Partenariat scientifique

PROGRAMME DE RECHERCHE
2007/2009 de PELAGOS France

EVALUATION DU NIVEAU DE CONTAMINATION D'ESPÈCES ODONTOCÈTES ET MYSTICÈTES DU SANCTUAIRE PELAGOS

- RAPPORT FINAL-

Rédigé par :

Sophie LARAN, Emilie PRACA, Nathalie TAPIE, Hélène BUDZINSKI, Thierry LEGAVRE , Denis ODY

Contrat : 09 042.83400 du 14/09/09

CONTRAT DE PARTENARIAT

Entre :

Le Parc national de Port-Cros

(Animateur de PELAGOS France)

Castel Ste Claire, rue Ste Claire

83418 Hyères cedex

Représenté par son Directeur,

Et :

Le Groupement d'Intérêt Scientifique pour les mammifères marins en Méditerranée et leur environnement,

GIS 3M

Castel Ste Claire, rue Ste Claire

83418 Hyères cedex

Représenté par son Président,

Les Partenaires de cette étude

GIS3M :

- WWF-France – Coordinateur
- Centre de Recherche sur les Cétacés – CRC - Marineland
- EcoOcéan-Institut
- GECEM : Groupe d'Etude sur les Cétacés de Méditerranée

Autres partenaires :

- ISM / LPTC (UMR CNRS 5255) - UNIVERSITE BORDEAUX 1
- CIRAD - Département BIOS UMR DAP
- Laboratoire d'Océanologie, Université de Liège (Belgique)
- Laboratoire d'Ecologie Animale et Ecotoxicologie, Université de Liège (Belgique)
- RNE (Réseau national Echouage)
- CIRCE (Conservation, Information and Research on Cetaceans).
- Programme mondial *Cachalote Consorsium - Southwest Fisheries Science Center, NOAA Fisheries*.
- Laboratoire d'Océanologie, Université de Liège (Belgique)
- Laboratoire d'Ecologie Animale et Ecotoxicologie, Université de Liège (Belgique)

Avec le soutien de :

- Sanctuaire PELAGOS – Partie française
- Agence de l'eau
- Institut Océanographique Paul Ricard
- Fondation Nicolas Hulot
- BP Marine France - Angleterre

RÉSUMÉ

Au cours de quatre années de campagnes en mer menées par le Centre de Recherche sur les Cétacés et le WWF (5418 milles parcourus en effort d'observation), 95 biopsies ont été collectées sur les espèces *Balaenoptera physalus* (79) *Physter macrocephalus* (12) et *Globicephala melas* (4). Ces biopsies ont permis d'établir un niveau de référence pour la contamination des rorquals communs en PCBs, OCPs, PBDE : 5824 et 2622 $ng.g^{-1}$ lp mâles et femelles respectivement pour les 7PCBs , 10370 et 3239 $ng.g^{-1}$ lp mâles et femelles respectivement pour les OCPs, 245 et 119 $ng.g^{-1}$ lp mâles et femelles respectivement pour les PBDE. Les niveaux de contamination en Alkylphénols sont encore faibles, de l'ordre de 100 à 200 ng.g-1 pf pour le nonylphenol, inférieure à 200 ng.g-1 pf pour le bisphénol. Il n'a pas été possible de détecter les HAP dans ces échantillons de gras car ce tissu n'est pas approprié.

Ces taux de PCB et de DDT sont significatifs mais cohérents avec les données existantes sur d'autres populations et au régime alimentaire des rorquals communs qui se situe assez bas dans la chaîne alimentaire.

Les taux de PBDE sont encore faibles ce qui peut être interprété comme la conséquence d'une régulation précoce de leur usage en Europe (contrairement aux USA par exemple où ils sont très répandus) ou du caractère encore récent de ces polluants qui n'ont pas encore pu imprégner les rorquals communs.

Les mâles sont 3 fois plus contaminés que les femelles qui peuvent se décharger de ces polluants via l'allaitement. Ce résultat peut être interprété positivement comme la preuve indirecte que la plupart des femelles ont mis bas ces dernières années.

Les concentrations en PCBs ou OCPs sont très importantes pour les cachalots, globicéphales noirs et dauphins de Risso : 11,9-268,4 ; 22,6-148 ; 39,3-205,3 µg.g-1 lp ∑PCBs respectivement et 9,8-283,3 ; 8,7 à 84,2 ; 13,1 à 71,40 µg.g-1 lp ∑DDT respectivement également.

Ces niveaux de contamination sont 5 à 10 fois plus élevés que ceux de leurs congénères d'Atlantique.

Ces valeurs sont également 15 à 30 fois supérieures à celles des rorquals communs et dépassent le plus souvent le seuil au-delà duquel on pourrait observer des effets physiologiques (Kannan *et al. ,* 2000).

Ces travaux ont également montré que le sex-ratio de la population de rorquals communs était équilibré sur l'ensemble des saisons mais suggère que les mâles pourraient arriver sur la zone du sanctuaire Pelagos plus tôt dans la saison. Ils ont aussi permis de démonter que la génétique constituait un complément voire une alternative fiable à la photo-identification pour identifier chaque individus de cette population et mettre en évidence d'éventuels liens de parenté.

SOMMAIRE

1 - INTRODUCTION 12

2 - LES POLLUANTS 14

2.1 - Les Polychlorobiphényles (PCB) 14

2.1.1 - Origine des PCB 14

2.1.2 - Utilisation des PCB 15

2.1.3 - Propriétés physico-chimiques 16

2.1.4 - Toxicité des PCB 17

2.1.4.1 - Toxicité aigue 17

2.1.4.2 - Toxicité chronique 17

2.1.5 - Congénères suivis dans l'environnement 18

2.2 - Les retardateurs de flammes bromés 19

2.2.1 - Origine des retardateurs de flammes 19

2.2.1.1 - Les PBDE 19

2.2.1.2 - L'Hexabromocyclodécane 19

2.2.2 - Utilisation des retardateurs de flammes bromés 20

2.2.3 - Propriétés physico-chimiques 21

2.2.4 - Toxicité des retardateurs de flammes bromés 21

2.2.4.1 - Toxicité aigue 21

2.2.4.2 - Toxicité chronique 21

2.2.5 - Congénères suivis dans l'environnement 22

2.3 - Pesticides Organochlorés (OCP) 23

2.3.1 - Origine des Pesticides Organochlorés 23

2.3.2 - Utilisation des Organochlorés 23

2.3.3 - Propriétés physico-chimiques 24

2.3.4 - Toxicité des Pesticides Organochlorés 24

2.3.4.1 - Toxicité aigue 24

2.3.4.2 - Toxicité chronique 24

2.4 - Les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) 25

2.4.1 - Origine des HAP 25

2.4.2 - Propriétés Physicochimiques 25

2.4.3 - Toxicité 26

2.4.3.1 - Toxicité aigue 26

2.4.3.2 - Toxicité chronique 26

2.4.4 - Composés suivis 27

2.5 - Alkylphénols (AKP) 28

2.5.1 - Origine des Alkylphénols 28

2.5.2 - Utilisation des Alkylphénols 28

2.5.3 - Propriétés physico-chimiques des Alkylphénols 29

2.5.4 - Toxicité des Alkylphénols **29**
2.5.4.1 - Toxicité aigue 30
2.5.4.2 - Toxicité chronique 30
2.5.5 - Réglementation **31**
2.5.6 - Composés suivis **31**

3 - MATERIEL ET METHODES **32**

3.1 - Collecte des échantillons ***32***
3.1.1 - Campagnes en mer et effort **32**
3.1.2 - Prélèvement des biopsies **35**

3.2 - Analyses des polluants ***37***
3.2.1 - Préparation des échantillons **37**
3.2.2 - Analyse des PCB, PBDE et OCP **39**
3.2.3 - Analyse des HAP **40**
3.2.4 - Analyse des alkylphénols **41**
3.2.5 - Évaluation des taux de lipides **42**
3.2.6 - Synthèse des analyses réalisées **43**

3.3 - Analyses en isotopes stables ***43***

3.4 - Sexage ***46***
3.4.1 - Extraction d'ADN **46**
3.4.2 - Identification du sexe **47**
3.4.3 - Identification génétique des individus **51**

4 - RÉSULTATS **53**

4.1 - Les observations de cétacés ***53***

4.2 - Sexage et carte d'identité génétique des individus ***56***
4.2.1 - Sexage **56**
4.2.2 - Sex-ratio chez le rorqual commun **60**
4.2.3 - Carte d'identité génétique du rorqual commun **61**
4.2.3.1 - Validation de la démarche expérimentale et des techniques 61
4.2.3.2 - Recherche de « recapture » d'animaux entre les différentes années 61
4.2.3.3 - Recherche de lien de parenté 61
4.2.3.4 - Structuration de la population 62

4.3 - Niveau de contamination du rorqual commun ***64***
4.3.1 - Évaluation des taux de lipides **64**
4.3.2 - Contamination en PCB, PBDE et OCP **67**
4.3.2.1 - Contamination globale 67
4.3.2.2 - Profil de contamination en PCB des rorquals communs 71
4.3.2.3 - Profil de contamination en PBDE des rorquals communs 73
4.3.2.4 - Profil de contamination en OCP des rorquals communs 73
4.3.3 - Contamination des rorquals communs en HAP **74**

4.3.4 - Contamination des rorquals communs en Alkylphénols 76

4.4 - Niveau de contamination des odontocètes 79

4.5 - Analyse en isotopes stables chez les odontocètes teutophages 82

5 - DISCUSSION..... 85

5.1 - Sex-ratio des rorquals communs 85

5.2 - La contamination des rorquals communs 85

5.2.1 - Les PCB et OCP 85
5.2.2 - Le rapport CB118/CB153 indicateur du niveau trophique 88
5.2.3 - PCBs et reproduction 89
5.2.4 - PCBs et génétique 91
5.2.5 - Les PBDE 93
5.2.6 - Les Alkylphénols 94

5.3 - Contamination chez les odontocètes teutophages 95

5.3.1 - Facteurs influençant la contamination des odontocètes 95
5.3.2 - Profil de contamination des odontocètes 95
5.3.3 - Niveaux de contamination et toxicité 96

5.4 - Comparaison odontocètes et mysticètes pour les ∑ 7 PCB..... 98

6 - CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES 99

7 - REFERENCES 102

TABLE DES FIGURES

Figure 1 - Structure générique des PCB..... 14

Figure 2 - Structure générique des PBDE 19

Figure 3 - Structure de HBCD..... 20

Figure 4 - Structure générale des pesticides chlorés du groupe 1, les dichloro-diphényl-éthanes et du groupe 2, les cyclodiènes. 23

Figure 5 - Carte de localisation des biopsies (toutes espèces confondues) et des échantillons issus d'échouages de Méditerranée pour l'ensemble des campagnes (certains points sont superposés)... 33

Figure 6 - Transects réalisés en effort d'observation lors des campagnes de biopsies entre 2006 et 2009..... 35

Figure 7 - Collecte de la biopsie avec une arbalète à bord du pneumatique (1) ; récupération de l'échantillon avec le lard qui dépasse de la pointe (2) ; préparation de l'échantillon, séparation de la peau pour les analyses génétiques et en isotopes stables et du gras pour les analyses de polluants. Tous les tubes sont congelés à bord. 36

Figure 8 - Préparation de la cellule avant extraction par ASE. 37

Figure 9 - Photographie et schéma de principe du système d'extraction ASE 200 (Dionex). 38

Figure 10 - Protocole de traitement des échantillons de graisse de rorquals communs pour l'analyse des PCB, PBDE, OCP, Alkylphénols et HAP 39

Figure 11 - Protocole de traitement des échantillons de graisse de rorquals communs pour l'analyse des PCB, PBDE, OCP..... 40

Figure 12 - Protocole de traitement des échantillons de graisse de rorquals communs pour l'analyse des HAP 41

Figure 13 - Protocole de traitement des échantillons de graisse de rorquals communs pour l'analyse des alkylphénols. 42

Figure 14 - Protocole de traitement des échantillons de graisse de rorquals communs de la série D pour l'analyse des alkylphénols..... 42

Figure 15 - Illustration des différentes étapes de l'analyse moléculaire des biopsies de rorquals communs. (a) Broyage dans un mortier en présence d'azote liquide de morceaux de tissu de rorqual. (b) Purification de l'ADN par une étape de précipitation à l'isopropanol. (c) Dépôt sur gel d'agarose 3 % des produits de PCR permettant d'identifier le sexe des Rorquals. Visualisation des bandes d'ADN sous UV après électrophorèse et coloration au Bet. (d) Autoradiographie permettant de visualiser les différents allèles d'un locus microsatellite donné. Après codage des allèles, les données sont intégrées et traitées via « DARwin » afin de construire un arbre génétique. (Photos réalisées par Frédéric Bassemayousse Mi Air Mi Eau Photo)..... 50

Figure 16 - Représentation de toutes les observations de cétacés par espèces réalisées lors des campagnes de collecte de biopsies de 2006 à 2009. 53

Figure 17 - Répartition par espèce du nombre d'observations et d'individus entre 2006 et 2009..... 55

Figure 18 - Électrophorèse des produits de PCR ZFY et ZFX des échantillons de rorquals communs de 2006 (A), 2007 (B), 2008 (C) et 2009 (D). Figures A et B, pour chaque individu, les produits de PCR spécifique à ZFY et à ZFX ont été réunis et déposés dans un même puits. Figure C, pour chaque individu, les produits de PCR spécifique à ZFY et à ZFX ont été déposés dans des puits indépendants. Figure D, électrophorèse sur séquenceur automatique Li-Cor®. La fluorescence rouge correspond le produit d'amplification marqué au IRD700 spécifique de l'allèle « femelle », en vert correspond le produit d'amplification marqué au IRD800 spécifique de l'allèle « mâle ». 58

Figure 19 - Vérification du sexe des échantillons A10 et A11 58

Figure 20 - Évolution du sex-ratio obtenu sur les biopsies de rorquals communs en fonction des saisons sur les données des quatre années 2006-2009, et sur 2009 seulement. 60

Figure 21 - Représentation arborée de l'analyse de Neighbor-Joining basée sur les données de génotypage des rorquals biopsiés de 2006 (rose), 2007 (vert , 2008 (orange), 2009 (bleu) et échoués en Méditerranée (noir) et en Atlantique (bleu clair). Les valeurs sur les branches donnent la force de la relation entre les individus sur la branche (100 % pour les recaptures). 63

Figure 22 - Schéma des zones de prélèvement des échantillons de rorqual commun fournis par le CRMM 65

Figure 23 - Contaminations moyennes totales et par sexe en PCB, PBDE et OCP dans la graisse des rorquals communs de Méditerranée rapportées au poids frais (ng g^{-1} pf). 67

Figure 24 - Contaminations moyennes totales et par sexe en PCB, PBDE, HBCD et OCP dans la graisse des rorquals communs de Méditerranée rapportées à la teneur lipidique vraie des échantillons (ng g-1 pf). 68

Figure 25 - Profil de contaminations des PCB dans la graisse de rorqual commun en Méditerranée.. 72

Figure 26 - Formule chimique du CB 118 et CB 153. 72

Figure 27 - Profil de contaminations des PBDE dans la graisse de rorqual commun en Méditerranée. 73

Figure 28 - Profil de contaminations des OCP dans la graisse de rorqual commun (ng.g-1 lp) en Méditerranée. 74

Figure 29 - Moyenne ± écart-type des concentrations (µg.g^{-1} poids lipidique) chez les odontocètes (Gg : dauphin de Risso, Pm : cachalot, Gm : globicéphale) : somme des congénères ICES7 (∑ ICES7), somme totale des PCBs (∑ PCBs) et somme totale des DDTs et Dieldrine (∑ DDTs + Dieldrine). 79

Figure 30 - Moyenne ± écart-type des rapports isotopiques de l'azote et du carbone (respectivement δ15N et δ13C), dans les échantillons de peau du globicéphale (Gm), du cachalot (Pm), du dauphin de Risso (Gg) et l'échantillon de muscle de la baleine à bec de Cuvier (Zc), et dans le muscle d'octopodes (Octopoda), de sèches (Sepioidea), de calmars (Teuthoidea) et d'Histioteuthidae. 82

Figure 31 - Relation entre les rapports isotopiques $\delta^{13}C$ des odontocètes (en haut) et $\delta^{15}N$ (en bas), et les concentrations (en ng.g^{-1} poids lipidique) des PCBs totaux (∑ PCBs), des congénères ICES7 (∑ ICES7) et les composés DDTs totaux (∑ DDTs). 84

Figure 32 - Évolution de la concentration moyenne en PCB et PBDE dans les œufs d'oiseaux de mer de l'île Prince Léopold de 1975 à nos jours (Braune et al., 2005). 86

Figure 33 - Évolution de la concentration de différents congénères de PBDE et PCB dans des moules échantillonnées entre 1981 et 2003 à Villerville situé à la sortie de l'estuaire de la Seine (Johansson et al., 2004). 86

Figure 34 - Répartition des mâles et des femelles par classes de niveau de contamination (∑7PCB).. 90

Figure 35 - Représentation arborée de l'analyse de Neighbor-Joining basée sur les données de génotypage des individus de Méditerranée et d'Atlantique. En rose les femelles, en bleu les mâles. La contamination en PCBs est également indiquée. 92

TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1 - Nomenclature IUPAC des PCB (Ballschmitter et Zell, 1980). 15

Tableau 2 - Quelques propriétés physico-chimiques des PCB d'après Erickson (1997). 16

Tableau 3 - Propriétés physico-chimiques des PBDE et de HBCD (Watanabe et Tatsukawa, 1989 ; De Wit, 2002). 21

Tableau 4 - Synthèse des distances parcourues en effort au cours des différentes campagnes qui ont permis la collecte de biopsies. 34

Tableau 5 - Conditions d'extraction des échantillons par ASE. 37

Tableau 6 - Listing d'échantillon et nature des analyses réalisées pour le rorqual commun. 44

Tableau 7 - Récapitulatif des échantillons obtenus et analyses réalisées chez les odontocètes teutophages (IS : Isotopes Stables, POPs : Polluants Organiques Persistants). 45

Tableau 8 - Valeur des DO des échantillons d'ADN de rorqual commun à 206 nm et à 280 nm et de leur concentration. 48

Tableau 9 - Synthèse des observations (et du nombre d'individus entre parenthèses) par année, par mois et par espèce, ainsi que des effectifs moyens dénombrés au cours des différentes campagnes de biopsies entre 2006 et 2009. 54

Tableau 10 - Récapitulatif des biopsies, des échantillons collectés et du sexe correspondant pour le rorqual commun. 59

Tableau 11 - Comparaison des teneurs lipidiques (pourcentage de matière extractible) exprimées en pourcentage de poids frais retrouvé dans les rorquals communs de cette étude avec les données de la bibliographie. 64

Tableau 12 - Résultats de l'évaluation des taux de lipides avec ou sans lyophilisation (n=3) 65

Tableau 13 - Variabilité spatiale de la teneur en lipides dans les différents échantillons d'un même rorqual. La localisation des prélèvements est décrite Figure 22. 66

Tableau 14 - Contaminations moyennes des rorquals communs en PCB, PBDE, HBCD et OCP (ng g-1 pf et ng g-1 lp) (n= 73 individus) 69

Tableau 15 - Contamination des rorquals communs analysés en PCB, PBDE et OCP (ng.g-1 pf et ng.g-1 lp) (n= 73). 70

Tableau 16 - Contaminations en HAP des 27 rorquals communs analysés (ng.g^{-1} pf) 75

Tableau 17 - Contamination des rorquals communs de Méditerranée en 4 NP et en BPA (ng g^{-1} pf). 78

Tableau 18 - Concentration (µg.g-1 poids lipidique) chez les odontocètes des Polychlorobiphényles (PCBs), somme des 14 congénères (∑ PCBs), somme des 7 congénères inclus dans la liste développée par l'International Council for the Exploration of the Sea (ICES) pour des comparaisons internationales (∑ ICES7, congénères 28, 52, 101, 118, 138, 153 et 180) et proportion des congénères ICES7 par rapport à la somme des PCBs. 80

Tableau 19 - Concentration (µg.g^{-1} poids lipidique) chez les odontocètes des pesticides organochlorés : Lindane, dichloro-diphenyl-dichloroethylene (4,4'-DDE) et dieldrine, dichloro-diphenyldichloroethane, (4,4'-DDD), dichloro-diphenyl-trichloroethane (4,4'-DDT), somme de l'ensemble des DDTs et du dieldrine, et proportion des 4,4'-DDE et dieldrine par rapport à la somme des DDTs. 81

Tableau 20 - Rapports isotopiques de l'azote et du carbone (respectivement δ15N et δ13C) mesurés chez les odontocètes teutophages. 83

Tableau 21 - Comparaison du niveau de contamination des rorquals communs (les valeurs marquées d'un astérisque ont été recalculées de façon à avoir accès à la somme des 7 PCB). 87

Tableau 22 - Comparaison du rapport CB 118/153 entre les rorquals communs échantillonnés en Méditerranée et en Atlantique (ratio : pas d'unité). 89

Tableau 23 - Comparaison des niveaux de contamination des animaux recapturés ou présentant des liens de parenté..... 91

Tableau 24 - Comparaison des concentrations totales (µg.g-1) des congénères de PCBs (∑ PCBs) et des composés du DDTs (∑ DDTs) chez les odontocètes teutophages en Méditerranée, avec celles observées dans d'autres zones d'études et chez d'autres espèces en Méditerranée (pl : poids lipidique, pf : poids frais, ps : poids sec)..... 97

Tableau 25 - Niveaux de contamination moyens obtenus sur les échantillons d'odontocètes analysés. 98

1 - INTRODUCTION

Les cétacés sont dans l'imaginaire populaire des seigneurs des mers, évoluant libres de toute contrainte dans les océans, cependant ils sont soumis à de nombreuses pressions directes (risque de collisions, risque de captures accidentelles, etc.) ou plus insidieuses comme la pollution. En effet depuis le début du 20ème 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, impactant les écosystèmes terrestres, aquatiques puis à terme les mers et les océans du globe.

Parmi cette multitude de substances chimiques, les polluants organiques persistants (POP) comme les polychlorobiphényles (PCB) ou les pesticides organochlorés (OCP) connaissent un regain d'intérêt pour les scientifiques en raison de la récente réévaluation de leur toxicité (neurotoxiques, perturbateurs endocriniens), ces substances sont chimiquement stables, lipophiles, ce qui leur confère un fort potentiel de bioaccumulation par les organismes, et particulièrement par les animaux possédant un taux de lipides élevé comme les mammifères marins.

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, etc.). 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). 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.

Les mammifères marins, de par leurs taux de lipides élevés dans leurs tissus et leur place dans les réseaux trophiques pélagiques, sont particulièrement impactés par ces composés. Mais le niveau de cette contamination est encore très mal connu, en particulier en Méditerranée.

Cette contamination couplée aux autres nuisances contribue à affaiblir les populations de cétacés du Sanctuaire PELAGOS. Il est important d'en établir un niveau de référence qui sera

la première étape d'un suivi dans le temps et un argument fort pour imposer une limitation et un contrôle de l'émission de ces polluants dans le milieu naturel.

Cette étude a pour but de caractériser le niveau de contamination en PCB, PBDE, OCP, HAP et Alkylphénols de la population de rorquals communs (*Balaenoptera physalus*) et d'apporter des informations quant aux niveaux de contamination des cachalots (*Physeter macrocephalus*) et des globicéphales noirs (*Globicephala melas*) évoluant en Méditerranée. Ces derniers se trouvant à un échelon trophique supérieur, ce qui, en terme de contamination accumulée au cours du temps peut avoir un impact important.

2 - LES POLLUANTS

Quatre types de polluants ont été recherchés et analysés : les PCB (polychlorobiphényles), les retardateurs de flamme bromée, les OCP (pesticides organochlorés) et les HAP (hydrocarbures aromatiques polycycliques).

2.1 - Les Polychlorobiphényles (PCB)

Les PCBs constituent une famille de polluants très ancienne et très répandue, qui a largement contaminé l'ensemble de la biosphère. Ce sont les polluants sur lesquels la littérature est la plus abondante ce qui permet de comparer le niveau de contamination de nos rorquals communs de Méditerranée avec celui d'autres espèces ou d'autres zones géographiques. C'est ce qui a justifié leur choix.

2.1.1 - Origine des PCB

Les PCB sont des molécules synthétisées par l'homme pour un usage industriel sur une même structure générique (Figure 1). Ils sont constitués d'un noyau biphényle comportant jusqu'à cinq atomes de chlore par cycle phényle.

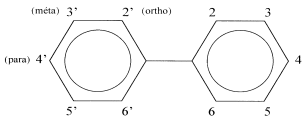


Figure 1 - Structure générique des PCB.

Le degré de substitution et la position des atomes de chlore permettent de définir la nomenclature régissant les PCB. Cette nomenclature de *l'International Union of Pure and Applied Chemistry*" (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 ceux de chlore.

Tableau 1 - Nomenclature IUPAC des PCB (Ballschmitter et Zell, 1980).

Substitutions sur le premier cycle																				
0																				
2	1	4																		
3	2	6	11																	
4	3	8	13	15																
23	5	16	20	22	40															
24	7	17	25	28	42	47														
25	9	18	26	31	44	49	52													
26	10	19	27	32	46	51	53	54												
34	12	33	35	37	56	66	70	71	77											
35	14	34	36	39	58	68	72	73	79	80										
234	21	41	55	60	82	85	87	89	105	108	128									
235	23	43	57	63	83	90	92	94	107	111	130	133								
236	24	45	59	64	84	91	95	96	110	113	132	135	136							
245	29	48	67	74	97	99	101	102	118	120	138	146	149	153						
246	30	50	69	75	98	100	103	104	119	121	140	148	150	154	155					
345	38	76	78	81	122	123	124	125	126	127	157	162	164	167	168	169				
2345	61	86	106	114	129	137	141	143	156	159	170	172	174	180	182	189	194			
2346	62	88	109	115	131	139	144	145	158	161	171	175	176	183	184	191	196	197		
2356	65	93	112	117	134	147	151	152	163	165	177	178	179	187	188	193	201	200	202	
23456	116	142	160	166	173	181	185	186	190	192	195	198	199	203	204	205	206	207	208	209
	0	**2**	**3**	**4**	**23**	**24**	**25**	**26**	**34**	**35**	**234**	**235**	**236**	**245**	**246**	**345**	**2345**	**2346**	**2356**	**23456**

Substitutions sur le deuxième cycle (')

Les PCB ont été synthétisés pour la première fois en 1881, et produits industriellement à partir de 1929 par la société MONSANTO. En théorie, 209 congénères distincts peuvent être produits selon le nombre et la position des atomes de chlore sur le biphényle. Cependant les contraintes thermodynamiques, le caractère orienté de la chloration (positions ortho et para privilégiées) et les contraintes stériques empêchent la formation de tous les congénères. Dans les faits, seulement 130 à 150 congénères sont réellement synthétisés (Schulz *et al*., 1989 ; Larsen *et al*., 1993).

2.1.2 - Utilisation des PCB

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, etc.

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.

2.1.3 - 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 1 300°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 atomes de chlore (Tableau 2). La masse moléculaire des PCB va de 188 uma (unité de masse atomique) pour un congénère présentant 1 atome de chlore (monoCB) à 494 uma pour le congénère présentant le nombre de substitution maximale en chlore soit 10 atomes de chlore (décaCB).

Tableau 2 - Quelques propriétés physico-chimiques des PCB d'après Erickson (1997).

Congénères	Température de fusion (°C)	Température d'ébullition (°C)	Pression de vapeur à 25°C	Solubilité dans l'eau (g/m3)	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

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.

2.1.4 - Toxicité des PCB

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.

2.1.4.1 - Toxicité aigue

Les PCB présentent une toxicité aigue 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 aigue.

2.1.4.2 - 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, le 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 les fonctions thyroïdienne et sexuelle (Iwasaki *et al*., 2002). De façon simplifiée, les PCB globulaires induisent une activité œstrogénique (Mckinney et Waller, 1994) et il est actuellement fortement suspecté que ce sont les métabolites hydroxylés qui expriment cette activité œstrogénique (Cravedi et Narbonne, 2002). De leur coté, 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 cancérigènes 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 (Polyclorodibenzofuranes) qui pourraient jouer un rôle synergique sur les mécanismes de toxicité (Uenotsuchi *et al*., 2005 ; Masuda *et al*., 1998).

2.1.5 - Congénères suivis dans l'environnement

Le bureau Communautaire de référence de la Commission de la communauté européenne a défini, en 1982, sept congénères majoritaires à suivre parmi les 209 congénères possibles. Ces composés majoritaires dans l'environnement sont les PCB 28, 52, 101, 118, 138, 153 et 180.

2.2 - Les retardateurs de flammes bromés

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 et à l'hexabromocyclodécane (HBCD).

2.2.1 - Origine des retardateurs de flammes

2.2.1.1 - Les PBDE

L'origine des retardateurs de flammes bromés est anthropique. Les PBDE sont des molécules synthétisées par l'homme pour un usage industriel sur une même structure générique (Figure 2). Ils sont constitués d'un noyau biphényle éther comportant jusqu'à cinq atomes de brome substitués par cycle phényle.

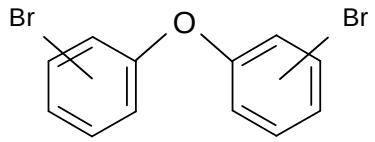


Figure 2 - Structure générique des PBDE

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.

Il n'existe pas à proprement parler de sources de PBDE naturelles, mais il a été observé des diphényle-éthers polybromés méthoxylés dans des échantillons biologiques provenant d'une baleine à bec (*Mesoplodon mirus*) probablement accumulés par son alimentation (De Wit, 2002). 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.

2.2.1.2 - L'Hexabromocyclodécane

Le HBCD (Figure 3) comme les PCB et les PBDE a une origine exclusivement anthropique, il est principalement utilisé comme additif retardateur de flammes dans les polystyrènes.

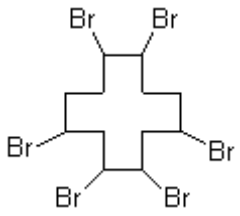


Figure 3 - Structure de HBCD

2.2.2 - Utilisation des retardateurs de flammes bromés

Les retardateurs de flammes 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 diphényle-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.

L'Hexabromocyclodécane (HBCD) est préparé industriellement par bromation de cis, trans-cyclododécatriène (CTT-CDT) et largement utilisé comme retardateur de flammes, en particulier dans les mousses de polystyrène.

Les PBDE et l'HBCD appartiennent à la grande famille des retardateurs de flammes, ces produits sont utilisés en tant qu'additifs ignifugeants dans une large gamme de produits industriels ou de consommation courante (De Wit, 2002) :

- Equipements électroniques : circuits imprimés d'ordinateurs, de téléviseur, etc.
- Construction : polystyrène, polyuréthane, peinture, mastic, éclairage, plastiques.

- Industries : fibres synthétiques, polymères, résines, colles, polyuréthane, câbles, etc.
- Transport : partie électrique et revêtement textile des avions, bateaux et voitures.
- Textiles : ameublement, aménagement intérieur, habillement, etc.
- Traitement du bois.

2.2.3 - Propriétés physico-chimiques

Les retardateurs de flammes sont stables, bio-accumulables et rémanents. Les PBDE, de par leur structure chimique commune, présentent des propriétés physico-chimiques semblables. Ils sont stables, non hydrolysables, et 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. La masse moléculaire de l'HBCD est de 641,7 uma. Les principales propriétés physico-chimiques des PBDE et de l'HBCD sont listées dans le Tableau 3.

Tableau 3 - Propriétés physico-chimiques des PBDE et de HBCD (Watanabe et Tatsukawa, 1989 ; De Wit, 2002).

Congénères	Température de fusion (°c)	Pression de vapeur à 25°c (°c)	Solubilité dans l'eau $g.m^{-3}$	Log Kow
TétraBDE	79-82	$2,6\text{-}3,3\ 10^{-4}$	0,0109	5,9-6,2
PentaBDE	92-98	$2,9\text{-}7,3\ 10^{-5}$	0,0024	6,5-7,0
HéxaBDE	-	$4,2\text{-}9,4\ 10^{-6}$	0,0010	6,9-7,9
OctaBDE	75-220	$1,2\text{-}2,2\ 10^{-7}$	0,0005	8,4-8,9
DécaBDE	290-306	$<10^{-4}$	<0,0001	10
HBCD	-	$6,3\ 10^{-5}$	0,0034	5,6

2.2.4 - Toxicité des retardateurs de flammes bromés

2.2.4.1 - Toxicité aigue

Les PBDE et le HBCD présentent une toxicité aigue faible, avec des DL 50 pour les mélanges commerciaux supérieurs à $1g.kg^{-1}$ pc (poids corporel) (De Boer, 2000 ; De Wit, 2002).

2.2.4.2 - Toxicité chronique

Les PBDE sont considérés comme des perturbateurs endocriniens (Legler et Brouwer, 2003).

Les PBDE et HBCD perturbent la fonction de reproduction et la fonction thyroïdienne (Darnerud, 2003). Les structures chimiques des PBDE, et *a fortiori* de leurs 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 cancérigène ; le décaBDE n'est pas classé cancérigène 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). Helleday et *al*. (1999) ont rapporté des effets génotoxiques observés pour les PBDE et le HCBD sur des lignées cellulaires de mammifères.

Les PBDE 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*" (AHHR).

2.2.5 - Congénères suivis dans l'environnement

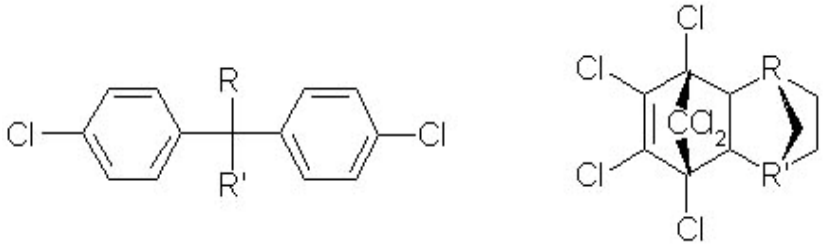
Il n'y a pas à proprement dit de congénère de PBDE marqueur, mais le BDE 47 majoritaire dans l'environnement est classiquement suivi et utilisé pour comparer des niveaux de contamination.

2.3 - Pesticides Organochlorés (OCP)

Tout comme les PCBs cette famille de composés a été très largement répandue dans le milieu et son caractère fortement rémanent fait qu'ils sont toujours retrouvés dans les milieux naturels et dans les espèces malgré son interdiction dans les pays industrialisés. Ils font aussi l'objet d'une littérature généreuse qui permet les comparaisons.

2.3.1 - Origine des Pesticides Organochlorés

L'origine des pesticides organochlorés est exclusivement anthropique. Contrairement aux PCB et aux PBDE, les pesticides chlorés ne présentent pas de structure commune et révèlent des propriétés variées. Ils ont cependant tous dans leur composition chimique au moins un atome de chlore autour d'un ou de plusieurs cycles carbonés. Trois groupes de composés peuvent être définis. Le premier est le groupe des dichloro-diphényl-éthanes, dont le plus commun est le dichloro-diphényltrichloro-éthane (DDT) et ses produits de dégradation le dichloro-diphényl-éthane (DDD) et le Dichlorophényl-éthène (DDE). Le deuxième groupe est celui des cyclodiènes qui englobe le chlordane, et le troisième groupe regroupe les autres composés de structures différentes (Figure 4).



Dichloro-diphényl-éthane Cyclodiène

Figure 4 - Structure générale des pesticides chlorés du groupe 1, les dichloro-diphényl-éthanes et du groupe 2, les cyclodiènes.

2.3.2 - Utilisation des Organochlorés

Les pesticides organochlorés ont été utilisés en usage dispersif notamment pour lutter contre les insectes dans les cultures, les charpentes, sur les animaux, etc. Ils ont été synthétisés au début de la deuxième guerre mondiale, puis leur efficacité et leur faible coût de production en ont fait des composés largement utilisés dans l'agriculture à partir des années 1940.

La découverte de la rémanence et de la non spécificité des effets toxiques de ces pesticides a entraîné leur interdiction dans les pays industrialisés.

2.3.3 - Propriétés physico-chimiques

Les pesticides organochlorés, ne présentant pas de structure commune mis à part un atome de chlore, au moins dans leur structure, possèdent de ce fait des propriétés physico-chimiques diverses. Néanmoins, ils sont tous stables et persistants dans l'environnement.

Ils présentent également des coefficients de partage octanol eau variant entre 3,3 pour le lindane et 7 pour le DDE, ce qui leur confère tout, comme pour les PCB et les PBDE, des propriétés lipophiles facilitant leur bioaccumulation dans les organismes.

2.3.4 - Toxicité des Pesticides Organochlorés

2.3.4.1 - Toxicité aigue

Les pesticides chlorés agissent sur le système nerveux central des organismes exposés et, à fortes doses, ils peuvent entraîner des tremblements, des convulsions et même la mort. Les DL 50 varient de 100 à 300 $mg.kg^{-1}$ par voie orale (Thompson, 1999).

