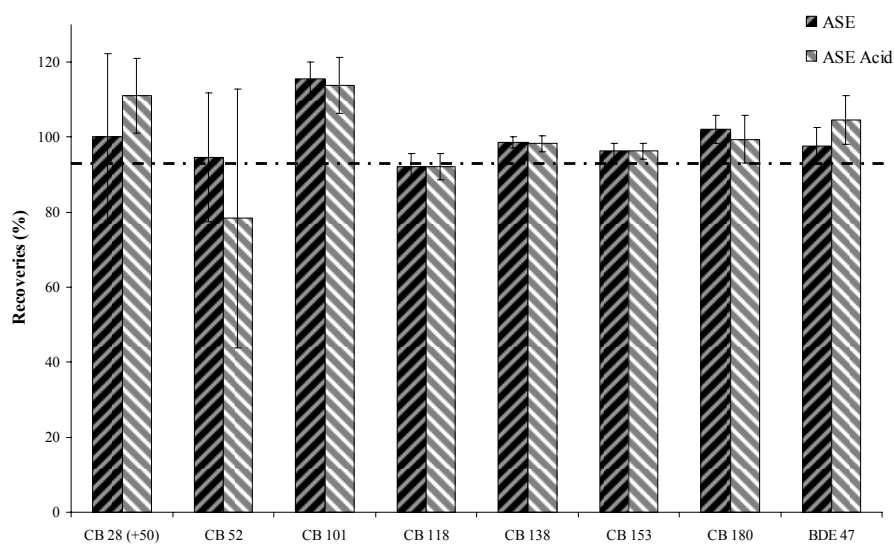
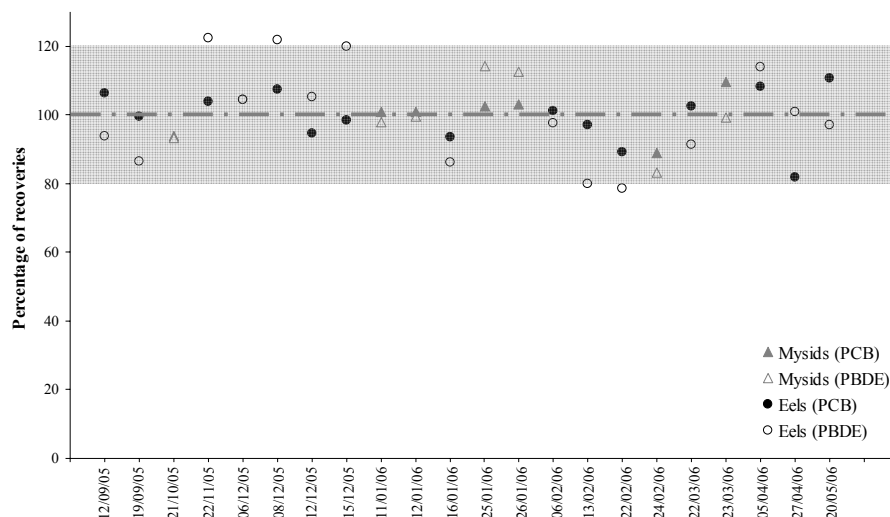


Figure 6 : Recoveries of PCBs and PBDEs for eels compared to MAE protocol.



**Figure 7 : Control cards for PCB and PBDE analysed in mysids and eels.
(Grey zone represents 20% of variability)**

Temperature	100°C
Static time	8 min
Cycle	1
Solvent	Dichloromethane
Pressure	130 bars
Heat time	5 min
Flush volume	60%
Purge time	60s
Dead volume material	Glass pearls (Roth)

Table 1 : Standard extraction parameters used in experiments.

IUPAC Number	MAE		ASE		ASE Acid		MAE Acid		Reference value	
	Conc (ng.g ⁻¹)	SD	Conc (ng.g ⁻¹)	SD	Conc (ng.g ⁻¹)	SD	Conc (ng.g ⁻¹)	SD	Conc (ng.g ⁻¹)	SD
CB 28 (+50)	24.3	0.3	24.2	0.8	24.1	0.7	24.0	0.3	19.1	0.5
CB 52	9.5	0.6	10.3	0.8	10.4	2.6	10.8	2.7	9.5	0.3
CB 101	6.1	0.6	9.5	0.6	10.1	0.5	6.3	1.0	9.5	0.3
CB 118	6.9	2.1	9.9	0.1	8.9	0.4	8.5	1.6	9.5	0.3
CB 138	9.0	1.5	9.7	1.1	8.4	0.4	8.8	1.2	9.4	0.3
CB 153	9.1	1.8	9.4	0.8	9.6	1.0	8.6	1.0	9.5	0.3
CB 180	10.6	1.0	9.5	3.0	9.1	1.0	10.7	0.8	9.5	0.3
BDE 47	12.4	0.3	14.0	1.7	12.6	1.1	12.5	1.0	12.1	0.4
BDE 99	8.4	0.2	10.9	1.7	12.5	1.4	10.5	0.7	12.1	0.3
BDE 119	8.0	0.3	10.8	1.6	10.8	2.7	9.5	1.4	11.6	0.3
BDE 153	10.7	0.7	12.0	1.7	12.3	1.6	11.1	1.4	11.8	0.5
BDE 190	11.9	1.5	8.8	1.4	9.3	5.0	10.2	2.2	11.8	0.5

Table 2 : Concentration (ng g⁻¹ dry weight) of PCB and PBDE in spiked matrix (trout's muscle) obtained by the four tested protocols (n=3).

IUPAC Number	MAE		ASE Acid		MAE Acid		Reference value	
	Conc (ng.g ⁻¹)	SD	Conc (ng.g ⁻¹)	SD	Conc (ng.g ⁻¹)	SD	Conc (ng.g ⁻¹)	SD
CB 28 (+50)	6.5	0.3	7.2	0.8	6.0	0.3	5.4	0.4
CB 52	8.2	1.0	7.0	0.4	6.6	0.4	8.4	0.5
CB 101	12.5	0.7	10.3	1.1	12.3	0.7	11.2	1.2
CB 118	10.1	0.4	12.1	0.9	10.2	1.1	10.5	1.0
CB 138	14.4	0.5	15.5	1.3	14.1	0.7	16.6	1.6
CB 153	14.6	0.1	12.5	0.6	12.7	0.6	14.1	1.0
CB 180	6.6	0.2	6.0	0.5	5.9	0.3	6.8	0.7
BDE 47	35.9	1.0	40.1	2.5	34.2	2.5	41.1	1.3
BDE 99	6.8	1.0	6.5	0.1	6.4	0.2	5.6	0.8
BDE 119	< ld	< ld	< ld	< ld	< ld	< ld	< ld	< ld
BDE 153	< ld	< ld	< ld	< ld	< ld	< ld	0.2	0.1
BDE 190	< ld	< ld	< ld	< ld	< ld	< ld	< ld	< ld

Table 3 : Concentration (ng g⁻¹ dry weight) of PCBs and PBDEs in certified matrix SRM 2977 (mussel) obtained by the three tested protocols (n=3).

IUPAC Number	MAE		ASE Acid		MAE Acid		Reference value	
	Conc (ng.g ⁻¹)	SD	Conc (ng.g ⁻¹)	SD	Conc (ng.g ⁻¹)	SD	Conc (ng.g ⁻¹)	SD
CB 28 (+50)	5.9	0.3	7.2	0.3	5.6	0.3	< ld	< ld
CB 52	21.2	1.7	28.1	4.1	23.1	5.0	< ld	< ld
CB 101	98.3	1.2	125.9	7.7	103.5	1.1	< ld	< ld
CB 118	106.8	9.5	97.6	6.6	103.0	0.5	130.1	32.5
CB 138	207.2	17.4	192.2	9.5	206.9	9.3	< ld	< ld
CB 153	199.8	13.3	195.0	8.4	201.4	6.7	< ld	< ld
CB 180	118.6	4.3	118.7	6.0	119.9	5.5	< ld	< ld
BDE 47	126.4	2.7	132.5	6.3	124.8	1.6	123.2	24.8
BDE 99	40.6	0.8	41.2	2.1	38.9	2.0	37.5	4.2
BDE 119	1.0	0.9	< ld	< ld	< ld	< ld	< ld	< ld
BDE 153	12.8	0.4	11.6	0.8	14.6	0.5	17	8.0

Table 4 : Concentration (ng g⁻¹ dry weight) of PCB and PBDE in certified matrix WMF 1 (fish) obtained by tested protocols (n=3).

IUPAC Number	MAE		ASE		ASE Acid		MAE Acid	
	Conc (ng.g ⁻¹)	SD	Conc (ng.g ⁻¹)	SD	Conc (ng.g ⁻¹)	SD	Conc (ng.g ⁻¹)	SD
CB 28 (+50)	2.0	0.5	2.0	0.3	3.0	0.6	2.0	0.4
CB 52	11.0	0.9	11.0	2.0	12.0	1.9	11.0	1.0
CB 101	37.0	1.1	35.0	3.2	27.0	1.0	28.0	3.0
CB 118	15.0	0.5	15.0	2.0	16.0	1.2	14.0	3.7
CB 138	50.0	5.9	49.0	0.9	61.0	1.7	61.0	2.6
CB 153	84.0	9.8	92.0	3.2	107.0	3.5	100.0	10.4
CB 180	22.0	3.8	22.0	1.3	24.0	0.3	24.0	0.9
BDE 47	6.0	0.7	6.0	1.2	6.0	0.4	6.0	1.0
BDE 99	4.0	0.3	4.0	0.7	4.0	0.3	4.0	0.2
BDE 119	< ld	< ld	< ld	< ld	< ld	< ld	< ld	< ld
BDE 153	< ld	< ld	< ld	< ld	< ld	< ld	< ld	< ld
BDE 190	< ld	< ld	< ld	< ld	< ld	< ld	< ld	< ld

Table 5 : Concentrations of PCBs and PBDEs analysed in mysids by all protocols (MAE, ASE, MAE Acid, ASE Acid) (n=3).

IUPAC Number	MAE		ASE		ASE Acid	
	Conc (ng.g ⁻¹)	SD	Conc (ng.g ⁻¹)	SD	Conc (ng.g ⁻¹)	SD
CB 28 (+50)	9.0	4.0	9.0	2.0	10.0	1.0
CB 52	37.0	1.0	35.0	6.0	29.0	10.0
CB 101	58.0	3.0	67.0	3.0	66.0	5.0
CB 118	63.0	5.0	58.0	2.0	58.0	2.0
CB 138	350.0	6.0	345.0	5.0	344.0	7.0
CB 153	242.0	7.0	233.0	5.0	233.0	5.0
CB 180	189.0	3.0	193.0	7.0	188.0	12.0
BDE 47	44.0	2.9	43.0	2.1	46.0	3.0
BDE 99	< ld	< ld	< ld	< ld	< ld	< ld
BDE 119	< ld	< ld	< ld	< ld	< ld	< ld
BDE 153	< ld	< ld	< ld	< ld	< ld	< ld
BDE 190	< ld	< ld	< ld	< ld	< ld	< ld

Table 6 : Concentrations of PCBs and PBDEs analysed in eels for three protocols (MAE, ASE, ASE Acid) (n=3).

Annexe 2

A Model for Estimating the Potential Biomagnification of Chemicals in a Generic Food Web: Preliminary Development.

Alonso E^{1*}, Tapie N², Budzinski H², Lemenach K², Pelluhet L² and Tarazona JV¹

¹ Lab of ecotoxicology. Depart of Environmental, INIA. Madrid (Spain)

² Lab de Physico-Toxicochimie des Systemes Naturels (LPTC). Univ. Bordeaux I. Talence (France)

*Corresponding author (elalonso@inia.es)

Goal, scope and background. Bioaccumulation and biomagnification of organic pollutants have been increasingly assessed and modelled during last years. Due to the complexity of these processes and the large variability of food webs, setting generic assessments for these parameters is really difficult. Equilibrium models, based on compound's lipophilicity, are the main tool in regulatory proposals, such as for identifying Persistent and Bioaccumulative Substances (PBTs), although a refinement has been claimed by the scientific community. Toxicokinetic studies offer an alternative for these estimations, where biomagnification is modelled as a succession of bioaccumulation process, each one regulated by toxicokinetic parameters.