2.3.4.2 - Toxicité chronique

Les pesticides chlorés ont des effets néfastes sur la reproduction et la fertilité. Il a été démontré, par une étude menée sur des souris, qu'une dose de chlordane de 22 $mg.kg^{-1}.j^{-1}$ pendant trois semaines induisait une baisse de fertilité de 50 % (Kamrin, 1997). Une autre étude sur le dichloro-diphényl-trichloro-éthane (DDT) a démontré la relation entre l'épaisseur des coquilles d'œufs de faucon pèlerin et la concentration de DDT chez cet oiseau (Ratcliffe, 1970). Le DDT est impliqué dans la diminution des populations de ce rapace.

De plus, les pesticides chlorés sont, comme les PCBs, des perturbateurs du système endocrinien. Des études *in vitro* ont démontré une activité œstrogénique pour le DDT et ses métabolites ainsi que pour le trans-nonachlore (Klotz et *al.*, 1996). Aucun effet mutagène, tératogène, ni cancérigène n'est connu pour ces composés, mis à part pour l'hexachlorobenzène (HCB) et la dieldrine qui ont des effets tératogènes à fortes doses, et le chlordane et l'heptachlore qui sont classés comme cancérigènes probables par l'EPA (*Environnemental Protection Agency* USA). De plus, les pesticides chlorés sont comme les PCB et les PBDE des perturbateurs du système endocrinien et semblent présenter le même type de toxicité cérébrale.

2.4 - Les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP)

La Méditerranée est une petite mer fermée (1% des océans mondiaux) sur laquelle circule 30 % du trafic maritime mondial. On estime que les rejets illégaux d'hydrocarbures en Méditerranée se situent entre 70 000 et 400 000 tonnes par an (synthèse de diverses sources). Il nous a semblé intéressant de tenter d'estimer l'impact de ces polluants sur les cétacés, tout en sachant que les tissus prélevés (peau et gras) n'étaient pas favorables à ce type d'analyse.

2.4.1 - Origine des HAP

Les HAP sont des molécules organiques composées au moins de deux cycles benzéniques condensés, principalement sous forme linéaire ou angulaire. Ces molécules sont constituées uniquement d'atomes d'hydrogène et de carbone et ont une structure plane au niveau des cycles.

Parmi les cent HAP connus, les composés les plus "mobiles" sont les plus étudiés dans l'environnement (du Naphtalène qui est le HAP possédant la masse moléculaire la plus faible, 128 kDa, jusqu'au Coronène, 300 kDa). Ces molécules sont présentes dans l'environnement sous forme de mélanges complexes. Les HAP sont soit d'origine naturelle soit d'origine anthropique. Trois sources principales sont généralement mentionnées pour les HAP (Neff, 1979 ; McElroy, 1989).

La source la plus importante (majoritairement d'origine anthropique), qualifiée de source pyrolytique, provient de la combustion incomplète de la matière organique à haute température. Ces processus comprennent principalement la combustion du bois et des déchets agricoles (chauffage, incendies, etc) et la consommation de la matière organique fossile dans les véhicules et dans l'industrie (essence, charbon, etc). Les HAP peuvent également avoir une origine pétrogénique et une origine diagénétique (minoritaire). Dans tous les cas, il s'agit soit de sources diffuses soit de sources ponctuelles.

2.4.2 - Propriétés Physicochimiques

Les propriétés physico-chimiques de ces composés dépendent essentiellement de leur poids moléculaire et de leur structure. Selon leur nombre de cycles benzéniques, ces composés sont classés en HAP "légers" (3 cycles, avec une masse molaire comprise entre 120 et 180 $g.mol^{-1}$) ou "lourds" (4 cycles, avec une masse molaire comprise entre 200 et 280 $g.mol^{-1}$). A l'exception de certains composés légers qui peuvent se volatiliser (à la surface de l'eau ou du sol), les HAP sont relativement peu volatils (pression de vapeur de 7,2 pour le naphtalène à 20°C jusqu'à $1,3\times10^{-8}$ pour le dibenz[a,h]anthracène à 20°C) et peu solubles dans l'eau. En effet, excepté pour le naphtalène, la solubilité des HAP dans l'eau est de modérée (30 $mg.l^{-1}$) à très faible ($2,6\times10^{-4}$ $g.l^{-1}$) pour les HAP lourds. De plus, la solubilité est fonction de la

température et du coefficient de partage octanol/eau (Kow). Pour ces composés, le log de Kow, varie de 3,37 à 6,5 (Mackay et *al.*, 1992).

2.4.3 - Toxicité

2.4.3.1 - Toxicité aigue

Peu d'effets à court terme des HAP ont été rapportés chez les organismes. La plupart des effets sont par ailleurs mentionnés composé par composé et sont très variables suivant le composé et l'espèce considérés. Chez l'homme, aucune donnée n'étant disponible, la toxicité aiguë est basée sur l'expérimentation animale. Ainsi, chez la souris, les DL 50 mesurées par voie orale sont supérieures à 1 600 $mg.kg^{-1}$ pour le benzo[a]pyrène (Awogi et Sato, 1989). Pour les organismes aquatiques, des données de DL 50 sont disponibles pour plusieurs espèces. Ainsi, des DL 50 de 1,5 $\mu g.l^{-1}$ (Newsted et Giesy, 1987), de 95 $\mu g.l^{-1}$ (Munoz et Tarazona, 1993) et > 357 $\mu g.l^{-1}$ (Vindimian, 2000) ont été rapportées respectivement pour le benzo[a]pyrène, l'anthracène et l'indéno[1,2,3,-cd]pyrène, chez des daphnies. De même, une DL 50 de 8 $\mu g.l^{-1}$ a été rapportée pour l'anthracène chez des poissons (McCloskey et Oris, 1991).

2.4.3.2 - Toxicité chronique

La toxicité des HAP dépend essentiellement de la structure moléculaire et de la métabolisation de ces composés par les organismes. Du fait de leur caractère lipophile, les HAP peuvent être accumulés par les organismes au niveau de leurs réserves lipidiques. La plupart des organismes peuvent métaboliser les HAP pour faciliter leur excrétion. Dans le cas des organismes supérieurs tels que les poissons, leurs capacités de bioaccumulation leur permettent d'éliminer ces composés (Varanasi et *al*., 1989, Altenburger et al., 2003). Par conséquent, les concentrations tissulaires en HAP ne reflètent pas le niveau réel d'exposition des poissons. On a ainsi souvent pu noter que des poissons collectés dans des environnements fortement pollués ne contenaient pas de fortes teneurs en HAP (Varanasi et *al*., 1989, 1990 ; Baumard, 1997). Cette capacité de biotransformation et d'élimination des composés n'est présente que chez les organismes supérieurs. C'est pourquoi, pour suivre l'exposition des poissons au HAP, il est actuellement reconnu qu'il faut suivre les métabolites, et non les HAP parents (Mazeas, 2004). Si les processus cellulaires de bioaccumulation sont censés constituer des mécanismes de détoxication, ils peuvent également mener à la formation de métabolites qui s'avèrent parfois plus toxiques que les composés de départ. Certains des métabolites formés (diol-époxydes, o-quinones) peuvent ainsi réagir directement ou indirectement avec le matériel génétique et conduire à la formation de lésions structurales de l'ADN (Pahlman et Pelkonen, 1987).

Ces espèces très réactives sont généralement électrophiles et donc susceptibles de se lier de manière covalente avec les sites nucléophiles des macromolécules cellulaires. Ainsi, lipides,

protéines et acides nucléiques (ADN, et ARN) constituent des cibles pour les contaminants. L'homéostasie cellulaire normale est ainsi perturbée et des dommages parfois irréversibles sont infligés à la cellule. Ces dommages sont d'autant plus importants lorsqu'ils affectent l'ADN et donc le patrimoine génétique.

2.4.4 - Composés suivis

Classiquement dans l'environnement les composés suivis sont les 16 HAP prioritaires (naphthalène, acénaphthylène, acénaphthène, fluorène, phénanthrène, anthracène, fluoranthène, pyrène, benz[a]anthracène, chrysène, benzo[b]fluoranthène, benzo[k]fluoranthène, benzo[a]pyrène, dibenz[a,h]anthracène, benzo[ghi]perylène, indéno[1,2,3,cd]pyrène). Dans le cadre de cette étude, étant donné que l'espèce ciblée possède de fortes capacités de métabolisation des HAP, il aurait été préférable de suivre les métabolites biliaires des HAP. Cependant il est impossible de prélever de la bile de façon non invasive sur un rorqual commun vivant, il a donc été choisi d'analyser les 16 HAP prioritaires.

2.5 - Alkylphénols (AKP)

Ce sont des composés présents dans de nombreux composés de grande consommation produits et utilisés au cœur des terres. Nous les avons sélectionnés en tant que traceur de ce lien entre la terre et la mer. Les retrouver au cœur des tissus d'animaux pélagiques comme les cétacés est une démonstration sans équivoque du fait que tous les polluants finissent un jour au sein des océans. C'est aussi un vecteur de sensibilisation du public et un argument pour améliorer les réglementations.

2.5.1 - Origine des Alkylphénols

L'origine des alkylphénols est exclusivement anthropique. Les alkylphénols (AP) sont très généralement fabriqués à haute température par réaction entre un phénol et une molécule de tripropylène en présence d'un catalyseur et servent d'intermédiaires dans la synthèse d'agents tensioactifs et de résines phénoliques. L'une des principales sources d'alkylphénols est la biodégradation des alkylphénols-éthoxylés (APEO). Les APEO sont formés par réaction d'une molécule d'alkylphénol avec une ou plusieurs molécules d'oxyde d'éthylène en présence d'un catalyseur (hydroxyde de potassium) et sont commercialisés essentiellement en tant qu'adjuvants de formulations de pesticides, détergents dans l'industrie textile, pour les traitements de surface, comme additif de désencrage dans l'industrie papetière, et comme émulsifiant.

2.5.2 - Utilisation des Alkylphénols

Les alkylphénols-éthoxylés (APEO) sont utilisés dans de nombreux secteurs d'activité (INERIS, 2004) :

- Production et formulation de produits industriels comme les produits détergents, dispersant, désinfectant, floculant pour les eaux usées.
- Polymères en émulsion (polymérisation en phase aqueuse) et peintures.
- Produits phytosanitaires, engrais.
- Nettoyage industriel et domestique.
- Tannerie.
- Production de papier et pâte à papier.

2.5.3 - Propriétés physico-chimiques des Alkylphénols

Les alkylphénols et alkylphénols-polyéthoxylés sont des tensio-actifs organiques non ioniques, molécules amphiphiles comportant au moins un groupement polaire hydrophile (assurant la solubilité dans l'eau) et une chaîne carbonée apolaire (lipophile).

Les groupements hydrophile et hydrophobe sont respectivement représentés par la chaîne polyéthoxylée et par l'alkylphénol. Les propriétés physiques de ces composés dépendent essentiellement de leur structure amphiphilique (se dit d'une structure constituée d'un groupe polaire soluble dans l'eau attaché à une chaîne carbonée insoluble dans le même solvant).

Leur propriété caractéristique est de se concentrer aux interfaces (liquide-liquide, liquide-solide) et de réduire les tensions superficielles. Les alkylphénols sont des molécules peu volatiles (pression de vapeur < 10 Pa) caractérisées par une solubilité faible dans l'eau (<15 $mg.L^{-1}$). A contrario, les alkylphénol-polyéthoxylés sont des molécules très solubles dans l'eau. Leur solubilité dépend du nombre de groupements polaires formant la partie hydrophile de la molécule. Ces molécules sont d'autant plus solubles dans l'eau que leur nombre de groupements polaires est élevé. Les propriétés physico-chimiques de ces composés vont déterminer leur devenir dans l'environnement. Ils sont introduits dans l'environnement principalement via les effluents des stations d'épuration urbaines et industrielles (eaux usées et boues), mais également par épandages directs de pesticides. Les APEO et leurs métabolites sont donc retrouvés dans tous les compartiments des écosystèmes (l'eau, l'air et les sols).

Selon le TemaNord (1996), la distribution théorique du nonylphénol dans l'environnement est de plus de 60 % dans les sédiments, plus de 10 % dans les sols et d'environ 25 % dans les eaux. Une fois introduits dans les écosystèmes aquatiques, ces composés, qui possèdent des log Kow allant de 3,9 à 4,5, vont avoir tendance à s'adsorber sur les particules et les sédiments. Certains auteurs ont rapporté la présence de ces composés bioaccumulés par une grande variété d'organismes aquatiques parmi lesquels des algues (Ahel et *al*., 1993), des crustacés (Ferrara et *al*., 2005), des mollusques (Granmo et *al*., 1991) et des poissons (Lewis et Lech, 1996).

2.5.4 - Toxicité des Alkylphénols

La toxicité des alkylphénols et alkylphénols-polyéthoxylés dépend essentiellement de la structure chimique de ces molécules. En effet, le caractère hydrophobe (Saarikoski et Viluksela, 1982) et le caractère électrophile (Cronin et *al*., 2001) de ces composés sont les paramètres responsables de leur toxicité.

2.5.4.1 - Toxicité aigue

Des données de DL 50 sont disponibles chez de nombreux organismes, essentiellement pour le nonylphénol. Ainsi, chez les organismes aquatiques, le nonylphénol présente une toxicité aiguë de 0,15 $mg.l^{-1}$ (96 heures), de 0,043 $mg.l^{-1}$ (96 heures), de 0,13 à 0,9 $mg.l^{-1}$ (96 heures), respectivement chez *Hyalella azteca* et *Mysidopsis Bahia* (Weeks et *al*. 1996) et *Salmo salar* (McLeese et *al*., 1981). Chez les mammifères (rat), des DL 50 de 1 475 $mg.kg^{-1}$ ont été rapportées (De Jager et *al*., 2001).

2.5.4.2 - Toxicité chronique

Les alkylphénols sont répertoriés parmi les perturbateurs endocriniens (Colborn et *al*., 1993). Ils peuvent avoir des effets oestrogéniques sur les organismes en se liant directement avec le récepteur aux oestrogènes et en mimant le mécanisme d'action du 17 - oestradiol (White et *al*., 1994). Chez l'Homme, ils peuvent également avoir des effets sur les hormones thyroïdiennes. Le nonylphénol est considéré, avec l'octylphénol, comme l'alkylphénol potentiellement le plus oestrogéno-mimétique ; il est de ce fait le plus étudié. Les hommes peuvent être exposés aux alkylphénols essentiellement par la voie alimentaire (ingestion de produits contaminés) et par contact dermique. La toxicité chronique est estimée via l'expérimentation animale. Ainsi, l'activité oestrogénique du nonylphénol a été mise en évidence, chez les mammifères, par Soto et al. (1991).

D'autres auteurs ont démontré que le nonylphénol pouvait également avoir des effets immunotoxiques (Karrow et *al*., 2004), cancérogènes par l'induction de la prolifération cellulaire et par la formation d'adduits à l'ADN (Seike et al., 2003).

Chez les organismes aquatiques, O'halloran et *al*. (1999) ont montré que des expositions prolongées au nonylphénol réduisaient la diversité zooplanctonique. De plus, des perturbations endocrines (réduction/augmentation de la fertilité, augmentation de l'incidence des cas d'hermaphrodisme, perturbations du métabolisme stéroïdien) ont été observées chez différentes espèces de crustacés (*Daphnia magna, Corophium volutator, Elminius modestus, Balanus amphitrite*) et de mollusques (*Crassostrea gigas*) suite à des expositions au nonylphénol à des concentrations allant de 0,1 à 100 $\mu g.L^{-1}$ (Forget et *al*., 2003 ; Vazquez et *al*., 2005). Des expositions à de fortes concentrations en nonylphénol (44 $\mu g.L^{-1}$) ont par ailleurs montré le caractère embryotoxique de ce composé chez les daphnies (LeBlanc et *al*., 2000). Des phénomènes d'inter-sexe ont également été rapportés chez les Medaka japonais (*Oryzias latipes*, poisson ovipare d'eau douce originaire d'Asie du Sud-Est) suite à des expositions chroniques au nonylphénol (Gray et Metcalfe, 1997). Enfin, des effets mutagènes du nonylphénol ont été décrits chez des crustacés par Atiezar et *al*. (2002) pour des concentrations de 0,1 à 10 $\mu g.L^{-1}$.

2.5.5 - Réglementation

Les nonylphénols/nonylphénols polyéthoxylés ont été inclus en 1998, lors de la réunion ministérielle OSPAR (la convention OSPAR est l'instrument légal actuel qui guide la coopération internationale pour la protection de l'environnement marin de l'Atlantique du Nord-Est), dans la liste des substances nécessitant une action prioritaire pour éliminer tous rejets, émissions ou pertes de ces composés dans l'environnement marin d'ici 2020. Depuis, le nonylphénol a été classé en tant que substance dangereuse prioritaire dans le cadre de la Directive Cadre Eau de l'Union Européenne. L'UE a fixé des valeurs de PNEC pour le nonylphénol dans les eaux de surface de 0,33 $\mu g.L^{-1}$ (phase dissoute) et de 0,039 $mg.kg^{-1}$ (de poids humide) dans les sédiments (EU, 2002). Par ailleurs, l'Union Européenne soutient une politique de restriction de l'utilisation et de la commercialisation des nonylphénols/nonylphénols polyéthoxylés (Journal officiel de l'Union Européenne, juillet 2003). Ainsi, ces composés ne doivent pas dépasser 0,1 % de la masse totale dans les substances commercialisées.

2.5.6 - Composés suivis

Dans le cadre de cette étude il a été choisi de suivre les composés les plus bioaccumulables : le Nonylphénol ainsi que le Bisphénol A.

3 - MATERIEL ET METHODES

3.1 - Collecte des échantillons

L'essentiel des échantillons provient de biopsies réalisées sur des animaux vivants rencontrés en mer (Figure 5).

Des prélèvements réalisés sur des animaux échoués fournis par le Réseau National Echouage (RNE) en Méditerranée et en Atlantique ont également complété et enrichi ces biopsies. Ils ont permis d'augmenter le nombre et la provenance des individus étudiés, et de disposer de plus grands volumes d'échantillons ce qui peut être avantageux pour certaines analyses.

Pour les rorquals communs, Frank Dhermain du GECEM (Groupe d'Etude des Cétacés de Méditerranée) a fourni des prélèvements de différents organes (peau, muscle ou foie) d'un mâle échoué le 11/12/2002 à Fos sur mer, d'une femelle échouée à Toulon le 11/06/2007 et d'une jeune femelle morte le 17/10/2007 dans les filets d'un petit bateau de pêche à Marseille.

Willy Dabin du CRMM (Centre de Recherche sur les Mammifères Marins) de La Rochelle a fourni des prélèvements de 12 individus (2 mâles, 8 femelles et 2 indéterminés) échoués entre 1994 et 2006 sur la façade atlantique.

Concernant les odontocètes teutophages, des échantillons de peau, de lard et de muscle ont été fournis pour quatre dauphins de Risso, un cachalot et un juvénile de baleine à bec de Cuvier, afin de compléter l'aperçu pour les odontocètes.

3.1.1 - Campagnes en mer et effort

Les données d'observations proviennent de quatre années de campagnes. Ces observations ont été faites entre 2006 et 2009.

Année 2006 : 25 journées de campagne en mer sur *Fleur de Lampaul* réalisées par le WWF, la Fondation Nicolas Hulot et EcoOcéan Institut. La campagne s'est déroulée sur quatre mois : mai, juin, septembre et octobre.

Année 2007 : deux campagnes différentes ont été menées cette année là. La première par le CRC dans le cadre de la thèse d'Emilie Praca sur l'étude de la niche écologique de quatre espèces d'odontocètes teutophages (Praca, 2008). Au cours de cette campagne 32 jours ont été passés en mer sur les mois de juin et de septembre. La seconde campagne en 2007 a été réalisée par le WWF, la fondation Nicolas Hulot et EcoOcéan Institut à bord de *Fleur de Lampaul*. 23 journées de campagnes étalées sur les mois de mai, juin, août et septembre.

Année 2008 : La première partie de la campagne a été réalisée par le WWF et EcoOcéan Institut du mois de mai au mois d'août à bord du *WWF Columbus*. Sur ces trois mois, 15

journées ont été passées en mer. La seconde partie de la campagne, en septembre (11 journées), a été menée par le WWF et le CRC à bord du *WWF Columbus*.

Année 2009 : les données proviennent exclusivement de la campagne Cap Cétacés réalisée à bord du *WWF Columbus*. 32 jours de mission répartis sur les mois de juin (17 jours), juillet (5 jours), août (5 jours) et septembre (5 jours). Cette campagne a été menée par le WWF et le CRC.

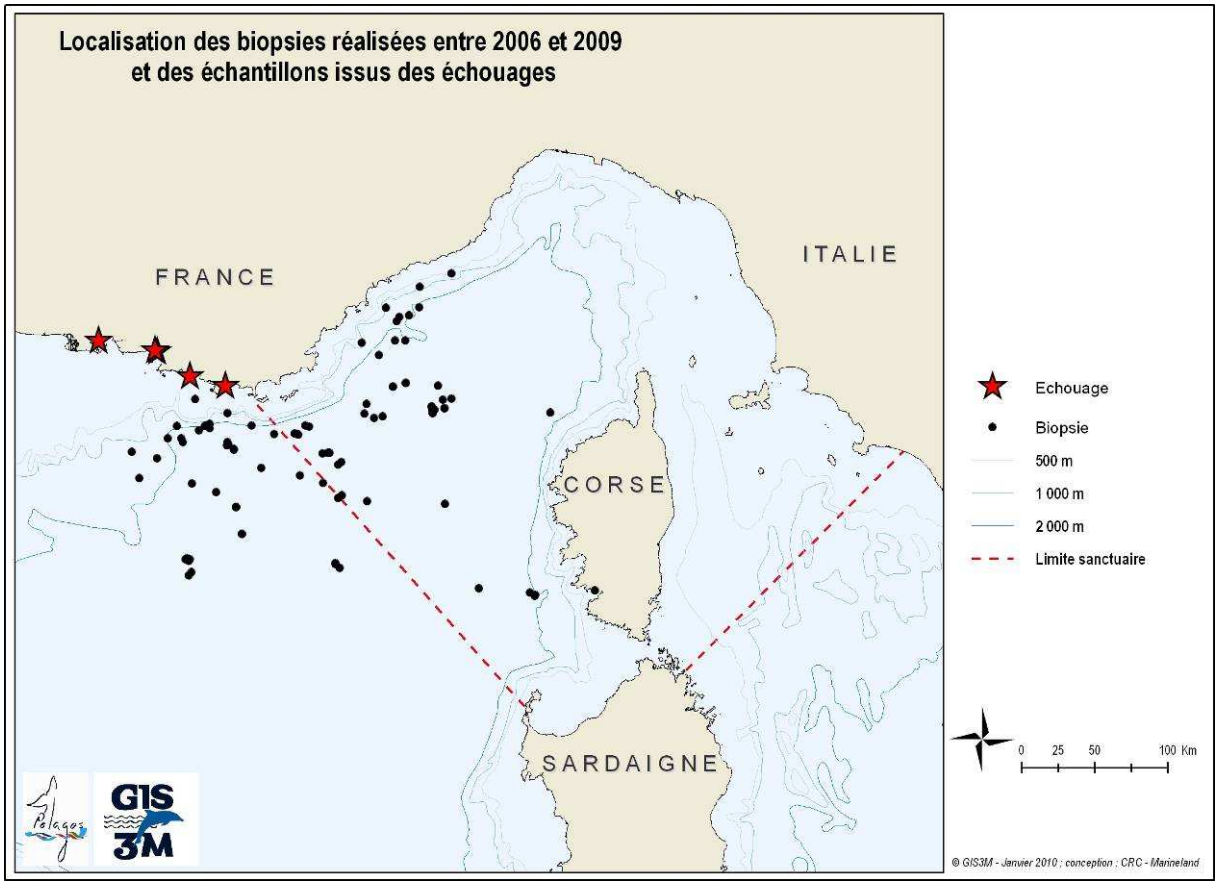


Figure 5 - Carte de localisation des biopsies (toutes espèces confondues) et des échantillons issus d'échouages de Méditerranée pour l'ensemble des campagnes (certains points sont superposés).

Effort d'observation

La distance totale parcourue au cours de ces différents programmes est de 5 418 milles nautiques, soit 10 034 kilomètres, en 138 jours de mission en mer dont 3 579 milles nautiques (6 628 km) parcourus au sein du Sanctuaire PELAGOS (Figure 6 ; Tableau 4).

Tableau 4 - Synthèse des distances parcourues en effort au cours des différentes campagnes qui ont permis la collecte de biopsies.

Structures	Campagne	Bateau	Année	Mois	Distance (km)	Nb jours
WWF - FNH - EOI	Objectifs Cétacés	Fleur de Lampaul	2006	Mai	72	2
WWF - FNH - EOI	Objectifs Cétacés	"	"	Juin	242	6
WWF - FNH - EOI	Objectifs Cétacés	"	"	Septembre	752	8
WWF - FNH - EOI	Objectifs Cétacés	"	"	Octobre	415	9
	Total 2006				**1 481**	**25**
CRC	Biopsie I	Voilier	2007	Juin	930	15
CRC	Biopsie II	"	"	Septembre	1 044	17
WWF - EOI	Objectifs Cétacés	Salsa	"	Mai	235	2
WWF - FNH - EOI	Objectifs Cétacés	Fleur de Lampaul	"	Juin	1 060	10
WWF - EOI	Objectifs Cétacés	Licorne	"	Août	110	2
WWF - FNH - EOI	Objectifs Cétacés	Fleur de Lampaul	"	Septembre	684	9
	Total 2007				**4 063**	**55**
WWF - EOI	Cap Cétacés	Columbus	2008	Mai	542	6
WWF - EOI	Cap Cétacés	"	"	Juin	442	4
WWF - EOI	Cap Cétacés	"	"	Août	371	5
WWF - CRC	Cap Cétacés	"	"	Septembre	746	11
	Total 2008				**2 100**	**26**
WWF - CRC	Cap Cétacés	Columbus	2009	Juin	1 128	17
WWF - CRC	Cap Cétacés	"	"	Juillet	527	5
WWF - CRC	Cap Cétacés	"	"	Août	411	5
WWF - CRC	Cap Cétacés	"	"	Septembre	324	5
	Total 2009				**2 389**	**32**
	Total 2006 - 2009				**10 034**	**138**

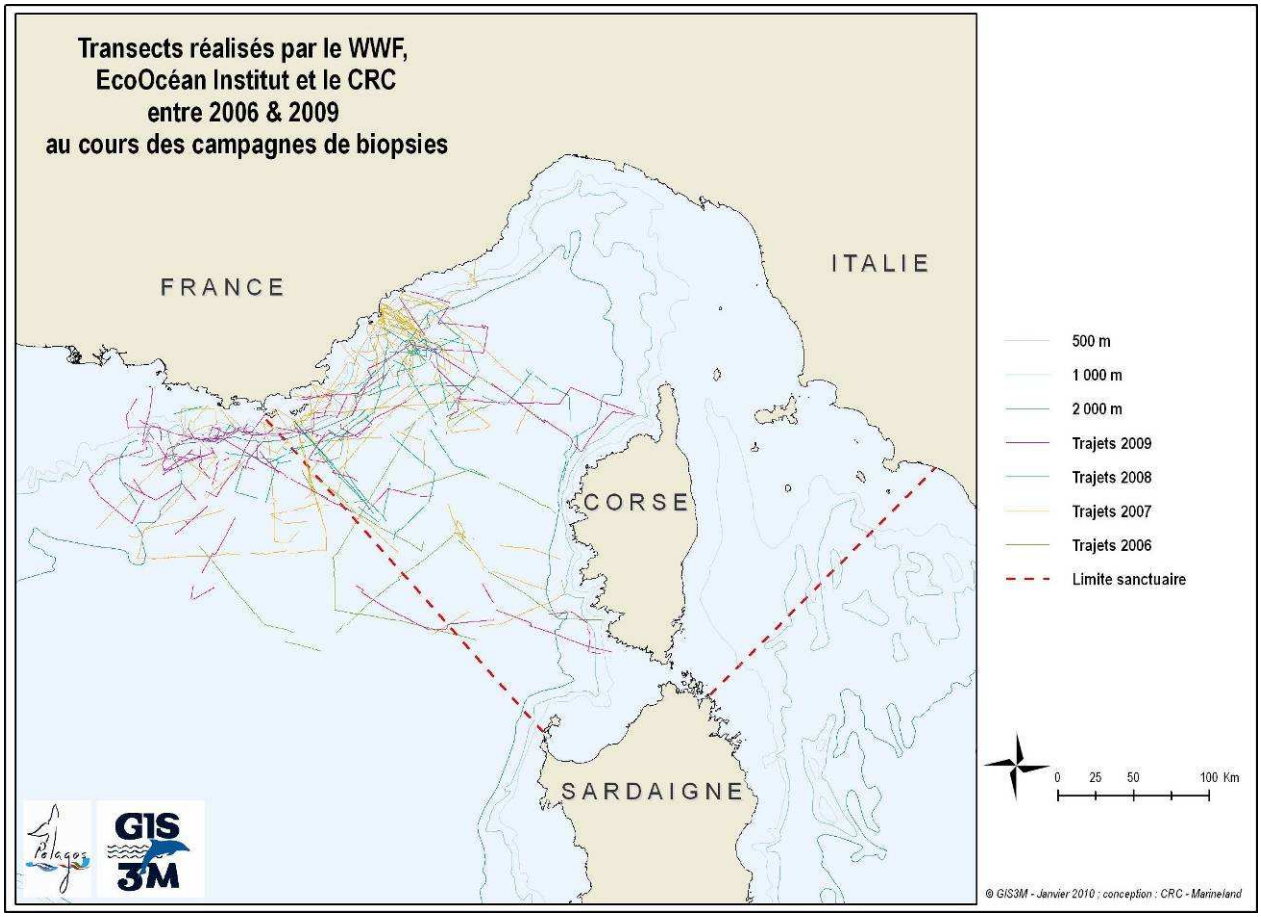


Figure 6 - Transects réalisés en effort d'observation lors des campagnes de biopsies entre 2006 et 2009.

3.1.2 - Prélèvement des biopsies

Le mode de vie des cétacés, qui ne passent que quelques pour-cent de leur vie en surface, et les contraintes du travail en mer au large, limitent fortement les options pour prélever des tissus sur des animaux vivants. Il n'est ici aucunement question de capturer ou d'endormir les animaux comme cela est souvent pratiqué en milieu terrestre. Le prélèvement doit être effectué "à la volée" au moment où les animaux sont accessibles en surface (Figure 7).

Les biopsies sont réalisées à l'aide d'une flèche d'arbalète dès lors que les autorisations sont délivrées par la DREAL. Les pointes de biopsies sont celles produites par Finn LARSEN (CETADART®) classiquement utilisées dans le milieu de la cétologie pour ce propos. Nous utilisons deux types de pointes selon les espèces : 7 mm de diamètre et 40 mm de long pour les rorquals communs et les cachalots, 7 mm de diamètre et 25 mm de long pour les globicéphales noirs.

En parallèle de la prise de biopsie une photo identification de l'animal est réalisée.

1

2

3

Figure 7 - Collecte de la biopsie avec une arbalète à bord du pneumatique (1) ; récupération de l'échantillon avec le lard qui dépasse de la pointe (2) ; préparation de l'échantillon, séparation de la peau pour les analyses génétiques et en isotopes stables et du gras pour les analyses de polluants. Tous les tubes sont congelés à bord.

3.2 - Analyses des polluants

3.2.1 - Préparation des échantillons

Les échantillons de graisse ont été traités sans préparation préalable. Les prises d'essai varient en fonction des individus entre 0,11 et 0,80 g (soit en moyenne 0,41 ± 0,18 g), ce qui représente des prises d'essai très faibles pour l'analyse de contaminants organiques.

Les échantillons ont été traités par extraction sous fluide pressurisé. Ils ont été introduits dans des cellules métalliques (Figure 8) puis ont été extraits selon les conditions décrites dans le Tableau 5 (Tapie et *al*, 2008).

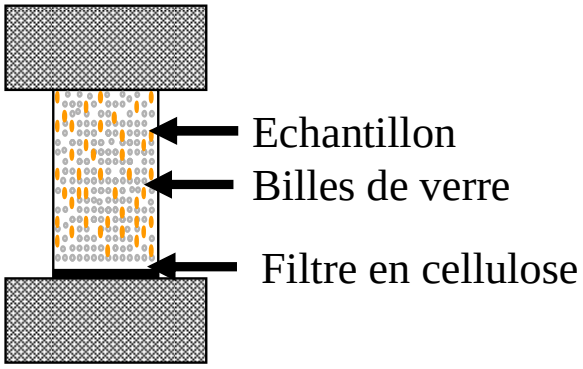


Figure 8 - Préparation de la cellule avant extraction par ASE.

Tableau 5 - Conditions d'extraction des échantillons par ASE.

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)

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 et directement filtré dans des flacons ambrés (Figure 9).

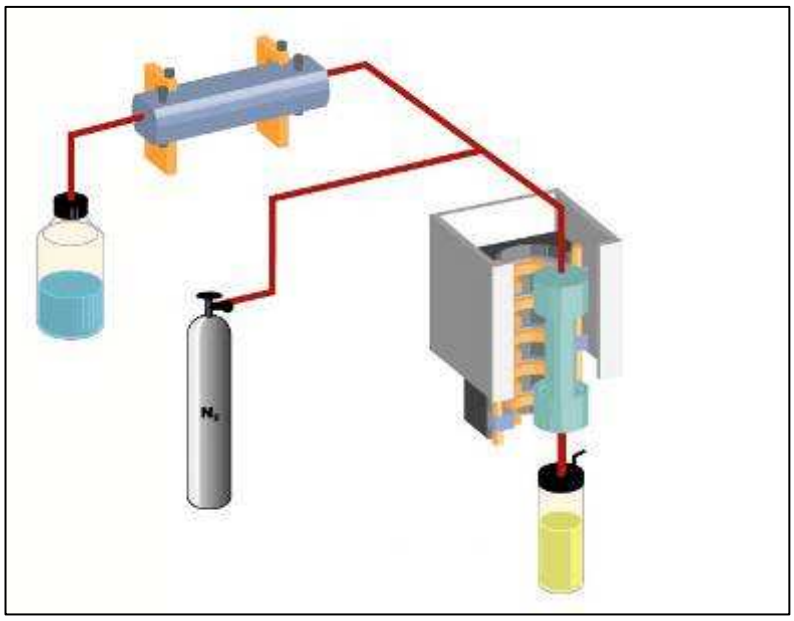


Figure 9 - Photographie et schéma de principe du système d'extraction ASE 200 (Dionex).

Pour les premières séries d'analyses (A, B et C) l'extrait ainsi récupéré a été fractionné sous contrôle gravimétrique en 3 parties aliquotes (Figure 10) :

- 5/10 pour l'analyse des PCB, PBDE et OCP
- 4/10 pour l'analyse des Alkylphénols et HAP
- 1/10 pour l'évaluation du taux lipidique

Pour la dernière série (D), l'extrait a été uniquement séparé en 2, 4/5 pour l'analyse des PCB, PBDE et OCP et 1/5 pour le taux lipidiques.

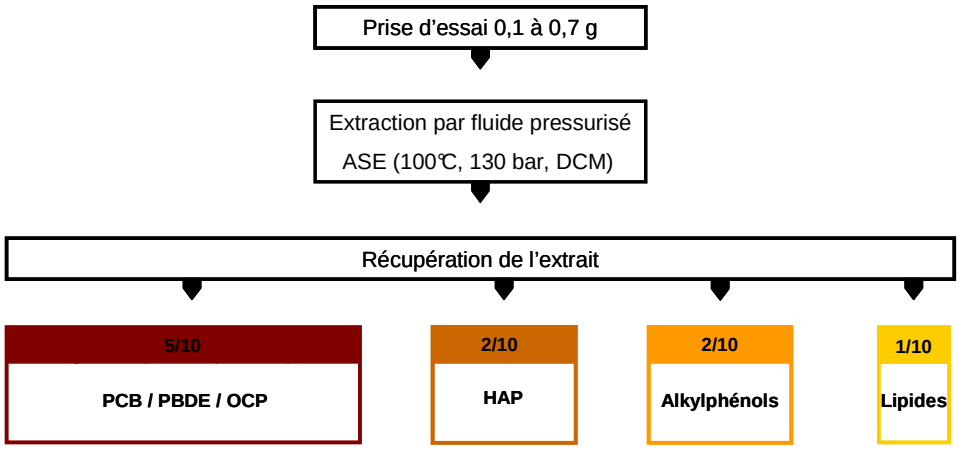


Figure 10 - Protocole de traitement des échantillons de graisse de rorquals communs pour l'analyse des PCB, PBDE, OCP, Alkylphénols et HAP

3.2.2 - Analyse des PCB, PBDE et OCP

La fraction de l'extrait organique récupéré pour l'analyse des PCB, PBDE et OCP est traitée selon le protocole de dosage illustré Figure 10. Les étalons internes (CB 30, CB 103, CB 155 et CB 198) sont ajoutés gravimétriquement pour la quantification. Après ajout de 1 ml d'iso-octane, l'extrait est re-concentré par un évaporateur sous dépression (Rapidvap, Labconco). Il est ensuite repris pour une purification sur colonne de silice acide. La purification a pour but d'éliminer les molécules interférentes pouvant gêner la quantification des PCB, PBDE et OCP. Elle sert à éliminer deux types d'interférents. D'une part, l'acide fixé sur la colonne permet une oxydation ménagée qui élimine les lipides présents dans l'extrait, ainsi que les molécules les moins stables et, d'autre part, la purification par chromatographie d'adsorption sur colonne de silice élimine les composés interférents les plus polaires (Tapie et *al*, 2008).