Methods. A review of kinetics models covering species belonging to different trophic levels and with different ecological behaviour has been conducted. The results were employed for setting a conceptual model for estimating the biomagnification potential in a generic food web, which was mathematically implemented through system dynamic models developed under data sheet software. Crystal Ball was then employed for allowing probabilistic calculations.

Several bioaccumulation laboratory assays have been performed to estimate toxicokinetic parameters in three marine species and with PCBs (CB 153) and PAHs (Chrysene and Benzo(a)pyrene). The contamination has been delivered to the different species via the food for the mussels and the fishes and via the dissolved phase for the algae. The contamination lasted more than one month followed then by a depuration phase. The contaminant content has been determined on an individual basis for mussels and fishes on five replicates. The differences between the various contaminants will be discussed in relation to the species. The accumulation data will be used to illustrate the biomagnification model.

Results and Discussion. The reviewed information suggested the development of a tiered conceptual biomagnification model, starting with a simplified food chain which can be refined to more realistic and complex models in successive levels. The implementation of the model through a datasheet program and Crystal Ball offers both simplicity when require and versatility for covering generic and site-specific assessments as well as for using complex kinetic estimations and relationships when required. The simulations conducted with the model revealed the role of the k_d as the leading factor in most occasions, and confirmed the possibilities for discriminating between true variability and uncertainty when the information is available. The validation exercises conducted for the accumulation of PAHs in mussels and of PCB 153 in a complex food chain indicated the agreement between measurements and model predictions.

Conclusions. The mathematical implementation of the conceptual model offers a tool for estimating the potential for bioaccumulation and biomagnification of chemicals under very different conditions. The versatility of the model can be used for both comparative estimations and for validating the model.

Keywords: biomagnification model, toxicokinetics, comparative assessments.

1 Introduction

The bioaccumulation of chemicals in biota and the potential for biomagnification through the food chain represent essential elements for a proper hazard and risk assessment of chemical substances. For comparative and regulatory assessments, simplified methods, e.g. based on the estimation of rates or factors, are frequently employed. The Bioconcentration Factor from water (BCF) established as the ratio between the concentration in an aquatic organisms and the concentration in the water at steady-state represents the best example. Similar approaches, estimating biota-sediment or biota-food bioaccumulation factors (BAF) have been suggested, however, the predictive and comparative values of these BAFs is much lower than that associated to the water BCF as the later is independent of the exposure concentrations. The complexity increase when moving to food-chain assessment, as the final biomagnification will depend on a large amount of factors including the chemical, the exposure conditions, the organisms involved, and the trophic relationships among organisms. The use of these factors offers several advantages for grouping substances, setting regulatory triggers, and conducting simplified estimations based on reduced set of data, however, the lack of enough scientific support for these methods represent a clear problem. The EU regulations on the environmental risk assessment of chemicals offer a good example of such debates, where a simplified approach estimating the biomagnification risk and classifying chemicals was agreed by regulatory bodies in the Technical Guidance Document 1 (ECB 2003), but the scientific bases of the proposal received significant criticisms when reviewed by the independent scientific committee (CSTEE 2002).

In addition, quantitative structure activity relationships (QSARs) for estimating the water BCF based on the lipophylicity, mostly expressed as the K_{ow} , of the substance have been developed and validated. However, when similar approaches have been transferred to bioaccumulation estimations from food, the results have not been so exciting. Bioaccumulation in lipid tissues is the most frequent bioaccumulation mechanisms for organic chemicals, and obviously the lipophylicity plays a role in the bioaccumulation as expected. Several authors have observed different types of relationships between the bioaccumulation and the K_{ow} for specific datasets. However, the review of available information covering a large number of chemicals and species suggested that the relationship is not so evident. Several factors should be considered for explaining the complexity of the bioaccumulation processes via food; two of them are of toxicokinetic character and requires specific consideration. First, the time pattern for uptake and elimination are different, uptake is related to food ingestion which is an episodic phenomenon for most species, while elimination/metabolisms are continuous processes, therefore, a real dynamic equilibrium will never be achieved and only pseudo-equilibrium estimations should be considered. Second, the uptake is regulated by different mechanisms and the lipophylicity can play different, and even opposite, roles for each mechanisms, producing ambiguous results; even more, the role of each mechanisms can be different for different species, and may depend on the concentration level producing apparently contradictory results.

Toxicokinetic models evolved from the pharmacokinetic models developed and although were initially developed for mammalian species have been later employed for several organisms and groups. These models offer a several possibilities and complexity levels, from simplistic one-compartment first-order kinetic models to the multifaceted physiologically-based pharmacokinetic models of PBPK models. These models can estimate final concentrations, and therefore factors based on steady-state conditions, but most important, can be used as system dynamic models to predict the time-evolution of concentrations in different organisms. Based on a review of available information, a conceptual model for toxicokinetic-based biomagnification estimations is presented. The model has been implemented through system dynamic tools and transformed into a probabilistic model for covering variability and uncertainty. As a preliminary proposal, a set on individual experiments have been conducted

for checking the real capacity of toxicokinetic tools for predicting the bioaccumulation potential in a dynamic way.

2 Model framework

The food-chain biomagnification model was derived as a combination of independent dynamic toxicokinetic models representing each species within the food chain.

The model is presented in four step of increasing complexity (see Figure 1). In all of them, the accumulation in primary producers represents a non-food exposure route. Basically, for these organisms, the bioconcentration from water is mainly considered, although other routes, such as exposure from sediment, can be incorporated. The oral exposure process is considered for all consecutive trophic levels.

The initial step constitutes the base of subsequent ones, where the bioaccumulation potential is regulated by following the basic equation:

$$BB_{\text{organism}} = f(F, \alpha, C_{\text{food}}, k_d, t) \quad (1)$$

Where BB (body burden) is the chemical concentration in the organism and C_{food} the chemical concentration in the food. F is the feeding rate (in kg food / kg organisms / day) and k_d is the elimination rate constant accounting for the loss of the chemical from the organism (or compartment) due to elimination or metabolism with units of day⁻¹. The assimilation efficiency (α) represents the fraction (f1) of the chemical that is assimilated by the organism (1- f1) and t is the time increment.

As the time patters for food consumption is episodic and species-specific, the differential equation is transformed in a succession of time-segments. The selected unit is one day, as most species get food at least once a day. The uptake can be modelled as a function of mass of chemical present in the food ingested that day ($F \times C_{\text{food}}$) multiplied by the assimilation factor α , which can be a fix number or a function depending on other variables such as the C_{food} . Additional exposure routes other than food can be incorporated, e.g. uptake from water. The total uptake of that day is obtained as the sum of the uptakes estimated for each relevant route. The elimination potential is modelled as a function of the k_d and the concentration in the organisms at the beginning of that particular time-segment, and therefore depends on the concentration accumulated by the organisms in previous days being independent of the actual concentration level in the food consumed on the assessed day. Therefore, the concentration on day t resulting from food exposure only is modelled as :

$$BB_{\text{organism}t} = BB_{\text{organism}t-1} + (F \cdot \alpha \cdot C_{\text{food}t} \cdot \Delta t) - (k_d \cdot BB_{\text{organism}t-1} \cdot \Delta t) \quad (2)$$

If additional routes are considered, the amount absorbed by that particular route on that particular day is added to the second term. (Figure 1) E.g., absorption from water can be modelled through the absorption rate K_a , producing the following equation:

$$BB_{\text{organism}t} = BB_{\text{organism}t-1} + (F \cdot \alpha \cdot C_{\text{food}t} \cdot \Delta t) + (K_a \cdot C_{\text{water}t} \cdot \Delta t) - (k_d \cdot BB_{\text{organism}t-1} \cdot \Delta t) \quad (3)$$

The second step is a simplistic link of the individual models, where C_{food} is just the estimated concentration in the prey (food) on day t. A simplified food-chain, with one species representing each level, is obtained. (Figure 1)

The third step in the mathematic implementation, is to segregate each level into several species, which can cover different exposure patterns; e.g. secondary consumers feeding on pelagic or on sediment dwelling primary consumers, or top predators feeding on fish (exposed via food and water) or on aquatic mammals (exposed exclusively via food).

The four step establishes realistic complex relationships among the species. The mathematical implementation only requires setting the relevance of each species in the diet of the other

species through a proper rate which can be a number or a function. The position of each species in the chain, or Trophic Index (TI) is calculated as:

$$TI_i = 1 + \sum(TI_j FFi,j) \quad (4)$$

Where TI_i is the trophic index of the species i , TI_j is the trophic index of the species j and FFi,j is the fraction of the species j in the total diet of species i . (Figure 1). For primary producers, a TI equal 0 was assumed

3. Simulation study

The model was designed (in Excel datasheet software) to simulate chemical concentrations in organisms of a food chain exposed from different routes (environment and/or diet) at intervals of time using accumulation kinetics. The time of simulation can be prolonged as the case required, allowing to reach steady-state conditions and thereby calculation of Accumulation Factors. This simulation reproduces data from specific accumulation kinetics values of chemicals in organisms. The variability of these inputs was considered by the probabilistic implementation of the model (using Crystal Ball software), where each variable can be represented by a probability function instead of a value.

4. Methodology for initial model checking and validation

Three complementary approaches have been employed in order to calibrate definitively the model. First, a sensitivity analysis for checking the role of toxicokinetics variables (particularly the assimilation and elimination rate) was performed. To explore the relevance of these variables, an assortment of combinations (k_d , α) were conducted and the data generated by simulations were compared. Because of the relatively high degree of variability and data gaps, normal distribution with a range of mean values and two different error distributions were used for covering the variability and uncertainty of the accumulation kinetics parameters. The Biomagnification Factor (as product of BAFs) was the parameter chosen to compare the diverse accumulation behaviour.

Second an experimental estimation of kinetic variables was performed using the common mussel *Mytilus edulis*. The mussels were orally exposed to two different Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs); Benzo[a]pyrene and Chrysene with nominal concentration of 100 $\mu\text{g/g}$ and 12 $\mu\text{g/g}$ respectively. The uptake of PAHs via food was assessed during 36 days of daily feeding with a commercial pool of phytoplankton previously spiked with the PAHs. Then, the contaminated food was replaced by non-contaminated food and the PAH concentrations in mussel were monitored during 48 days in order to consider the depuration kinetics of the compounds. Five mussels were sampled each three days along the 84 days that spend the experiment and their whole body concentration were measured by GC/MS.

Third an initial validation on field body burden in a food chain from the Barents Sea was performed. The field data obtained in the observations from Hop et al. (2002) were compared with data generated by the model using published experimental kinetic data obtained under laboratory conditions.

5. Results

The model development produced a versatile biomagnification model with three complexity levels, which are graphically represented in Figure 1(B-D). The low complexity stage is a simple generic food chain with a single step per trophic level. The medium complexity stage offers an aggregation of generic chains, where additional exposure routes, such as gill uptake or exposure to sediment are considered when ever relevant. Both, the initial and medium stages only allow the allocation of species in “classical” trophic levels: primary producers and primary, secondary and tertiary consumers. At the third stage, the complex model offers all

kind of combinations among organisms in the food chain producing the intermediary trophic indices observed in the real environment.

The three levels were mathematically implemented in a single dynamic model constructed on the basis of a datasheet with species presented as rows and daily body burdens as files. Changes in model complexity are directly obtained through the allocation of representative species and their trophic relationships by setting the variable $FF_{i,j}$, expressing the fraction of the species j in the total diet of species i .

The combination of Excel and Crystal Ball software confers to the model a tremendous versatility regarding the mathematical implementation. All variables can be represented as functions, allowing the implementation of complex toxicokinetic bioaccumulation behaviours such as multicompartmental models or even physiologically based toxicokinetic (PBTK) models. In addition, true variability and uncertainty for each variable and parameter can be introduced as probability distributions through the use of Crystal Ball.

This capacity allowed a sensitivity analysis covering not only changes in the average value for each variable but also considering data dispersion. As the feeding rate is species specific but independent of the chemical, the efforts focused on the assimilation efficiency and the elimination rate. Several combinations of deterministic and probabilistic variables were simulated. According to the Central Limit Theorem (Ianuzzi and Ludwig 2000), a normal distribution is appropriate for characterizing the mean of large data sets. Thus, normal distributions were selected for the simulations. Simulations cover a wide set of combinations, ranging from 0.8 to 0.2 for α and from 1 to 0.003 for the k_d . Simulations assuming a constant standard distribution and a constant variability coefficient were also compared. The model was run maintaining constant concentration in primary producers and the simulation was prolonged until all organisms reach equilibrium conditions, resulting on constant exposure for all trophic levels and allowing to infer steady-state Biomagnification Factors.

Figure 2 present the typical trend chard obtained for each simulation cluster. Overall results are summarised in Figure 3. Clusters A and B were obtained assuming similar k_d s for all consumers; the effect of a lower elimination rate for the primary consumers can be observed in clusters C and D. The figures also demonstrate a higher contribution for the k_d than for α in the final BMF. However, when the standard deviation is kept constant, implying modifications in the variability coefficients, the relative contribution of α becomes particularly higher for very low k_d values. Second-order (hierarchical or 2D) Montecarlo simulations can be employed for establishing the relative contributions of true variability and uncertainty. Figure 4 shows an example of the possibilities of this tool, simulating results for a k_d around 0.01; if enough information is available, these simulations can be fully implemented in the developed biomagnification model through the combination of the Excel implemented mathematical model and Crystal Ball software.

Figure 5 shows the fitting of the model estimations to the experimental values obtained for the biaccumulation of two PAHs in mussels. The toxicokinetic parameters k_d and $F \cdot \alpha$ (mean and standard deviations) were obtained by fitting the experimental results to different kinetic equations, no significant enhancements in data fitting was obtained by departing from the simple one-compartment first-order kinetic model, therefore, exponential equations were employed. The accumulation data, particularly for Benzo-a-Pyrene, could suggest a more complex model, including a second compartment with a saturable-like behaviour, however, further information is required for checking this hypothesis. In the mean time, the probabilistic model based on the simplistic toxicokinetic equations and normal distributions of the toxicokinetic parameters produce proper estimations of the expected concentrations, and the variability around the estimated means.

The realistic food chain used for the final initial validation is presented in Figure 6. Hop and co-workers (2002) reported a large number of chemical concentrations along a food chain from the Barent Sea just and the trophic relationship among organisms. Their data, excellently reported, combined with toxicokinetic parameters obtained under experimental conditions, have been used for the model validation. Table 1 specifies the input parameters used in this validation. The model simulation started by building-up a site-specific food-chain for this specific location. The part of the marine food web that was integrated into the model included copepods (predominately *Calanus glacialis*), krill (predominately *Thysanoessa inermis*) and the pelagic amphipod *Parathemisto libellula* as zooplankton. Two fish, polar cod (*Boreogadus saida*) and atlantic cod (*Gadus morhua*) and two sea birds species, Brünnich's gilletot (*Uria lomvia*) and black gilletot (*Cepphus grille*) completed the food chain. For facilitating the comparisons, the Trophic Level (TL) calculated by Hop and collaborators from stable isotope ($\delta^{15}\text{N}$) and its relationship with the trophic index (TI) calculated by equation 4 are presented in Figure 6. Since the diet of primary consumer (pelagic amphipods, copepods and krill) was not specified, constants reported concentrations for selected PCB (153) were assumed for this level. Then, the concentration of PCB 153 in the other organisms within the trophic chain was calculated using the diet preferences, the default F values suggested by the model and α and k_d values reported from experimental laboratory studies on fish and birds for this PCB. Black guillemonts are known to be opportunistic in their food choice and switch rapidly between prey groups as their availability changes (Cramp S, 1985). Studies on their food choice in the Barent Sea region suggest that amphipods and krill comprise about 50% or more of their diets and polar cod most of the rest (Hartley and Fisher, 1936 and Mehlum et al., 1996). Considering this situation model simulations were conducted assuming both diet possibilities for this sea bird; first the diet specified by Hop et al (2002) and the second considering the opportunistic condition of this species. The kinetic data employed for the simulations are summarised in Table KK. The k_d values reported for PCB 153 in fish and birds showed a high variability but a proper fitting to a single distribution was not possible. Therefore, the model simulations were conducted using a normal distribution for the k_d with a fix mean value (mean of reported values) and a variable standard deviation, representing by an uniform distribution obtained from the observed ranges in published papers. Figure 7 present the model estimation and its comparison with measured values. The capacity of the model for predicting the accumulation and biomagnification potential is clear. In addition, the model suggest an opportunistic feeding behaviour for the black guillemont.

6. Discussion

The use of simplistic models and fixed assumptions offer several advantages in the regulatory arena. However, even if initially the proposal is based on scientific grounds, the oversimplification can lead to a lack of scientific support in the final decision. The combination of persistence and bioaccumulation potential, produce a highly relevant environmental hazard related to the potential of the chemical for moving and concentrate through the food chain. The complexity of the process is high and the level of real knowledge is limited; however, due the need for taken regulatory measures, some simplistic models have been proposed. The EU Technical Guidance Document on the risk assessment of new and existing substances (ECB 2003) offers a good example. The biomagnification process is covered in the marine risk assessment by multiplying the fish BCF by two Biomagnification factors representing the biota-food accumulation which are estimated directly by the Kow. The scientific value of this approach was has been questioned (CSTEE 2002).

In a previous report (Gonzalez-Donzel et al. 2003) we analysed the published data on the relationships of biota-food and food-chain biomagnification factors and the Kow, concluding that although a role on the Kow in the process is evident, the capacity of the Kow as single descriptor for these factors cannot be supported by scientific data. It seems that

biological/physiological factors plays a much higher role for the bioaccumulation from food than in the bioconcentration from water, and therefore modelling this process requires toxicokinetic considerations.

Bioaccumulation/biomagnification models are receiving an increasing attention (e.g. Mackay et al. 2000), and the generation of information on the toxicokinetics of aquatic organisms exposed via food (Nichols et al. 2004) allows the use of toxicokinetic-based models.

The model presented in this paper offers different levels of complexity, which can be used during risk assessment at different tiers. The simplest model, a generic organism representing each trophic level, can be applied when standardization is more important than accuracy such as screening and comparison between large numbers of chemicals. The medium complexity model could be used in order to estimate the level of exposure for different organism considering all potential routes allowing characterizing the risk by comparison with the level at which adverse effects have been observed. Finally, for higher tier and site-specific assessments, the model offers enough versatility for being adapted to any detailed food chain.

Although additional validation exercises are required, the examples included here indicate the capacity of the model. The main objective of the first validation exercise conducted with mussels was to check the capacity of the model and their probabilistic implementation for addressing the variability observed in experimental studies. The mathematical implementation of the model has been largely simplified by transformed the continuous functions in daily-time-segments, the results confirm the suitability of this approach, as presented in Figure 5. The main objective of the second validation exercise was to check the capability of the model for predicting field data within a food-chain and their variability based on experimental toxicokinetic information. It should be considered that the combination of fish and bird data obtained for the PCB 153 allowed a proper estimation of the field measurements reported by Hop et al. (2002) even when no kinetic information for the measured species is available.

In conclusion, the conceptual model and their mathematical implementation offer a versatile tool for assessing the bioaccumulation and biomagnification processes and their time evolution under experimental and field situations. The model can be employed for both generic and specific assessments and can implement any kind of toxicokinetic alternatives. The implementation of the model through Monte Carlo analysis can cover the assessment of variability and uncertainty, issues which are critical in biomagnification estimations (von Stackelberg et al. 2002 and Linkov et al. 2001).

Acknowledgements:

This work has been funded by the LRI Programme ENVIRONMENT: PERSISTENCE, BIOACCUMULATION & TOXICITY Project No: ECO-1AINIA-1100

References

- Cramp S (1985). *The Bird of the Western Palearctic*. Oxford University Press: Oxford, U.K., Vol. IV
- CSTEE (2002) Opinion on the TGD Draft revision version on Part 3/B - Environmental Risk Assessment - Marine Part. Opinion expressed by written procedure on 25 January 2002. Scientific Committee on Toxicity, Ecotoxicity and the Environment, DG SANCO, European Commission, Brussels.
- Dabrowska H, Fisher S W, Dabrowski K, Staubus AE. (1999) Dietary uptake efficiency of 2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl in yellow perch and rainbow trout: Role of dietary and body lipids. *Environ Toxicol Chem.* 18, 938-945

- ECB (2003) Technical Guidance Document in support of Commission Directive 93/67/EEC on Risk Assessment for new notified substances, Commission Regulation (EC) No 1488/94 on Risk Assessment for existing substances and Directive 98/8/EC of the European Parliament and of the Council concerning the placing of biocidal products on the market. Edition 2. European Chemicals Bureau. Ispra, 2003
- Fisk AT, Norstrom RJ, Cymbalisty CD, Muir DCG (1998). Dietary accumulation and depuration of hydrophobic organochlorines: Bioaccumulation parameters and their relationship with the octanol/water partition coefficient. *Environ Toxicol Chem.* 17, 951-961
- González-Doncel M, Alonso E, and Tarazona JV. 2003 Biomagnification: Concepts and Modelling Approaches. A review of the literature and identification of experimental data requirements. Report from the Department of the Environment, INIA, Madrid, 34pp.
- Harrad S, Smith D. (1998) Field evaluation of a mathematical model of PCB transfer through the freshwater aquatic food chain. *Sci Total Environ*, 8, 137-4
- Hartley CH and Fisher J. J. *Anim. Ecol.* 1936, 5-370-389
- Hop H, Borga K, Gabrielsen GW, Kleivane L, Skaare JU (2002). Food web magnification of persistent organic pollutants in poikilotherms and homeotherms. *Environ Sci Technol* 36(12), 2589-97
- Ianuzzi TJ and Ludwig DF (2000). The role of Food Web Models in the Environmental Management of Bioaccumulative Chemicals. *Soil Sediment Contam* 9(3),181-195.
- Linkov I, von Stackelberg KE, Burmistrov D, Bridges TS (2001). Uncertainty and variability in risk from trophic transfer of contaminants in dredged sediments. *Sci Total Environ* 274(1-3), 255-269
- Mackay D, Fraser A, Kenneth M. (2000). Review Award. Bioaccumulation of persistent organic chemicals: mechanisms and models. *Environ Pollut* 110(3), 375-391
- Mehlum F, Hunt GI, Klusek X, Decker MB, Nordlund N.(1996) *Polar Biol* 16, 537-547.
- Nichols JW, Fitzsimmons PN, Whiteman FW (2004) A physiologically based toxicokinetic model for dietary uptake of hydrophobic organic compounds by fish: II. simulation of chronic exposure scenarios. *Toxicol Sci* 77(2), 219-229
- Sijm DTHM, Van Der Linde A (1995) Size-dependent bioconcentration kinetics of hydrophobic organic chemicals in fish based on diffusive mass transfer and allometric relationships. *Environ Sci Technol*, 29(11), 2769-2777
- von Stackelberg KE, Burmistrov D, Vorhees DJ, Bridges TS, Linkov I (2002). Importance of uncertainty and variability to predicted risks from trophic transfer of PCBs in dredged sediments. *Risk Anal* 22(3), 499-512