L'extrait est déposé en tête de colonne, puis élué avec trois fois 5 ml d'un mélange pentane/dichlorométhane (90:10, v:v). L'éluât est récupéré, re-concentré et repris dans 90 µl d'isooctane. Un étalon de rendement (octachloronaphtalène) est ajouté par gravimétrie en fin de manipulation 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, PBDE et OCP.

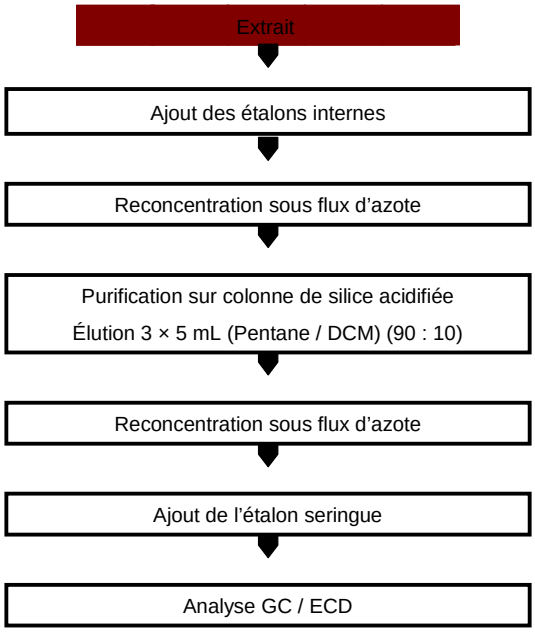


Figure 11 - Protocole de traitement des échantillons de graisse de rorquals communs pour l'analyse des PCB, PBDE, OCP.

3.2.3 - Analyse des HAP

La fraction de l'extrait organique récupéré pour l'analyse des HAP a été traitée selon le protocole de dosage illustré Figure 11.

Les étalons internes (Naphtalène d8, DBT d8, Phénanthrène d10, Anthracène d10, Fluoranthène d10, Chrysène d12, BbF d12, BeP d12, BaP d12) sont ajoutés par gravimétrie pour la quantification. Après ajout de 1 ml d'iso-octane, l'extrait est re-concentré par un évaporateur sous dépression (Rapidvap, Labconco). Il est repris pour une première purification sur colonne d'alumine (élution 3×5 ml de dichlorométhane), puis re-concentré à nouveau pour être purifié sur une colonne de silice (élution 3×5 ml d'un mélange pentane/dichlorométhane (v/v, 65/35))

Des étalons de rendement (Pyrène d10, BbF d12) sont ajoutés par gravimétrie en fin de manipulation 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 spectromètre de mass (GC/MS).

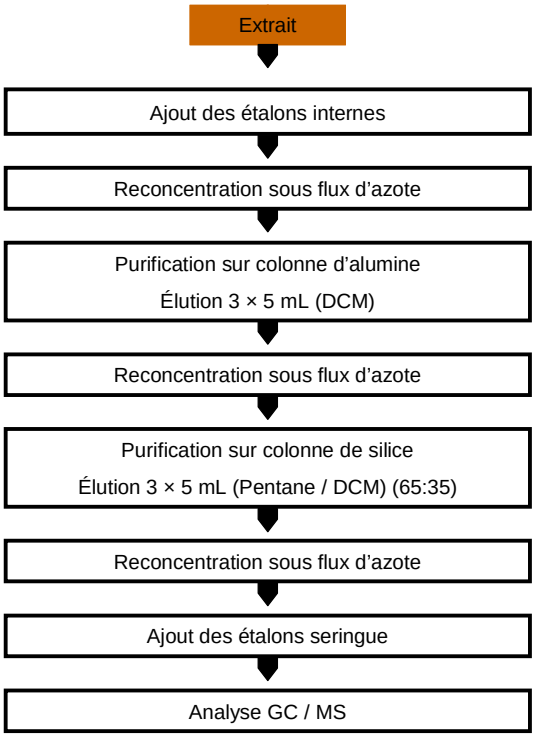


Figure 12 - Protocole de traitement des échantillons de graisse de rorquals communs pour l'analyse des HAP

3.2.4 - Analyse des alkylphénols

La fraction de l'extrait organique pour l'analyse des Alkylphenols a été traitée selon deux protocoles. Le premier protocole qui a servi à traiter les séries A, B et C est présenté Figure 13. Les étalons internes (np NP, BPA d16) sont ajoutés gravimétriquement pour la quantification. L'extrait est ensuite re-concentré puis purifié deux fois sur cartouche de florisil (élution 50 mL Hexane/Isopropanol). L'extrait final est re-concentré, repris dans le méthanol puis injecté en chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse.

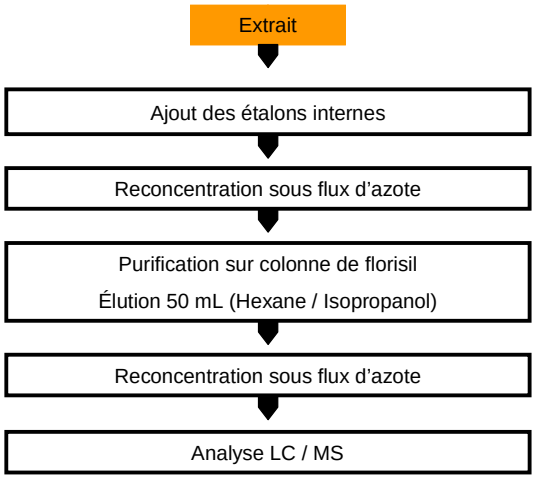


Figure 13 - Protocole de traitement des échantillons de graisse de rorquals communs pour l'analyse des alkylphénols.

Le deuxième protocole permet de traiter les échantillons prélevés en 2009 (série D) est illustré Figure 14.

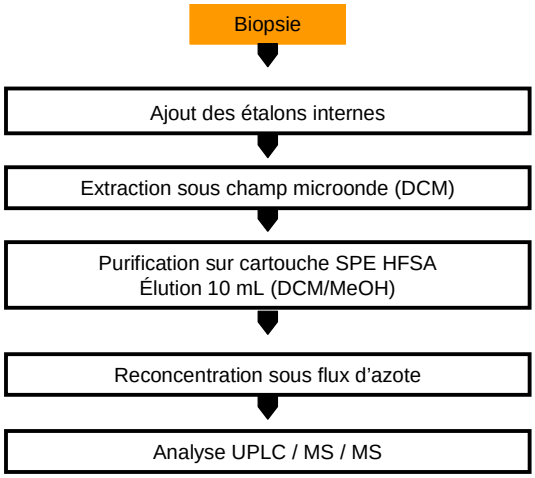


Figure 14 - Protocole de traitement des échantillons de graisse de rorquals communs de la série D pour l'analyse des alkylphénols.

3.2.5 - Évaluation des taux de lipides

L'aliquote pour l'évaluation des taux de lipides a été évaporé sous flux d'azote et la masse de matière sèche restante a été pesée. Cette masse est une approximation de la quantité de lipides présents dans l'échantillon. Ramenée à la quantité d'échantillon extraite, elle permet de calculer un taux de lipides (Marsili et Focardi, 1997) et d'exprimer les concentrations de polluant en $ng.g^{-1}$ de lipides. Cette mesure est importante car elle permet de corriger les concentrations en PCB, PBDE et OCP en éliminant les variations liées aux teneurs lipidiques des échantillons qui se sont avérées très inégales.

3.2.6 - Synthèse des analyses réalisées

Les analyses réalisées sur chaque échantillon de Rorqual commun sont listées dans le Tableau 6. Les PCB, PBDE et OCP ont été analysés sur 72 échantillons, les HAP sur 28 échantillons et les AKP sur 51 échantillons. Le Tableau 7 récapitule la liste des analyses réalisées pour les odontocètes teutophages.

3.3 - Analyses en isotopes stables

L'utilisation de $\delta_{13}C$ et $\delta_{15}N$ en écologie est basée sur son faible changement au travers des réactions métaboliques, tels que la photosynthèse, la respiration ou l'excrétion. Ce phénomène, appelé "fractionnation", est causé par la discrimination entre les isotopes lourds et légers. Les rapports isotopiques en carbone et azote d'un prédateur sont une moyenne pondérée de la composition isotopique de ses proies, potentiellement modifiée par cette étape de « fractionnation ».

Les échantillons sont conservés à -20°C jusqu'à l'analyse. Ils sont séchés à 50°C pendant 48h pour être réduits à l'état de fine poudre homogène. Un spectrogramme de masse (VG Optima, GV Instrument, UK) couplé à un analyseur N-C-S (NA 1500, Carlo Erba, Italy) est utilisé pour réaliser les mesures de rapports isotopiques.

Les rapports sont exprimés en utilisant la notation classique δ :

$$\delta X = \left(\frac{R_{sample} - R_{standard}}{R_{standard}}\right) \times 1000$$

où *X* est ^{13}C ou ^{15}N et *R* les rapport correspondant $^{13}C/^{12}C$ ou $^{15}N/^{14}N$ des échantillons ou du standard (Peedee Belemnite : v-PDB) pour le carbone et l'azote atmosphérique pour l'azote.

Les lipides sont connus pour être pauvres en ^{13}C en comparaison de la composition isotopique de la source de nourriture (Tieszen *et al.*, 1983). Plusieurs corrections arithmétiques ont été développées dans le but de corriger cette réduction (Sweeting *et al.*, 2006). L'estimation de $\delta^{13}C$ des protéines et lipides purs n'a pu être appliquée à cause d'un trop petit nombre d'échantillons, les valeurs de δ13C ont donc été corrigées en utilisant une équation de normalisation lipidique.

Tableau 6 - Listing d'échantillon et nature des analyses réalisées pour le rorqual commun.

			Analyses réalisées		
Code Echantillon	**Recapture**	**Sexe**	**AKP**	**PCB**	**HAP**
A1	= A16	F	AKP	PCB	HAP
A2		M	AKP	PCB	HAP
A3		M	AKP	PCB	HAP
A4		F	AKP	PCB	HAP
A5		M	AKP	PCB	HAP
A6		F	AKP	PCB	HAP
A7		F	AKP	PCB	HAP
A8		M	AKP	PCB	HAP
A9		M	AKP	PCB	HAP
A10		F	AKP	PCB	HAP
A11		M	AKP	PCB	HAP
A12		M	AKP	PCB	HAP
A13		F	AKP	PCB	HAP
A14		M	AKP	PCB	HAP
A15		M	AKP	PCB	HAP
A16	=A1	F	AKP	PCB	HAP
A17		F	AKP	PCB	HAP
A18		M	AKP	PCB	HAP
A19		F	AKP	PCB	HAP
B1		F	AKP	PCB	HAP
B2		F	AKP	PCB	HAP
B3		F	AKP	PCB	HAP
B4		F	AKP	PCB	HAP
B5		F	AKP	PCB	HAP
B6		M	AKP	PCB	HAP
B7		M	AKP	PCB	HAP
B8		F	AKP	PCB	HAP
B9		F	AKP	PCB	HAP
C1		F	AKP	PCB	-
C2		M	AKP	PCB	-
C3		M	AKP	PCB	-
C5		M	AKP	PCB	-
C6		M	AKP	PCB	-
C7		F	AKP	PCB	-
C8		F	AKP	PCB	-
C9		M	AKP	PCB	-
C10		M	AKP	PCB	-
C11		F	AKP	PCB	-
D1		M	AKP	PCB	-
D2		M	-	PCB	-
D3	=D5	M	AKP	-	-
D4		F	-	PCB	-
D5	=D3	M	AKP	-	-
D6		F	-	PCB	-
D8		M	AKP	PCB	-
D9		M	-	PCB	-
D10		M	-	PCB	-
D11		F	-	PCB	-
D12		M	-	PCB	-
D13		M	-	PCB	-
D14		F	-	PCB	-
D15		M	-	PCB	-
D16		F	-	PCB	-
D17		F	-	PCB	-
D18		F	-	PCB	-
D19		M	-	PCB	-
D20	=D21	M	AKP	-	-
D21	=D20	M	-	PCB	-
D22		F	AKP	-	-
D23		F	-	PCB	-
D24		M	-	PCB	-
D25		F	AKP	-	-
D26		F	-	PCB	-
D27		M	-	PCB	-
D28		F	AKP	-	-
D29		F	-	PCB	-
D30		M	-	PCB	-
D31		M	-	PCB	-
D32		M	-	PCB	-
D33		F	-	PCB	-
D34		F	-	PCB	-
D35	=B2	F	-	PCB	-
D36		M	-	PCB	-
D37	=D38	F	AKP	-	-
D38	=D37	F	-	PCB	-
D39		F	-	PCB	-
D40	=D42	F	AKP	-	-
D41	=C10	M	AKP	-	-
D42	=D40	F	-	PCB	-
BP 17-10-07			AKP	PCB	-
BP 11-06-07			AKP	PCB	-

Tableau 7 - Récapitulatif des échantillons obtenus et analyses réalisées chez les odontocètes teutophages (IS : Isotopes Stables, POPs : Polluants Organiques Persistants).

Espèce	Code	Origine	Date	Taille	Sexe	IS peau	IS muscle	POPs lard	POPs muscle
Globicéphale noir	Gm20070612-A	Biopsie	12/06/2007	6,00	M	X			
	Gm20070922-A	Biopsie	22/09/2007	4,00	?	X		X	
	Gm20080922-A	Biopsie	22/09/2008	4,00	?	X		X	
	Gm20080922-B	Biopsie	22/09/2008	4,00	F	X		X	
	Gm20071012-Str	Echouage	12/10/2007	2,52	F	X	X	X	X
Cachalot	Pm20070907-A	Biopsie	07/09/2007	9,00	?	X		X	
	Pm20070909-A	Biopsie	09/09/2007	11,50	?	X		X	
	Pm20070914-A	Biopsie	14/09/2007	11,00	?	X		X	
	Pm20070916-C	Biopsie	16/09/2007	10,00	?	X		X	
	Pm20070920-D	Biopsie	20/09/2007	10,00	?	X		X	
	Pm20070920-E	Biopsie	20/09/2007	10,00	?	X			
	Pm20080819-A	Biopsie	20/08/2008	?	?	X		X	
	Pm20080910-A	Biopsie	10/09/2008	12,00	?	X		X	
	Pm20080916-A	Biopsie	16/09/2008	10,00	?	X			
	Pm20090610-A	Biopsie	10/06/2009	12,00	?	X		X	
	Pm20090622-A	Biopsie	22/06/2009	6,00	?	X		X	
	Pm20090807-A	Biopsie	07/08/2009	?	?	X		X	
	Pm20060321-Str	Echouage	21/03/2006	12,50	M	X	X	X	
	Pm20090702-Str	Echouage	02/07/2009	?	?	X	X	X	X
Dauphin de Risso	Gg20050728-Str	Echouage	28/07/2005	3,08	M	X	X	X	X
	Gg20070401-Str	Echouage	01/04/2007	2,17	M	X	X	X	X
	Gg20070501-Str	Echouage	01/05/2007	2,40	M	X	X	X	X
	Gg20090903-Str	Echouage	03/09/2009	1,60	M	X	X	X	X
Baleine à bec de Cuvier	Zc20030416-Str	Echouage	16/04/2003	2,70	F		X		X

3.4 - Sexage

Il est préférable de connaître le sexe des animaux étudiés pour interpréter les résultats de leurs taux de polluants. En effet, les femelles sont toujours moins « chargées » que les mâles car elles transmettent une partie de leurs contaminants à leur descendance via le lait maternel. Pour les odontocètes, ce sexage peut se faire en partie sur le terrain : les femelles cachalot sont en général accompagnées de jeunes, et elles n'ont pas les mêmes habitudes ni les mêmes zones de fréquentation aux mêmes périodes que les mâles qui sont le plus souvent solitaires. Chez les globicéphales, les mâles, plus gros, sont assez facilement reconnaissables mais il est malgré tout nécessaire de déterminer de manière certaine le sexe des individus par analyse génétique.

Pour les rorquals communs, en revanche, cette identification sur le terrain est impossible, il faut avoir recours aux techniques de génétique.

Pour les échantillons prélevés sur des individus échoués le sexe est, dans la majorité des cas, identifié lors de l'examen *post mortem*.

3.4.1 - Extraction d'ADN

Le protocole utilisé a été développé dans le laboratoire du CIRAD (Risterucci *et al*., 2005). Il permet d'extraire les acides nucléiques d'un grand nombre de tissus de plantes, d'insectes, de champignons et d'animaux. Afin d'augmenter le rendement d'extraction à partir d'un tissus « mou » d'animal, un traitement à la protéinase K puis un traitement avec trois détergents ont été rajoutés.

Une centaine de milligrammes de peau est broyée dans un mortier avec de l'azote liquide (figure 15a) en présence de 100 mg de polyvinyl-poly-pyrolidone (PVPP SIGMA) jusqu'à l'obtention d'une poudre très fine puis transvasée dans un tube de 15 ml. Ajouter 2 ml de tampon MATAB (Risterucci *et al.,* 2005) complémenté de 100 µg de protéinase K puis incuber 1h à 37°C. Ajouter 1 ml de tampon TE3D (Charbit *et al.* 2004) et homogénéiser doucement et régulièrement jusqu'à ce que le contenu soit visqueux (pendant 20 à 30 min). Ajouter 250 µl de NH4/Ac (10 M) puis homogénéiser doucement (pendant 5 min). Ajouter 1 volume de CiAA (chloroforme-alcool iso-amylique (24-1)), porter à émulsion puis centrifuger 15 min à 10 000 g. Prélever la phase aqueuse et ajouter 1 volume d'isopropanol 80 %. Homogénéiser doucement jusqu'à obtenir une pelote d'acide nucléique (figure 15b). Recueillir la pelote avec l'embout d'une pipette pasteur en verre, re-suspendre dans 500 µl de TE (Tris ph7 100 mM, EDTA 0,10 mM).

L'intégrité, la qualité et la quantité de l'ADN extrait sont vérifiées respectivement par électrophorèse sur gel d'agarose (0,8 %) et par spectrophotométrie aux UV (260 nm et 280 nm). Un ADN intègre, donc non dégradé, migrera très lentement au-dessus d'une taille de 20 Kb tandis qu'un ADN dégradé migrera plus vite et de façon plus ou moins étalée (de

0,5 à 10 kb) suivant son degré de dégradation. La valeur de DO (densité optique) à 260 nm permet de calculer la concentration (C) d'ADN :

$$[C] = (DO.50(\mu g.ml^{-1}.cm).dilution.1(cm^{-1})/1000) \text{ en } \mu g.\mu l^{-1}.$$

Le ratio de la valeur de DO à 260 nm sur celle à 280 nm permet d'évaluer la qualité de l'ADN (un ratio autour de 1,8 correspond à un ADN de très bonne qualité).

Quelle que soit l'origine des échantillons (biopsies sur animaux vivants ou prélèvement sur animaux échoués), l'origine du tissu (peau, muscle, foie), leur conditionnement initial et leur durée de stockage, il a été possible d'extraire de l'ADN d'une part en quantité importante : entre 0,5 et 1,5 µg/µl, soit 25 µg à 500 µg d'ADN total sachant que seulement 0,05 µg sont nécessaires pour une PCR (*Polymerase Chain Reaction*), et d'autre part de bonne qualité (en dehors des échantillons EOA 2, 3, 4 qui ont un rapport de DO faible reflétant un ADN de moyenne qualité. Pour l'échantillon EOA3, trois extractions indépendantes ont été réalisées et toutes ont donné un ADN oxydé sur lequel aucune amplification d'ADN (sexage ou carte d'identité génétique) n'a pu être obtenue.

3.4.2 - Identification du sexe

L'identification du sexe repose sur l'amplification des fragments d'ADN spécifiques du gène ZF-X (porté par le chromosome X) et du gène ZF-Y (porté par le chromosome Y) selon Bérubé et Palsboll (1996).

Pour les échantillons 2006/2007/2008

Deux microlitres d'ADN de chaque échantillon sont déposés dans les puits d'une plaque PCR de 96 puits. Ensuite sont ajoutés 48 µl d'un Mix réactionnel de PCR contenant 31,25 pmol de chaque amorce F et R (tableau ci-dessous), 20 pmol de dNTP et 2,5 unités de polymérase de *Thermus aquaticus* (Taq pol Pfu, Stratagene).

Les conditions d'amplification sont : 94°C, 5 min ; (94°C, 45 sec ; 55°C, 30 sec ; 72°C, 45 sec) 35 cycles et 72°C pendant 7 min pour l'élongation finale. Les produits d'amplification sont ensuite visualisés après électrophorèse sur gel d'agarose 3 % (Figure 15-c). Le fragment alors amplifié pour le gène ZF-X porté par le chromosome X est constitué de 425 paires de bases. Le fragment alors amplifié pour le gène ZF-Y porté par le chromosome Y est constitué de 269 paires de bases.

ZFYX 582F	5' ATAGGTCTGCAGACTCTTCTA 3' (21 mers ; TM = 57°C)
ZFY 767R	5' TTTGTGTGAACTGAAATTACA 3' (21 mers ; TM = 52°C)
ZFX 923R	5' AGAATATGGCGACTTAGAACG 3' (21 mers ; TM = 59°C)

Tableau 8 - Valeur des DO des échantillons d'ADN de rorqual commun à 206 nm et à 280 nm et de leur concentration.

	260	280	260/280	µg/µl
A1	0,092	0,05	1,8	0,92
A2	0,072	0,048	1,5	0,72
A3	0,61	0,36	1,7	6,1
A5	0,076	0,044	1,7	0,76
A6	0,064	0,041	1,6	0,64
A7	0,049	0,03	1,6	0,49
A8	0,079	0,047	1,7	0,79
A9	0,054	0,034	1,6	0,54
A10	0,055	0,031	1,8	0,55
A11	0,064	0,038	1,7	0,64
A12	0,041	0,022	1,9	0,41
A13	0,066	0,03	2,2	0,66
A14	0,066	0,045	1,5	0,66
A15	0,094	0,054	1,7	0,94
A16	0,131	0,07	1,9	1,31
A17	0,067	0,037	1,8	0,67
A18	0,103	0,56	1,8	1,03
A19	0,84	0,48	1,8	8,4
B1	0,135	0,078	1,7	1,35
B2	0,115	0,06	1,9	1,15
B3	0,126	0,108	1,2	1,26
B4	0,165	0,089	1,9	1,65
B5	0,116	0,062	1,9	1,16
B6	0,106	0,056	1,9	1,06
B7	0,085	0,043	2	0,85
B8	0,096	0,053	1,8	0,96
B9	0,133	0,073	1,8	1,33
C1	0,155	0,081	1,9	1,55
C2	0,142	0,079	1,8	1,42
C3	0,133	0,078	1,7	1,33
C4	0,151	0,088	1,7	1,51
C6	0,161	0,101	1,6	1,61
C7	0,299	0,182	1,6	2,99
C8	0,21	0,131	1,6	2,1
C9	0,271	0,174	1,6	2,71
C10	0,208	0,125	1,7	2,08
C11	0,286	0,171	1,7	2,86
EM1	0,068	0,048	1,4	0,68
EM2007	0,075	0,042	1,8	0,75
EM2007baby	0,089	0,05	1,8	0,89

	260	280	260/280	µg/µl
D1	0,044	0,022	2,0	0,088
D2	0,126	0,066	1,9	0,252
D3	0,143	0,072	2,0	0,286
D4	0,112	0,061	1,8	0,224
D5	0,112	0,061	1,8	0,224
D6	0,19	0,104	1,8	0,38
D7	0,17	0,096	1,8	0,34
D8	0,138	0,076	1,8	0,276
D9	0,075	0,044	1,7	0,15
D10	0,058	0,033	1,8	0,116
D11	0,13	0,069	1,9	0,26
D12	0,193	0,107	1,8	0,386
D13	0,187	0,099	1,9	0,374
D14	0,072	0,052	1,4	0,144
D15	0,02	0,011	1,8	0,04
D16	0,279	0,168	1,7	0,558
D17	0,191	0,112	1,7	0,382
D18	0,02	0,01	2,0	0,04
D19	0,179	0,117	1,5	0,358
D20	0,19	0,106	1,8	0,38
D21	0,294	0,177	1,7	0,588
D22	0,043	0,022	2,0	0,086
D23	0,121	0,064	1,9	0,242
D24	0,11	0,057	1,9	0,22
D25	0,1	0,054	1,9	0,2
D26	0,083	0,042	2,0	0,166
D27	0,03	0,016	1,9	0,06
D28	0,37	0,175	2,1	0,74
D29	0,113	0,066	1,7	0,226
D30	0,096	0,06	1,6	0,192
D31	0,137	0,069	2,0	0,274
D32	0,117	0,058	2,0	0,234
D33	0,053	0,029	1,8	0,106
D34	0,076	0,043	1,8	0,152
D35	0,085	0,053	1,6	0,17
D36	0,09	0,051	1,8	0,18
D37	0,167	0,078	2,1	0,334
D38	0,152	0,102	1,5	0,304
D39	0,048	0,035	1,4	0,096
D40	0,036	0,03	1,2	0,072
D41	0,429	0,252	1,7	0,858
D42	0,072	0,051	1,4	0,144

OA1	0,33	0,19	1,7	3,3
OA2	0,4	0,37	1,2	4
OA3	0,187	156	1,2	1,87
OA4	0,095	0,076	1,3	0,95
OA5	0,205	0,131	1,9	2,05
OA6	0,17	0,11	1,5	1,7

OA7	0,417	0,218	1,9	4,17
OA8	0,56	0,31	1,8	5,6
OA9	0,527	0,28	1,9	5,27
OA10	0,387	0,201	1,9	3,87
OA11	0,445	0,23	1,9	4,45
OA12	0,206	0,106	2	2,06

Pour les échantillons 2009

Le travail a été réalisé sur la plateforme de génotypage du CIRAD.

Une extension d'ADN M13 (tableau ci-dessous) a été ajouté eà l'extrémité 5' des amorces « reverse » (R) spécifiques du gène ZF-X et ZF-Y servant à l'amplification d'ADN (PCR). Une amorce M13 marquée avec le chromophore IRD700 (« colorant rouge ») sera ajoutée dans les réactions de PCR spécifique du gène ZF-X tandis qu'une amorce M13 marquée avec le chromophore IRD800 (« colorant vert ») sera ajoutée dans les réactions de PCR spécifique du gène ZF-Y.

ZFYX 582F	5' ATAGGTCTGCAGACTCTTCTA 3'
ZFY 767R	5' CACGACGTTGTAAAACGACTTTGTGTGAACTGAAATTACA3'
ZFX 923R	5' CACGACGTTGTAAAACGACAGAATATGGCGACTTAGAACG3'

Les produits de l'amplification sont alors visualisés sur un séquenceur automatique (Li-Cor®) qui permet de visualiser deux images de migration en même temps.

Il est donc possible de multiplexer les produits de PCR obtenus par différents marqueurs à la fois en fonction de la taille des allèles, et selon le marquage des amorces par l'un des deux colorants IRD700 ou IRD800.

Le fragment amplifié pour le gène ZF-X porté par le chromosome X est constitué de 425 paires de bases fluoresce en rouge.

Le fragment amplifié pour le gène ZF-Y porté par le chromosome Y est constitué de 269 paires de bases fluoresce en vert.

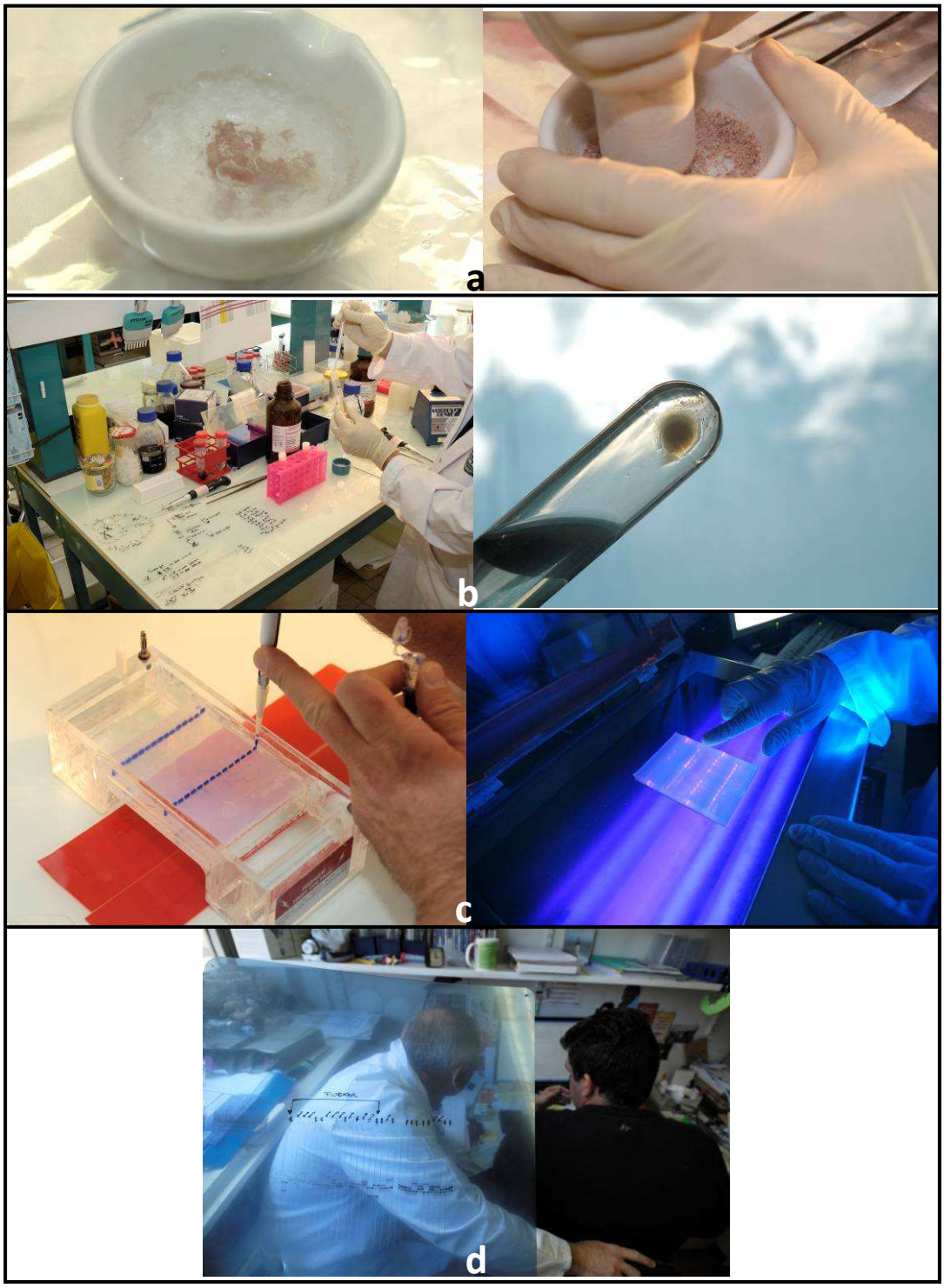


Figure 15 - Illustration des différentes étapes de l'analyse moléculaire des biopsies de rorquals communs. (a) Broyage dans un mortier en présence d'azote liquide de morceaux de tissu de rorqual. (b) Purification de l'ADN par une étape de précipitation à l'isopropanol. (c) Dépôt sur gel d'agarose 3 % des produits de PCR permettant d'identifier le sexe des Rorquals. Visualisation des bandes d'ADN sous UV après électrophorèse et coloration au Bet. (d) Autoradiographie permettant de visualiser les différents allèles d'un locus microsatellite donné. Après codage des allèles, les données sont intégrées et traitées via « DARwin » afin de construire un arbre génétique. (Photos réalisées par Frédéric Bassemayousse Mi Air Mi Eau Photo).

3.4.3 - Identification génétique des individus

L'identification génétique repose sur l'amplification de fragments d'ADN microsatellites spécifiques d'un locus donné et présentant du polymorphisme (plusieurs formes alléliques) selon Bérubé *et al.* (1999) et Palsboll *et al.* (1997). Les couples d'amorces microsatellites (synthétisés par SIGMA-ALDRICH) qui ont été utilisés pour cette étude sont décrits dans le tableau ci-dessous.

En 2008, les premières expériences ont été réalisées comme suit. Le marquage de 31,25 pmol de l'amorce F est réalisé à 37°C pendant 45 minutes en présence de 10 unités de protéine kinase (Fermentas) et de 0,5 µCi d'ATPγ33 (3 000 mCi/mmol, Perkin Elmer). Deux microlitres d'ADN de chaque échantillon sont déposés dans les puits d'une plaque PCR de 96 puits. Ensuite sont ajoutés 48 µl d'un Mix réactionnel de PCR contenant 31,25 pmol de chaque amorce F (marqué préalablement au P33 en 5', ci-dessus) et R, 20 pmol de dNTP et 2,5 unités de polymérase de *Thermus aquaticus* (Taq pol Pfu, Stratagene). Les conditions d'amplification sont : 94°C, 5 min ; (94°C, 45 sec ; TM, 30 sec ; 72°C, 45 s) 35 cycles et 72°C pendant 7 min pour l'élongation finale. Les amplicons (fragment d'ADN amplifié par PCR (réaction en chaîne par polymérase)) sont ensuite visualisés par autoradiographie après une électrophorèse sur gel d'acrylamide 5 %, urée 7M.

A partir de 2009, le travail a été réalisé sur la plateforme de génotypage du CIRAD.

Les couples d'amorces microsatellites (synthétisés par SIGMA-ALDRICH), qui ont été utilisés pour cette étude, ont été modifiés avec l'ajout d'une extension d'ADN M13 (CACGACGTTGTAAAACGAC) à l'extrémité 5' des amorces « reverse » (R). Il est donc possible de multiplexer les produits de PCR obtenus par différents marqueurs à la fois en fonction de la taille des allèles, et selon le marquage des amorces par l'un des deux colorants IRD700 ou IRD800.

Pour chaque locus microsatellite, les allèles ont été codés en fonction de la taille du produit de PCR. Un individu possède deux locus microsatellites (héritage paternel et maternel) soit de formes alléliques identiques (un seul produit de PCR) codés n,n (homozygote) soit de formes alléliques différentes (deux produits de PCR de tailles différentes) codés n,n' (hétérozygote). Des analyses de Neighbor-Joining (NJ) ont été réalisées avec le logiciel DARwin développé par Perrier, X. et Jacquemoud-Collet, J.P. du CIRAD (2006, http://darwin.cirad.fr/darwin).

Première série microsatellite (bérubé *et al.,* 1996)			
Nom	Séquence 5'-3'	Taille et temp d'hybridation	Nb d'allèles
GT023R	CATTTCCTACCCACCTGTCAT	19 mers ; TM = 60°C	7
GT023F	GTTCCCAGGCTCTGCACTCTG	21 mers ; TM = 66°C	
GT101R	CTTTCTCCTAGTGCTCCCCGC	21 mers ; TM = 66°C	5
GT101F	CTGTGCTGGTATATGCTATCC	20 mers ; TM = 60°C	

GT195R GT195F	TGAGAAAGATGACTATGACTC TGAAGTAACAGTTAATATACC	21 mers ; TM = 55°C 21 mers ; TM = 51°C	8
GT211R2 GT211F2	CATCTGTGCTTCCACAAGCCC GGCACAAGTCAGTAAGGTAGG	21 mers ; TM = 62°C 21 mers ; TM = 60°C	6
GT271F GT271R	GCTCACACTGGTAATCTGTGG CCCTAGGAAGGATAGACATAG	21 mers ; TM = 60°C 21 mers ; TM = 60°C	6
GT307F GT307R	ATATAGTTATATCTGTTGCTC TTAGCGAGTCATATTATAAAG	21 mers ; TM = 51°C 21 mers ; TM = 51°C	7
GT310R GT310F	TAACTTGTGGAAGATGCCAAC GAATACTCCCAGTAGTTTCTC	21 mers ; TM = 57°C 21 mers ; TM = 57°C	2
GT575F GT575R	TATAAGTGAATACAAAGACCC ACCATCAACTGGAAGTCTTTC	21 mers ; TM = 53°C 21 mers ; TM = 57°C	5

Seconde série microsatellite (Palsboll *et al.,* 1998)			
Nom	Séquence 5'-3'	Taille et temp d'hybridation	Nb d'allèles
ACCC392F ACCC392R	CTGATGTTTGGTTGATTAC CTTCCCTCCATCCAAGTATTG	19 mers ; TM = 52°C 21 mers ; TM = 59°C	7
GATA028F GATA028R	AAAGACTGAGATCTATAGTTA CGCTGATAGATTAGTCTAGG	21 mers ; TM = 51°C 20 mers ; TM = 58°C	19
GATA053F GATA053R	ATTGGCAGTGGCAGGAGACCC GACACAGAGATGTAGAAGGAG	21 mers ; TM = 64°C 21 mers ; TM = 59°C	14
GATA098F GATA098R	TGTACCCTGGATGGATAGATT TCACCTTATTTTGTCTGTCTG	21 mers ; TM = 57°C 21 mers ; TM = 55°C	8
GATA417F GATA417R	CTGAGATAGCAGTTACATGGG TCTGCTCAGGAAATTTTCAAG	21 mers ; TM = 59°C 21 mers ; TM = 55°C	3
GGAT416F GGAT416R	GAGACCACTGCAGGAACACAG CAGAGGCTGACTTTATACCAC	21 mers ; TM = 62°C 21 mers ; TM = 59°C	4
GGAA520F GGAA520R	TAGCAGATCTGAGTTATTTCC TAGCATTTTAGTCTTGGGTGG	21 mers ; TM = 55°C 21 mers ; TM = 57°C	18
TAA023F TAA023R	CTCGCACAGAAATGAAGACCC AGAGCCTGAACCAGAACAAGG	21 mers ; TM = 60°C 21 mers ; TM = 60°C	7
TAA031F TAA031R	AGATCCTGCAAGCCGCATCGG TCACTTCCTACTTTGATGAGG	21 mers ; TM = 64°C 21 mers ; TM = 57°C	3

4 - RÉSULTATS

4.1 - Les observations de cétacés

Au total 898 observations ont été enregistrées en quatre ans, représentant 5 852 individus (Figure 16 ; Tableau 9).

L'espèce la plus représentée est le dauphin bleu et blanc qui comptabilise à lui seul 638 observations soit 72 % de l'ensemble des observations. La seconde espèce la plus fréquemment observée est le rorqual commun avec 20 % des observations (178 observations). Ensuite en nombre bien inférieur sont observés les cachalots (44 observations), les dauphins de Risso (11 observations), les globicéphales noirs (9 observations) et enfin les grands dauphins (4 observations). Les observations indéterminées représentent 1,5 % des observations (14 observations).

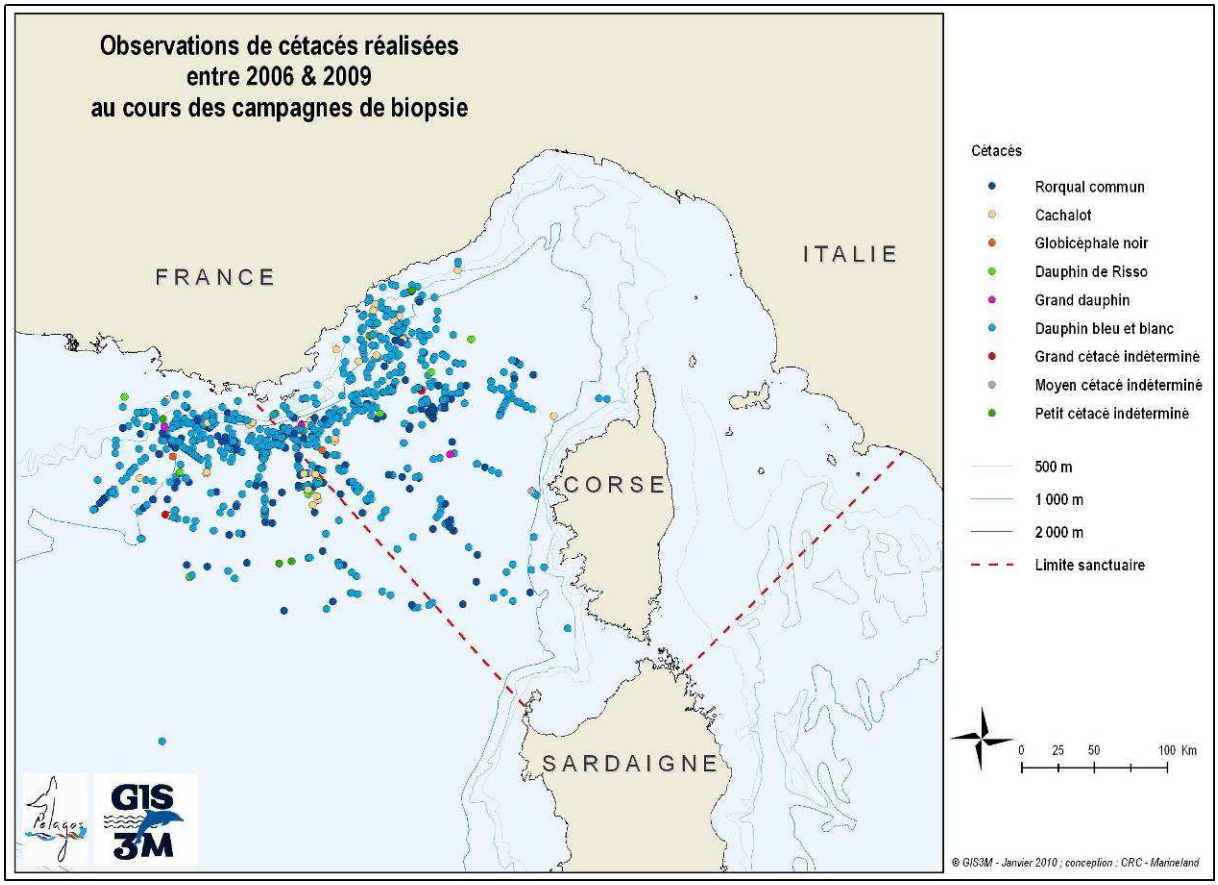


Figure 16 - Représentation de toutes les observations de cétacés par espèces réalisées lors des campagnes de collecte de biopsies de 2006 à 2009.

Tableau 9 - Synthèse des observations (et du nombre d'individus entre parenthèses) par année, par mois et par espèce, ainsi que des effectifs moyens dénombrés au cours des différentes campagnes de biopsies entre 2006 et 2009.

ANNEE	MOIS	*Balaenoptera physalus*	*Physeter macrocephalus*	*Globicephala melas*	*Grampus griseus*	*Tursiops truncatus*	*Stenella coeruleoalba*	*Grand Cétacé Indéterminé*	*Moyen Cétacé Indéterminé*	*Petit Cétacé Indéterminé*	Total
2006	Mai	2 *(2)*	0 *(0)*	0 *(0)*	0 *(0)*	0 *(0)*	1 *(2)*	0 *(0)*	0 *(0)*	0 *(0)*	3 *(4)*
	Juin	19 *(71)*	0 *(0)*	0 *(0)*	0 *(0)*	0 *(0)*	19 *(173)*	0 *(0)*	0 *(0)*	1 *(1)*	39 *(245)*
	Septembre	10 *(17)*	0 *(0)*	2 *(62)*	0 *(0)*	2 *(8)*	38 *(285)*	1 *(1)*	1 *(1)*	1 *(1)*	55 *(375)*
	Octobre	6 *(13)*	0 *(0)*	0 *(0)*	1 *(10)*	0 (0)	32 *(224)*	0 *(0)*	0 *(0)*	5 *(11)*	44 *(258)*
Total 2006		**37 *(103)***	**0 *(0)***	**2 *(62)***	**1 *(10)***	**2 *(8)***	**90 *(684)***	**1 *(1)***	**1 *(1)***	**7 *(13)***	**141 *(882)***
2007	Mai	3 *(5)*	0 *(0)*	0 *(0)*	0 *(0)*	0 *(0)*	14 *(112)*	1 (1)	0 *(0)*	0 *(0)*	18 *(118)*
	Juin	16 *(24)*	3 *(3)*	1 *(120)*	1 *(1)*	0 *(0)*	109 *(1376)*	0 *(0)*	0 *(0)*	0 *(0)*	130 *(1524)*
	Août	3 *(5)*	2 *(6)*	0 *(0)*	2 *(9)*	0 *(0)*	6 *(40)*	0 *(0)*	0 *(0)*	0 *(0)*	13 *(60)*
	Septembre	26 *(35)*	13 *(25)*	3 *(40)*	2 *(6)*	2 (15)	102 *(673)*	0 *(0)*	0 *(0)*	0 *(0)*	147 *(791)*
Total 2007		**48 *(69)***	**18 *(34)***	**4 *(160)***	**5 *(16)***	**2 *(15)***	**231 (*2 201)***	**1 *(1)***	**0 *(0)***	**0 *(0)***	**308 *(2 493)***
2008	Mai	8 *(12)*	4 *(6)*	0 *(0)*	0 *(0)*	0 *(0)*	42 *(366)*	0 *(0)*	0 *(0)*	4 *(10)*	58 *(394)*
	Juin	4 *(5)*	1 *(1)*	0 *(0)*	0 *(0)*	0 *(0)*	14 *(190)*	0 *(0)*	0 *(0)*	0 (0)	19 *(196)*
	Août	12 *(17)*	3 *(4)*	0 *(0)*	0 *(0)*	1 *(10)*	21 *(105)*	0 *(0)*	0 *(0)*	0 (0)	37 *(136)*
	Septembre	14 *(15)*	3 *(4)*	3 (57)	1 *(13)*	0 *(0)*	69 *(313)*	0 *(0)*	0 *(0)*	0 (0)	90 *(402)*
Total 2008		**38 *(49)***	**11 *(15)***	**3 (57)**	**1 *(13)***	**1 *(10)***	**146 *(974)***	**0 *(0)***	**0 *(0)***	**4 *(10)***	**204 *(1 128)***
2009	Juin	29 *(45)*	5 *(7)*	0 *(0)*	1 (2)	0 *(0)*	62 *(405)*	0 *(0)*	0 *(0)*	0 *(0)*	109 *(459)*
	Juillet	0 *(0)*	0 *(0)*	0 *(0)*	0 *(0)*	0 *(0)*	24 *(161)*	0 *(0)*	0 *(0)*	0 *(0)*	28 *(163)*
	Août	6 *(10)*	4 *(4)*	0 *(0)*	0 *(0)*	0 *(0)*	22 *(182)*	0 *(0)*	0 *(0)*	0 *(0)*	35 *(196)*
	Septembre	5 *(10)*	1 *(2)*	0 *(0)*	3 (17)	0 *(0)*	32 *(204)*	0 *(0)*	0 *(0)*	0 *(0)*	41 *(232)*
Total 2009		**40 *(65)***	**10 *(13)***	**0 *(0)***	**4 (19)**	**0 *(0)***	**140 *(952)***	**0 *(0)***	**0 *(0)***	**0 *(0)***	**213 *(1 050)***
Total		**163 *(286)***	**39 *(62)***	**9 *(279)***	**11 *(58)***	**5 *(35)***	**607 *(4 811)***	**2 *(2)***	**1 *(1)***	**11 *(23)***	**866 *(5 553)***
Effectifs moyens		**1,8**	**1,6**	**31,0**	**5,3**	**7,0**	**7,9**	**1,0**	**1,0**	**2,1**	

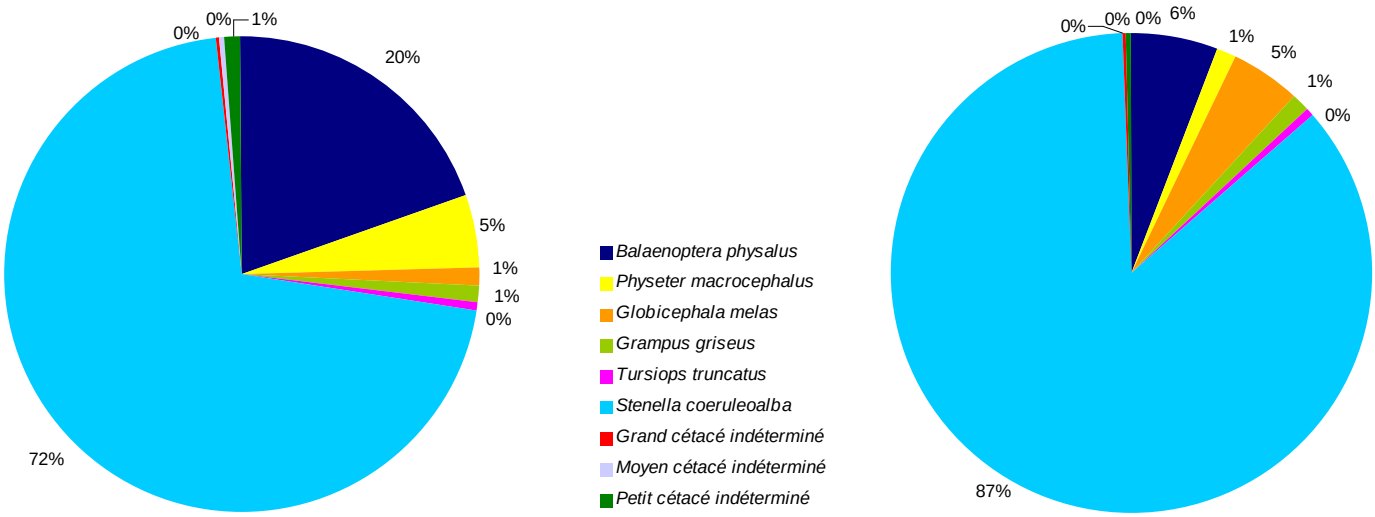


Figure 17 - Répartition par espèce du nombre d'observations et d'individus entre 2006 et 2009.

Cette forte représentativité des dauphins bleu et blanc est encore plus marquée lorsque l'on regarde le nombre d'individus : cette espèce représente 87 % des individus observés au cours de ces quatre années de campagne (Figure 17). Cet effectif s'explique d'une part par le grand nombre d'observations de cette espèce mais également par l'effectif des groupes dont la moyenne est de 7,9 individus.

Pour les autres delphinidés rencontrés au cours de ces quatre années les effectifs moyens sont de 31 individus en moyenne pour les globicéphales noirs, cependant ce chiffre très élevé est en grande partie dû à une observation d'un groupe de 120 individus en juin 2007 ; 5,3 individus par groupe rencontré chez les dauphins de Risso, et 7 individus en moyenne pour les grands dauphins.

4.2 - Sexage et carte d'identité génétique des individus

4.2.1 - Sexage

Pour ce qui concerne les odontocètes, les échantillons destinés aux analyses génétiques, dont le sexage, ont été transmis pour le cachalot à Sarah L. Mesnick du *Southwest Fisheries Science Center* de la NOAA (*National Oceanic and Atmospheric Administration*) dans le cadre du programme mondial *Cachalote Consortium*. Pour les globicéphales noirs, les échantillons ont été transmis à Philippe Verborgh de CIRCE Espagne (*Conservation, Information and Research on Cetaceans*) pour un projet de génétique de l'espèce au niveau du bassin méditerranéen. Les résultats du sexage pour les cachalots ne sont pas encore disponibles, mais pour les globicéphales deux biopsies ont déjà été analysées, l'individu Gm20070612-A étant un mâle et l'individu Gm20080922-B une femelle (Tableau 7).

Pour les rorquals communs, tous les ADN ont été amplifiés par PCR et chaque individu présente un produit de PCR d'une taille de 425 pb correspondant à la présence du chromosome X (qu'il soit mâle ou femelle).

Les individus qui présentent une bande supplémentaire de 269 pb sont donc des individus mâles (Figure 18).

Dans notre échantillon, nous avons un couple décrit à partir des observations de terrain comme étant une mère et son petit (A7 et A6 respectivement).

Cette expérience de sexage a été « verrouillée » avec des individus échoués de sexe connu établi lors de l'examen *post mortem*. Le profil des produits de PCR d'un mâle et de deux femelles de Méditerranée fourni par le GECEM est cohérent avec les données d'autopsie.

Pour les individus de l'océan Atlantique, aucun produit de PCR n'a été obtenu pour les individus OA1 et OA3 confirmant la mauvaise qualité des ADN probablement liée à l'état de décomposition avancé des cadavres. Pour les autres individus, les profils PCR sont cohérents avec l'identification du sexe par autopsie. Pour les deux individus de sexe indéterminé, les profils PCR montrent qu'OA4 est une femelle tandis qu'OA6 est un mâle.

Le profil des produits de PCR de A10 et A11, Figure 18-A, montre qu'ils sont respectivement un mâle et une femelle.

Cependant lors de l'élaboration de la carte d'identité génétique il se trouve que A10 et B4 se sont révélés être un seul et même individu. Ceci est en contradiction avec l'information du sexage. Les hypothèses de gémellité ou de frère/sœur issu d'un même père ont été écartées par les spécialistes en cétologie. Il y a donc eu une erreur d'étiquetage pour ces deux échantillons mais on ignore à quelle étape (extraction d'ADN, conditionnement des ADN dilués, réaction de PCR).

Une nouvelle extraction d'ADN et un test de sexage ont été réalisés sur différents individus dont A10 et A11. Le profil de PCR, Figure 19, permet d'affirmer que A10 est bien une femelle et que A11 est un mâle. En fait lors du premier dépôt des produits de PCR sur gel d'agarose, il y a eu une inversion de ces deux échantillons.

Pour les échantillons de 2009, nous avons adapté le protocole de détermination du sexe des rorquals communs basé sur la présence/absence de l'allèle ZF-Y avec la technique de génotypage sur séquenceur automatique développée sur le plateau technique régional du CIRAD. Cette technique permet de traiter un plus grand nombre d'échantillons (jusqu'à 96 individus par dépôt sur gel d'électrophorèse) et de gagner du temps « laboratoire » ainsi que du temps « analyse des données ».

Le sexe de tous les animaux échantillonnés a pu être déterminé (Tableau 10). En plus des contrôles avec les animaux échoués, certains indices du terrain permettent de valider les données de sexage. En effet, l'individu A7 considérée comme une mère avec son petit (A6) a effectivement été identifiée comme une femelle.

Les biopsies A1 et A16 estimées comme étant le même individu par la photo indentification ont bien le même sexe : femelle.

Le sexage des échantillons C2 et C4 correspondant à un même individu qui a été biopsié dans la même journée (authentifié par photo identification) confirme un mâle.

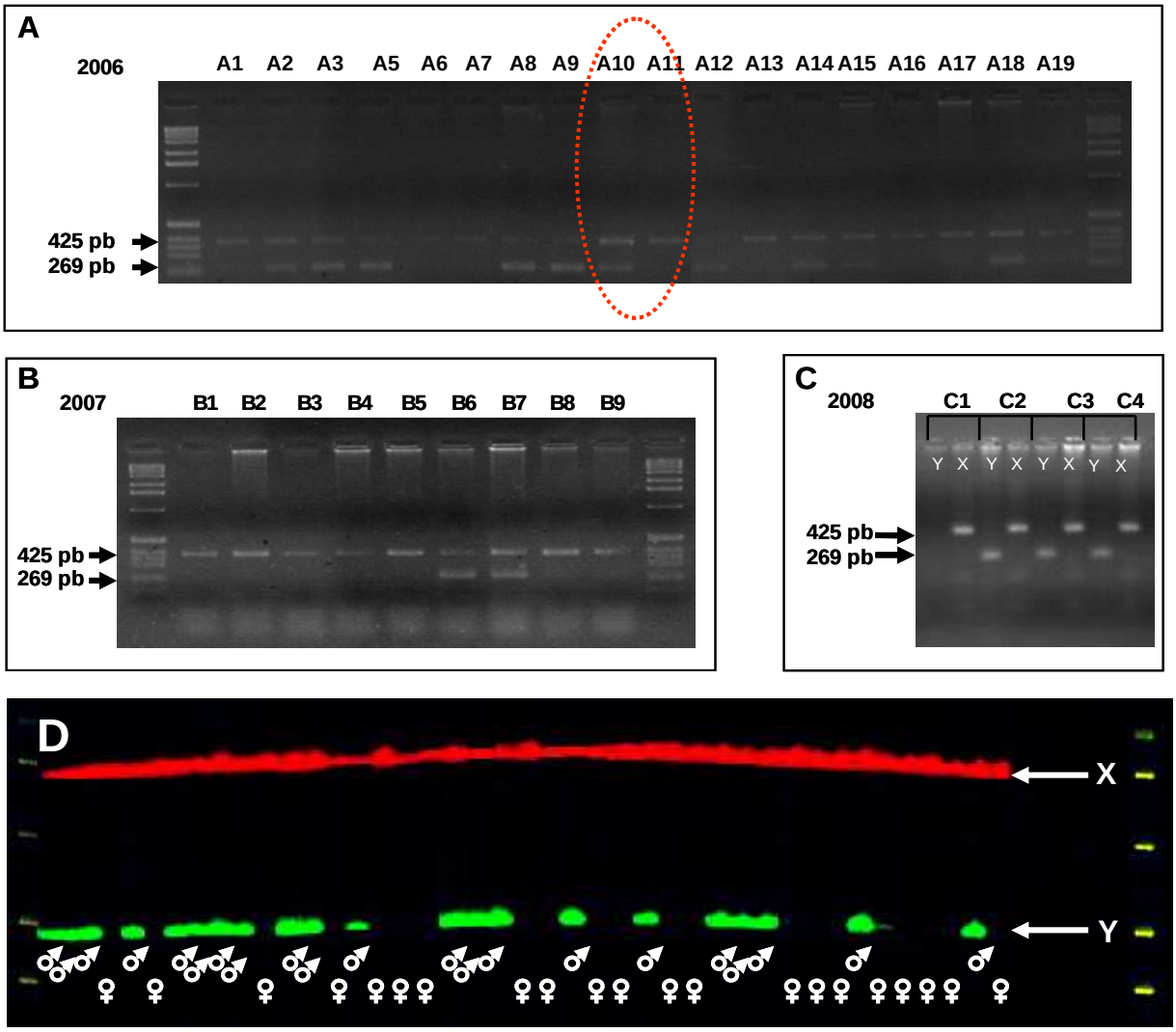


Figure 18 - Électrophorèse des produits de PCR ZFY et ZFX des échantillons de rorquals communs de 2006 (A), 2007 (B), 2008 (C) et 2009 (D). Figures A et B, pour chaque individu, les produits de PCR spécifique à ZFY et à ZFX ont été réunis et déposés dans un même puits. Figure C, pour chaque individu, les produits de PCR spécifique à ZFY et à ZFX ont été déposés dans des puits indépendants. Figure D, électrophorèse sur séquenceur automatique Li-Cor®. La fluorescence rouge correspond le produit d'amplification marqué au IRD700 spécifique de l'allèle « femelle », en vert correspond le produit d'amplification marqué au IRD800 spécifique de l'allèle « mâle ».

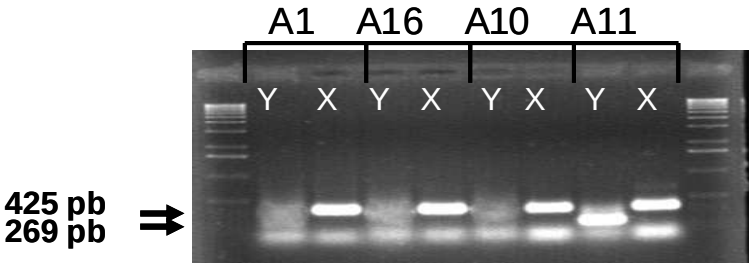


Figure 19 - Vérification du sexe des échantillons A10 et A11

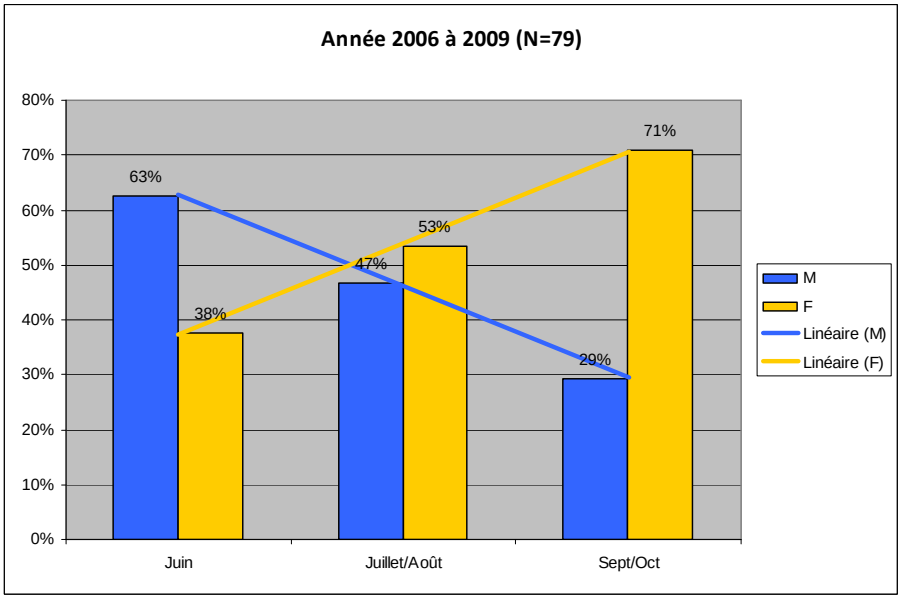
Tableau 10 - Récapitulatif des biopsies, des échantillons collectés et du sexe correspondant pour le rorqual commun.

Code	Date	Heure	Sexe	Obs
Rorqual 2006				
A1	21/06/06	7h00	F	=A16
A2	21/06/06	15h06	M	
A3	21/06/06	15h06	M	
A4	21/06/06	18h11	ND	
A5	21/06/06	18h12	M	
A6	22/06/06	10h04	F	
A7	22/06/06	1004	F	
A8	22/06/06	11h16	M	
A9	22/06/06	11h17	M	
A10	22/06/06	14h07	F	=B4
A11	22/06/06	17h52	M	
A12	24/06/06	10h00	M	
A13	24/06/06	10h01	F	
A14	24/06/06	10h02	M	
A15	06/10/06	7h43	M	
A16	06/10/06	7h43	F	=A1
A17	10/10/06	18h06	F	
A18	10/10/06	18h06	M	
A19	12/10/06	14h48	F	
2007				
B1	18/06/07	13h56	F	
B2	27/08/07	12h57	F	=D35
B3	08/09/07	7h10	F	
B4	08/09/07	17h31	F	=A10
B5	10/09/07	13h55	F	
B6	10/09/07	18h04	M	
B7	15/09/07	9h43	M	
B8	15/09/07	9h43	F	
B9	16/09/07	15h22	F	
2008				
C1	02/06/08	17h09	F	
C2	03/06/08	6h54	M	=C4
C3	03/06/08	9h04	M	
C4	04/06/08	9h04	M	=C2
C6	19/08/08	17h14	M	
C7	28/08/08	10h31	F	
C8	22/08/08	12h06	F	
C9	22/08/08	12h26	M	
C10	17/09/08	17h48	M	=D41
C11	18/09/08	16h59	F	
Échouages Rorquals				
EM1	11/12/02	-	M	Med
EM2007	11/06/07	-	F	Med
EM2007BB	17/10/07	-	F	Med
OA1	-	-	ND	Atlant
OA2	-	-	M	Atlant
OA3	-	-	ND	Atlant
OA4	-	-	F	Atlant

Code	Date	Heure	Sexe	Obs
Rorqual 2009				
D1	09/06/09	12h12	M	
D2	09/06/09	15h03	M	
D3	15/06/09	15h55	M	=D5
D4	15/06/09	17h28	F	
D5	15/06/09	19h24	M	=D3
D6	16/06/09	11h17	F	
D7	16/06/09	11h17	M	
D8	17/06/09	12h12	M	
D9	17/06/09	12h12	M	
D10	17/06/09	12h12	M	
D11	18/06/09	9h31	F	
D12	18/06/09	9h31	M	
D13	18/06/09	9h31	M	
D14	18/06/09	9h31	F	
D15	18/06/09	11h40	M	
D16	22/06/09	12h20	F	
D17	24/06/09	8h46	F	
D18	24/06/09	12h33	F	
D19	24/06/09	12h33	M	
D20	25/06/09	9h02	M	=D21
D21	25/06/09	9h02	M	=D20
D22	25/06/09	14h48	F	
D23	01/08/09	18h44	F	
D24	01/08/09	18h44	M	
D25	02/08/09	8h12	F	
D26	05/08/09	13h13	F	
D27	05/08/09	13h41	M	
D28	05/08/09	13h41	F	
D29	05/08/09	16h15	F	
D30	06/08/09	19h12	M	
D31	06/08/09	19h12	M	
D32	06/08/09	19h39	M	
D33	11/09/09	8h02	F	
D34	11/09/09	14h08	F	
D35	11/09/09	20h10	F	=B2
D36	12/09/09	14h18	M	
D37	13/09/09	9h03	F	=D38
D38	13/09/09	9h03	F	=D37
D39	13/09/09	12h58	F	
D40	13/09/09	12h58	F	=D42
D41	13/09/09	12h58	M	=C10
D42	13/09/09	12h58	F	=D40
Échouages Rorquals				
OA5	-	-	F	Atlant
OA6	-	-	M	Atlant
OA7	-	-	F	Atlant
OA8	-	-	F	Atlant
OA9	-	-	F	Atlant
OA10	-	-	F	Atlant
OA11	-	-	M	Atlant
OA12	-	-	F	Atlant

4.2.2 - Sex-ratio chez le rorqual commun

Le sex-ratio obtenu sur les échantillons de rorquals communs sur l'ensemble des campagnes 2006, 2007, 2008 et 2009 est globalement équilibré avec 40 femelles et 39 mâles. Si l'on examine ce sex-ratio en fonction des mois sur les quatre années rassemblées, ou sur l'année 2009, il paraît favorable aux mâles en juin. L'abondance de ces derniers décroissant au cours de l'été. Néanmoins notre échantillon ne nous permet pas de tester statistiquement cette tendance qui devra être éprouvée au cours des prochaines campagnes (Figure 20).



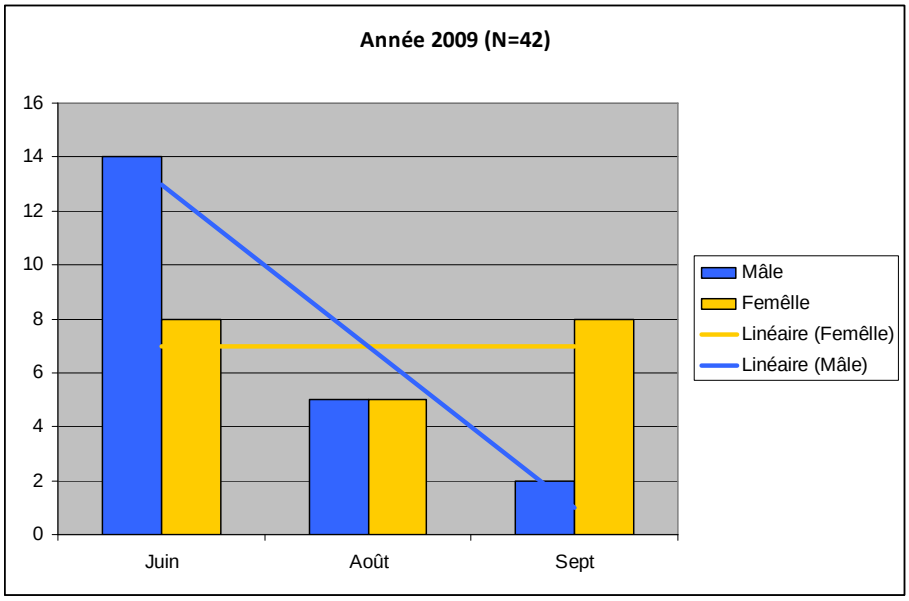


Figure 20 - Évolution du sex-ratio obtenu sur les biopsies de rorquals communs en fonction des saisons sur les données des quatre années 2006-2009, et sur 2009 seulement.

4.2.3 - Carte d'identité génétique du rorqual commun

4.2.3.1 - Validation de la démarche expérimentale et des techniques

Les données alléliques de chaque locus microsatellites ont permis de dresser une carte d'identité génétique pour chaque individu.

Les cartes d'identités ont été confrontées entre elles ce qui a permis de confirmer :

- que pour 2006, A1 et A16 sont bien un seul et même individu (nommé « Flucker ») reconnaissable par sa caudale caractéristique et biopsié à quelques mois d'intervalles.
- que pour 2007, C2 et C4 sont bien aussi un même individu ce qui confirme l'identification visuelle de la dorsale bien marquée lors des biopsies réalisées à quelques heures d'intervalles et par les photos identifications.
- que pour 2009, sont bien un seul et même individu : D3 et D5 ; D20 et D21 ; D37 et D38 ainsi que D40 et D42. Ces animaux ont été biopsiés volontairement deux fois pour les besoins de l'étude des contaminants.

4.2.3.2 - Recherche de « recapture » d'animaux entre les différentes années

La confrontation des cartes d'identité a permis de mettre en évidence plusieurs recaptures « génétiques » d'individus entre 2006 et 2009 :

- A10 (2006) et B4 (2007) sont génétiquement un seul et même individu femelle. Une analyse rapide des photos identification a été réalisée par N. Di-Méglio de EcoOcéan-institut. Elle confirme la recapture de l'animal et précise que celui-ci est très peu marqué et n'aurait peut-être pas été retenu sans cette information génétique.
- B2 (2007) et D35 (2009) sont génétiquement un seul et même individu femelle.
- C10 (2008) et D41 (2009) sont génétiquement un seul et même individu mâle.

4.2.3.3 - Recherche de lien de parenté

Une recherche de probabilité de relation « mère de … » ou « père de … » a été réalisée avec le logiciel « Parenté » (**http://www-leca.ujf-grenoble.fr/logiciels.htm**) à partir des données alléliques provenant des 82 animaux biopsiés entre 2006 et 2009.

Sept relations sont ainsi mises en évidence :

Relation « mère de »	Relation « père de »
A7 mère de **A6** avec une probabilité de 98 %	**D7** père de **A3** avec une probabilité de 75 %
C7 mère de **D17** avec une probabilité de 82 %	**D12** père de **D9** avec une probabilité de 95 %.
C1 mère de **C8** avec une probabilité de 97 %	**C9** père de **B5** avec une probabilité de 62 %
B5 mère de **C9** avec une probabilité de 65 %	

Le traitement de ces données avec le logiciel « Parenté » calcule le lien de parenté des individus dans une population donnée en intégrant d'une part le sexe des individus et d'autre part les fréquences alléliques des microsatellites ainsi que leur force.

Cela donne pour les deux femelles A6 et A7 une probabilité de relation « A7 mère/A6 fille » de 98 % tandis que la relation inverse « A6 mère/A7 fille » n'est vraie qu'à 58 %.

Les données terrains rapportent que les individus A6 et A7 sont respectivement un petit et sa mère. La comparaison des cartes d'identité confirme que ces individus partagent bien une moitié de leur patrimoine génétique renforçant l'hypothèse visuelle d'une mère et sa fille.

Les probabilités des relations « mère/fille » et « père/fils », c'est-à-dire entre deux individus du même sexe, sont toujours plus élevées (plus de 75 %) que les probabilités des relations « mère/fils » ou « père/fille », c'est-à-dire entre deux individus de sexe opposé.

Dans le cas de la femelle B5 et du mâle C9, on ne peut conclure sur le sens de la filiation qui les unirait selon le logiciel « Parenté » (Père - fille ou mère – fils).

4.2.3.4 - Structuration de la population

Des analyses de Neighbor-Joining (NJ) ont été réalisées avec le logiciel DARwin (**http://darwin.cirad.fr/darwin/Home.php**). Cette méthode de NJ consiste à calculer des matrices successives de distances qui prennent en compte les divergences moyennes de chacune des unités taxonomiques opérationnelles avec les autres. Un arbre est alors construit en reliant les plus proches unités taxonomiques opérationnelles par des nœuds qui représentent un ancêtre commun.

Des données alléliques pour six locus microsatellites pour les animaux échoués provenant d'Atlantique ont été intégrées avec celles des animaux biopsiés de Méditerranée dans des analyses de Neighbor-Joining (NJ) avec le logiciel DARwin. L'arbre correspondant est présenté Figure 21.

La structuration de cet arbre est nette et met en évidence un classement des animaux en trois groupes.

Chaque individu « recapturé » sort sur une même branche avec une probabilité que l'homologie soit vraie de 100 %.

Les animaux d'Atlantique se répartissent dans deux de ces groupes, formant deux sous-groupes bien marqués (en bleu clair Figure 21), dont un (central) qui est constitué essentiellement de femelles.