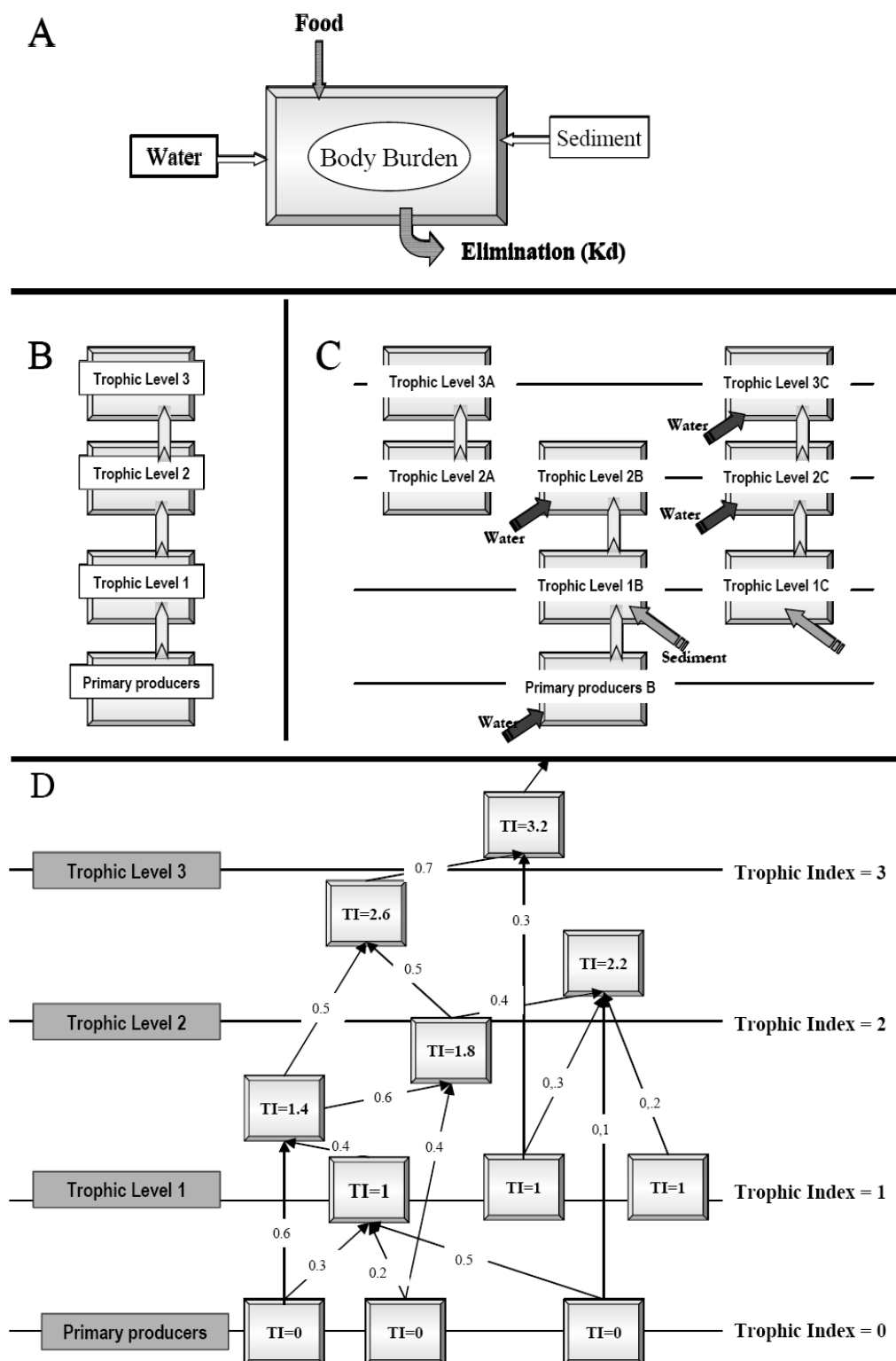


Figure 1. Schematic diagram of biomagnification model steps. A; Kinetic model regulating the mass balance considering several exposure routes (food, sediment and water). B, C and D are consecutive framework model steps which correspond to three complexity levels of the model; simplified food chain, aggregation of generic food chains and realistic food chain where each organism have associate a trophic index.

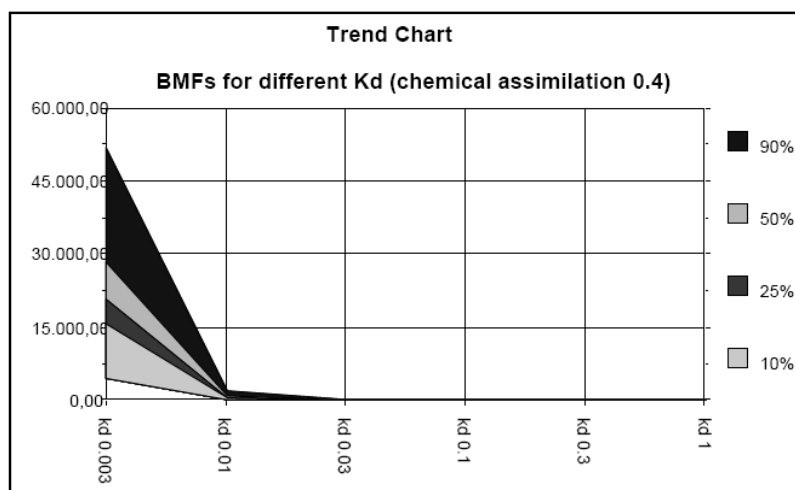


Figure 2. Example of a simulation cluster, showing the effect of variable k_d for a single assimilation efficiency ($0,4 \pm 0,008$). Parameters k_d and α were characterized as normal distribution with a fix variation coefficient of 20%.

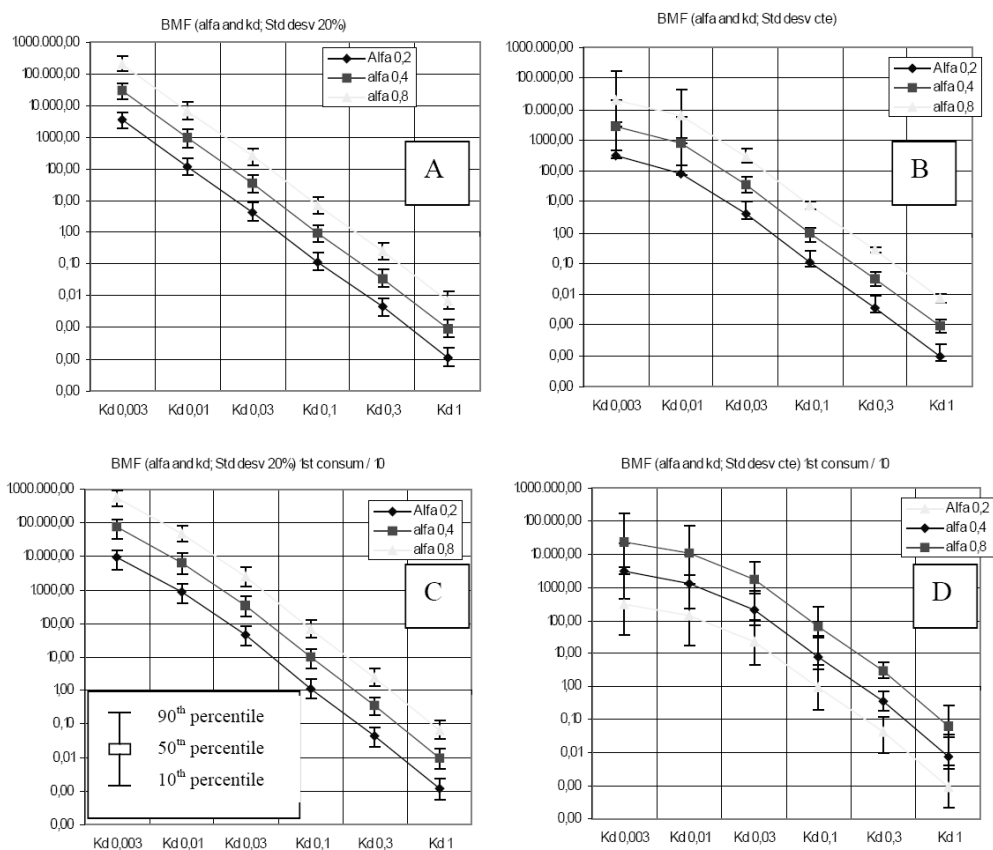


Figure 3. Summary of simulation results showing the 10, 50 and 90 percentiles of the BMF distributions generated by the model under the different simulated conditions.

A: k_d and α ; Normal distribution with proportional standard deviation (20% of the mean).

B: k_d and α ; Normal distribution with constant standard deviation.

C: Normal distribution with proportional standard deviation (20% of the mean). Mean values of k_d divided by 10 for first consumers.

D: k_d and α ; Normal distribution with constant standard deviation. Mean values of k_d divided by 10 for first consumers.

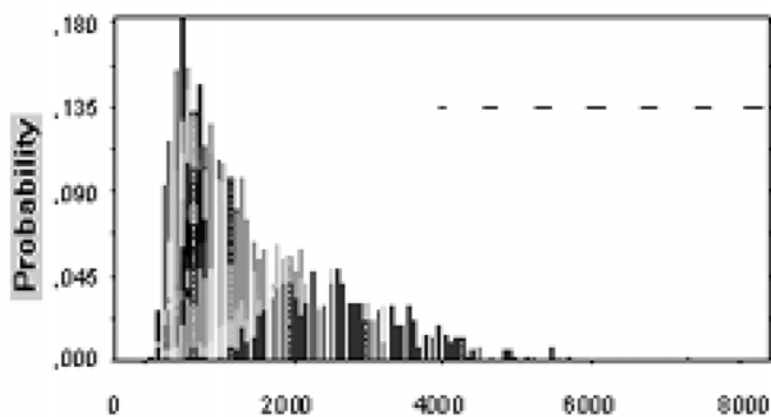


Figure 4. Overlay distributions generated by the model using 2D Monte Carlo for 20 haphazard values of elimination rate close to 0,01 remaining the variability as 20% of average value which was sampled 2000 times.

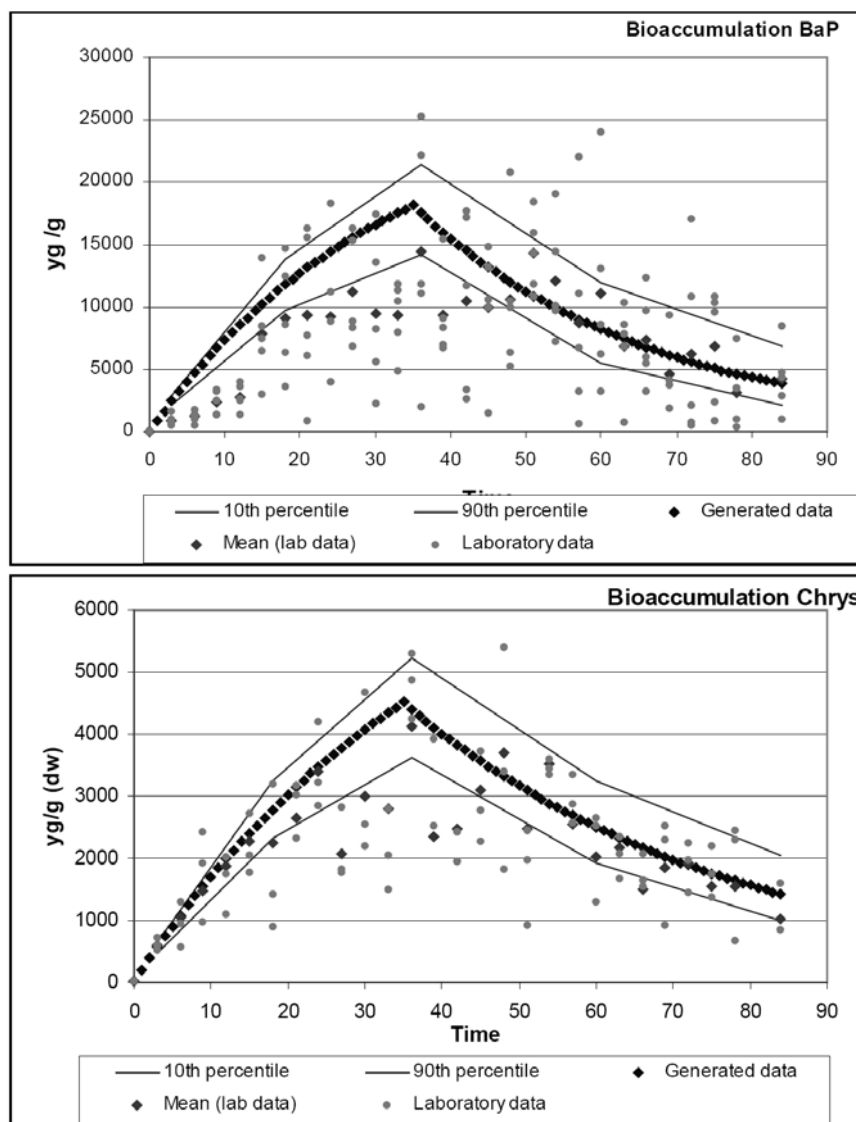


Figure 5. Comparison between Polycyclic Aromatic Hydrocarbons bioaccumulation trend in *Mytilus edulis* extracted from toxicokinetics laboratory experiments and generated by the model. The lines represent the mean and 10th and 90th percentiles estimated by the model.