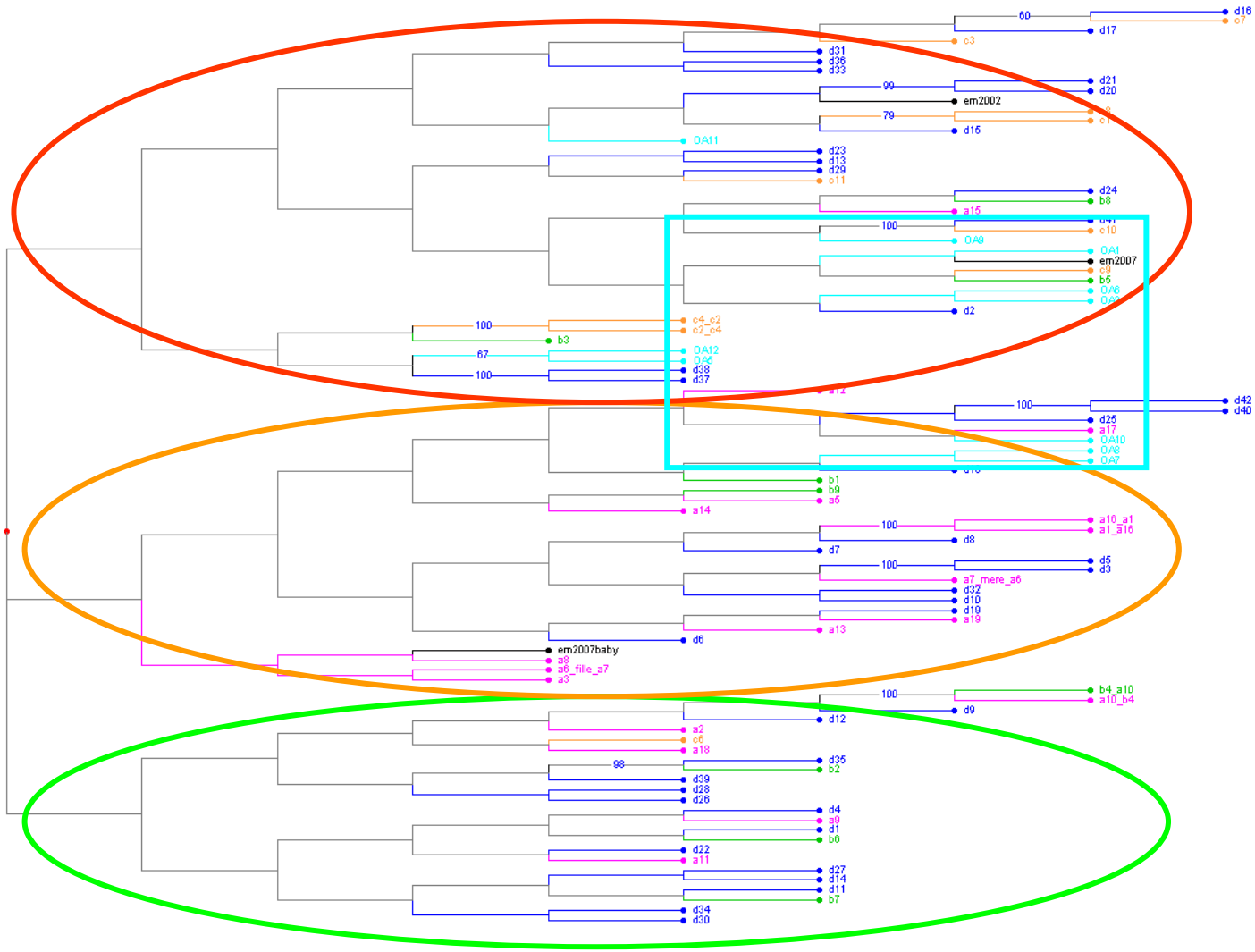


Figure 21 - Représentation arborée de l'analyse de Neighbor-Joining basée sur les données de génotypage des rorquals biopsiés de 2006 (rose), 2007 (vert , 2008 (orange), 2009 (bleu) et échoués en Méditerranée (noir) et en Atlantique (bleu clair). Les valeurs sur les branches donnent la force de la relation entre les individus sur la branche (100 % pour les recaptures).

4.3 - Niveau de contamination du rorqual commun

4.3.1 - Évaluation des taux de lipides

Les teneurs lipidiques obtenues dans cette étude ont été comparées avec les données bibliographiques disponibles sur les différentes espèces de balénoptéridés (Tableau 11). Il est relativement complexe de trouver dans la bibliographie des données suffisamment détaillées pour avoir accès au pourcentage de matière extractible d'échantillons de graisse de rorqual commun (*Balaenoptera physalus*). Le recueil de données a donc été élargi à deux espèces de balénoptéridés proches, la baleine bleue (*Balaenoptera musculus*) et le petit rorqual (*Balaenoptera acutorostrata*). Les données ont été également uniformisées en terme d'unité : toutes les données sont présentées en pourcentage de lipides par rapport au poids frais d'échantillon.

Tableau 11 - Comparaison des teneurs lipidiques (pourcentage de matière extractible) exprimées en pourcentage de poids frais retrouvé dans les rorquals communs de cette étude avec les données de la bibliographie.

	Espèce	Lieu	Échouage / Biopsie	n	Lipide (% pf)
Gauthier et al, 1997 a	*B. acutorostrata*	Atlantic nord	Échouage	12	59 ±23
Gauthier et al, 1997 b	*B. acutorostrata*	Atlantic nord	Biopsie	21	60 ±9
Gauthier et al, 1997 a	*B. musculus*	Atlantic nord	Échouage	7	48 ±12
Gauthier et al, 1997 b	*B. musculus*	Atlantic nord	Biopsie	2	49 ±14
Cette étude	***B. physalus***	**Méditerranée**	**Biopsie**	**40**	**31 ±14**
Marsili et Focardi, 1997	*B. physalus*	Méditerranée	Échouage	2	39 ±33
Gauthier et al, 1997 b	*B. physalus*	Atlantic nord	Biopsie	15	62 ±14
Marsili et Focardi, 1996	*B. physalus*	Méditerranée	Biopsie	68	58 ±10

Les teneurs lipidiques moyennes de cette étude exprimées en % de poids frais sont dans la gamme basse des valeurs retrouvées dans la bibliographie, mais reste cohérentes avec celles-ci. Elles varient de 2,9 à 96,2 %, avec une moyenne de 31 ±14 %.

Le mode de prélèvement peut contribuer à expliquer ces teneurs situées dans la moyenne basse des valeurs bibliographiques. En effet, il a été récemment établi que les prélèvements réalisés par biopsie peuvent présenter des teneurs lipidiques significativement moins élevées que ceux réalisés sur des animaux échoués par prélèvement direct de lard. A titre d'exemple voici la teneur lipidique de deux biopsies réalisées sur des bélougas, les teneurs sont de 5,8 et 37 % (Krahn et *al*, 2004). Ces différences peuvent être dues au mode de prélèvement lui-même (fuite de lipides pendant le prélèvement) ou à la nature de l'échantillon prélevé. En effet il semblerait qu'il existe une stratification des lipides dans le lard de certains cétacés (Gauthier et *al*, 1997 ; Krahn et *al*, 2004). Cette stratification dans la nature et la teneur des lipides conduit généralement à un pourcentage lipidique moins important dans la couche de lard extérieur. Lors d'une biopsie, seule

la couche de lard externe est échantillonnée, ce qui peut expliquer les teneurs lipidiques plus faibles. Pour valider ces hypothèses sur le rorqual commun, nous avons contacté le CRMM (Centre de Recherche sur les Mammifères Marins) afin d'obtenir un lot d'échantillons de gras prélevés sur un rorqual commun échoué. Les échantillons ont été prélevés sur le corps d'un rorqual mâle échoué le 21 novembre 2004 au Verdon en Gironde (Figure 22).

Le lot qui nous a été fourni est composé de 6 échantillons de lard prélevés sur différentes zones de l'animal (Ia, Ib, Ic, IIa, IIb, et IIc).

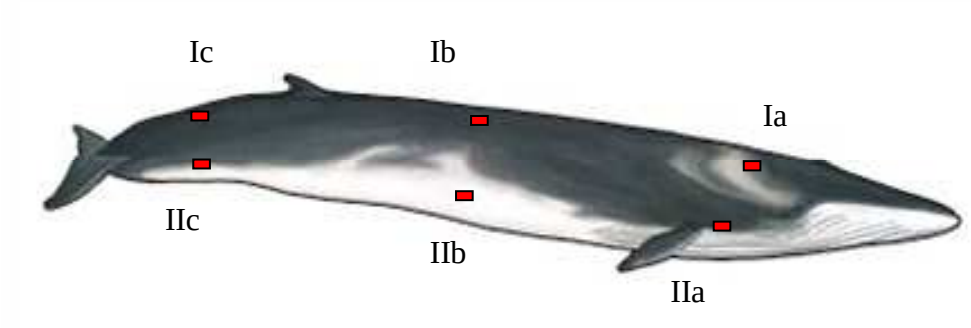


Figure 22 - Schéma des zones de prélèvement des échantillons de rorqual commun fournis par le CRMM

Le premier essai réalisé sur les échantillons du CRMM a testé l'influence de la lyophilisation sur la teneur lipidique de l'échantillon. En effet l'ensemble des échantillons de lard traités dans le cadre de cette étude a été analysé sans lyophilisation. Ce choix a été fait afin de limiter les pertes de matière souvent inévitables lors des étapes de lyophilisation et de broyage.

Afin de tester la possible influence de la lyophilisation sur le traitement des échantillons, une partie de l'échantillon IIb a été lyophilisée (afin d'éliminer toute trace d'eau) et l'autre partie a été traitée directement après congélation. Chaque condition a été traitée en triplicat, les résultats sont présentés dans le Tableau 12.

Tableau 12 - Résultats de l'évaluation des taux de lipides avec ou sans lyophilisation (n=3)

	Teneur lipidique (% en équivalent poids frais)
BP LR II b lyoph	8,8 ±1,1
BP LR II b "frais"	6,6 ±3,6

En conclusion de ce test, on peut observer que les teneurs retrouvées sont cohérentes, le fait d'avoir traité les échantillons de cette étude sans lyophilisation n'entraîne pas de biais sur la détermination de la teneur lipidique, elle augmente légèrement la variabilité de la mesure.

Le deuxième test réalisé sur les échantillons fournis par le CRMM a servi à tester la variabilité spatiale de la teneur lipidique. La couche supérieure des six échantillons fournis par le CRMM a été

analysée (Ia, Ib, Ic, IIa, IIb, et IIc) (Figure 22). L'échantillon Ic correspondant au point d'impact le plus probable de la flèche lors de la biopsie, a été séparé en trois parties (Ia, Ib, Ic) pour une étude de la stratification verticale de la teneur lipidique dans le lard. L'échantillon Ic1 correspond à la couche extérieure du lard, l'échantillon Ic2 correspond à la couche du milieu et l'échantillon Ic 3 à la couche la plus intérieure. Les extractions ont été réalisées grâce à deux techniques d'extraction : l'extraction assistée sous champ micro-onde (MAE) et l'extraction sous fluide pressurisé (ASE). Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau 13.

Tableau 13 - Variabilité spatiale de la teneur en lipides dans les différents échantillons d'un même rorqual. La localisation des prélèvements est décrite Figure 22.

	Teneur lipidique (% en équivalent poids frais)	
	MAE	ASE
BP LRI a	17,5	16,8
BP LR I b	14,8	20,6
BP LR Ic 1	10,7	9,7
BP LR Ic 2	1,6	0,7
BP LR Ic 3	1,4	0,8
BP LR II a	17,3	5,3
BP LR II b	6,5	8,0
BP LR II c	23,0	31,5

Les résultats obtenus par les deux techniques d'extraction sont homogènes. Globalement la teneur lipidique de cet individu (15 ±7 % pf) est parmi les valeurs les plus basses de celles retrouvées dans la bibliographie. Une variabilité relativement importante est observée entre les différents sites de prélèvement du gras, de 6 à 31 % du poids frais.

Une stratification verticale a également été mise en évidence sur l'échantillon Ic. Cependant il faut bien garder à l'esprit que ce test a été réalisé sur un individu unique, et qu'il est délicat de tirer des généralités à partir d'un seul individu. De plus cet individu a été retrouvé échoué, le corps marqué par des morsures d'orques (Réseau National Echouage, comm. pers.), il se peut qu'il ait été en "mauvaise santé". La répartition lipidique observée n'est pas forcément représentative d'un individu en bonne santé mais confirme une stratification des lipides.

En conclusion, les polluants organiques persistants s'accumulant préférentiellement dans les lipides, il est important d'en déterminer la teneur dans les échantillons et de rapporter les concentrations en PCB, PBDE et OCP à cette valeur mesurée plutôt qu'à une valeur moyenne ou estimée.

4.3.2 - Contamination en PCB, PBDE et OCP

4.3.2.1 - Contamination globale

L'ensemble des composés analysés a été détecté dans les échantillons analysés (CB 18, CB 50+28, CB 52, CB 44, CB 101, CB 118, CB 153, CB 105, CB 138, CB 187, CB 180, CB 170, BDE 47, BDE 99, BDE 153, HBCD, lindane, 24'DDE, 44'DDE, 24'DDD, 44'DDD, 24'DDT, 44'DDT).

Les résultats PCB totaux sont présentés sous la forme de sommes des 7 PCB indicateurs (Somme CB 28, CB 52, CB 101, CB 118, CB 138, CB 153, CB 180) afin de faciliter la lecture des données et d'obtenir une somme comparable avec les données de la bibliographie.

Les résultats PBDE correspondent à la somme des composés analysés.

Les résultats OCP sont la somme des congénères de DDT, DDD et DDE et de la dieldrine.

Les résultats bruts, présentés dans les Tableau 14 & Tableau 15, les Figure 23 & Figure 24, illustrent les contaminations moyennes totales et par sexe pour les trois classes de composés analysés (PCB, PBDE et OCP).

La Figure 23 montre les niveaux de contamination rapportés au poids frais (ng.g-1 pf). Les PCB et les OCP montrent des niveaux de contamination comparables, même si le niveau de contamination en OCP est légèrement supérieur (respectivement 1140 ±856 ng.g^{-1} pf et 1914 ±1658 ng.g^{-1} pf si l'on considère les individus indépendamment du sexe). Les niveaux de contamination en PBDE et en HBCD sont nettement plus faibles (respectivement 49 ±47 ng.g^{-1} pf et 6 ±12 ng.g^{-1} pf).

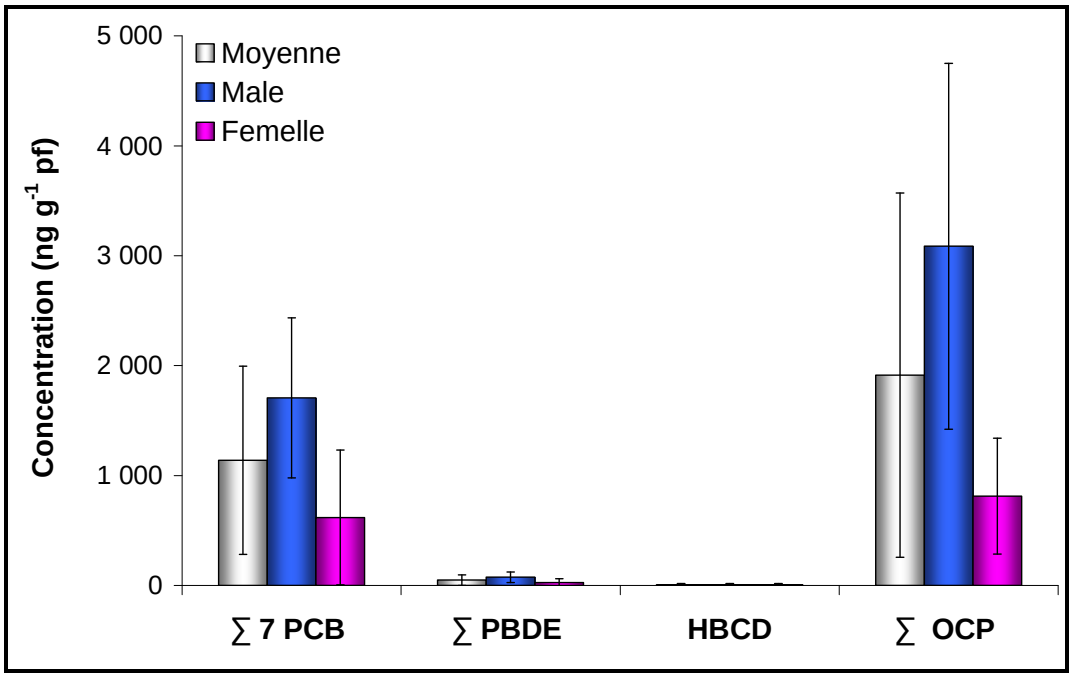


Figure 23 - Contaminations moyennes totales et par sexe en PCB, PBDE et OCP dans la graisse des rorquals communs de Méditerranée rapportées au poids frais (ng g^{-1} pf).

Si l'on s'intéresse à la différence de contamination entre les sexes, les mâles sont significativement plus contaminés que les femelles quelle que soit la classe de contaminants considérée (d'un facteur 3 environ). Ce facteur est cohérent avec la littérature (Kleivane et *al*, 1998). Cette différence s'explique par le fait que les femelles "dépurent" lors de leurs mises bas et de leurs lactations successives. Il a été montré chez les dauphins bleu et blanc (*Stenella coeruleoalba*) que les femelles peuvent perdre jusqu'à 90 % de leurs charges en POP pendant la gestation et la lactation (Marsili et Focardi 1997 ; Tanabe et *al*, 1982). Ce résultat a été confirmé récemment chez le dauphin d'Electre (*Peponocephale electra*) (Kajiwara et *al*, 2008). Les femelles perdent environ 85 % de leur teneur en POP (PBDE, PCB, OCP).

Elles remobilisent leurs réserves pour la gestation et la production de lait, et par là même les contaminants associés. Le lait produit par les mammifères marins, très riche en lipides (33 % de lipides environ (Marsili et Focardi, 1997)), concentrent donc des teneurs en POP très élevées, "détoxifiant" la mère et contaminant le petit.

La Figure 24 montre les niveaux de contamination rapportés à la teneur lipidique mesurée des échantillons (ng g^{-1} lp).

La contamination globale atteint des niveaux de concentration de l'ordre de 4121 ±3700 ng.g^{-1} lp pour les 7 PCB indicateurs, de 177 ±208 ng.g^{-1} lp pour les PBDE, de 13 ±13 ng.g^{-1} lp pour l'HBCD et de 6643 ±5959 ng.g^{-1} lp pour les OCP. Les mâles présentent toujours un niveau de contamination trois fois supérieur à celui des femelles. Les niveaux de contamination sont respectivement pour les mâles et les femelles de 5824 ±3282 ng.g^{-1} lp et 2622 ±3505 ng.g^{-1} lp pour les 7 PCB, de 245 ±179 ng.g^{-1} lp et 119 ±223 ng.g^{-1} lp pour les PBDE, de 16 ±13 ng.g^{-1} lp et 10±11 ng.g^{-1} lp pour le HBCD et de 10370 ±6246 ng.g^{-1} lp et 3239 ±2896 ng.g^{-1} lp pour les OCP.

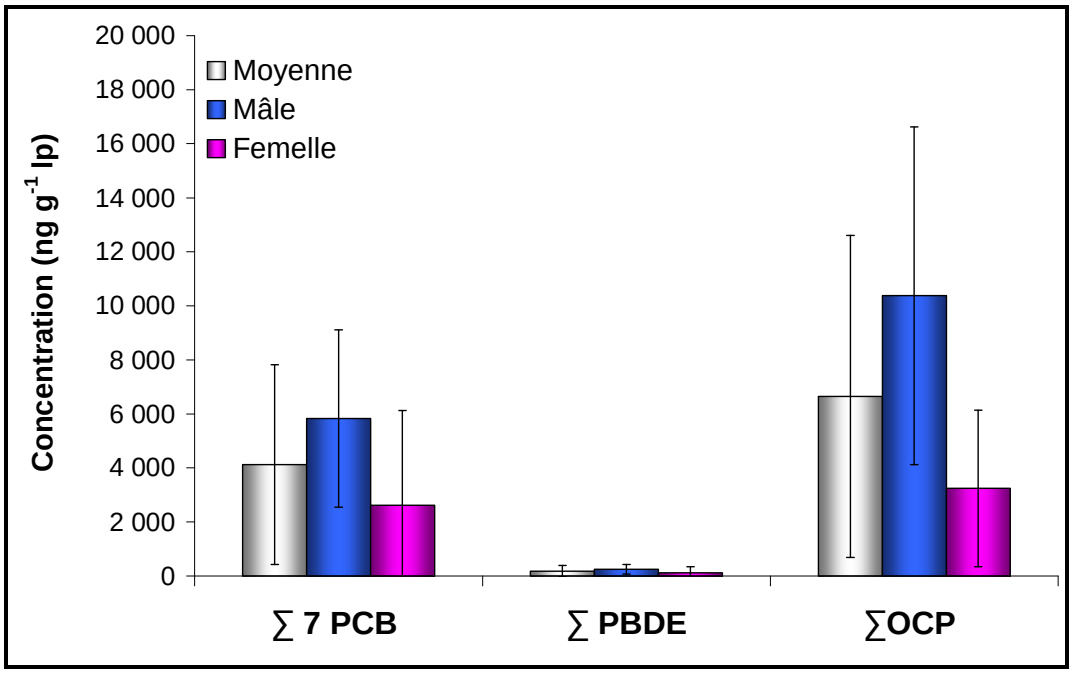


Figure 24 - Contaminations moyennes totales et par sexe en PCB, PBDE, HBCD et OCP dans la graisse des rorquals communs de Méditerranée rapportées à la teneur lipidique vraie des échantillons (ng g-1 pf).

Tableau 14 - Contaminations moyennes des rorquals communs en PCB, PBDE, HBCD et OCP (ng g-1 pf et ng g-1 lp) (n= 73 individus)

	∑ 7 PCB ng.g^{-1} pf	∑ PBDE ng.g^{-1} pf	∑ TOT DDT ng.g^{-1} pf	HBCD ng.g^{-1} pf	∑ 7 PCB ng.g^{-1} lp	∑ PBDE ng.g^{-1} lp	∑ DDT ng.g^{-1} lp	HBCD ng.g^{-1} lp
Moyenne	**1 140**	**49**	**1 914**	**5**	**4 121**	**177**	**6 643**	**16**
Ecart-type	**856**	**47**	**1 658**	**4**	**3 700**	**208**	**5 959**	**13**
Médiane	**909**	**31**	**1 380**	**4**	**2 860**	**110**	**4 365**	**14**
Minimum	**68**	**1**	**68**	**0**	**252**	**7**	**245**	**0**
Maximum	**3 626**	**212**	**7 437**	**18**	**17 980**	**1 194**	**26 695**	**52**
Moyenne Mâle	**1706**	**74**	**3 086**	**7**	**5 824**	**245**	**10 370**	**20**
Ecart-type Mâle	**727**	**47**	**1 665**	**5**	**3 282**	**179**	**6 246**	**13**
Médiane Mâle	**1683**	**64**	**2 836**	**7**	**5 353**	**207**	**8 955**	**21**
Minimum Mâle	**427**	**13**	**457**	**0**	**1 631**	**51**	**1 744**	**0**
Maximum Mâle	**3626**	**212**	**7 437**	**18**	**17 980**	**842**	**26 695**	**43**
Moyenne Femelle	**618**	**27**	**813**	**3**	**2 622**	**119**	**3 239**	**12**
Ecart-type Femelle	**613**	**36**	**526**	**3**	**3 505**	**223**	**2 896**	**11**
Médiane Femelle	**432**	**17**	**664**	**3**	**1 829**	**63**	**2 716**	**10**
Minimum Femelle	**68**	**1**	**68**	**0**	**252**	**7**	**245**	**0**
Maximum Femelle	**3203**	**180**	**2 325**	**11**	**17 362**	**1 194**	**18 095**	**40**

Tableau 15 - Contamination des rorquals communs analysés en PCB, PBDE et OCP (ng.g-1 pf et ng.g-1 lp) (n= 73).

	Date prélèvement	Sexe	Taux de Lipides %	∑ 7 PCB ng.g^{-1} pf	∑ PBDE ng.g^{-1} pf	HBCD ng.g^{-1} pf	∑ DDT +Dieldrin ng.g^{-1} pf	∑ 7 PCB ng.g^{-1} lp	∑ PBDE ng.g^{-1} lp	HBCD ng.g^{-1} lp	∑ DDT +Dieldrin ng.g^{-1} lp
Biopsie A1	21/06/2006	F	3	68	1	nd	93	2 343	48	nd	3 200
Biopsie A2	21/06/2006	M	21	909	19	nd	1 464	4 246	88	nd	6 840
Biopsie A3	21/06/2006	M	26	427	13	4	457	1 631	51	14	1 744
Biopsie A4			96	1 133	24	nd	2 138	1 178	25	nd	2 222
Biopsie A5	21/06/2006	M	9	639	19	nd	921	7 266	219	nd	10 466
Biopsie A6	22/06/2006	F	17	226	6	1	376	1 305	34	8	2 174
Biopsie A7	22/06/2006	F	23	316	9	2	345	1 372	38	9	1 502
Biopsie A8	22/06/2006	M	39	1 799	44	8	2 002	4 614	113	22	5 133
Biopsie A9	22/06/2006	M	27	921	32	9	1 047	3 400	118	31	3 862
Biopsie A10	22/06/2006	F	21	593	17	7	531	2 851	82	34	2 554
Biopsie A11	22/06/2006	M	20	1 909	38	9	2 812	9 498	190	43	13 991
Biopsie A12	24/06/2006	M	33	2 067	47	10	2 515	6 342	145	31	7 715
Biopsie A13	24/06/2006	F	22	171	7	2	186	772	30	10	842
Biopsie A14	24/06/2006	M	24	1 784	35	nd	2 550	7 592	148	nd	10 850
Biopsie A15	06/10/2006	M	37	860	22	4	1 205	2 355	60	10	3 300
Biopsie A16	06/10/2006	F	39	1 127	30	2	1 380	2 860	75	5	3 503
Biopsie A17	10/10/2006	F	28	70	2	nd	68	252	7	nd	245
Biopsie A18	10/10/2006	M	39	1 525	43	5	2 201	3 881	108	nd	5 600
Biopsie A19	12/10/2006	F	55	1 352	35	3	1 969	2 458	63	nd	3 580
Biopsie B1	18/06/2007	F	31	202	6	nd	203	649	20	nd	651
Biopsie B2	27/08/2007	F	32	544	22	10	551	1 721	69	32	1 743
Biopsie B3	08/09/2007	F	17	432	15	3	363	2 482	85	18	2 088
Biopsie B4	08/09/2007	F	20	416	15	4	498	2 049	74	20	2 455
Biopsie B5	10/09/2007	F	42	479	15	2	471	1 137	36	5	1 119
Biopsie B6	10/09/2007	M	35	1 913	59	11	2 288	5 545	171	33	6 632
Biopsie B7	15/09/2007	M	24	1 047	30	6	1 627	4 308	123	26	6 697
Biopsie B8	15/09/2007	F	22	616	15	nd	731	2 786	67	nd	3 307
Biopsie B9	16/09/2007	F	38	742	21	5	914	1 957	55	12	2 411
Biopsie C1	02/06/2008	F	42	327	13	6	456	782	32	15	1 091
Biopsie C2	03/06/2008	M	23	1 708	55	7	2 836	7 356	237	30	12 217
Biopsie C3	03/06/2008	M	39	2 674	81	4	6 371	6 867	207	11	16 363
Biopsie C4	04/06/2008	M	42	3 093	121	18	4 389	7 360	287	43	10 443
Biopsie C6	19/08/2008	M	26	966	33	5	1 430	3 675	125	19	5 442
Biopsie C7	28/08/2008	F	23	314	12	na	366	1 391	51	na	1 624
Biopsie C8	22/08/2008	F	22	659	24	5	997	3 019	109	24	4 568
Biopsie C9	22/08/2008	M	45	1 502	48	13	1 904	3 303	106	29	4 185
Biopsie C10	18/09/2008	M	41	2 284	94	16	3 879	5 511	226	39	9 360
Biopsie C11	19/09/2008	F	28	653	31	11	621	2 332	111	40	2 218
BP 17 10 07	17/10/2007		11	378	15	6	604	3 466	135	52	5 534
BP 11 06 07	11/06/2007		58	337	18	5	518	580	30	9	891
Biopsie D1 bis	09/06/2009	M	21	1 559	64	0	4 719	7 406	304	nd	22 421
Biopsie D2	15/06/2009	M	41	1 683	114	12	3 668	4 109	277	29	8 955
Biopsie D4	15/06/2009	F	23	351	22	2	801	1 554	97	9	3 544
Biopsie D5	16/06/2009	M	25	3 626	212	3	2 941	14 411	842	13	11 689
Biopsie D6	16/06/2009	F	15	2 275	180	nd	501	15 087	1 194	nd	3 323
Biopsie D8 bis	17/06/2009	M	33	2 650	144	11	5 329	7 987	435	33	16 061
Biopsie D9	17/06/2009	M	36	1 917	87	8	2 579	5 353	242	21	7 200
Biopsie D10	17/06/2009	M	23	1 574	69	nd	4 479	6 873	300	nd	19 564
Biopsie D11	18/06/2009	F	33	595	41	6	1 457	1 829	124	17	4 476
Biopsie D12	18/06/2009	M	45	1 894	164	7	3 008	4 225	365	16	6 711
Biopsie D13	18/06/2009	M	28	2 333	117	nd	7 437	8 373	419	nd	26 695
Biopsie D14	18/06/2009	F	36	349	18	nd	965	983	49	nd	2 716
Biopsie D15	18/06/2009	M	35	2 076	147	9	4 970	5 995	425	25	14 354
Biopsie D16	22/06/2009	F	5	227	8	nd	969	4 249	144	nd	18 095
Biopsie D17	24/06/2009	F	21	322	12	2	648	1 571	59	9	3 160
Biopsie D18	24/06/2009	F	18	3 203	141	3	805	17 362	765	15	4 365
Biopsie D19	24/06/2009	M	39	662	34	5	1 416	1 693	87	13	3 623
Biopsie D21	25/06/2009	M	25	1 413	69	6	3 650	5 644	277	22	14 583
Biopsie D23	01/08/2009	F	31	574	18	nd	1 090	1 861	60	nd	3 530
Biopsie D24	01/08/2009	M	45	1 547	73	8	2 946	3 445	162	17	6 558
Biopsie D26	05/08/2009	F	28	325	12	4	664	1 176	42	14	2 402
Biopsie D27	05/08/2009	M	31	1 600	71	nd	3 729	5 244	231	nd	12 222
Biopsie D29	05/08/2009	F	22	351	10	nd	582	1 572	44	nd	2 602
Biopsie D30	05/08/2009	M	47	2 221	129	4	5 958	4 774	277	9	12 804
Biopsie D31	06/08/2009	M	16	2 798	129	nd	4 046	17 980	828	nd	25 997
Biopsie D32	06/08/2009	M	31	913	54	4	1 257	2 930	173	13	4 033
Biopsie D33	11/09/2009	F	29	691	38	nd	1 328	2 363	132	nd	4 545
Biopsie D34	11/09/2009	F	37	483	27	4	1 233	1 323	74	11	3 375
Biopsie D35	11/09/2009	F	44	548	28	6	1 628	1 237	63	14	3 676
Biopsie D36	12/09/2009	M	46	1 220	91	12	3 994	2 641	196	26	8 649
Biopsie D38	13/09/2009	F	47	380	17	2	878	809	37	5	1 869
Biopsie D39	13/09/2009	F	50	1 235	55	8	2 325	2 450	110	17	4 611
Biopsie D42	13/09/2009	F	23	428	20	nd	1 448	1 830	86	nd	6 194

Le Tableau 15 détaille l'ensemble des résultats obtenus pour la somme des PCB, des PBDE, de l'HBCD et des OCP pour chaque rorqual commun. On observe une grande variabilité entre les niveaux de contamination des différents individus, de l'ordre d'un facteur 40. Les individus les plus faiblement contaminés sont des femelles (ex. : A17). Ceci peut s'expliquer par la possibilité qu'ont les femelles de se "dépurer" lors de leurs gestations et leurs lactations successives. Il est d'ailleurs intéressant de noter que deux individus liés par un lien de filiation (A6 et A7) évoluant ensemble au moment de la biopsie présentent des niveaux de contamination équivalents quels que soient les contaminants considérés et le mode d'expression des résultats. Ces individus évoluant ensemble au moment des biopsies, et les observateurs ayant fortement suspecté un lien de filiation au comportement des animaux, on peut supposer que le petit était relativement jeune et donc relativement proche de sa dernière période de lactation, ce qui peut expliquer les niveaux de contamination comparables.

Deux autres couples Parent/Petit présentent des niveaux de concentrations comparables (D9 qui a été identifié comme étant le petit de D12, et D17 comme le petit de C7). A contrario le couple mère/petit C1/C8 présente une différence de contamination significative, d'un facteur 3.

Il faut également souligner qu'un même individu parfaitement identifiable puisque sa caudale est coupée, a été échantillonné à quatre mois d'intervalle, une première fois le 21 juin 2006 (biopsie A1), puis le 6 octobre 2006 (biopsie A16). Les niveaux de contamination obtenus lors de l'analyse de ces deux biopsies sont très différents respectivement 68 $ng.g^{-1}$ pf et 1127 $ng.g^{-1}$ pf pour les 7 PCB. Cette différence de niveau de contamination disparaît lorsqu'on corrige la concentration en POP par la teneur lipidique de l'échantillon (respectivement 2343 $ng.g^{-1}$ lp et 2860 $ng.g^{-1}$ lp). Ces résultats confirment l'importance de la correction de la concentration par la teneur réelle en lipides de l'échantillon.

4.3.2.2 - Profil de contamination en PCB des rorquals communs

Au total 18 congénères de PCB ont été analysés (CB 08, CB 18, CB 50+28, CB 52, CB 44, CB 66, CB 101, CB 118, CB 153, CB 105, CB 138, CB 187, CB 128, CB 180, CB 170, CB 195, CB 206, CB 209). Afin d'obtenir un profil de contamination, ces congénères ont été regroupés par degré de chloration et normalisés par la somme des PCB totaux (Figure 25).

Les composés possédant deux et trois chlore représentent moins de 1 % des PCB totaux, les tétrachlorés environ 4 ±2 % et les penta chlorés autour de 13 ±4 %. Le profil est dominé par les hexa et heptachlorés respectivement 46 ±5 et 34 ±4 %. Les composés les plus chlorés (8 Cl, 9 Cl et 10 Cl) représentent 2 % des PCB totaux. Le composé majoritaire est le CB 153 (hexachloré), connu pour être le PCB le plus difficilement métabolisé donc le plus bioaccumulé (Kannan et *al*, 1995), suivi par le CB 138 (hexachloré), le CB 180 (heptachloré), puis le CB 187 (heptachloré). Ce profil correspond au profil classiquement retrouvé chez les balénoptéridés (Marsili et Focardi 1997 ; Gauthier et *al*, 1997 ; Marsili et Focardi 1996).

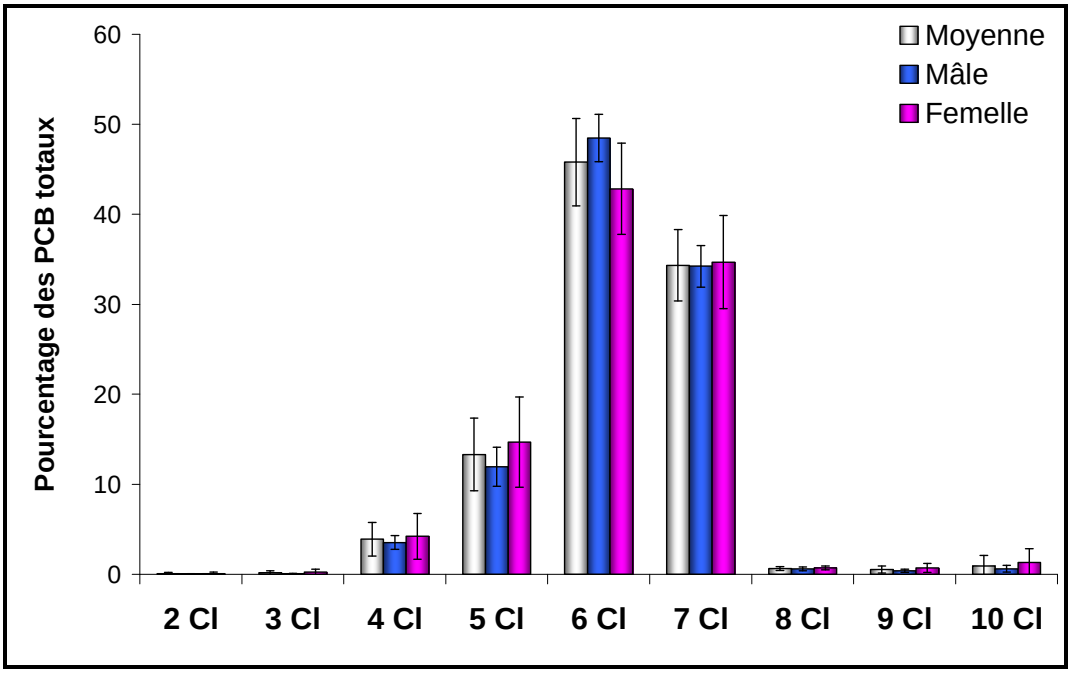


Figure 25 - Profil de contaminations des PCB dans la graisse de rorqual commun en Méditerranée.

Il peut être également intéressant de suivre l'évolution du rapport de concentration de deux composés particuliers, le CB 118 et le CB 153. Le CB 118 est connu pour être métabolisable par un complexe enzymatique particulier, le cytochrome P450 1A, car il présente des atomes de carbone vicinaux non substitués en chlore. A l'opposé, le CB 153 est un PCB très peu dégradable et par conséquent peu dégradé, il est considéré comme un marqueur de contamination (Figure 26).

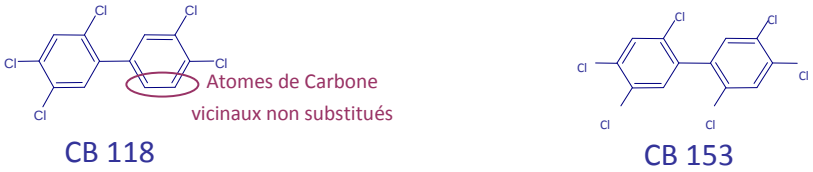


Figure 26 - Formule chimique du CB 118 et CB 153.

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 niveaux trophiques aux niveaux supérieurs.

Dans le cadre de cette étude, le rapport CB 118/CB 153 des rorquals communs échantillonnés est de 0,27 ±0,11. Une différence significative a été mise en évidence entre les mâles et les femelles (respectivement 0,24 ±0,04 et 0,31 ±0,14). On peut également noter une plus grande variabilité du rapport CB 118 / CB 153 chez les femelles.

4.3.2.3 - Profil de contamination en PBDE des rorquals communs

Les niveaux de PBDE détectés dans les rorquals communs échantillonnés sont faibles, au maximum de 287 ng.g^{-1} lp. Le composé majoritaire est le BDE 47 d'environ 76 ±9 %, puis le BDE 99 (18 ±4 %). Le BBE 153 a été détecté à l'état de traces (Figure 27). Ce profil est cohérent avec la bibliographie (Petterson et *al*, 2004 ; Law et *al*, 2005). Le BDE 47 est un composé très rémanent présentant des capacités de bioaccumulation équivalentes voire supérieures au CB 153 (Tapie 2006). Le faible niveau de ce composé dans la graisse de rorqual commun démontre que ces animaux sont peu impactés par les PBDE.

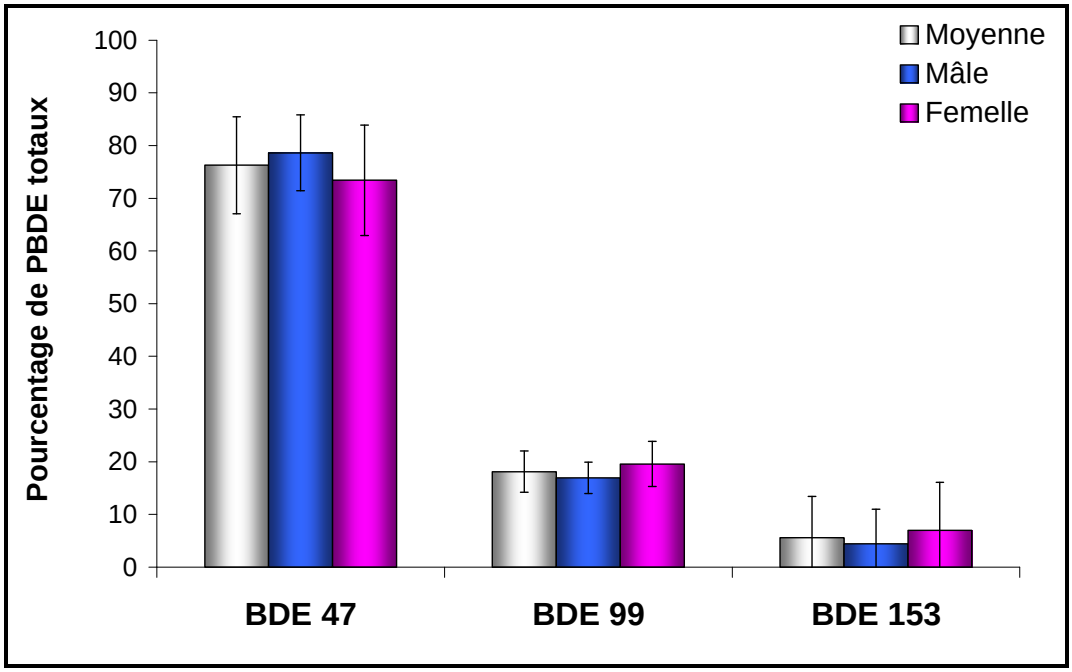


Figure 27 - Profil de contaminations des PBDE dans la graisse de rorqual commun en Méditerranée.

4.3.2.4 - Profil de contamination en OCP des rorquals communs

Les niveaux de contamination des différents pesticides chlorés analysés sont présentés dans la Figure 28. Le lindane est présent à des niveaux faibles (de l'ordre de 6 ng g^{-1} lp). Il représente moins de 1 % de la somme totale des pesticides chlorés analysés. La somme des DDT et de ses métabolites DDE et DDD représente plus de 99 % des pesticides analysés. Le 4,4' DDE, métabolite majoritaire du DDT représente plus de 75 ±11 % de la somme DDT + DDD + DDE. Ce profil de contamination est cohérent avec les profils obtenus dans la littérature (Marsili et Focardi 1997 ; Gauthier et *al*. 1997b).

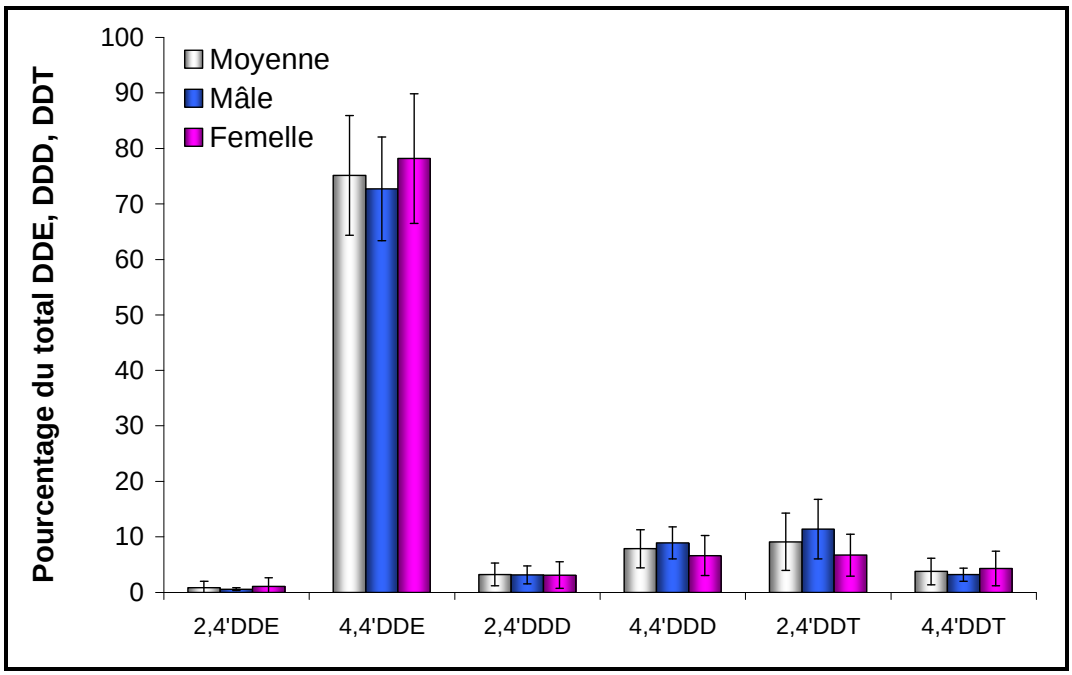


Figure 28 - Profil de contaminations des OCP dans la graisse de rorqual commun (ng.g-1 lp) en Méditerranée.

Afin d'identifier des origines de contamination différentes ou des niveaux de métabolisation différents, il peut être intéressant de suivre le rapport ΣDDT/ΣDDE. Ainsi, le rapport ΣDDT/ΣDDE des rorquals communs analysés dans le cadre de cette étude est de 0,19 ±0,12, mais une différence significative est observée entre les mâles et les femelles (respectivement 0,22 ±0,14 et 0,15 ±0,10).

4.3.3 - Contamination des rorquals communs en HAP

Dans le cadre de cette étude, les 16 HAP traceurs (Naphtalène, Acénaphthylène, Acénaphtène, Fluorène, Phénathrène, Anthracène, Fluoranthène, Pyrène, Chrysène, Benzo(a) anthracène, Benzo(k) fluoranthène, Benzo(b) fluoranthène, benzo(a) pyrène, Dibenzo (a,h) anthracène, Benzo (g,h,i) perylène, indeno(1,2,3) pyrène) ont été recherchés dans les échantillons de lard. La somme des HAP recherchés est inférieure à 2 $ng.g^{-1}$ pf (Tableau 16). Les HAP sont des molécules très fortement biodégradables par les vertébrés supérieurs,et il est donc logique de ne pas retrouver de HAP dans le lard de rorqual commun. Il est par ailleurs maintenant admis que pour suivre une contamination par les HAP, il faut suivre les métabolites des HAP. Cependant ces métabolites de HAP ne sont détectables que dans la bile ou le plasma, ce qui exclut le type de prélèvement réalisé dans cette étude. Les premiers résultats confirmant la non présence des HAP dans le lard, seuls les échantillons de la série A (2006) et B (2007) ont été analysés pour cette classe de composés.

Tableau 16 - Contaminations en HAP des 27 rorquals communs analysés (ng.g^{-1} pf)

	Naphtalène	Acénaphtylène	Acénaphtène	Fluorène	Phénanthrène	Anthracène	Fluoranthène	pyrène	B(a)Anthracène	Chrysène	BbF+BjF+BkF	BaP	Pérylène	Indéno pyrène	DahA+DacA	Somme HAP
A2	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
A3	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,7	nd	nd	nd	nd	nd	0,7
A4	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
A5	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
A6	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
A7	1,9	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,6	nd	nd	nd	nd	nd	2,5
A8	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
A9	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,3	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,3
A10	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
A11	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
A12	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
A13	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
A14	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
A15	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
A16	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
A17	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
A18	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
A19	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
B1	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
B2	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
B3	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
B4	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
B5	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
B6	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
B7	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
B8	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,49	nd	nd	nd	nd	nd	0,5
B9	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd

4.3.4 - Contamination des rorquals communs en Alkylphénols

Parallèlement aux autres molécules ciblées dans cette étude, un premier screening (dépistage) a été réalisé sur les alkylphenols Deux molécules de cette famille ont été choisies : le 4-nonylphenol (4-NP) et le bisphénol A (BPA). L'analyse de ces composés dans des biopsies de rorquals communs pose des difficultés analytiques importantes : faible quantité d'échantillons, échantillons à forte teneur lipidique, purification de l'échantillon difficile à mettre en œuvre, situation d'échantillon unique, molécules ubiquistes (ce qui rend l'obtention d'un bon blanc de manipulation ardue).

Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau 17. Le 4-nonylphénol et le bisphénol A ont été détectés dans certains échantillons.

Les analyses des séries A, B et C ont été réalisées avec le premier protocole. Les séries A et B ont été réalisées sur 2/10 de l'extrait total obtenu après extraction par ASE (protocole 1a), la concentration des échantillons de la série C a été déterminée sur 4/10 de l'extrait total (protocole 1b) (les 2/10 initialement prévu pour les HAP ont été utilisés pour la détermination des alkylphénols). La série D a été déterminée par le deuxième protocole, les 4/5 de l'extrait ont servi à l'analyse du 4-nonylphénol et le bisphénol A.

L'utilisation du nouveau protocole sur la série D (protocole 2) permet d'améliorer nettement les limites de détection notamment dans le cas du nonylphénol, mais également la sélectivité grâce à l'usage de la spectrométrie de masse en tandem (UPLC/MS/MS). La diminution des limites de détection pour le nonylphénol avec le protocole D permet de niveler les apparentes disparités observées dans les premières séries.

Les limites de détection variables observées dans le cas du BPA sur les différents protocoles sont dues aux variations des niveaux de blancs. Le bisphénol A est une molécule ubiquiste, présente partout, les niveaux de blancs sont donc très variables. Les échantillons de rorquals communs obtenus par biopsie, étant des échantillons uniques, ne permettent pas de répliquer l'extraction en cas de blancs élevés ou de nécessité de réinjection au niveau analytique. A titre d'exemple, l'échantillon D22 qui présente un niveau de BPA étonnamment élevé aurait mérité d'être extrait à nouveau pour confirmer la valeur obtenue. La valeur de BPA de cet échantillon est donc à prendre avec précaution puisqu'elle n'a pas pu être confirmée.

Les résultats obtenus permettent tout de même d'obtenir un niveau de référence du nonylphénol pour les rorquals communs de Méditerranée. Ils présentent des niveaux de nonylphénols de l'ordre de 100 à 200 $ng.g^{-1}$ pf, ce qui est cohérent avec les données de la littérature qui montrent des mécanismes d'accumulation chez les poissons (Arukwe et *al*, 2000). L'imprégnation en BPA semble également globalement faible, inférieure à 200 $ng.g^{-1}$ pf, à l'exception d'un individu qui aurait demandé une vérification. Cette accumulation du 4-

NP et le BPA sont également cohérentes avec leur log Kow (Coefficient de partage octanol / eau) respectivement de 4,48 de 3,18.

Il est difficile de conclure réellement sur les différences de contamination entre les mâles et les femelles. Le sexe des rorquals communs a été reporté dans le Tableau 17 à titre indicatif.

Il n'existe à ce jour à notre connaissance aucune donnée sur les teneurs en alkylphénols chez les rorquals communs. Les mécanismes d'accumulation et de distribution des alkylphénols sont encore peu documentés dans la littérature, en raison de la difficulté d'analyse de ces composés dans les matrices biologiques complexes. La compréhension de ces mécanismes représente à ce jour un enjeu.

Tableau 17 - Contamination des rorquals communs de Méditerranée en 4 NP et en BPA (ng g^{-1} pf).

	Sexe	[NP] (ng.g^{-1} pf)	[BAP] (ng.g^{-1} pf)	Protocole utilisé	Limite de (ng.g^{-1} pf)	Limite de (ng.g^{-1} pf)
A1	F					
A2	M	297	nd	1 a	90	100
A3	M	167	nd	1 a	90	100
A4	-	551	nd	1 a	90	100
A5	M	449	nd	1 a	90	100
A6	F	308	nd	1 a	90	100
A7	F	nd	nd	1 a	90	100
A8	M	nd	nd	1 a	90	100
A9	M	nd	103	1 a	90	100
A10	F	nd	nd	1 a	90	100
A11	M	nd	nd	1 a	90	100
A12	M	nd	nd	1 a	90	100
A13	F	nd	nd	1 a	90	100
A14	M	nd	nd	1 a	90	100
A15	M	nd	nd	1 a	90	00
A16	F	nd	nd	1 a	90	100
A17	F	nd	nd	1 a	90	100
A18	M	147	nd	1 a	90	100
A19	F	nd	nd	1 a	90	100
B1	F	nd	nd	1 a	90	100
B2	F	nd	nd	1 a	90	100
B3	F	92	nd	1 a	90	100
B4	F	nd	nd	1 a	90	100
B5	F	nd	nd	1 a	90	100
B6	M	nd	nd	1 a	90	100
B7	M	nd	nd	1 a	90	100
B8	F	nd	nd	1 a	90	100
B9	F	nd	nd	1 a	90	100
C1	F	nd	nd	1 b	90	55
C2	M	nd	nd	1 b	90	55
C3	M	nd	nd	1 b	90	55
C5	M	nd	nd	1 b	90	55
C6	M	nd	nd	1 b	90	55
C7	F	114	nd	1 b	90	55
C8	F	nd	nd	1 b	90	55
C9	M	168	57	1 b	90	55
C10	M	232	nd	1 b	90	55
C11	F	332	nd	1 b	90	55
BP 17-10-07	-	1 240	nd	1 b	90	55
BP 11-06-07	-	630	nd	1 b	90	55
D1	M	nd	nd	2	15	100
D3	M	nd	nd	2	15	100
D8	M	nd	nd	2	15	100
D20	M	26	nd	2	15	100
D22	F	45	5896	2	15	100
D25	F	nd	nd	2	15	100
D28	F	118	nd	2	15	100
D37	F	45	nd	2	15	100
D40	F	125	nd	2	15	100
D41	M	nd	nd	2	15	100

4.4 - Niveau de contamination des odontocètes

Les concentrations en POPs obtenues chez les odontocètes sont très importantes pour les cachalots, les globicéphales noirs et les dauphins de Risso, que ce soit pour les PCBs ou les OCPs. Le tableau 17 présente les contaminations en PCBs et le tableau 18 celles en OCPs.

Concernant les PCBs, la somme des concentrations des 14 congénères analysés (∑ PCBs) varie de 22,65 à 148,00 $\mu g.g^{-1}$ poids lipidique (pl) pour le globicéphale, de 11,88 à 268,43 $\mu g.g^{-1}$ pl pour le cachalot, de 39,28 à 205,28 $\mu g.g^{-1}$ pl pour le dauphin de Risso (Figure 29) et une concentration de 49,85 $\mu g.g^{-1}$ pl a été obtenue pour l'échantillon de baleine à bec de Cuvier. Parmi ces congénères, ceux utilisés pour des comparaisons internationales (∑ ICES7) sont présents en grande quantité, de 50 à 88 %, généralement en proportion supérieure à 70 %.

Chez le globicéphale, la somme des concentrations des composés DDTs et de la dieldrine varie de 8,73 à 84,25 $\mu g.g^{-1}$ pl, chez le cachalot de 9,82 à 283,30 $\mu g.g^{-1}$ pl, chez le dauphin de Risso de 13,14 à 71,40 $\mu g.g^{-1}$ pl (Figure 29) et chez la baleine à bec de Cuvier une concentration de 35,43 $\mu g.g^{-1}$ pl a été obtenue. La proportion du DDE+Dieldrine dans la somme des composés DDTs est très importante, variant de 64 à 100 %, mais majoritairement supérieure à 80 %.

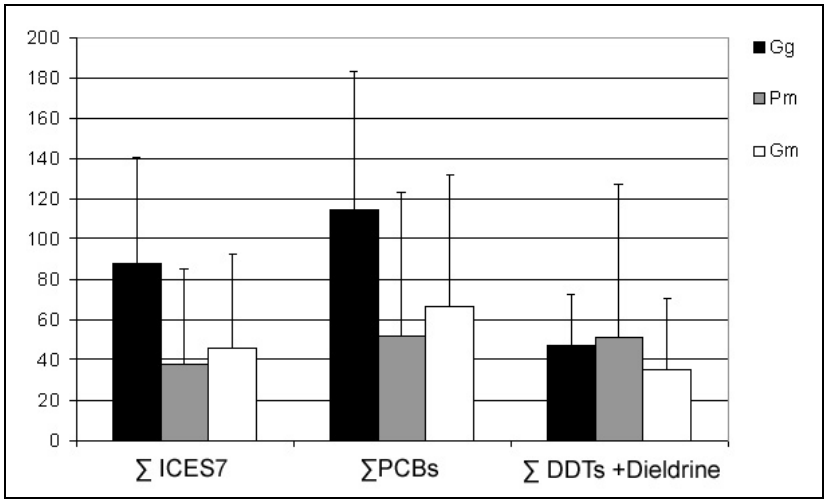


Figure 29 - Moyenne ± écart-type des concentrations ($\mu g.g^{-1}$ poids lipidique) chez les odontocètes (Gg : dauphin de Risso, Pm : cachalot, Gm : globicéphale) : somme des congénères ICES7 (∑ ICES7), somme totale des PCBs (∑ PCBs) et somme totale des DDTs et Dieldrine (∑ DDTs + Dieldrine).

Pour ∑ PCBs, ∑ ICES7 et ∑ DDTs + Dieldrine, les différences interspécifiques ne sont pas significatives (respectivement H=4,938, *p=0,08* ; H=4,438, *p=0,11* et H=0,591, *p=0,74*).

Tableau 18 - Concentration (µg.g-1 poids lipidique) chez les odontocètes des Polychlorobiphényles (PCBs), somme des 14 congénères (∑ PCBs), somme des 7 congénères inclus dans la liste développée par l'International Council for the Exploration of the Sea (ICES) pour des comparaisons internationales (∑ ICES7, congénères 28, 52, 101, 118, 138, 153 et 180) et proportion des congénères ICES7 par rapport à la somme des PCBs.

Code	Tissu	28	44	52	101	118	128	138	153	170	180	187	195	206	209	∑ ICES7	∑ PCBs	∑ ICES7/∑ PCBs
Gm20070922-A	Lard	0,00	20,98	0,00	2,54	1,73	0,00	8,47	12,68	7,17	7,45	4,56	0,00	0,00	0,00	32,86	65,58	0,50
Gm20080922-A	Lard	0,12	0,08	0,46	0,60	1,39	1,71	7,71	4,47	2,16	6,37	2,25	0,36	0,09	0,08	21,11	27,84	0,76
Gm20080922-B	Lard	0,03	0,03	0,20	0,48	1,34	1,19	5,41	3,44	1,94	5,86	2,04	0,35	0,17	0,16	16,76	22,65	0,74
Gm20071012-Str	Lard	0,00	1,60	0,00	8,17	8,48	3,92	31,81	41,65	10,16	23,43	17,84	0,95	0,00	0,00	113,55	148,00	0,77
Gm20071012-Str	Muscle	0,00	1,86	0,00	4,12	3,11	0,00	14,12	18,88	3,32	9,67	6,85	0,00	0,00	0,00	49,89	61,93	0,81
Pm20070907-A	Lard	0,00	0,00	0,00	2,60	1,72	0,00	0,00	12,84	0,00	6,70	3,93	0,00	0,00	0,00	23,86	27,78	0,86
Pm20070909-A	Lard	0,00	57,33	0,00	14,90	13,33	2,35	53,02	65,59	10,79	28,93	22,19	0,00	0,00	0,00	175,77	268,43	0,65
Pm20070914-A	Lard	0,00	0,00	0,00	2,21	2,70	0,00	18,65	22,64	0,00	15,43	8,20	0,00	0,00	0,00	61,64	69,84	0,88
Pm20070920-D	Lard	0,00	15,41	0,00	2,94	0,00	0,00	12,87	17,96	0,00	10,19	5,80	0,00	0,00	0,00	43,97	65,18	0,67
Pm20080819-A	Lard	0,02	0,01	0,13	0,48	1,04	0,59	3,82	2,27	0,85	2,69	1,03	0,10	0,03	0,00	10,44	13,06	0,80
Pm20080910-A	Lard	0,00	0,05	0,16	0,52	1,05	0,45	3,31	2,28	0,67	2,38	1,03	0,00	0,00	0,00	9,68	11,88	0,81
Pm20080916-A	Lard	0,02	0,03	0,32	0,84	1,68	1,20	7,10	4,01	1,91	5,34	1,74	0,25	0,08	0,05	19,32	24,57	0,79
Pm20090610-A	Lard	0,04	0,05	0,49	1,15	2,23	1,41	8,06	4,38	2,44	6,20	2,13	0,38	0,16	0,15	22,54	29,28	0,77
Pm20090622-A	Lard	0,00	0,00	0,19	0,46	1,10	0,47	3,27	2,39	0,69	2,33	0,90	0,13	0,06	0,00	9,74	11,99	0,81
Pm20090807-A	Lard	0,01	0,00	0,30	0,54	1,22	0,81	5,40	2,93	1,46	4,00	1,35	0,18	0,06	0,03	14,40	18,29	0,79
Pm20060321-Str	Lard	0,00	0,71	0,00	4,12	4,01	1,51	14,82	18,29	4,20	10,17	6,73	0,33	0,09	0,00	51,41	64,98	0,79
Pm20090702-Str	Lard	0,02	0,03	0,19	0,42	1,43	0,85	4,81	3,07	1,32	4,01	1,48	0,16	0,04	0,02	13,94	17,82	0,78
Gg20050728-Str	Lard	0,17	0,97	0,11	7,02	6,02	3,78	22,25	29,02	7,99	21,68	12,76	0,82	0,32	0,00	86,26	112,91	0,76
Gg20070401-Str	Lard	0,44	1,83	0,31	12,80	11,70	7,22	43,94	54,01	14,94	34,93	22,06	1,10	0,00	0,00	158,12	205,28	0,77
Gg20070501-Str	Lard	0,26	0,78	0,00	4,96	4,87	2,40	19,00	25,22	7,49	21,46	12,22	0,82	0,00	0,00	75,77	99,48	0,76
Gg20090903-Str	Lard	0,13	0,09	0,47	0,79	2,13	2,35	11,24	6,62	3,03	8,83	3,00	0,43	0,18	0,00	30,20	39,28	0,77
Gg20050728-Str	Muscle	0,22	1,12	0,13	6,86	6,09	3,84	19,11	23,32	6,81	15,76	10,55	0,72	0,30	0,30	71,47	95,12	0,75
Gg20070401-Str	Muscle	0,08	0,34	0,06	2,95	3,44	2,13	10,67	14,02	4,21	10,01	5,93	0,43	0,05	0,01	41,24	54,34	0,76
Gg20070501-Str	Muscle	0,16	0,45	0,12	2,19	2,25	1,32	8,04	11,15	2,90	8,67	5,14	0,34	0,17	0,11	32,58	43,01	0,76
Zc20030416-Str	Muscle	0,00	0,58	0,00	2,43	2,90	0,62	9,97	14,83	3,29	10,03	5,19	0,00	0,00	0,00	40,17	49,85	0,81

Tableau 19 - Concentration (µg.g^{-1} poids lipidique) chez les odontocètes des pesticides organochlorés : Lindane, dichloro-diphenyl-dichloroethylene (4,4'-DDE) et dieldrine, dichloro-diphenyldichloroethane, (4,4'-DDD), dichloro-diphenyl-trichloroethane (4,4'-DDT), somme de l'ensemble des DDTs et du dieldrine, et proportion des 4,4'-DDE et dieldrine par rapport à la somme des DDTs.

Code	Tissue	Lindane	4,4'DDE + Dieldrine	4,4'DDD	4,4'DDT	∑ DDTs + Dieldrine	4,4'DDE+Dieldrine/∑ DDT
Gm20070922-A	Lard	0,60	28,56	0,00	0,63	29,19	0,98
Gm20080922-A	Lard	0,00	6,11	1,39	1,23	8,73	0,70
Gm20080922-B	Lard	0,00	16,21	0,66	2,47	19,34	0,84
Gm20071012-Str	Lard	0,06	75,36	2,88	6,01	84,25	0,89
Gm20071012-Str	Muscle	0,28	46,93	1,07	1,43	49,43	0,95
Pm20070907-A	Lard	0,32	45,79	0,00	0,00	45,79	1,00
Pm20070909-A	Lard	1,12	266,35	3,09	13,86	283,30	0,94
Pm20070914-A	Lard	0,00	75,34	0,00	2,70	78,04	0,97
Pm20070920-D	Lard	0,78	55,91	0,00	0,86	56,77	0,98
Pm20080819-A	Lard	0,00	12,33	0,33	0,68	13,34	0,92
Pm20080910-A	Lard	0,00	13,72	0,39	0,15	14,26	0,96
Pm20080916-A	Lard	0,01	16,74	1,27	2,42	20,42	0,82
Pm20090610-A	Lard	0,00	12,52	1,39	4,42	18,33	0,68
Pm20090622-A	Lard	0,00	10,50	0,45	1,54	12,49	0,84
Pm20090807-A	Lard	0,01	6,66	0,82	2,33	9,82	0,68
Pm20060321-Str	Lard	0,08	44,88	1,48	5,01	51,37	0,87
Pm20090702-Str	Lard	0,00	4,47	0,72	1,81	6,99	0,64
Gg20050728-Str	Lard	0,00	56,92	1,46	1,49	59,86	0,95
Gg20070401-Str	Lard	0,00	63,94	3,54	3,93	71,40	0,90
Gg20070501-Str	Lard	0,00	39,95	1,93	2,40	44,28	0,90
Gg20090903-Str	Lard	0,00	11,53	1,09	0,65	13,27	0,87
Gg20050728-Str	Muscle	0,03	30,29	1,76	1,81	33,85	0,89
Gg20070401-Str	Muscle	0,01	11,63	0,52	0,99	13,14	0,88
Gg20070501-Str	Muscle	0,03	15,56	0,93	1,02	17,51	0,89
Zc20030416-Str	Muscle	0,14	32,96	2,26	0,21	35,43	0,93

4.5 - Analyse en isotopes stables chez les odontocètes teutophages

Les rapports isotopiques sont présentés dans le Tableau 20. Ceux-ci ont été majoritairement mesurés dans la peau. Les résultats obtenus pour les échantillons de muscles sont donnés à titre indicatif et ne seront pas discutés plus en détail.

Concernant le $\delta^{13}C$ (carbone), le globicéphale noir présente une valeur moyenne de –17,5 ± 0,7 ‰, le cachalot de –17,4 ± 1,0 ‰, le dauphin de Risso de –16,8 ± 0,8 ‰ et la baleine à bec de Cuvier une valeur de –16,9 ‰. Ces différences entre espèces pour le $\delta^{13}C$ ne sont pas significatives (H=3,109, *p=0,1).* Les valeurs pour le $\delta^{15}N$ (azote) sont de 9,9 ± 0,3 ‰ chez le globicéphale, 10,6 ± 0,5 ‰ chez le cachalot, 11,7 ± 0,7 ‰ chez le dauphin de Risso et de 12,9 ‰ pour la baleine à bec de Cuvier. Ces différences entre espèces sont toutes significatives pour le $\delta^{15}N$ (H=14,17, *p=0,00083* et pour le test post-hoc 0,02<p<0,009).

Il a aussi été possible de réaliser des analyses en isotopes stables chez des espèces de céphalopodes océaniques, qui sont potentiellement des proies pour les espèces odontocètes. Une différence globale de 2,6 ‰ pour le $\delta^{15}N$ et de 1,2 ‰ pour le $\delta^{13}C$ est obtenue entre les odontocètes et les céphalopodes océaniques (Figure 30). Ces valeurs sont tout à fait en accord avec les valeurs mesurées généralement entre des prédateurs et leurs proies.

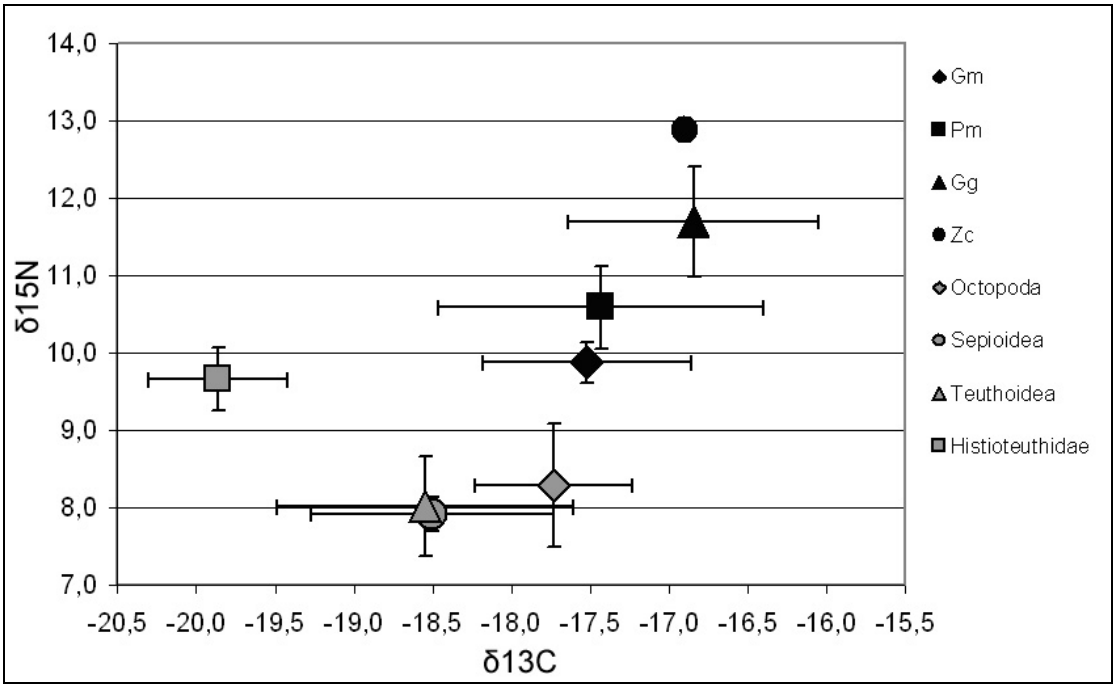


Figure 30 - Moyenne ± écart-type des rapports isotopiques de l'azote et du carbone (respectivement δ15N et δ13C), dans les échantillons de peau du globicéphale (Gm), du cachalot (Pm), du dauphin de Risso (Gg) et l'échantillon de muscle de la baleine à bec de Cuvier (Zc), et dans le muscle d'octopodes (Octopoda), de sèches (Sepioidea), de calmars (Teuthoidea) et d'Histioteuthidae.

Tableau 20 - Rapports isotopiques de l'azote et du carbone (respectivement δ15N et δ13C) mesurés chez les odontocètes teutophages.

Echantillons	Tissu	$\delta^{15}N$	$\delta^{13}C$
Gm20070612-A	Peau	10,0	-16,9
Gm20070922-A	Peau	10,1	-16,8
Gm20080922-A	Peau	9,4	-18,2
Gm20080922-B	Peau	9,8	-18,2
Gm20071012-Str	Peau	10,1	-17,5
Gm20071012-Str	Muscle	9,6	-16,4
Pm20070907-A	Peau	10,6	-16,9
Pm20070909-A	Peau	10,6	-16,6
Pm20070914-A	Peau	11,2	-16,7
Pm20070916-C	Peau	11,0	-16,8
Pm20070920-D	Peau	11,1	-17,0
Pm20070920-E	Peau	10,7	-17,0
Pm20080819-A	Peau	10,7	-18,0
Pm20080910-A	Peau	9,8	-18,0
Pm20080916-A	Peau	10,1	-18,5
Pm20090610-A	Peau	10,6	-17,7
Pm20090622-A	Peau	10,2	-18,1
Pm20090807-A	Peau	9,5	-18,3
Pm20060321-Str	Peau	11,0	-15,2
Pm20090702-Str	Peau	11,2	-19,3
Pm20090702-Str	Muscle	11,0	-20,6
Gg20050728-Str	Peau	12,6	-15,8
Gg20070401-Str	Peau	11,0	-17,1
Gg20070501-Str	Peau	12,0	-16,8
Gg20090903-Str	Peau	11,3	-17,7
Gg20050728-Str	Muscle	10,5	-16,6
Gg20070401-Str	Muscle	12,4	-15,9
Gg20070501-Str	Muscle	10,4	-17,1
Gg20090903-Str	Muscle	11,2	-17,5
Zc20030416-Str	Muscle	12,9	-16,9

Il y a une corrélation significative entre les concentrations en PCB et les rapports isotopiques du carbone (r=-0.653078, p = 0.001796) et de l'azote (r=0.445, p = 0.04883), entre les

congénères ICES7 et les rapports isotopiques du carbone (r= -0.6576201, p = 0.001626) et de l'azote (r=0.4780354, p = 0.03302) et entre DDTs et les rapports isotopiques du carbone (r=-0.7225673, p = 0.0003201) (Figure 31).

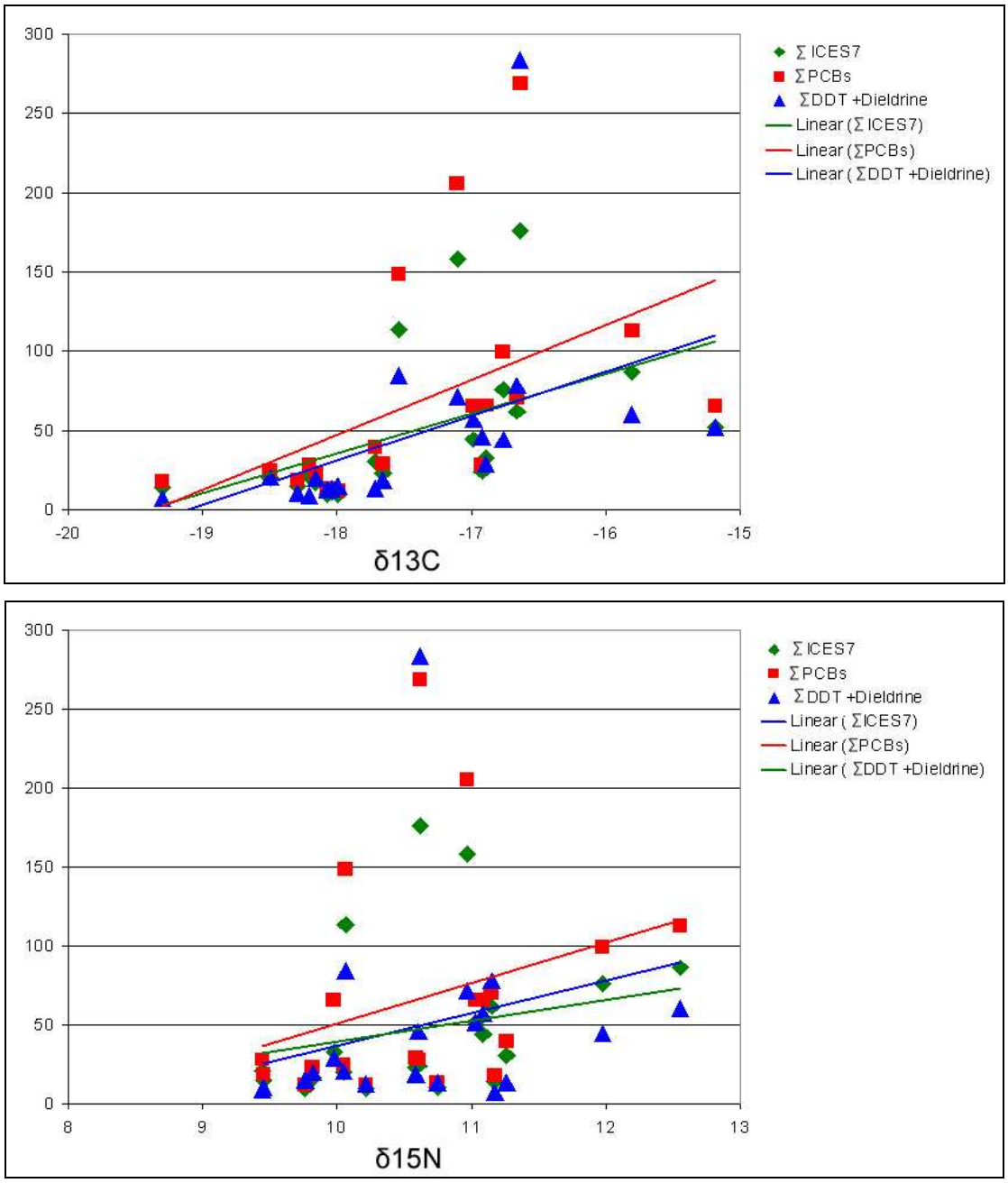


Figure 31 - Relation entre les rapports isotopiques $\delta^{13}C$ des odontocètes (en haut) et $\delta^{15}N$ (en bas), et les concentrations (en $ng.g^{-1}$ poids lipidique) des PCBs totaux (∑ PCBs), des congénères ICES7 (∑ ICES7) et les composés DDTs totaux (∑ DDTs).