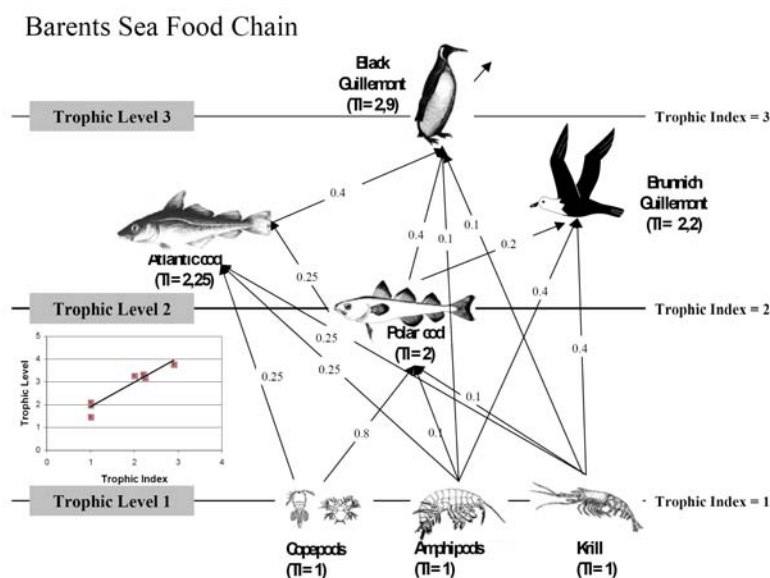


Figure 6. Food chain structure of Baltic Sea reported by Hop and collaborators (2002). Trophic Index (TI) were calculated based on equation 4. For copepods, pelagic amphipods and krill, a TI equal 1 was assigned. Diet composition was used for calculating the rest of TI; Polar cod $TI = 1 + (0,8 \times \text{Copepods TI} + 0,1 \times \text{Amphipods TI} + 0,1 \times \text{Krill TI})$; Atlantic cod $TI = 1 + (0,25 \times \text{Copepods TI} + 0,25 \times \text{Amphipods TI} + 0,25 \times \text{krill TI} + 0,25 \times \text{Polar Cod TI})$; Brünnich's guillemot $TI = 1 + (0,2 \times \text{Polar cod TI} + 0,4 \times \text{Amphipods TI} + 0,4 \times \text{krill TI})$; Black guillemot $TI = 1 + (0,4 \times \text{Atlantic cod TI} + 0,4 \times \text{Polar cod TI} + 0,1 \times \text{Amphipods TI} + 0,1 \times \text{krill TI})$.

Correlation between Trophic Levels calculated by stable isotope and Trophic Index calculated by equation 4 ($r^2=0.91$)

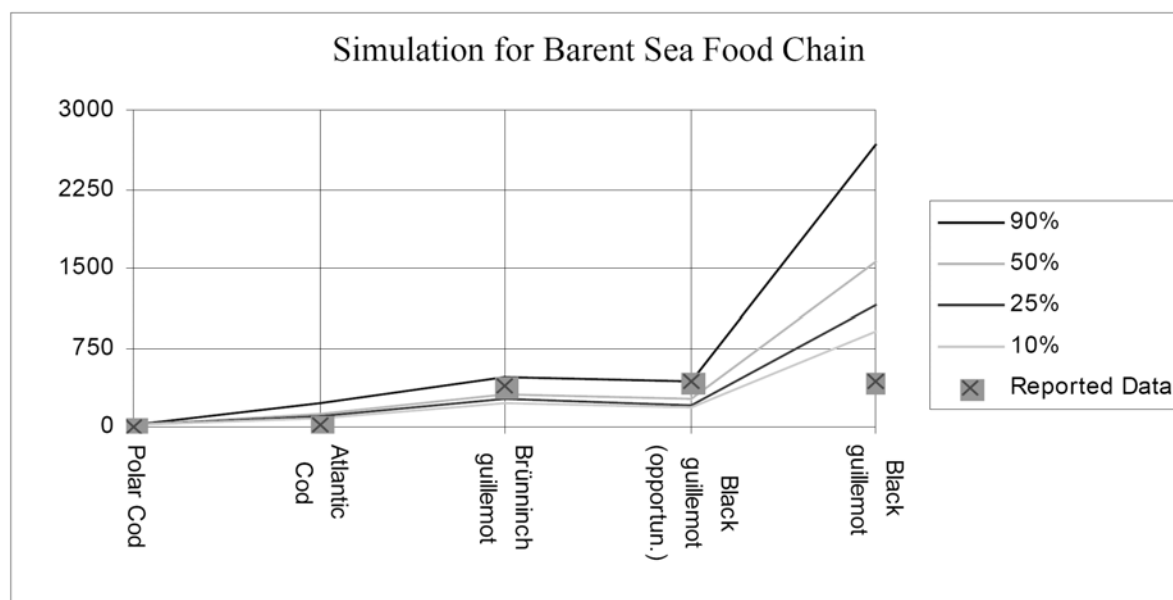


Figure 7. Comparison between PCB 153 concentration in Barents Food Chain reported by Hop and probabilistic estimations generated by the biomagnification model for this compound.

Table 1. A summary of input parameters and probability distribution for PCB 153 that are used in the Barent Sea food chain model calculation

Input	Fish ^a				Birds ^b	
	Distribution type	Mean	Std dev	Distribution type	Mean	Std dev
Elimination rate	Normal	0.0095	Uniform distribution (0.0014-0.0033)	Normal	0.0049	Uniform distribution (0.0007-0.0017)
Assimilation efficiency	Normal	0.58	0.11	Truncated Normal	0.82	0.16
Feeding rate	-	0.2	-	-	0.15	

^a data extracted from Dabrowska et al 1999, Fisk et al, 1998, Dick and Van Der Linde 1995, Harrad and Smith 1998

^b data extracted from Drouillard et al 2001

Annexe 3

Polychlorinated biphenyls in Fish from the Gironde estuary (France)

N. Tapie, H. Budzinski* and K. Le Ménach.

Laboratoire de Physico-Toxico Chimie des systèmes naturels (UMR 5472 CNRS),
Université Bordeaux 1, 341 cours de la Libération 33405 Talence, France.

* Corresponding author: h.budzinski@lptc.u-bordeaux1.fr

Abstract

The interest of the study of polychlorinated biphenyls (PCBs) has been revived these last years because of their toxic properties (carcinogenicity, teratogenicity, immunotoxicity, endocrine disruption...), and the recent re-evaluation of neurotoxicity. This paper investigates contamination levels of the trophic food web in the Gironde estuary (south west coast of the France). This estuary is well known for its metallic contamination, but there are few data on the organic one. In this study, twenty individual congeners were determined comprising the seven prior PCB as marker of PCB contamination in seven species: european eel (*Anguilla anguilla*), sea bass (*Dicentrarchus labrax*), meagre (*Argyrosomus regius*), sole (*Solea vulgaris*), flounder (*Platichthys flesus*), mullet (*Liza ramada*) and sturgeon (*Acipenser baeri*). Eels et sturgeon are more contaminated as other species. Both species present high level of contamination for the 7 prior PCB in muscle respectively about 1000 ng.g⁻¹ dw and 600 ng.g⁻¹ dw. Muscles of other studied species show average value of contamination are less than 200 ng.g⁻¹ dw for the 7 prior PCB. (Bass 180 ng.g⁻¹ dw, Flounder 180 ng.g⁻¹ dw, Mullet 110 ng.g⁻¹ dw, Meagre 90 ng.g⁻¹ dw, Sole 50 ng.g⁻¹ dw).

Moreover, to understand the mechanism of trophic transfer, the contamination of the pelagic food web (copepods 170 ng.g⁻¹ dw, mysids 80 ng.g⁻¹ dw, shrimps 150 ng.g⁻¹ dw and black gobies 230 ng.g⁻¹ dw) was also characterised for the 7 prior PCBs.

Keywords : PCBs, Gironde estuary, food web, fish, plankton.

I. Introduction

A large number of studies have demonstrated that many organic compounds are present in the marine environment; the highest concentrations have often been detected in estuaries and coastal areas (Voorspoels et al, 2004; Leah et al., 1997). Among the thousands of anthropogenic substances produced and released into the aquatic environment, Polychlorobiphenyls (PCBs) have aroused a great interest because of their toxic properties (carcinogenicity, teratogenicity, immunotoxicity, endocrine disruption...) (Iwasaki et al., 2002, Bernes et al., 1998, Ville et al., 1995), and the recent re-evaluation neurotoxicity. (Sharma et Kodavanti, 2002, Aoki et al., 2000, Schantz, 1998). PCBs consist of 209 congeners differing in number and position of chlorine atoms on biphenyl structure. Each compound has its own unique chemical, physical, and toxicological properties that depend on the number and position of chlorine atoms. They were used in a lot of applications due to their insulating and fire retardant properties. The production of PCBs started in the USA, Germany and France in 1930. Despite the fact that PCB production ceased during the eighties, they are still present in the environment. In France, their production was banned since 1987.

They were first identified in the environment by Jensen (Jensen, 1966) in Sweden. Since this date, PCBs have been found in numerous environmental matrices. Several papers have studied to what extent organisms are exposed to the contamination of the various compartments from the environment. (Braune et al., 2005; Harding et al., 1997).

In the present study, we report concentrations of PCBs in the estuarine food web of the Gironde estuary in the southwest of France (Europe). This estuary is well known for its cadmium contamination (Baudrimont et al., 2005, Schäfer et al., 2002), but there are few data on its organic contamination (Budzinski et al., 1997).

The objective of this study is on the one hand to draw a view of fish contamination in the Gironde estuary. The Gironde estuary is a good reference estuary showing the largest assemblage of migratory amphihaline fish (European eel, flounder, mullet, sea lamprey, river lamprey...) and with marine adventitious species that appear in the estuarine zone during spring and summer in the lower and middle parts of the estuary, when environmental conditions and salinity are particularly suitable (Lobry et al, 2003). Particularly, a lot of marine juvenile species appear in this estuary during summer. In this respect it is important to gain a better knowledge of its potential chemical contamination.

In this study, different species were selected: eel (*Anguilla anguilla*), bass (*Dicentrarchus labrax*), meagre (*Argyrosomus regius*), sole (*Solea vulgaris*), because of their economic interest and condition of life. Eel and mullet are catadromous fish, meagre, bass and sole are marine species that spend part of their life in the estuary. Flounder (*Platichthys flesus*) that spends most of its life in the estuary was chosen as sentinel species. Moreover, its feeding preference (benthic fauna) makes it particularly vulnerable to sediment contamination. On the other hand, to understand the mechanism of trophic transfer, the contamination of the pelagic food web (copepod, mysid, shrimp and black goby) was characterised. Sturgeons (*Acipenser baeri*) escaped from a farm since December 1999 were also caught in this study.

II. Materials and Methods

1. Sampling area

The Gironde estuary, one of the largest in Western Europe (170 km), is located in the south western part of France (Figure 1). It is generally considered as a little contaminated macrotidal estuary. It is the result of the confluence of the Garonne and Dordogne rivers at the "bec d'Ambes", its surface area is approximately 625 km² at the tide (Lobry et al., 2003).

This estuary is characterized by a more or less permanent high turbidity zone mainly composed of suspended matter with concentration about 1 g/l at the surface and 10 g/l near the bed (Sottolichio and Castaing, 1999). The position and the extension of this turbidity zone depend on the river discharge and the tide. This high turbidity zone seems to control the

biological turn over (bacterial development, plankton growth, zooplankton grazing), physico chemical processes and indirectly fish communities.

2. Sample Collection

Organisms were collected in May and September 2001 on board of the "Esturial" research vessel in the Gironde estuary. The strategy of sampling has permitted to catch a large number of species and individuals living in this area for a first screening of PCB contamination. Fish european eels (*Anguilla anguilla*), bass (*Dicentrarchus labrax*), sturgeon (*Acipenser baeri*), flounder (*platichthys flesus*), meagre (*Argyrosomus regius*), mullet (*Liza ramada*), and sole (*Solea vulgaris*) were caught in a sampling area between PK 50 and PK 90 in haline sector and dissected on board. Biometric values (weight, length) were noted and parts of liver and caudal muscle were taken and kept in aluminium containers at -20°C until chemical analysis.

Plankton (gammarus, mysids, copepods) and other little species (shrimp, black goby) were collected in May 2002 in the Gironde estuary in the middle estuary at Pauillac (PK 50) to illustrate contamination of first trophic levels.

3. Chemical analyses

In order to determine polychlorobiphenyl concentration, the following method was used. First, samples were freeze-dried and then crushed. Aliquots (1 g) of homogenised samples were taken for extraction. Internal standards, 4 PCB (CB 30, CB 103, CB 155, CB 198) were gravimetrically added to matrix prior to extraction. The PCB congeners analysed and the internal standards were obtained from Cluzeau info labo (Sainte Foy la Grande, France, purity 99%). Then, samples were extracted by microwave assisted extraction (MAE, 30 W 10 min) with dichloromethane (Ultra resi analysed, Atlantic Labo, Eysines, France) (Budzinski et al., 1996; Thompson 1998). The extract was filtered in order to eliminate matrix residue. This extract was purified by shaking 5 times with sulphuric acid (sulfuric acid 95-98 %, extra pure, Scharlau, ICS, Belin Beliet, France).

Organic and acid phases were separated, the organic extract was neutralised with deionised water and dried with anhydrous sodium sulphate (Fluka Chemic, Buchs, Switzerland). Then, the extract was concentrated to perform a second purification on a column of silica gel 60 (Merck, VWR, Strasbourg, France). PCBs were eluted with 3×5 ml of a mixture of dichloromethane and pentane (10/90, v/v) (Nanograde, Mallinckrodt chemicals, Atlantic Labo, Eysines, France). The extract was concentrated under a gentle stream of nitrogen and transferred to isooctane (Nanograde, Mallinckrodt chemicals, Atlantic Labo, Eysines, France) for injection.

Analyses were performed on an HP 5890 series II gas chromatograph (Hewlett-Packard, Avondale, MA) coupled to a ⁶³Ni electron capture detector (ECD). A capillary column HP 5 MS (Hewlett-Packard, Avondale, MA) was used (60 m, 0.25 mm diameter, 0.25 film thickness) for PCB's analyse. Helium (He, 5.6 quality, Linde gas, Toulouse, France) was used as carrier gas at a flow rate of 1ml/min⁻¹ and nitrogen (N₂, 5.0 quality Linde gas, Toulouse, France) was used as make up gas at 60 ml/ min⁻¹. The GC conditions are as follows: splitless injection (1 µl); injector temperature, 280°C; detector temperature, 280°C; initial oven temperature, 80°C. The temperature program was 80°C for 2 min, 6°C/min to 120°C, 120°C during 5 min, 2°C/min to 280°C and 20 min at 280°C.

Twenty individual congeners were determined by this method (CB 8, CB 18, CB 28, CB 52, CB 44, CB 66, CB 77, CB 87, CB 101, CB 105, CB 118, CB 128, CB 138, CB 153, CB 170, CB 180, CB 187, CB 195, CB 200, CB 206, CB 209). The relative response factor of the different compounds was determined by injecting a standard reference material SRM 2962 (chlorinated biphenyl congener in 2,2,4, trimethylpentane) that was provided by the National Institute of Standards and Technology (NIST, Gaithersburg, MD, USA), spiked with the same

solution of internal standards CB 30, CB 103, CB 155, CB 198 that was used for spiking samples. Blank injections of isooctane were performed between each sample injection to ensure the cleanliness of the GC ECD injector.

For quality assurance, procedural blanks were regularly performed during the extraction process (representing less than 10% of the sample content) and all results presented are corrected taking into account blank levels. The validity of this method for PCB analysis was confirmed by extraction and analyse of a certified matrix SRM 2977 (mussel tissues, *Perna perna*, from Guanabara Bay, Brazil) provided by the NIST (Gaithersburg, MD, USA) was analysed. Recovery percentages of analysed PCBs are higher than 80% and for the majority of compounds, variability is less than 15% (n=3), demonstrating close agreement. Moreover for all series of sample analysed, one internal control matrix (muscle of eels) was also analysed. Analysed performed over a period of 10 month shows a variability of about 15 % for 7 prior PCB.

4. Lipid content

The lipid content of each sample was estimated by microwave assisted extraction (MAE). Few milligrams of sample were extracted with dichloromethane (30 W, 10 min, 20 ml). Solvent extracted global lipids, and then the organic extract was filtered and evaporated. The residue was weighed in order to estimate gravimetrically the lipid content of samples. The lipid content was expressed in percentage of lipid per dry weight

III. Results

1. Biometric results

Biometric values and lipid contents of each species are shown in Table 1. Fishes sampled present a good homogeneity of length and weight except for bass and meagre (respectively in May 536 ± 127 g and 2954 ± 1084 g and in September 1464 ± 1109 and 565 ± 89 g). This variability makes seasonal comparison of PCB contamination difficult for these two species. For other species weight differences are less pronounced: eel weight was about 510 ± 150 g, flounder 230 ± 40 g, mullet 840 ± 150 and sole 330 ± 180 g.

2. PCB levels

2.1. Level of the 7 prior PCBs

For this study, two organs of 84 individuals have been analysed. The 21 analysed PCB congeners were detected in all samples of muscle and liver. Results obtained for the 7 prior PCBs (CB 28, 52, 101, 118, 138, 153 and 180) in fish from the Gironde estuary are listed in Table 2. PCB concentration varied in organs and organisms but a relatively homogenous distribution inside the same species can be observed. For bass, flounder, meagre, mullet and sole analysed, liver is more contaminated than muscle. These results are concordant with other studies in these species (Ferreira et al, 2004; Antunes and Gil, 2004; Ashley et al., 2003). This phenomenon could be explained by the lipid content of liver (between 10 and 20 % of the dry weight) that is higher than lipids content in muscle for these species (between 2 and 10 % of the dry weight). Moreover liver is the organ where enzymatic activities take place for xenobiotique degradation.

Eel and sturgeon show similar level of contamination in muscle and in liver. These two species are high lipid content fish (approximately 50 % of lipids taking into account the dry weight for muscle). Eel is the only specie in this study to present lipid content of muscle above liver (respectively 50 and 15 % of the dry weight). Eel and sturgeon are also the most contaminated fish analysed in this study, respectively about $1000 \text{ ng.g}^{-1} \text{ dw}$ and $600 \text{ ng.g}^{-1} \text{ dw}$ for muscle. All the other analysed fish present values less than $250 \text{ ng.g}^{-1} \text{ dw}$ for muscle. Fish

from Gironde estuary are relatively high contaminated for an ecosystem characterised by a low contamination of its abiotic compartment. Sole liver (about 3300 ng.g⁻¹ lipid weight) present the same level of contamination than sole caught in western scheldt estuary (Netherland) between 1500 and 4000 ng.g⁻¹ lipid weight (Voorspoels et al., 2004). Flounder analysed in this study show highest level of contamination than flounder from Douro estuary, Iberian peninsula (respectively in muscle about 180 ng.g⁻¹ dw against 50 ng.g⁻¹ dw). On the contrary contamination level of mullet in this area is higher than contamination of mullet in Gironde estuary (respectively in muscle about 100 ng.g⁻¹ dw against 300 ng.g⁻¹ dw) (Ferreira et al, 2004). Both area western scheldt estuary and Douro estuary are considered as contaminated area. However contamination of analysed species is lower as contamination observed in Stripped bass and American eel in the Hudson River estuary, that is considered as a heavily contaminated area (respectively for bass, 700 to 8 000 ng.g⁻¹ dw and for eel, 200 to 20 000 ng.g⁻¹ dw).

No significant seasonal variation in PCB concentrations could be observed between May and September. The levels of contamination seem to vary according to trophic level of the species, lipid content of each fish but also the position of the organism in the water column. Fish ecology and physiology is expected to affect bioaccumulation (factors related to diet, feeding and assimilation rate, growth rate, and lipid loss through metabolism or egg laying) (Ashley et al, 2003).

2.2. PCB Pattern of fish

A similar tissue congener distribution pattern can be observed for all sampled fishes (Figure 2). The profile is dominated by hexachlorinated compounds, especially CB 153 (20-30 % of total PCB), well known for its capacity for bioaccumulation, and by CB 138 (10-20 % of total PCB). Then, heptachlorinated congeners (particularly CB 180, 10-20% of total PCB) and pentachlorinated compounds account also for an important part (about 15 % of total PCB). Low chlorinated PCBs (bichlorinated, trichlorinated and tetrachlorinated compounds) have almost disappeared from the general pattern (less than 10 % of total PCB), probably biodegraded by first trophic levels or by fish themselves (De Boer et al, 1993). This pattern holds true for the majority of fish contaminated by PCBs (Monosson 2003, Ferreira 2004).

3. Bioaccumulation of PCB

PCBs are now well known for their capacity for bioaccumulation (Oost 2003, Harding 1997). In the Gironde estuary, the pelagic food web is complicated; few species spend their entire life cycle in the estuary (Lobry et al., 2003). In this way, PCB patterns analysed in this study show the result of bioaccumulation during all life of fish and not exclusively related only to estuary contamination. However, these fish live quite an important part of their lives in this estuary, and are exploited by the local population that is why it is interesting to understand the mechanism of contamination in this system and the potential impact of contamination on the local population. The results obtained for 7 indicators PCB in the Gironde estuary pelagic food web organism are shown in Figure 3.

The trend of bioaccumulation is not clear, and underlines a relatively high contamination of low trophic level, especially copepods (176 ± 5 ng.g⁻¹ dw) in comparison with contamination level of the abiotic part (less than 15 ng.g⁻¹ dw for particles). In seine estuary level of PCB in copepod (*Eurytemora affinis*) vary from 300 to 1100 ng.g⁻¹ dw, and particles from 240 to 342 ng.g⁻¹ dw (Cailleaud Tidal Cycle, 2006). Bioaccumulation factors between particulate matter and copepods in the Seine estuary, that is considered as a heavily contaminated area, is lower than those observed in Gironde estuary respectively 2-3 for the Seine Estuary and 7-8 for the Gironde estuary (Cailleaud Tidal Cycle, 2006). That proves a particular functioning of the trophic food web in the Gironde estuary.