5 - DISCUSSION

5.1 - Sex-ratio des rorquals communs

Cette étude suggère un décalage dans l'arrivée des rorquals communs mâles et des rorquals communs femelles sur notre zone d'étude (le Sanctuaire PELAGOS élargi) ; les premiers semblant arriver de façon plus précoce que les secondes. Il faudra valider ou invalider cette tendance au cours des prochaines campagnes. Si elle est confirmée elle pourrait résulter d'une exploitation différenciée des ressources trophiques entre mâles et femelles, être liée à la reproduction, ou les deux ensemble. Le Sanctuaire PELAGOS est connu pour être une zone de nourrissage estival. Au cours de nos missions, certains comportements observés suggéraient des interactions sexuelles, mais ils demeurent trop rares et trop peu étudiés pour affirmer que la zone du Sanctuaire PELAGOS est également une zone importante pour la reproduction de l'espèce. Il s'agit néanmoins d'une piste intéressante qui pourrait être étayée un peu plus par l'analyse du taux d'hormone chez les rorquals : une fluctuation saisonnière du taux de testostérone chez les mâles appuierait l'hypothèse d'une reproduction saisonnière impliquant la zone du sanctuaire Pelagos.

5.2 - La contamination des rorquals communs

5.2.1 - Les PCB et OCP

Les résultats de cette étude portent sur 73 échantillons ce qui nous semble suffisant pour leur conférer une valeur de référence concernant le Sanctuaire PELAGOS et plus largement la Méditerranée nord-occidentale. Ils pourront être répliqués dans 5 à 10 ans pour évaluer l'évolution de ces concentrations dans les tissus des rorquals communs et ils constituent de ce fait un indicateur pérenne de lq qualité du milieu pour la gestion du Sanctuaire PELAGOS.

Les niveaux de contamination retrouvés dans la graisse des rorquals communs durant cette étude ont été comparés avec les données de la littérature. Cependant cette comparaison n'est pas aisée. Les différents modes d'expression des résultats ($ng.g^{-1}$ de poids frais, $ng.g^{-1}$ de poids sec et $ng.g^{-1}$ de lipide), la multitude de congénères analysés (notamment dans le cas des PCB) rendent les données difficiles à comparer. Peu d'articles permettent une comparaison fiable des niveaux de contamination des populations de rorquals communs. La recherche de niveau de contamination dans la bibliographie a donc été élargie à d'autres espèces de balénoptéridés proche comme le petit rorqual (*Balaenoptera acutorostrata*).

Il apparaît que les niveaux de contamination des rorquals communs de cette étude sont dans la moyenne de ceux trouvés dans la littérature, que ce soit en termes de niveau de PCB ou de DDT (Tableau 21). Pour ce qui concerne la Méditerranée, les niveaux de contamination de cette étude sont du même ordre que ceux observés dans les débuts des années 90 par

Marsili et *al* (1998). Cependant la comparaison des données avec cette étude réalisée sur la même zone que la nôtre est délicate. En effet la teneur lipidique des échantillons n'a pas été réalisée, et le détail des niveaux de contamination de chaque composé n'est pas donné. Les valeurs données dans le Tableau 21 sont une extrapolation des valeurs de la publication initialement données en $ng.g^{-1}$ de poids sec. Il faut en particulier remarquer qu'il n'y a pas de différence de niveau de contamination entre mâles et femelles signalée dans cette étude ce qui est étonnant.

Les PCB comme les pesticides chlorés sont de "vieux contaminants" depuis longtemps interdits à la production, et il a été observé dans certains cas une diminution progressive de leurs concentrations dans l'environnement (Figure 32 et Figure 33). Les données disponibles ne nous permettent malheureusement pas d'attester d'une tendance de ce type pour ce qui concerne les rorquals communs de Méditerranée.

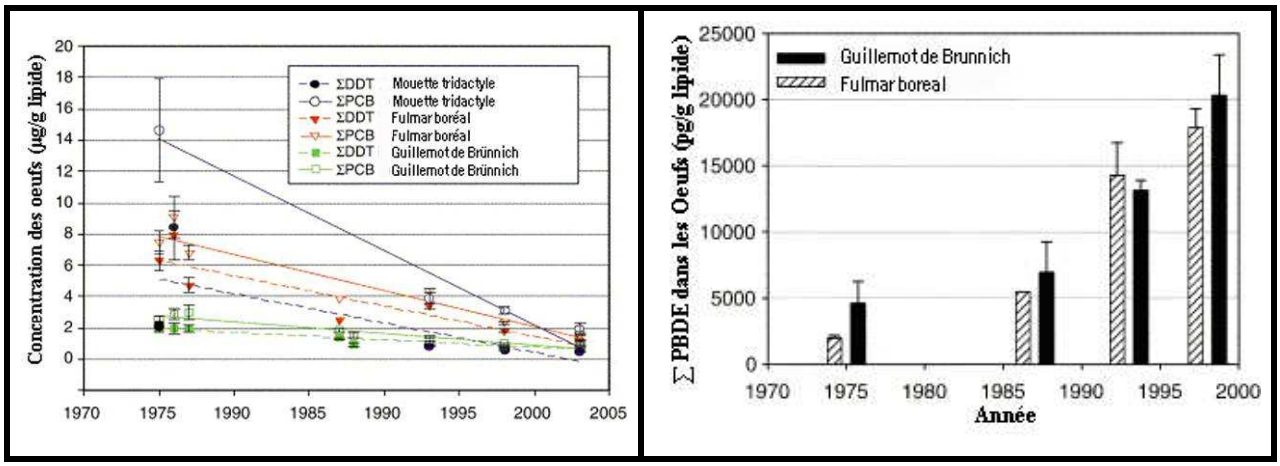


Figure 32 - Évolution de la concentration moyenne en PCB et PBDE dans les œufs d'oiseaux de mer de l'île Prince Léopold de 1975 à nos jours (Braune et al., 2005).

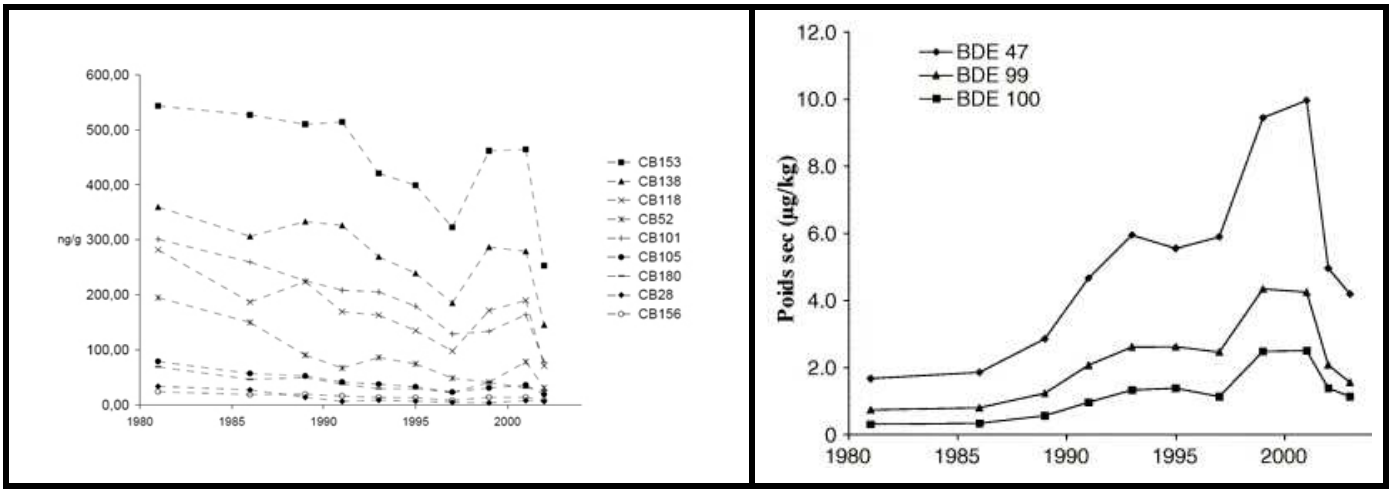


Figure 33 - Évolution de la concentration de différents congénères de PBDE et PCB dans des moules échantillonnées entre 1981 et 2003 à Villerville situé à la sortie de l'estuaire de la Seine (Johansson et al., 2004).

Tableau 21 - Comparaison du niveau de contamination des rorquals communs (les valeurs marquées d'un astérisque ont été recalculées de façon à avoir accès à la somme des 7 PCB).

Référence bibliographie	Espèce	Echouage / Biopsie	Date prélèvement	Site		n		7 PCB ($ng.g^{-1}$ lp)	S DDT ($ng.g^{-1}$ lp)
Kleivane et Skaare, 1998	*B. acutorostrata*	Echouage	1992	Atlantique nord	Norvège	72	Total	3 369	2685
							Mâle	4836*	3860 (1270 - 14760)
							Femelle	1902*	1510 (700 - 3370)
Hobbs et al, 2001	*B. Physalus*	Echouage	1971-72	Atlantique Nord	Newfoundland	12	Total	1156*	5670 (1910-10400)*
					Nova scotia	5	Total	4435*	27900 (7400-37700)*
Gauthier et al, 1997 b	*B. Physalus*	Biopsie	1991	Atlantique Nord		15	Total	2238 ±2325	3999 ±3879
						9	Mâle	2731 ±2781	4706 ±4647
						6	Femelle	1154 ±752	2472 ±1601
Marsili et Focardi, 1995	*B. Physalus*	Biopsie	1990-1993	Méditerranée	Mer de Ligure	2	Total	595 à 4610	4200 à 9500
Marsili et al, 1998	*B. Physalus*	Biopsie	1992-1995	Méditerranée	Mer de Ligure	24	Total	4665 ±3468*	6759 ±3432*
						14	Mâle	4528 ±6155*	4528 ±2768*
						10	Femelle	4856 ±7605*	7605 ±4205*
Cette étude	*B. Physalus*	Biopsie	2006 - 2008	Méditerranée	Mer de Ligure	40	Total	4121 ±3700	6643 ±5959
							Mâle	5824 ±3282	10370 ±6246
							Femelle	1817 ±853	3239 ±2896

5.2.2 - Le rapport CB118/CB153 indicateur du niveau trophique

Parallèlement au niveau de contamination globale en PCB, nous nous sommes intéressés au rapport CB 118 / CB 153. Globalement ce rapport est sensé diminuer lorsque la position trophique augmente, mais il est très fortement influencé par la capacité de métabolisation des espèces étudiées. Si on compare les rapports CB 118 / CB 153 obtenus pour les rorquals communs de Méditerranée avec ceux obtenu par Gauthier et *al*. (1997) (n=15) dans l'Atlantique nord, on observe une différence sensible (Tableau 22).

Cette différence va dans le sens de l'hypothèse selon laquelle les rorquals communs de Méditerranée se nourrissent presque exclusivement de krill (*Meganyctiphanes norvegicae*) tandis que les rorquals communs de l'Atlantique auraient un régime composé également de poissons.

Parmi les rorquals communs méditerranéens, on observe également une différence significative entre les mâles et les femelles (respectivement 0,24 ±0,04 et 0,31 ±0,14) qui suggère que les premiers seraient plus stricts dans leur régime à base de krill et les secondes plus opportunistes. On observe une différence inverse pour les rorquals communs d'Atlantique étudiés par Gauthier et *al* (1997) mais les écarts-types sont plus importants ce qui limite la significativité de cette différence. On peut aussi envisager que ce rapport soit modifié chez les femelles par une remobilisation différenciée de ces deux composants lors de la lactation, mais chez les deux femelles présentant un fort taux de PCBs (pour lesquelles on peut exclure une lactation récente, cf. ci-dessous) le rapport est élevé, ce qui est contradictoire.

Difficile à ce stade d'aller plus loin dans ce questionnement qui nécessiterait des analyses plus spécialisées (isotopes). S'il s'agit bien d'une différence de régime alimentaire, on peut envisager qu'elle soit liée au décalage que nous avons mis en évidence dans cette étude (mâles plus précoces) dans l'arrivée des animaux sur la zone du Sanctuaire PELAGOS (connue pour être une zone de nourrissage) ? Ou bien aux contraintes de la procréation ou de l'allaitement ? C'est en tout cas une piste potentielle pour la suite qu'il faudra donner à ce travail.

Tableau 22 - Comparaison du rapport CB 118/153 entre les rorquals communs échantillonnés en Méditerranée et en Atlantique (ratio : pas d'unité).

		CB 118 / CB 153 **Gauthier et al, 1997**	**CB 118 / CB 153** **Étude WWF – GIS3M**
Moyenne	*B. physalus*	0,45 ±0,48	0,27 ±0,11
Minimum	*B. physalus*	0,26	0,16
Maximum	*B. physalus*	0,48	0,67
Moyenne mâle	*B. physalus*	0,50 ±0,48	0,24 ±0,04
Moyenne femelle	*B. physalus*	0,32 ±0,29	0,31 ±0,14

5.2.3 - PCBs et reproduction

Tout en restant très prudent dans l'interprétation il n'est pas inintéressant d'examiner de plus près les données. Nous avons un couple mère/fille établi par la génétique qui a également été observé ***in situ*** ce qui suggère une naissance assez récente. Pour cette mère « récente », le niveau de contamination (somme des 7 PCBs) est de 1 868 ng/g de lipide. On constate également que seulement 7 femelles sur les 35 analysées pour les PCBs ont des valeurs supérieures à la moyenne (2 822) ; la plupart ont des niveaux qui sont similaires à ceux de notre mère étalon. Pour ce qui concerne les mâles c'est le contraire. La très grande majorité présente des valeurs très supérieures aux femelles (Figure 34). Si l'on considère que l'allaitement est la seule possibilité de dépuration, on peut alors estimer que la plupart des femelles analysées ont donné naissance, ce qui est une bonne nouvelle pour cette population.

A contrario, on peut penser que les deux femelles (D6 et D18) qui présentent des niveaux étonnamment élevés, près de 7 fois la valeur de la moyenne, sont soit stériles, soit trop âgées pour avoir donné naissance récemment. Le niveau de contamination de ces deux femelles très proches des valeurs maximales des mâles et le fait que les PCBs sont interdits depuis longtemps plaident pour l'hypothèse de femelles âgées et stériles.

Une toute autre hypothèse, assez peu probable, serait que les quatre animaux situés à l'extrémité de l'échelle des contaminations fréquentent spécifiquement une ou des zones extrêmement polluées.

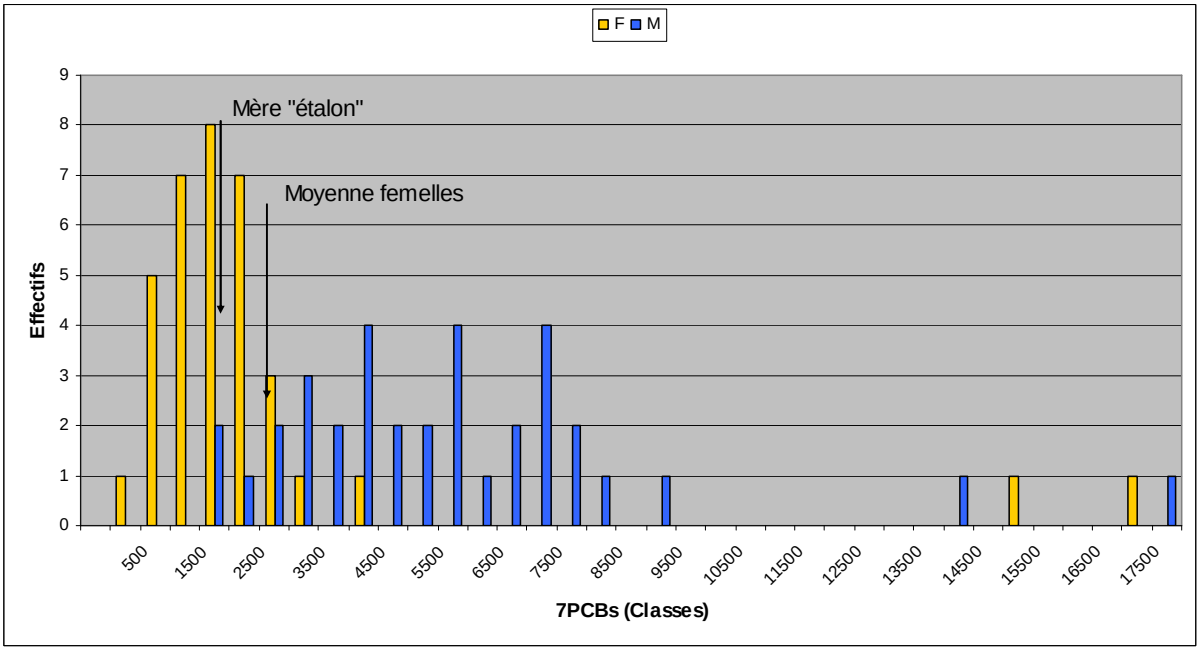


Figure 34 - Répartition des mâles et des femelles par classes de niveau de contamination (∑7PCB).

La comparaison des niveaux de contamination des animaux recapturés est difficile à interpréter (Tableau 23). Une femelle (un animal connu dont la caudale est amputée d'une moitié) recapturée à 4 mois d'intervalle montre une augmentation de 22 % ; un mâle biopsié deux fois à quelques minutes d'intervalle présente fort logiquement deux valeurs quasiment identiques, et enfin deux femelles recapturées à 15 mois et deux ans d'intervalle voient leur taux de PCBs diminuer de 29 %. Si l'on se fie aux données de la littérature pour d'autres espèces de cétacés (*Stenella* et *Péponocéphale*) qui indiquent des pertes de 90 % de la charge en POP des femelles au cours de la gestation et la lactation, cette diminution n'est pas suffisante pour signaler une naissance durant cette période.

La comparaison des niveaux de contamination des couples mère/petit identifiés par la génétique montre dans tous les cas que les petits rejoignent ou dépassent leur mère. Quand les petits sont des mâles cette différence peut être considérable, ce qui suggère que les animaux continuent de se charger en PCB via l'alimentation malgré l'interdiction ancienne de l'usage de ces composés.

Tableau 23 - Comparaison des niveaux de contamination des animaux recapturés ou présentant des liens de parenté.

Recaptures	∑ 7 PCB	∑ 7 PCB	Variation
A1=A16	2 343	2 860	+22%
C2=C4	7 356	7 360	0%
A10=B4	2 851	2049	-29%
B2=D35	1 721	1 237	-29%
"Mère de…"	∑ 7 PCB	∑ 7 PCB	
A7-A6	1 868	1 666	
C7-D1	1 942	10773	
C1-C8	1 061	3 945	
B5-C9	1 590	4 180	

5.2.4 - PCBs et génétique

Il n'y a pas de relation évidente entre la structuration génétique et le niveau de contamination des individus composants ces groupes. Seule la différence de contamination entre les mâles et les femelles semble évidente.

Les animaux de l'Atlantique se répartissent dans deux groupes parmi les animaux de Méditerranée (Figure 35). Ces résultats sont cohérents avec ceux de Bérubé et *al* (1998) qui montrent que les marqueurs micro-satellites ne permettent pas de distinguer aussi clairement les populations de Méditerranée et d'Atlantique-Est en comparaison avec les populations d'Atlantique-Ouest. D'une manière générale, l'article montre que les animaux de Méditerranée et Atlantique-Est sont très proches génétiquement. Les auteurs suggèrent aussi la possibilité de flux de gènes entres ces populations voisines. L'observation de passages dans un sens et dans l'autre d'animaux au niveau de Gibraltar renforce cette possibilité de flux (R. de Stephanis, communication personnelle).

Un sous-groupe constitué de cinq femelles d'Atlantique et de quatre femelles de Méditerranée se distingue fortement au centre de l'arbre (cadre bleu ciel). Les taux de contaminations de trois des femelles de Méditerranée sont plutôt faibles mais une au contraire présente le taux le plus élevé (D18, cf. supra). Dans la mesure où de telles différences de niveaux de contamination entre animaux d'Atlantique et de Méditerranée sont rapportées par Marsilli et Focardi (1996), cette proximité génétique pourrait donner à penser que les femelles A17, B1 et D38 sont d'origine Atlantique. Reste le cas particulier de D18 qui a déjà été évoqué plus haut et qui laisse ouverte la possibilité d'une origine atlantique.

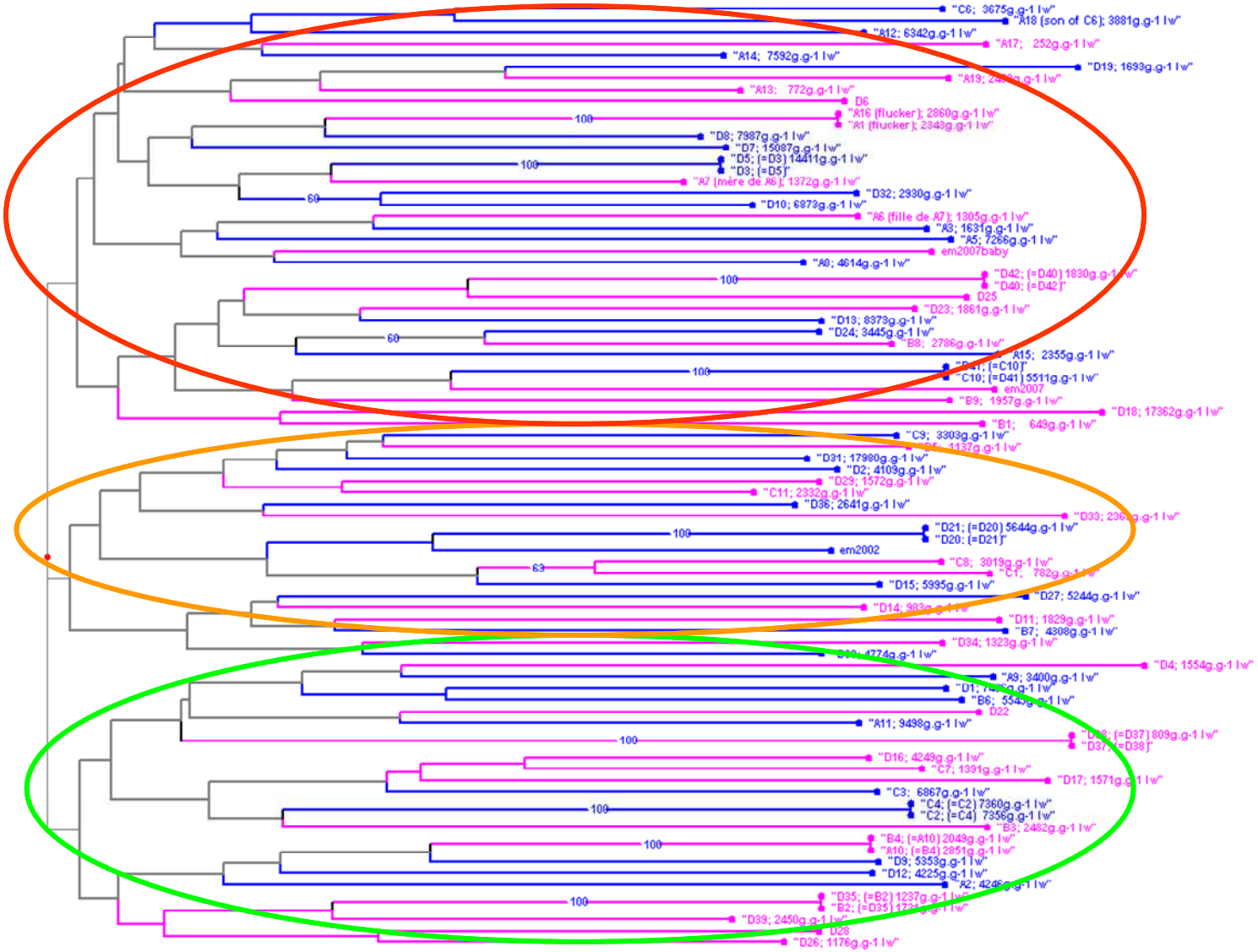


Figure 35 - Représentation arborée de l'analyse de Neighbor-Joining basée sur les données de génotypage des individus de Méditerranée et d'Atlantique. En rose les femelles, en bleu les mâles. La contamination en PCBs est également indiquée.

5.2.5 - Les PBDE

Concernant les niveaux de contamination en PBDE, il existe peu de données sur la contamination des balénoptéridés. Petterson et ses collaborateurs ont mis en évidence le BDE 47 à une concentration de l'ordre de 570 $ng.g^{-1}$ lp sur un rorqual commun échantillonné en Méditerranée, en mer Tyrrhénienne (Petterson et *al*, 2004). Law et ses collaborateurs ont détecté le BDE 47 à une concentration de 7 $ng.g^{-1}$ lp chez un rorqual commun (*B. physalus*), de 8 $ng.g^{-1}$ lp chez un petit rorqual (*B. acutorostrata*) (Law et *al*, 2005). La valeur moyenne retrouvée dans cette étude pour le BDE 47 est de 81 ± 60 $ng.g^{-1}$ lp. Les rorquals communs analysés présentent donc une faible contamination par les PBDE, dont la production et l'utilisation ont été très fortement régulées ces dernières années en Europe.

Les rorquals communs de Méditerranée échantillonnés présentent des niveaux de PCB et de DDT significatifs mais cohérents avec les données existantes. Ils semblent peu impactés par les PBDE. Le mode de contamination de ces animaux est quasi exclusivement trophique. Premièrement les cétacés sont des mammifères qui ont besoin de remonter à la surface pour respirer, ils ne vont donc pas ou très peu être impactés par voie respiratoire, contrairement aux poissons qui respirent dans l'eau grâce à leurs branchies. Deuxièmement la peau des cétacés, quasi totalement dépourvue de pilosité et de glandes sudoripares, est une véritable barrière entre leur organisme et le milieu ambiant, limitant ainsi l'exposition directe. De plus la voie trophique est connue pour être la voie d'exposition majoritaire pour les POP - Polluants Organiques Persistants (Pompa et *al*, 2003 ; Sjodin et *al* 2003).

Le régime alimentaire des rorquals communs quasi exclusivement basé sur la consommation d'organismes planctoniques explique certainement ces niveaux de contamination relativement peu importants. Les rorquals communs, qui se placent relativement bas dans le réseau trophique, ne sont donc pas soumis à des phénomènes de bioamplification trop importants. A titre de comparaison, la graisse des dauphins bleu et blanc (*Stenella coeruleoalba*) préférentiellement teutophages, ou des grands dauphins (*Tursiops truncatus)* à tendance plus ichtyophage, est 20 à 50 fois plus contaminée (respectivement 151 878 $ng.g^{-1}$ lp et 33 323 $ng.g^{-1}$ lp pour les PCB).

5.2.6 - Les Alkylphénols

L'analyse des alkylphénols s'est heurtée à des difficultés analytiques importantes qui nous ont conduits à changer de protocole en cours d'étude. Il s'est avéré nécessaire de consacrer un échantillon complet pour obtenir des résultats fiables ce qui a limité le nombre final d'échantillons analysés. Ces difficultés ont été partiellement résolues sur les 10 échantillons de 2009 bien que l'idéal aurait été de travailler sur des échantillons encore plus volumineux permettant de répliquer l'extraction et l'analyse.

Avec ces résultats nous disposons d'un premier état quand à la contamination des rorquals communs par ces polluants émergeants. Elle est globalement faible avec des niveaux de l'ordre de 100 à 200 $ng.g^{-1}$ pf pour les nonylphénols et de moins de 200 $ng.g^{-1}$ pf pour les BPA (Bisphénols A). Un individu présente cependant un niveau de contamination exceptionnellement élevé qu'il n'est malheureusement pas possible de confirmer totalement pour des raisons méthodologiques.

Ces valeurs sont cohérentes avec les données de la littérature retrouvées dans des poissons d'eau douce et d'eau marine (Rapport interne LPTC pour le CEMAGREF, Arukwe et *al*, 2000).

Il n'existe pas à notre connaissance de littérature scientifique sur la contamination des rorquals communs par les alkylphénols, ce qui confère un caractère pilote à ces travaux mais qui empêche aussi la comparaison de notre population méditerranéenne avec d'autres. Contrairement aux PCBs et aux OCP, les alkylphénols sont des polluants plus récemment introduits dans les milieux naturels et le suivi de ces composés dans les tissus des cétacés devrait être réédité dans quelques années. Il serait en particulier utile de lever le doute créé par la valeur exceptionnelle que présente un des individus analysé.

La contamination des rorquals communs, malgré leur bas niveau trophique qui limite la bio-amplification, par ces polluants utilisés par l'industrie depuis une quarantaine d'années démontre s'il était nécessaire le caractère global de la pollution de notre aquasphère et la magnitude de son impact potentiel sur l'ensemble du vivant.

5.3 - Contamination chez les odontocètes teutophages

5.3.1 - Facteurs influençant la contamination des odontocètes

Chez les prédateurs supérieurs, tels que les odontocètes, plusieurs modes de contamination existent : l'absorption par les poumons lors de la respiration, par la peau ou le placenta avant la naissance, pendant la lactation via le lait et par l'ingestion d'eau de mer (André *et al.*, 1990 ; Augier *et al.*, 1993a &1993b). Cependant, la source principale de contamination pour les cétacés est indéniablement l'alimentation (André 1990, Augier *et al.*, 1993a &1993b ; Reijenders & Aguilar 2002). De plus, les POPs sont stables et s'accumulent à travers le réseau trophique. Puisque les espèces étudiées sont des prédateurs supérieurs et qu'elles ont une durée de vie longue, elles sont sujettes à la bioaccumulation. La contamination des espèces peut donc être influencée par des niveaux trophiques différents, mais aussi par des habitats différents, la contamination d'une zone se reflétant dans tout le réseau trophique.

Ici, nous avons trouvé une faible corrélation positive entre le $\delta^{13}C$ et le $\delta^{15}N$, et les concentrations en PCBs et en OCPs. Le $\delta^{13}C$ et le $\delta^{15}N$ reflètent respectivement l'habitat et le niveau trophique de l'espèce. Les concentrations en POPs semblent donc augmenter pour les espèces ayant un habitat plus côtier et un niveau trophique plus important. Les différences interspécifiques ne sont pas significatives, mais le dauphin de Risso, ayant le plus haut niveau trophique et l'habitat le plus côtier (Praca & Gannier, 2008), semble présenter une contamination plus importante que le cachalot et le globicéphale noir. Le peu de biopsies que nous avons réussi à réaliser sur cette espèce ne permet cependant pas de conclure.

5.3.2 - Profil de contamination des odontocètes

Les congénères ICES7 étaient les congénères les plus utilisés dans les mélanges industriels, comme l'Aroclor 1254 ou 1260. Leur part importante dans les PCBs totaux mesurés chez les odontocètes correspond bien à leur importance dans les mélanges industriels et au transfert de ces proportions dans l'environnement (*e.g.* Aguilar *et al.*, 2002 ; Borrell *et al.*, 2007 ; UNEP, 2002).

Dans les organismes vivants, les processus métaboliques transforment le DDT en DDE et en une petite partie de DDD (Clark, 2001). Ici, le DDE montre de fortes concentrations, représentant plus de 80 % des DDTs totaux dans la majorité des échantillons. Ce résultat reflète le vieillissement de la contamination initiale en DDT et l'absence de nouveaux apports en Méditerranée (Borrell & Aguilar, 2007 ; Villeneuve *et al.*, 1999).

5.3.3 - Niveaux de contamination et toxicité

La contamination des odontocètes que nous avons mise en évidence est très importante. Le globicéphale noir, le cachalot et la baleine à bec de Cuvier présentent des concentrations 5 à 10 fois supérieures à celles observées chez les mêmes espèces dans l'océan Atlantique (Tableau 24). Ce très haut niveau de contamination a été retrouvé de manière similaire chez le dauphin de Risso et d'autres espèces en Méditerranée (Tableau 24). En relation avec son budget en eau négatif et sa topographie semi fermée, la Méditerranée est sujette à une importante accumulation de polluants (Tolosa *et al.*, 1997 ; UNEP, 2002). Cette région présente, avec la Californie, la plus haute contamination en POPs chez les mammifères marins au Monde (Aguilar *et al.*, 2002; Debier *et al.*, 2005 ; Le Boeuf *et al.*, 2002) et la Méditerranée nord-occidentale est la zone de Méditerranée où les sédiments sont les plus pollués en POPs (Gómez-Gutiérrez *et al.*, 2007a ; 2007b). Ce n'est donc pas surprenant que nous observions une telle contamination chez les odontocètes qui sont des prédateurs supérieurs avec une longévité importante.

Pour l'échantillon de juvénile de baleine à bec de Cuvier, un niveau de contamination similaire aux niveaux de contamination des adultes des autres espèces est observé. Cette contamination est due au transfert des POPs de la mère vers le petit pendant la gestation, à travers le placenta, et pendant l'allaitement, via le lait (Colborn & Smolen, 2003).

Chez les dauphins bleu et blanc de Méditerranée affectés par l'épisode de morbillivirus entre 1990 et 1992, les concentrations en PCBs dans le lard variaient entre 100 et 2 900 $\mu g.g^{-1}$ pl, avec une concentration médiane de 758 $\mu g.g^{-1}$ pl (Aguilar & Borrell, 1994). Ces hautes concentrations ont pu augmenter la prédisposition des individus à une infection par le morbillivirus (Aguilar & Borrell, 1994). Les concentrations que nous avons observées sont dans les plus basses des valeurs observées chez les dauphins infectés, mais pourraient quand même augmenter leur sensibilité aux maladies et virus, comme le morbillivirus.

De plus, Kannan *et al.* (2000) ont montré que des concentrations en PCBs autour 17 $\mu g.g^{-1}$pl dans le lard des mammifères marins pourraient être un seuil au-delà duquel les PCBs pourraient provoquer des effets physiologiques. Cette valeur, obtenue avec les pics du mélange d'Aroclor 1254, n'est pas directement comparable à notre ∑ PCBs, mais est équivalente à ∑ ICES7 multipliée par 3 (Jepson *et al.*, 2005). A la fois dans les échantillons de lard et muscle, les ∑ ICES7 multipliées par 3 que nous observons sont largement supérieures à ce seuil. Le lard semble servir de réservoir pour les polluants (Evans *et al.*, 2004) et les polluants de ce tissu ne seront toxiques que s'ils sont remobilisés dans l'organisme, dans le cas d'un manque de nourriture par exemple. Or, ces hautes concentrations sont aussi observées dans les échantillons de muscle, indiquant une forte contamination dans tout l'organisme et des effets potentiels sur les systèmes immunitaires et reproductifs.

Tableau 24 - Comparaison des concentrations totales (µg.g-1) des congénères de PCBs (∑ PCBs) et des composés du DDTs (∑ DDTs) chez les odontocètes teutophages en Méditerranée, avec celles observées dans d'autres zones d'études et chez d'autres espèces en Méditerranée (pl : poids lipidique, pf : poids frais, ps : poids sec).