A high contamination of eel and sturgeon (more than 1000 ng.g⁻¹ dw for eel) is also observed, probably due to the high lipids content of these fishes, and to their feeding preferences.

Differences in rates of uptake and metabolic degradation/elimination of certain congeners (Stapleton et al., 2001, Goerke and Weber, 2001) may alter both the magnitude and pattern of accumulated PCBs. That is why in order to understand the mechanism of accumulation, molecular ratios such as CB 118/153 has been investigated (Figure 4, Table 3). This ratio can be put in evidence diet effect or metabolic activities.

Globally, the CB 118/153 ratio decreases from particulate matter to eel and bass. This ratio seems to be in correlation with the trophic position. Particulate matter is characterised by a high value of this ratio, its pattern is dominated by pentachlorinated compounds, which are less presents in organisms because of depuration mechanisms. Little decapods (Copepods, mysids and shrimps) present the highest ratio in organism (about 0.3) probably due to place in the basement of the pelagic food web. Mulletts supposed to be herbivorous, sole and flounder that eat at the surface of sediments (principally benthic invertebrates) presents intermediary ratio CB 118/153 (about 0.25). And then meagres, eels and bass that are considered as top predator show lower ratio (about 0.2), due to the metabolic degradation of CB 118 along the food chain.

Data from literature show quite similar results for this ratio CB 118/CB 153 with a decrease of this ratio when the trophic level increase. Voorspoels et al (2004) present value around 0.9 à 0.5 for shrimp (*Crangon crangon*), and about 0.2 à 0.3 for sole (*Solea solea*) from the Western Scheldt estuary. Ferreira et al (2004) present similar value for flounder (0.3) and for mullet 0.2. This ratio illustrates the metabolic capacities of metabolisation of each species and its feeding preference.

IV. Discussion

The Gironde estuary is considered as a little contaminated estuary, nevertheless PCB levels in the biota of this system are relatively important in with comparison other estuaries. Compared to the Seine estuary (Loizeau, 2001), that is considered as the most contaminated estuary in France, organism of the Gironde estuary are less contaminated than Organisms from the Seine estuary, but not as much as expected. Copepods from the Seine show values about (900 ng.g⁻¹ dw), and the mean value in the Gironde is about 200 ng.g⁻¹ dw. Bioaccumulation factors between particulate matter and copepods is higher in gironde estuary as in Seine estuary (respectively 7-8 and 2-3)

These first results about the Gironde contamination seem to put in evidence a particular process in this estuary. This particular contamination could be explained by the role of the high turbidity zone (HTZ) which seems to control physico-chemical processes and the biological turn over. High levels of particles that are little contaminated induce an increasing concentration of the water column compared with a system with low turbidity. Particles could be considered as reservoir, and sources of contamination. Indeed, biota contamination could result from low and continu exposure due to the high turbidity zone. However, it is interesting to note that in this system, light is a limiting factor, which controls and reduces primary production. (Etcheber 1986, Sautour 1995) and permits the development of a bacterial loop, dominated by heterotrophic communities. This type of communities is suspected to lead to more efficient transfer of hydrophobic contaminants to higher trophic levels than a community dominated by phytoplankton. (Wallberg, 1997, Anderson 1998).

Fish from the Gironde estuary, particularly eels, show high levels of contamination by PCBs. Table 4 shows a comparison of our data with other studies. Nevertheless, the level of contamination in the Gironde Estuary, if we considered eel as sentinel species, is lower than in the Hudson river (Asley et al., 2003) or in Amsterdam, the Netherlands (Van der Oost et al., 1996). However such levels of contaminants could pose problems for eels, PCB exposure

reduces the spawning success of mature females, decreasing in particular the mean weight of eggs by interfering with ovarian development (Johnson et al., 1998). Moreover, the level of contamination of fish and particularly eel, fished and eaten by the local population is alarming. This species could raise sanitary problems with regards to French recommendations. In 2003, the AFSSA (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments) recommended an ADI (Acceptable Daily Intake) of 0.02 µg/kg/days, concentration expressed in aroclor 1254 equivalent. If considering a typical man of 75 kg, he can only eat 20g of eel by week to respect this directive, instead of a normal portion of fish (about 150g). Calcul of consumable quantity of other fishes are showed Table 5. These results are worrying for local populations which regularly eat fish caught in Gironde estuary. Moreover only globular PCBs have been investigated in the study, it could be sensible to investigate contamination level of others compounds that have similar properties such as dioxine, PCB dioxine like, flame retardants...

Fortunately, few people eat exclusively fish of Gironde estuary, and global risk for human being is relatively weak, moreover it is difficult to correlated environmental exposition of PCB to effect on population (Swanson et al., 1995).

V. Conclusion

The analysis of PCBs in the Gironde ecosystem has shown a relatively important concentration of these compounds. Two species (eel and sturgeon) could raise sanitary problems. It appears necessary to understand trophic relations in this system to really approach the ways of contamination. Molecular ratios of nitrogen and carbon could be a good approach to identify the real trophic position of the studied species. It seems also necessary to explore the contamination of the first trophic level of the system.

Acknowledgements

This work was supported by Gis Ecobag and Région Aquitaine. Cemagref (Cestas, France) and LEESA (University Bordeaux1) are thanked for their help during the sampling cruises and for information given on the biological aspect.

References :

- Aoki Y., *Environmental Research*, 86 (2001) 2-11.
- Antunes P., Gil O., *Chemosphere*, 54 (2004) 1503-1507.
- Ashley J.T.F., Horwitz R., Steinbacher J.C., Ruppel B., *Marine Pollution Bulletin* 46 (2003) 1294-1308.
- Bernes C., Naylor M., *Persistent Organic Pollutants: A Swedish View of an International Problem*. Monitor 16. Stockholm : Swedish Environmental Protection Agency. (1998).
- Braune B.M., Outridge P.M., Fisk A.T., Muir D.C.G., Helm P.A., Hobbs K., Hoekstra P.F., Kwan M., Letcher R.J. et al., *Science of The Total Environment*, 351-352 (2005) 4-56.
- Baudrimont M., Schäfer J., Marie V., Maury-Brachet R., Bossy C., Boudou A.; Blanc G., *Science of The Total Environment*, 337 (2005) 265-280.
- De Boer J., et al, *Chemosphère*, 26 (1993)1823-1842.
- De Boer J., et al, *Environ Sci Technol* 28 (1994) 2242-2248.
- Etcheber H. (1986). *Biogéochimie de la matière organique en milieu estuarien : comportement, bilan, propriétés. Cas de la Gironde*. Mém.Inst.Géol.Bassin d'Aquitaine, 19,379 pp.

-
- Ferreira M., Antunes P., Gil O., Vale C., Reis-Henriques M.A., *Aquatic Toxicology* 69 (2004) 347-357.
- Goerke H., Weber K., *Mar. Environ. Res.*, 51 (2001)131-149.
- Harding G.C., LeBlanc R.J., Vass W.P., Richard Addison F., Barry Hargrave T., Sifford Pearre Jr., Dupuis A. and Brodie P.F., *Marine Chemistry*, 56 (1997) 145-179.
- Johnsson L.L., Misitano D., Sol S.Y., Nelson G.M., French B., Ypitallo G.M. and Hom T., *Trans. Am. Fish. Soc.*, 127 (1998) 375-92.
- Leah R., Johnson M.S., Connor L., Levene C., *Marine Environmental Research*, 43 (1997) 345-358.
- Lobry J., Mourand L., Rochard E.; and Elie P., *Aquatic Living Resources*, 16 (2003) 47-58.
- Loizeau V., Abarnou A., Cugier P., Jaouen Madoulet A., Le guellec A.M. et Menesguen *Marine pollution bulletin*, 43 (2001) 242-245.
- E. Monosson, A. Ashley, A.E. McElroy, D. Woltering, A.A. Elskus, *Chemosphere* 52 (2003) 777-787.
- Budzinski H., Jones I., Bellocq J., Piérard C. et Garrigues P., *Marine Chemistry*, 58 (1997) 85-97.
- Sautour B., Castel J., *Hydrobiologia*, 311 (1995)139-151.
- Swanson M., Ratcliffe E., Fisher L.J., *Regulatory toxicology and pharmacology* 21 (1995) 136-150.
- Schantz S.L., *Neurotoxicology and Teratology*, 18 (1996) 217-227.
- Schantz S.L., *Neurotoxicology and Teratology*, 20 (1998) 349.
- Sharma R. and Kodavanti P. R. S., *Toxicology and Applied Pharmacology*, 178 (2002)127-136.
- Schäfer J., Blanc G., Lapaquellerie Y., Maillet N., Maneux E. and Etcheber H., *Marine Chemistry*, 79 (2002) 229-242.
- Stapleton H.M., Letcher R.J., Baker J.E., *Environmental Science and Technology* 35 (2001) 4747-4752.
- Voorspoels S., Covaci A., Maervoet J., De Meester I., Schepens P., *Marine pollution bulletin* 49 (2004) 393 – 404.
- Wallberg P., Bergqvist P.A., Andersson A., *Hydrobiologia* 357 (1997) 53-62.

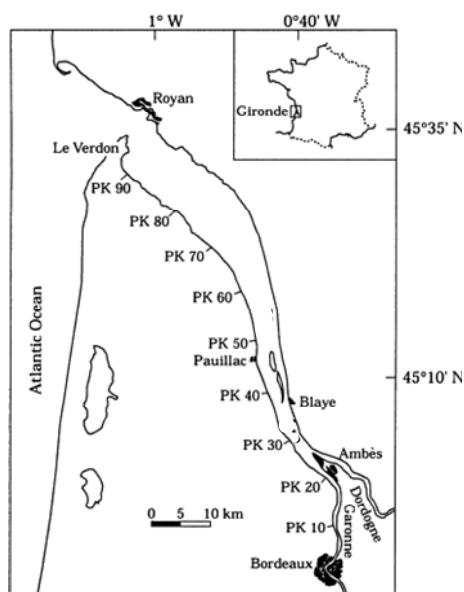


Figure 1 : The Gironde estuary localised in south west of France.

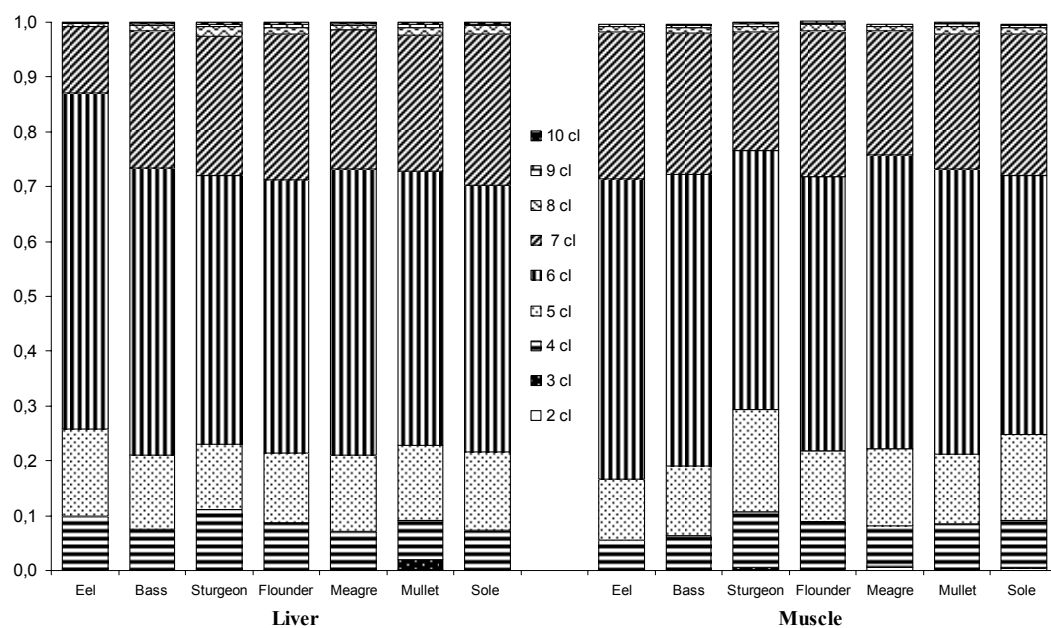


Figure 2 : Distribution of PCB congeners in liver and muscle fishes sampled in Gironde estuary (2 Cl = CB 8, 3 Cl = CB 18, 28, 4 Cl = CB 44, 52, 66, 5 Cl = CB 87, 101, 105, 118, 6 Cl = CB 128, 138, 153, 154, 7 Cl = CB 170, 180, 187, 8 Cl = CB 195, 200, 9 Cl = 206, 10 Cl = CB 209).