Espèces	Zone	n	Poids	Min-max des PCBs	Min-Max des DDTs	Réference
Cachalot	Méditerranée NO	12	pl	11,9 - 268,4	51,2 - 527,5	Cette étude
	Océan Atlantique*	7	pf	2,4 - 4,9	4,49 - 7,8	Law et al, 1996
		7	pl	2,2 - 4,35	5,1 - 10,8	Holsbeek et al, 1999
	Sud de l'Australie	37	pl	0,7 - 2,0	0,6 - 12,4	Evans et al, 2004
Baleine à bec de Cuvier	Méditerranée NO	1	pl	49,6²	35,4²	Cette étude
	Bermudes	4	pf	7,9 - 12,3	12,3 - 44,83	Knap & Jickells, 1983
Globicéphale	western Mediterranean Sea	4	pl	22,7 - 148,0	29,2 - 84,3	Cette étude
	Océan Atlantique°	417	pl	13,1"	11,7"	Dam & Bloch, 2000
Dauphin de Risso	Méditerranée NO	4	pl	39,3 - 205,3	44,1 - 71,1	Cette étude
		2	pl	42,0 -1000,0	11,0 - 670,0	Corsolini et al, 1995
Dauphin bleu et blanc	Méditerranée NO	89	ps	47,8 - 86,7	24,4 - 64,4	Marsili & Forcadi, 1996
		186	pl	170,4"	91,2"	Aguilar & Borrell, 2005
		6	pl	43,8 -110,3	2,7 - 6,6	Wafo et al, 2005
Grand dauphin	Méditerranée NO	36	pl	23,0 - 1377,2	6,5 - 548,8	Borrell & Aguilar, 2007
		20	pl	151,0"	61,3"	Borrell et al, 2006

**Echoués en Mer du Nord, poids lipidique calculé à partir du poids sec et du rapport poids sec/poids lipidique, donnés par les auteurs ; ²Uniquement un échantillon de muscle ;°Capturés aux îles Féroé ; "Moyenne globale.*

5.4 - Comparaison odontocètes et mysticètes pour les ∑ 7 PCB

Cette comparaison est donnée à titre indicatif car elle repose sur un trop faible nombre d'échantillons, notamment pour les odontocètes. Néanmoins les niveaux de contamination sont suffisamment importants pour que cette comparaison soit intéressante. Elle est donnée en nanogramme par gramme de lipides avec la séparation mâle / femelle pour les rorquals communs (Tableau 25).

Il apparaît que le niveau de contamination des trois espèces d'odontocètes est de 15 à 30 fois supérieur à celui des rorquals communs. C'est un résultat prévisible qui résulte de leur échelon trophique supérieur et de la bioaccumulation des PCBs au long de la chaîne alimentaire.

Tableau 25 - Niveaux de contamination moyens obtenus sur les échantillons d'odontocètes analysés.

ng.g^{-1} lp	D. de Risso	Globicéphale	Cachalot	Rorqual commun (Bp)	Bp mâle	Bp femelle
Moy ∑ 7 PCB	87 587	46 069	38 059	3 362	5 824	2 622
SD ∑ 7 PCB	32 943	44 497	46 748	2 331	3 282	3 505

6 - CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Cette étude repose sur un effort d'échantillonnage important : 138 jours de mer, 5 418 milles parcourus soit un quart de la circonférence de notre planète, dont les deux tiers à l'intérieur du Sanctuaire PELAGOS, 898 observations, 5 852 individus dénombrés. Cet effort a été nécessaire pour recueillir les 96 biopsies analysées dans le cadre de cette étude. A notre connaissance, cet effort est unique en Méditerranée. L'évolution du nombre de biopsies réalisées au cours des quatre années d'échantillonnage (19, 9, 10, 42) résulte à la fois de conditions plus ou moins favorables mais aussi d'un apprentissage technique et d'une amélioration des compétences.

L'analyse de ces échantillons montre une contamination globale des cétacés du Sanctuaire PELAGOS, tous les composés recherchés ont été retrouvés à des niveaux plus ou moins élevés dans le lard des animaux.

Nous disposons aujourd'hui d'un niveau de référence pour la contamination en PCBs, PBDE, OCP des rorquals communs mâles et femelles de cette partie de la Méditerranée. Il s'établit autour de 5 824 $ng.g^{-1}$ lp et 2 622 $ng.g^{-1}$ lp pour la somme des 7 PCBs chez les mâles et les femelles respectivement, en sachant que pour ces dernières la médiane (1 829 $ng.g^{-1}$ lp) est plus représentative de la population. Pour les PBDE, ces valeurs sont beaucoup plus faibles : 245 $ng.g^{-1}$ lp et 119 $ng.g^{-1}$ lp pour les mâles et les femelles respectivement avec pour ces dernières la même remarque concernant la médiane (63 $ng.g^{-1}$ lp). Pour la somme des DDT les valeurs sont de 10 370 $ng.g^{-1}$ lp et 3 239 $ng.g^{-1}$ lp pour les mâles et les femelles (médiane : 2 716 $ng.g^{-1}$ lp).

Ce niveau de référence est dans la moyenne de ce qu'on peut trouver dans la littérature pour des populations comparables pour ce qui concerne les PCBs et les OCP, plutôt faible pour ce qui concerne les PBDE. Ces valeurs basses pour les PBDE peuvent être interprétées comme la conséquence d'une régulation précoce de leur usage en Europe (contrairement aux USA par exemple où ils sont très répandus) ou du caractère encore récent de ces polluants qui n'ont pas encore pu imprégner nos populations de rorquals communs.

Pour ce qui concerne les PCBs dont l'usage est interdit de longue date, les données disponibles ne permettent pas réellement de valider une tendance quant à l'évolution du taux de contamination des animaux. Néanmoins la comparaison avec les résultats de Marsili *et al* (1998) suggère une tendance à la baisse. Il faut cependant souligner que quatre animaux présentent des valeurs très élevées qui montrent que la question des PCBs n'est certainement pas réglée en Méditerranée.

Comme nous l'avions anticipé, mais malgré tout tenté, il n'a pas été possible de mettre en évidence la présence de HAP dans la graisse des rorquals communs. De telles analyses ne pourront être possibles que sur d'autres tissus prélevés sur des animaux échoués.

Les rorquals communs du Sanctuaire PELAGOS sont également contaminés par les Alkylphénols (le 4-nonylphénol (4-NP) et le bisphénol A (BPA)) à des niveaux encore faibles : de l'ordre 100 à 200 $ng.g^{-1}$ pf pour le nonylphenol, inférieure à 200 $ng.g^{-1}$ pf pour le bisphenol. Il n'est pas possible de comparer le niveau d'imprégnation de nos rorquals communs méditerranéens avec d'autres populations faute de littérature disponible.

D'une façon générale, la contamination de ces animaux du grand large que sont les rorquals communs démontre le caractère global et la magnitude de la pollution de notre aquasphère, ainsi que le lien direct qui unit les continents et les océans.

Dans le cadre d'un suivi de la contamination de ces animaux sur le long terme, nous proposons d'envisager un suivi tous les 5 ou 10 ans sur une soixantaine d'individus (en tenant compte du sexe) qui porterait sur les contaminants historiques comme les PCB et les OCP, et des contaminants émergents afin d'évaluer leurs niveaux de présence et leur impact potentiel. Les biopsies se sont avérées être un bon moyen d'échantillonnage à condition que les données de contamination obtenues soient corrigées par la teneur lipidique. La seule limite de cette technique d'échantillonnage est la taille des échantillons prélevés, c'est pourquoi nous étudions la possibilité de l'augmenter.

La génétique nous a appris beaucoup, ne serait-ce qu'à travers la possibilité de distinguer mâle et femelle. Ainsi la contamination des mâles s'est avérée trois fois supérieure à celles des femelles. Indirectement ce constat est un élément positif car il suggère que la plupart des femelles échantillonnées a donné naissance au moins une fois ces dernières années.

Le sexage des animaux a également suggéré une occupation différenciée dans le temps du Sanctuaire PELAGOS par les mâles et les femelles, les premiers arrivants de façon plus précoce. Cette observation ne permet pas de conclure sur le rôle que pourrait jouer la zone du Sanctuaire PELAGOS pour la reproduction de l'espèce mais elle ouvre une piste pour des études futures.

La génétique s'est également révélée comme un complément intéressant à la photo identification, voire comme une alternative. En comparaison d'autres populations comme celles du Saint-Laurent, les rorquals communs de Méditerranée, sauf cicatrices remarquables, sont assez peu marqués et les conditions de lumières très contrastées de notre région nuisent à la qualité des photos (R. Sears, comm.pers.). La génétique permet d'identifier les recaptures de façon fiable, et le travail méthodologique accompli au cours de cette étude en a considérablement simplifié la mise en œuvre.

Les liens de parenté et la structuration de la population mis en évidence par la génétique sont également très intéressants mais ce travail doit être poursuivi pour en tirer le maximum de bénéfices.

Afin de donner plus de poids à la structuration de l'arbre génétique des animaux de Méditerranée et des animaux d'Atlantique il est nécessaire d'augmenter le nombre

d'individus étudiés. Couplées aux informations de capture/recapture, ces analyses permettront d'estimer la taille de la population ou des sous-populations de baleines qui fréquentent le Sanctuaire PELAGOS. En effet, en comparant 10 régions du génome de 42 baleines grises, Aster et *al*., (2007) ont calculé avec des outils de modélisation que la population initiale était comprise entre 76 000 et 118 000 animaux et que la taille efficace de la population ne doit pas descendre en-dessous de 22 000 individus pour ne pas être mise en péril.

On mesure tout l'intérêt qu'auraient de telles informations pour la protection de la population de rorquals communs de Méditerranée nord-occidentale et au-delà. C'est certainement un des axes prioritaires pour donner une suite à la présente étude.

Concernant le rorqual commun nous avons entamé un travail de recherche bibliographique pour identifier les polluants émergents qu'il serait intéressant de rechercher dans la graisse de ces animaux afin de compléter cette première série d'analyses. Il serait également très intéressant de rechercher certaines hormones signalant la gestation chez les femelles, mais les méthodologies sont encore balbutiantes.

Enfin, il est clair que nous devons porter l'effort sur les odontocètes, pas assez échantillonnés dans le cadre de cette étude. Les données d'observation montrent clairement pourquoi : ils sont plus rares et, pour ce qui concerne les cachalots, plus difficile à biopsier. La volonté d'aboutir à un échantillonnage représentatif des rorquals communs nous a fait privilégier cette espèce, mais cet effort pourrait être réorienté à l'avenir. Le niveau de contamination des odontocètes est très important et pourrait avoir des effets physiologiques sur leurs systèmes reproducteurs et immunologiques. Il est donc impératif de réaliser des analyses supplémentaires afin d'évaluer ce risque de toxicité.

7 - REFERENCES

Aguilar A. & Borrell A. (1994) Abnormally high polychlorinated biphenyl levels in striped dolphins (Stenella coeruleoalba) affected by the 1990-1992 Mediterranean epizootic. The Science of the Total Environment, 154 (2-3): 237-247.

Aguilar A, Borrell A, (2005). DDT and PCB reduction in the western Mediterranean in 1987–2002, as shown by levels in dolphins. Marine Environmental Research, 59, 391– 404.

Aguilar A., Borrell A. & Reijnders P.J.H. (2002) Geographical and temporal variation in levels of organochlorines contaminants in marine mammals. Marine Environmental Research, 53: 425-452.

Ahel M, Giger W, (1993). Partitioning of alkylphenols and alkylphenol polyethoxylates between water and organic solvents. Chemosphere, 26, 1471-1478.

Altenburger R, Segner H, van der Oost (2003). Biomarkers and PAHs prospects for the assessment of exposure and effects in aquatic systems. In PAHs: an ecological perspective (Douben P ed). 297-328. Wiley and Soons, London.

Alter SE, Rynes E, and Palumbi SR (2007). DNA evidence for historic population size and past ecosystem impacts of gray whales. PNAS, 104, 15162-15167.

Andersson O, Blomkvist G (1981). Polybrominated aromatic pollutants found in fish in Sweden. Chemosphere, 10, 1051-1060.

André JM, Amiard JC, Amiard-Triquet C, Boudou A, Ribeyre F (1990). Cadmium contamination of tissues and organs of delphinids species (Stenella attenuata) - influence of biological and ecological factors. Ecotoxicology and Environmental Safety 20, 290-306.

Aoki Y (2001). Polychlorinated Biphenyls, Polychlororinated Dibenzo-p-dioxins, and Polychlorinated Dibenzofurans as Endocrine Disrupters-What We Have Learned from Yusho Disease. Environmental Research, 86, 2-11.

Arukwe A, Thibaut R, Ingebrigsten K, Celius T, Goksøyr A, Cravedi JP (2000). In vivo and in vitro metabolism and organ distribution of nonylphenol in Atlantic salmon (Salmo salar). Aquatic Toxicology, 49, 289-304.

Atiezar FA, Billinghust Z, Depledge MH (2002). 4-n-nonylphenol and 17- ß estradiol may induce common DNA effects in developing barnacles larvae. Environmental Pollution, 120, 735-738.

Augier H., Benkoël L., Chamlian A., Park W.K. & Ronneau C. (1993a) Mercury, zinc and selenium bioaccumulation in tissues and organs of Mediterranean striped dolphins *Stenella coeruleoalba* Meyen. Toxicological result of their interaction. Cellular and Molecular Biology, 39 (6): 621-634.

Augier H., Benkoël L., Brisse J., Chamlian A. & Park W.K. (1993b) Microscopic localization of mercury - selenium interaction products in liver, kidney, lung and brain of Mediterranean striped dolphins (Stenella coeruleoalba) by silver enhancement kit. Cellular and Molecular Biology, 39 (7): 765-772.

Awogi T, Sato T (1989). Micronucleus test with benzo[a]pyrene using a single peroral administration and intraperitoneal injection in males of the MS/Ae and CD-1 mouse strains. Mutation Research, 223, 353-356.

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 fur Analytische Chemie. 302, 20-31.

Baumard P. (1997). Biogéochimie des composés aromatiques dans l'environnement marin. Thèse d'Université Bordeaux I, n° 1788.

Beineke A, Siebert U, McLachlan M, Bruhn R, Thron K, Failing K, Müller G, Baumgärtner W (2005). Invesitgations of the potential influence of environmental contaminanats on the thymus and spleen of harbour porpoises (Phocoena phocoena). Environmental Science & Technology 39, 3933-3938.

Bérubé M. and Palsboll P.J. (1996). Identification of sex in Cetaceans by multiplexing with three ZFX and ZFY specific primers Molecular Ecology 1996, 5, 283–287

Bérubé M., Aguilar A., Dendanto D., Larsen F., Notarbatolo di Sciara G., Sears R., Sigurjonsson J., Urban-R J. and Palsboll P.J.. (1998). Population genetic structure of north atlantic, Mediterranean sea and sea of cortez fin whales: analysis of mitochondrial and nuclear loci. Molecular Ecology, 7: 585-599.

Bérubé M., Jorgensen H., Ross Mcewing R. and Palsboll P.J. (1999). Polymorphic di-nucleotide microsatellite loci isolated from the humpback whale, Megaptera novaeangliae Molecular Ecology, 9, 2155–2234

Borrell A, Aguilar A (2007). Organochlorine concentrations declined during 1987-2002 in western Mediterranean bottlenose dolphins, a coastal top predator. Chemosphere 66(2):347-352.

Borrell A., Aguilar A., Tornero V., Sequeira M., Fernandez G. & Alis S. (2006) Organochlorine compounds and stable isotopes indicate bottlenose dolphin subpopulation structure around the Iberian peninsula. Environment International, 32: 516-523.

Borrell A., Cantos G., Aguilar A., Androukaki E. & Dendrinos P. (2007) Concentrations and patterns of organochlorine pesticides and PCBs in Mediterranean monk seals (Monachus monachus) from western Sahara and Greece. Science of the Total Environment, 381: 316-325.

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.

Carté B, Faulkner J (1981). Polybrominated diphenyl ethers from Dysidea chlorea and Phyllospongia foliascens. Tetrahedon, 37, 2335-2239.

Charbit E, Legavre T, Lardet L, Bourgeois E, Ferriere N, Carron MP. (2004) Identification of differentially expressed cDNA sequences and histological characteristics of Hevea brasiliensis calli in relation to their embryogenic and regenerative capacities.». Plant Cell Rep. Mar;22(8):539-48

Clark R.B. (2001) Marine Pollution. Oxford University Press, 237 pp.

Colborn T, Vom Saal FS, Soto AM, (1993). Developmental effects of endocrinedisrupting chemical in wildlife and humans. Environ. Health Perspect. 101, 378-384.

Corsolini S., Focardi S., Kannan K., Tanabe S., Borrell A. & Tatsukawa R. (1995) Congener profile and toxicity assessment of polychlorinated biphenyls in dolphins, sharks and tuna collected from Italina coastal waters. Marine Environmental Research, 40 (1): 33- 53.

Craig A. S., Herman L.M., and Pack A.A. (2002) Male mate choice and male–male competition coexist in the humpback whale (Megaptera novaeangliae). Can. J. Zool. 80: 745–755

Cravedi M, Narbonne JF (2002). Données récentes sur l'évaluation des dangers lies à la presence de PCB dans l'alimentation. Rapport AFSSA, 52pp.

Cronin MT, Manga N, Seward JR, Sinks GD, Schultz TW (2001). Relation between physicochemical properties of phenols and their toxicity and accumulation in fish. Chem. Res. Toxicol., 14, 1498-1505.

Dam & Bloch (2000) Screening of mercury and persistent organochlorine Pollutants in long-finned pilot whale (Globicephala melas) in the Faroe Islands. Marine Pollution Bulletin 40(12) : 1090-1099.

Darnerud PO (2003). Toxic effects of brominated flame retardants in man and wildlife. Environment International, 29, 841-853.

Das, K., Vossen, A., Tolley, K., Vikingsson, G., Thron, K., Müller, G., Baumgärtner, W. and Siebert, U. (2006). Interfollicular fibrosis in the thyroid of the harbour propoise: An endocrine disruption ? Arch. Environ. Contam. Toxicol. 51, 720-729.

Debier C., Ylitalo G.M., Weise M., Gulland F., Costa D.P., Le Boeuf B.J., de Tillesse T. & Larondelle Y. (2005) PCBs and DDTs in the serum of juvenile California sea lions: associations with vitamins A and E and thyroid hormones. Environmental Pollution, 134: 323-332.

De Boer J, de Boer K, Boon JP (2000). Polybrominated biphenyls and diphenylethers. New Types of Persistent Halogenated Compounds, 3, 61-95.

De Jager C, Bornman MS, Wandrag S, Sharp VW (2001). Lethal dose and reproductive parameters of p-nonylphenols in rats. Arch. Andrology 46, 183-187.

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.

Eriksson P, Viberg H, Jackobsson E, Orn U, Fredíksson A (1999). PBDE 2,2',4,4',5,5'pentabromodiphenyl ether, causes permanent neurotoxic effects during a defined period of neonatal brain developpement. Organohalogen Compounds, 40, 333-336.

Evans K., Hindell M.A. & Hince G. (2004) Concentrations of organochlorines in sperm whales (*Physeter macrocephalus*) from Southern Australian waters. Marine Pollution Bulletin, 48: 486-503.

Ferrara F, Fabietti F, Delise M, Funari E (2005). Alkylphenols and alkylphenol ethoxylates contamination of crustaceans and fishes from the Adriatic Sea (Italy). Chemosphere 59, 1145-1150.

Forget J, Beliaeff B, Bocquené G (2003). Acetylcholinesterase activity in copepods (Tigriopus brevicornis) from the Vilaine River estuary, France, as a biomarker of neurotoxic contaminants. Aquat. Toxicol. 62, 195-204.

Furue M, Uenotsuchi T, Urabe K, Ishikawa T, Kuwabara M (2005). Overview of Yusho. Journal of Dermatological Science Supplement, 1, 3-10.

Gannier A. (2006) Summer cetacean population in the Pelagos Marine Sanctuary (northwest Mediterranean): distribution and abundance. Mammalia 17–27.

Gauthier JM, Metcalfe CD, Sears R (1997a). Validation of the blubber biopsy Technique for the monitoring of Organochlorine contaminants in Balaenopterid Whales. Marine Environmental Research, 43, 157-179.

Gauthier JM, Metcalfe CD, Sears R (1997b). Chlorinated Organic contaminants in Blubber Biopsies from Northwestern Atlantic Balaenopterid Whales Summering in the Gulf of St Lawrence. Marine Environmental Research, 44, 201-203.

Gómez-Gutiérrez A., Garnacho E., Bayona J.M. & Albaigés J. (2007a) Assessment of the Mediterranean sediments contamination by persistent organic pollutants. Environmental Pollution, 148: 396-408.

Gómez-Gutiérrez A., Garnacho E., Bayona J.M. & Albaigés J. (2007b) Screening ecological risk assessment of persistent organic pollutants in Mediterranean sea sediments. Environment International, 33: 867-876.

Granmo A, Kollberg S, Berggren M, Ekelund R, Magnusson K, Renberg L, Wahlberg C (1990). Bioaccumulation of nonylphenol in caged mussels in an industrial coastal area on the Swedish west coast. In Organic Micropollutants in the Aquatic Environment. Angeletti G, Bjoerseth A, Kluwer P, Dordrect Eds., The Netherlands, 1991; p71-79.

Gray MA, Metcalfe CD (1997). Induction of testis-ova in Japanese medaka (Oryzias latipes) exposed to p-nonylphenol. Environmental Toxicology Chemistry, 16, 1082-1086.

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.

Hatch L.T., Dopman E.B. , Harrison R.G.(2006) Phylogenetic relationships among the baleen whales based on maternally and paternally inherited characters. Molecular Phylogenetics and Evolution 41 : 12–27

Helleday T, Tuominen KL, Bergman Å, Jenssen D (1999). Brominated flame retardants induce transgenic recombination in mammalian cells. Mutation Research – Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 439, 137-147.

Hobbs KE, Muir DCG, Mitchell E (2001). Temporal and biogeographic comprarisions of PCBs and persistent organochlorine pollutants in the blubber of Fin whales from eastern Canada in 1971-1991. Environmental Pollution, 114, 243-254.

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.

Holsbeek L., Joiris C., Debacker V., Ishaque B.A., Roose P., Nellissen J.P., Gobert S., Bouquegneau J.M. & Bossicart M. (1999) Heavy metals, organochlorines and polycyclic aromatic hydrocarbons in Sperm Whales stranded in the southern North Sea during the 1994/1995 winter. Marine Pollution Bulletin, 38: 304-313.

INERIS (2004) Les substances prioritaires de la Directive Cadre- Eau. Fiche de Données Technico- Economique. Rapport Ministère de l'Ecologie et du Développement Durable. 53-72 .

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.

Jepson P.D., Bennett P.M., Deaville R., Allchin C.R., Baker J.R. & Law R.J. (2005) Relationships between polychlorinated biphenyls and health status in harbor porpoises (*Phocoena phocoena*) stranded in the United Kingdom. Environmental Toxicology and Chemistry, 24 (1): 238-248.

Johansson I, Moisan K, Guiot N, Truquet I, Munschy C, Tronczinski J (2004). Levels and trends of organohalogen compounds in mussels from the Seine estuary in 1981-2003. Organohalogen Compounds, 66, 1844-1852.

Kamrin M.A. (1997). « Pesticide Profiles : Toxicity, Environmental Impact and Fate » CRC Lewis Publishers, pp 676.

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. Environnemental Science and Technology, 29, 1851-1859.

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.

Karrow NA, Guo TL, Delclos KB, Newbold RR, Weis C, Germolec DR, White Jr KL, McCay JA (2004). Nonylphenols alters the activity of splenic NK cells and the numbers of leucocytes subpopulations in Sprague-Dawley rats: a two-generation feeding study. Toxicology, 196, 237-245.

Kelly J.F. (2000) Stable isotopes of carbon and nitrogen in the study of avian and mammalian trophic ecology. Canadian Journal of Zoology, 78: 1-27.

Kleivane L, Skaare JU (1998). Organochlorine contaminants in northeast Atlantic minke whales (Balaenoptera acutorostrata) Environmental Pollution, 101, 231-239.

Klotz D.M., Beckman B.S., Hill S.M., McLachlan J.A., Walters M.R., Arnold S.F. (1996). Identification of Environmental Chemicals with estrogenic activity using a combination of In Vitro assays. Environmental Health Perspectives 104, 1084-1089

Knap & Jickells (1983) Trace metals and organochlorines in the goodebeaked whale. Marine Pollution Bulletin 14 (7) : 271-274.

Lang V. (1992). Review: Polychlorinated biphenyls in the environment. J. Chromatogr., 595, 1-43.

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” Édisté par J. Albaigés, Gordon and Breach Sciences Publishers, 3-24.

Law R.J., Stringer R.L., Allchin, C.R. & Jones B.R. (1996) Metals and organochlorines in sperm whales (*Physeter macrocephalus*) stranded around the North Sea during 1994/1995 winter. Marine Pollution Bulletin 32 (1) : 72-77.

Law RJ, Allchin CR, Mead LK (2005). Brominated diphényl ethers in the blubber of twelves species of marine mammals stranded in the UK. Baseline-Marine Pollution Bulletin, 50, 344-359.

LeBlanc GA, Mu X, Rider CV (2000). Embryo toxicity of the alkylphenol degradation product 4-nonylphenol to the crustacean Daphnia magna. Environ. Health Perspect. 108, 1133–1138.

Le Boeuf B.J., Giesy J.P., Kannan K., Kajiwara N., Tanabe S. & Debier C. (2002) Organochlorine pesticides in California sea lions revisited. BMC Ecology, 2: 8.

Legler J, Brouwer A, (2003). Are brominated flame retardant endocrine disruptor?. Environment International, 29, 879-885.

Lewis SK, Lech JJ (1996). Uptake, disposition, and persistence of nonylphenol from water in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). Xenobiotica 26, 813-819.

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., Shiu, W.Y., Ma, K.C., 1992. Illustrated handbook of physical-chemical properties and environmental fate for organic chemicals. Lewis Publishers, 2.

Marsili L. & Focardi S. (1996a) Chlorinated hydrocarbon (HCB, DDTs and PCBs) levels in cetaceans stranded along the Italian coasts: An overview. Environmental Monitoring and Assessment, 45: 129-180.

Marsili L, Focardi S (1996b). Organochlorine levels in subcutaneous blubber biopsies of Fin Whale (Balaenoptera physalus) and stripped dolphins (Stenella coeruleoalba) from the Mediterranean sea. Environmental Pollution, 91, 1-9.

Marsili L, Focardi S (1997). Chlorinated hydrocarbone (HCB, DDTs and PCBs) levels in cetaceans stranded along the Italian coast: an Overview.Environmental Monitoring and Assessment, 45, 129-180.

Masuda Y, Schecter A, Päpke 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) dansle milieu marin par le dosage des métabolites de HAP. Th. Univ. SVGSE. Spé Biogeochimie de l'environnement.

McConnaughey T. & McRoy C.P. (1979) Food-web structure and the fractionation of carbon isotopes in the Bering Sea. Marine Biology, 53: 257-262.

Mc Kinney JD, Waller CL (1994). Polychloritaned Biphenyls as Hormonally active Structural analogues. Environmental Health Perspectives, 102, 290-297.

McCloskey JT, Oris JT (1991). Effect of water temperature and dissolved oxygen concentration on the photo-induced toxicity of anthracene to juvenile bluegill sunfish (Lepomis macrochirus). Aquat. Toxicol. 21, 145-146.

McElroy AE, Farrington JW, Teal JM (1989). Bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment. Varanasi U. ed., CRC, Boca Raton, FL, USA pp 1-40.

McLeese DW, Zitko V, Sergeant DB, Burridge L, Metcalfe CD (1981). Lethality and accumulation of alkylphenols in aquatic fauna. Chemosphere 10, 723-730.

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.

Monaghan P. and Haussmann M.F. (2006) Do telomere dynamics link lifestyle and lifespan? TRENDS in Ecology and Evolution Vol.21 No.1

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.

Morin P., Nestler A., Rubio-Cisneros N., Robertson K., Mesnick S. (2005) Interfamilial characterization of a region of the ZFX and ZFY genes facilitates sex determination in cetaceans and other mammals. Molecular Ecology 14, 3275–3286

Munoz MJ, Tarazona JV (1993). Synergistic effect to two- and four component combinations of the polycyclic aromatic hydocarbons: phenanthrene, anthracene, naphtalene, and acenaphtene on Daphnia magna. B. Environ. Contam Tox. 50, 363- 368.

Navas JM, Segner H (1998). Antiestrogenic activity of anthropogenic and natural chemicals. Environmental Science and Pollution Research, 5, 75-82.

Neff JM (1979). Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Aquatic Environment. Sources, Fates and biological Effects. Applied Science Publishers, Essex, UK, 262 pp.

Newsted J, Giesy JJ (1987). Predictive models for photoinduced acute toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons to Daphnia magna, Strauss Cladocera, Crustacea. Toxicol. Chem. 6, 445-461.

Nishida S., Pastene L.A, Goto M., Koike H. (2003) SRY gene structure and phylogeny in cetacean species. Mamal Study 28: 57-66.

Notarbartolo di Sciara G, Zanardelli M, Jahoda M, Panigada S, Airoldi S. 2003. The fin whale, Balaenoptera physalus (L. 1758), in the Mediterranean Sea. Mammal Review 33: 105–150.

O'halloran SL, Liber K, Gangl JA, Knuth ML (1999). Effects of repeated exposure to 4-nonylphenol on the zooplankton community in littoral enclosures. Environ. Toxicol. Chem. 18, 376-385.

OCDE (1973). Décision recommandation du conseil concernant la protection de l'environnement par un contrôle des diphényles, C (73) 1/ Final.

Pahlman R, Pelkonen O (1987). Mutagenicity studies of different polycyclic aromatic hydrocarbons: The significance of enzymatic factors and molecular structure. Carcinogenesis, 8, 773-778.

Palsboll P.J., Bérubé M., Larsen A.H. and Jorgensen H. (1997) Primers for the amplification of tri- and tetramer microsatellite loci in baleen whales. Molecular Ecology 6, 893–895

Petterson A, Van Bavel B, Engwall M, Jimenez B (2004). Polybrominated Diphenylethers and methoxylated tetrabromodiphenylethers in Cetacean from the Mediterranean Sea. Archives of environmental contamination and toxicology, 47, 542-550.

Pompa G, Caloni F, Fracchiolla ML (2003). Dioxin and PCB contamination of fish and shellfish: assessment of human exposure. Review of the international situation. Veterinary Research Communications, 27, 159-167.

Post D.M., Layman C.A., Arrington D.A., Takimoto G., Quattrochi J. & Montaña C.G. (2007) Getting to the fat of the matter: Models, methods and assumptions for dealing with lipids in stable isotope analysis. Oecologia, 152: 179-189.

Praca, E. & Gannier, A., 2008. Ecological niches of three teutophageous odontocetes in the northwestern Mediterranean Sea. Ocean Science, 4(1), 49-59.

Praca, E. 2008. Ecological niches of the teutophageous odontocetes in the northwestern Mediterranean Sea. PhD Thesis, University of Liège, Belgium. 211pp.

Proceedings, Workshop on Brominated Aromatic Flame Retardants, Swedish National Chemicals Inspectorate, pp. 63-71. Solna, Sweden, 24-26 October 1989

Rahman F, Langford HK, Scrimshaw MD, Lester JN (2001). Polybrominated diphenyl ether (PBDE) flame retardants. The Science of the Total Environment, 275, 1-17.

Ratcliffe D.A. (1970). Changes attributable to pesticides in egg breakage frequency and eggshell thickness in some british birds. Journal of Applied Ecology, 7, 67-115.

Reijnders, P.J.H. and Aguilar, A. 2002. Pollution and marine mammals. pp. 948-957. In: W.F. Perrin, B. Würsig and J.G.M. Thewissen (eds.). Encyclopedia of marine mammals. Academic Press.

Risterucci A.M., Duval M.F., Rohde W., Billotte N. (2005) Isolation and characterization of microsatellite loci from Psidium guajava L. Molecular ecology notes 5:745-748

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. Environtal Toxicology and Chemistry, 8, 1201-1207.

Saarikoski J, Viluksela M (1982). Relation between physicochemical properties of phenols and their toxicity and accumulation in fish. Ecotox. Environ. Saf. 6, 501-512.

Safe SH (2001). The Handook of Environmental Chemistry Vol.3 Part L, Endocrine Disruptor Part 1 Chap 8 Spinger 2001.

Sager D, Girard D, Nelson D (1991). Early postnatal exposure to PCBs: Sperm function in rats. Environmental Toxicology and Chemistry, 10, 737-746.

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 chromatographyelectron capture detection. Environmental Science and Technology, 23, 852-859.

Seike N, Wanibuchi H, Morimura K, Wei M, Nishikawa T, Hirata K, Yoshikawa J, Fukushima S (2003). Enhancement of lung carcinogenesis by nonylphenol and genistein in a F344 rat multiorgan carcinogenesis model. Cancer Lett., 192, 25-36.

Sharma R, Kodavanti PRS (2002). In Vitro Effects of Polychlorinated Biphenyls and Hydroxy Metabolites on Nitric Oxide Synthases in Rat Brain. Toxicology and Applied Pharmacalogy, 178, 127-136.

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.

Soto AM, Justicia H, Wray JW, Sonnenschein C (1991). p-nonylphenol : an estrogenic xenobiotic released from « modified » polystyrene. Enviromental Health Perspective, 92, 167-176.

Sweeting, C.J., Polunin, N.V.C. and Jennings, S. 2006. Effects of chemical lipid extraction and arithmetic lipid correction on stable isotope ratios of fish tissues. Rapid Communications in Mass Spectrometry 20: 595-601.

Szczys P, Hughes CR and Kesseli RV (2005) Novel microsatellite markers used to determine the population genetic structure of the endangered Roseate Tern, Sterna dougallii, in Northwest Atlantic and Western Australia. Conserv Genet 6:461-466

Tanabe S, Tatsukawa R, Maruyama K, Miyazaki N (1982). Transplacental Transfert of PCBs and Chlorinated Hydrocarbon Pesticides from the Pregnant Striped Dolphin (Stenella coeruleoalba) to her Fetus, Agric. Biol. Chem. 46, 1249-1254.

Tapie N (2006). Contamination des écosystèmes aquatiques par les PCB et PBDE : Application à l'estuaire de la Gironde. Th. Univ. Sci. Chim. Spé. Chim. Analytique et environnement, Bordeaux I : 289 p.

Tapie N, Budzinski H, Le Ménach K. (2008). Fast and efficient extraction methods for the analysis of PCBS and PBDEs in biological matrices. Analytical and Bioanalytical Chemistry. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 391, 2169-2177.

TemaNord, 1996. Chemicals with Estrogen-like Effects. Nordic council of Ministers, Copenhagen. ISBN 92 9120 918 X.

Thompson S. (1999). Détermination des composés aromatiques et organochlorés dans l'environnement marin.
Th. Univ. Sci. Chim. Spé. Chim. Analytique et environnement, Bordeaux I : 247 p.

Tieszen, L.L., Boutton, T.W., Tesdahl, K.G. and Slade, N.A. 1983. Fractionation and turnover of stable carbon isotopes in animal tissues: implications for d13C analysis of diet. Oecologia 57: 32-37.

Tillit DE, Ankley GT, Giesy JP, Lugwig 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.

Tolosa I., Readman J.W., Fowler S.W., Villeneuve J.P., Dachs J., Bayona J.M. & Albaiges J. (1997) PCBs in the western Mediterranean. Temporal trens and mass balance assessment. Deep-Sea Research II, 44 (3-4): 907-928.

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.

UNEP (2002) Regionally based assessment of persistent toxic substances. Mediterranean Regional report. UNEP, Switzerland. 148 pp

Varanasi U, Stein JE, Nishimoto M (1989). Biotransformation and disposition of PAH in fish. In *Metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment* (Varanasi U, ed), 93-149. CRC Press, Boca Raton, Florida.

Vazquez-Duhalt R, Marquez-Rocha F, Ponce E, Licea AF, Viana MT (2005). Nonylphenol, an integrated vision of a pollutant. Scientific review. Applied Ecology and Environmental Research 4, 1-25.

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.

Villeneuve J.P., Carvahlo F.P., Fowler S.W. & Cattini C. (1999) Levels and trends of PCBs, chlorinated pesticides and petroleum hydrocarbons in mussels from the NW Mediterranean coast: comparison of concentrations in 1973/1974 and 1988/1989. The Science of the Total Environment, 237/238: 57-65.

Vindimian E, Bisson M, Dujardin R, Flammarion P, Garric J, Babut M, Lamy M-H, Porcher JM, Thybaud E (2000). Complément au SEQ-Eau : méthode de détermination des seuils de qualité pour les substances génotoxiques. Rapport final. INERIS, Agence de l'eau Rhin-Meuse, Verneuil-en-Halatte.

Watanabe I, Tatsukawa R (1989). Anthropogenic brominated aromatics in the Japanese environment.

Wafo E., Sarrazin L., Diana C., Dhermain F., Schembri T., Lagadec V., Pecchia M. & Rebouillon p. (2005) Accumulation and distribution of organochlorines (PCBs and DDTs) in various organs of *Stennella coeruleoalba* and *Tursiops truncatus* from Mediterranean littoral environment (France). Science of the Total Environment 38(1-3) : 115-127.

Weeks JA, Adams WJ, Guiney PD, Hall, JF, Naylor CG (1996). Risk assessment of nonylphenol and its ethoxylates in U.S. river water and sediment. In Proceedings of the 4th Surfactants Conference, Barcelone, Royal Society of Chemistry, Cambridge 3, 276-291.

White R, Jobling S, Hoare SA, Sumpter JP, Parker MG (1994). Environmentally persistent alkylphenolic compounds are estrogenic. Endocrinology, 135, 1, 175-182.

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.