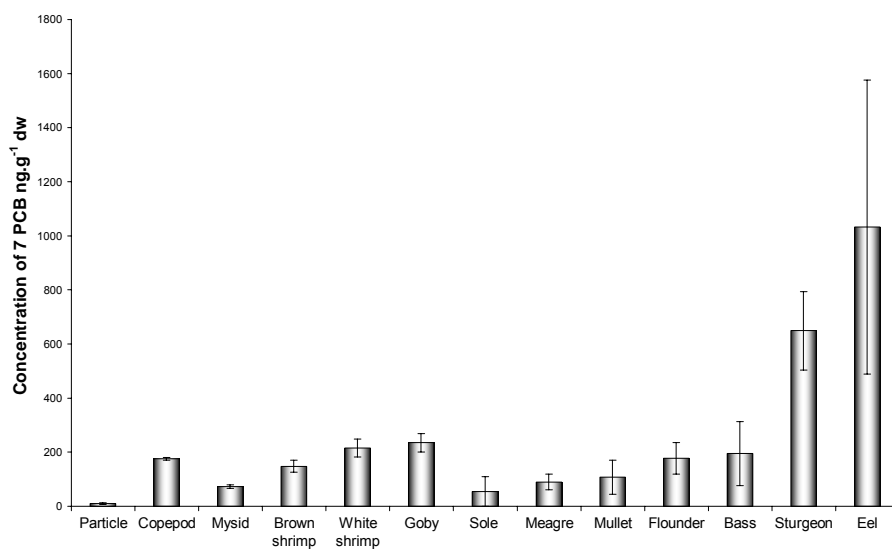


Figure 3 : Levels of 7 PCBs in fish (muscle) and in the first trophic level of Gironde estuary (total organisms) (ng.g⁻¹ dw).

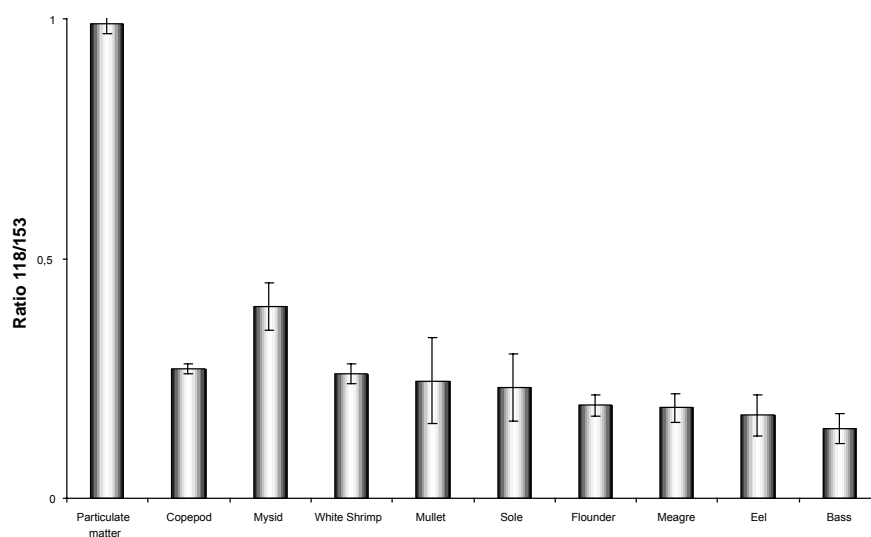


Figure 4 : Molecular ratio CB 118/153 in organism of Gironde estuary

	Species	n	Length (cm)	Weight (g)	Lipid content Muscle (%)	Lipid content Liver (%)
May	Eel	10	62 ± 7	500 ± 182	46 ± 9	15 ± 4
September		7	64 ± 6	534 ± 138	51 ± 10	14 ± 5
May	Bass	5	35 ± 3	536 ± 138	5 ± 2	12 ± 4
September		7	48 ± 11	1464 ± 1109	5 ± 4	10 ± 6
May	Sturgeon	4	58 ± 6	1037 ± 827	43 ± 2	53 ± 11
September		1	-	-	47	66
May	Flounder	5	28 ± 2	241 ± 44	3 ± 1	32 ± 11
September		8	28 ± 4	226 ± 92	6 ± 3	33 ± 10
May	Meagre	6	63 ± 10	2954 ± 1084	7 ± 4	35 ± 10
September		8	34 ± 3	565 ± 89	8 ± 4	33 ± 16
May	Mullet	8	39 ± 14	1060 ± 215	4 ± 3	20 ± 14
September		7	38 ± 2	616 ± 140	4 ± 2	17 ± 9
May	Sole	5	45 ± 3	358 ± 170	2 ± 0.2	23 ± 14
September		3	32 ± 8	303 ± 195	5 ± 3	31 ± 11

Table 1 : Summary of biometric data and lipid content of fish collected in the Gironde estuary

	Species	n	Sum of 7 PCB (ng.g ⁻¹ dw)		Sum of 7 PCB (ng.g ⁻¹ lipid)	
			Muscle	Liver	Muscle	Liver
May	Eel	10	849 ± 295	510 ± 171	1847 ± 459	3586 ± 2048
September		7	1217 ± 544	561 ± 269	2368 ± 953	4100 ± 1218
May	Bass	5	120 ± 40	581 ± 268	2697 ± 1210	4149 ± 696
September		7	242 ± 196	706 ± 389	5863 ± 2717	7384 ± 2002
May	Sturgeon	4	562 ± 145	675 ± 94	1313 ± 363	1319 ± 338
September		1	737	897	1571	1369
May	Flounder	5	148 ± 70	1173 ± 487	5687 ± 3405	3656 ± 1132
September		8	208 ± 58	2597 ± 1116	4531 ± 2710	8548 ± 5273
May	Meagre	6	97 ± 71	507 ± 207	1661 ± 322	1556 ± 781
September		8	83 ± 29	438 ± 162	1155 ± 325	1408 ± 397
May	Mullet	8	96 ± 60	1062 ± 413	3436 ± 1973	6568 ± 2793
September		7	121 ± 63	499 ± 225	2826 ± 1208	3073 ± 900
May	Sole	5	32 ± 13	764 ± 191	2184 ± 1067	3906 ± 1329
September		3	77 ± 55	799 ± 355	1463 ± 482	2654 ± 940

Table 2 : Concentrations of 7 PCBs (28, 52, 101, 118, 138, 153, 180) expressed in ng/g dry weight, and ng/g lipid in different fish collected in the Gironde estuary.

	May			September		
	n	Muscle	Liver	n	Muscle	Liver
Eel	10	0.163 ± 0.18	0.284 ± 0.11	7	0.173 ± 0.04	0.293 ± 0.08
Bass	5	0.312 ± 0.23	0.300 ± 0.17	7	0.145 ± 0.03	0.143 ± 0.03
Sturgeon	4	0.196 ± 0.05	0.233 ± 0.007	1	0.501	0.163
Flounder	5	0.282 ± 0.14	0.213 ± 0.06	8	0.194 ± 0.02	0.263 ± 0.13
Meagre	6	0.195 ± 0.04	0.310 ± 0.33	8	0.190 ± 0.03	0.240 ± 0.13
Mullet	8	0.177 ± 0.03	0.185 ± 0.04	7	0.245 ± 0.09	0.194 ± 0.11
Sole	5	0.336 ± 0.14	0.188 ± 0.10	3	0.231 ± 0.07	0.305 ± 0.12

Table 3 : Molecular ratio CB 118/153 in fish of the Gironde estuary.

Sampling site	Author	Number of fish	Average length (cm)	Average weight (g)	PCB concentration ng/g ww	
Poland	Lake Druglin Duzy	Green peace technical note 12/2005	5	51	218	2
Ireland 1	Lake Furnace	Green peace technical note 12/2005	5	46	177	4
France 2	Nantes	Green peace technical note 12/2005	5	37	88	5
Ireland 2	Owengarve River	Green peace technical note 12/2005	5	27	31	5
Netherlands	Harinxmakanaal	Green peace technical note 12/2005	2	38	108	16
France	Etang de thau	Green peace technical note 12/2005	5	47	179	29
Spain	River Turia	Bordajandi et al 2003	11	-	-	29
Spain	River mino	Green peace technical note 12/2005	4	44	152	54
Czech	River Otava	Green peace technical note 12/2005	2	52	250	66
France	Vaccares Lagoon, Mornes	Roche 2002	7	-	200	83
Belgium	Canal charleroi bruxelles	Green peace technical note 12/2005	4	58	415	97
Italy	Bracciano Lake	Green peace technical note 12/2005	2	57	374	120
Spain	River Ebro	Green peace technical note 12/2005	5	36	84	123
France	Vaccares Lagoon, Capelière	Roche 2002	5	-	72	125
UK	River Thames	Green peace technical note 12/2005	5	59	475	136
Netherlands	Noordzee Kanal	Green peace technical note 12/2005	2	39	114	165
Czech	River Elbe	Green peace technical note 12/2005	2	47	166	184
Germany	River Weser	Green peace technical note 12/2005	5	57	309	196
Netherlands	Amsterdam Lake Gaasperplas	Van der Oost (1996)	16	47	142	237
Netherlands	Amsterdam Diemerzeedijk	Van der Oost (1996)	10	48	190	247
US	Delaware river below trenton	Ashley et al 2003	6	56	350	290
Germany	River Elbe	Green peace technical note 12/2005	5	59	379	327
France	Gironde estuary	this study	17	63	517	350
Germany	River Rhein	Green peace technical note 12/2005	5	60	326	381
US	Raccoon creek NJ	Ashley et al 2003	8	52	330	450
Netherlands	Amsterdam Enclosed IJ	Van der Oost (1996)	10	49	183	462
Italy	Tevere River	Green peace technical note 12/2005	5	36	96	483
Netherlands	Amsterdam Amerika harbour	Van der Oost (1996)	10	50	201	536
US	Raritan Bay NJ	Ashley et al 2003	4	43	190	550
Germany	River Elbe	Green peace technical note 12/2005	5	68	580	566
Netherlands	Amsterdam Volgermeerpolder	Van der Oost (1996)	10	62	414	584
Netherlands	Amsterdam Lake Nieuwe	Van der Oost (1996)	10	46	134	772
US	Delaware river near Ft mifflin	Ashley et al 2003	5	60	455	800
Netherlands	Hollandsdiep	Green peace technical note 12/2005	2	40	126	1 512
US	Hudson River at GW Bridge	Ashley et al 2003	5	55	300	2 000
US	Hudson river Albany, NY	Ashley et al 2003	5	47	160	3 250
US	Hudson river Newburgh, NY	Ashley et al 2003	5	60	430	3 865

Table 4 : Comparison of eel contamination over the World

	Muscle concentration		AWI	Consumable quantity
	7 PCB (ng.g ⁻¹ ww)	arochlor 1254 equivalent (ng.g ⁻¹ ww)	Acceptable weekly intake (ng)	of fish (g)
Sole	14	27	10 500	385
Meagre	23	45	10 500	233
Mullet	27	54	10 500	194
Brown	37	74	10 500	142
Flounder	45	89	10 500	118
Bass	49	98	10 500	108
White shrimp	54	108	10 500	98
Sturgeon	162	325	10 500	32
Eel	258	517	10 500	20

Table 5 : Consumable quantities of fish to be in agreement with the AFSSA advice.