



HAL
open science

Contamination métallique passée et actuelle des habitats de poissons de l'estuaire de la Gironde par microchimie des otolithes : validation d'un traceur naturel par approche expérimentale et in situ

A. Echard

► To cite this version:

A. Echard. Contamination métallique passée et actuelle des habitats de poissons de l'estuaire de la Gironde par microchimie des otolithes : validation d'un traceur naturel par approche expérimentale et in situ. Sciences de l'environnement. 2015. hal-02602319

HAL Id: hal-02602319

<https://hal.inrae.fr/hal-02602319v1>

Submitted on 16 May 2020

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

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



Université de Bordeaux - UFR Sciences de la Terre et Environnement

Master 2 Sciences de la Terre et Environnement, Écologie
spécialité Océanographie côtière

Rapport de stage recherche

Aurélie Echard

Contamination métallique passée et actuelle des habitats de
poissons de l'estuaire de la Gironde par microchimie des
otolithes : validation d'un traceur naturel par approche
expérimentale et *in situ*.

*Stage effectué au sein des laboratoires de recherche de la station marine d'Arcachon et de l'Irstea de Cestas
Gazinet*

*Station marine d'Arcachon, UMR EPOC-EA, Place du Docteur Peyneau 33120 Arcachon
Irstea Bordeaux, UR EABX, 50 avenue de Verdun 33612 Cestas Gazinet*

Année 2015

Stage encadré par :

Jonathan Selleslagh / Magalie Baudrimont (UMR EPOC-EA) et Françoise Daverat (Irstea)

Remerciements :

Je tiens, en premier lieu, à remercier chaleureusement les membres de l'équipe PMA de l'Irstea Cestas, qui m'ont très rapidement intégrée parmi eux afin de m'offrir un cadre de travail des plus agréables.

Merci à Christine pour ta patience et le temps que tu as consacré à me former sur les machines de la salle blanche.

Merci à Jean François et Bernard qui m'avez permis de passer trois jours très agréables en votre compagnie sur l'Esturial. Je n'oublierai pas cette chouette expérience.

Je tiens aussi à remercier Xavier pour chacun des petits encouragements que tu m'as adressé tous les matins où j'étais présente à l'Irstea. Ça m'a permis de garder la forme et surtout de relativiser durant les jours de doute.

Jean Martin, je tiens à t'adresser des remerciements tout particuliers car je suis ravie de te connaître et d'avoir eu avec toi ces longues et nombreuses conversations qui m'ont beaucoup éclairée et permis d'avancer tant dans ma vie perso que pro. Tu occupes la place d'un précieux confident et conseiller que j'estime beaucoup.

Je remercie dans un second temps, l'équipe EA de la station marine d'Arcachon qui m'a également très bien accueillie.

Merci à Cerise Daffe et Patrice Gonzalez pour les formations microbio et à Pierre-Yves Gourves pour les formations ICP et Four GTA.

J'adresse également de chaleureux remerciements à l'équipe de Pau notamment Christophe Pécheyan, Gaëlle Barbotin et Sylvain Bérail.

Mes pensées les plus affectueuses vont à tout mon entourage personnel qui m'a soutenue et encouragée durant ces cinq ans d'études et tout particulièrement pendant cette année.

Un très grand merci aux plus importants : mes encadrants, qui se sont montrés très disponibles et m'ont soutenue jusqu'aux derniers moments de l'écriture de ce manuscrit.

Tout d'abord merci à toi Françoise pour les nombreux jours consacrés pour m'encadrer lors de certaines manips à Arcachon, Cestas ou Pau alors que tu es « overbookée » depuis plusieurs mois. J'ai énormément apprécié travailler avec toi, et toutes nos discussions autour du stage m'ont appris à développer mon sens de la réflexion scientifique. Merci aussi pour tous les petits moments que nous avons partagés autour d'un thé.

Merci à Magalie pour les nombreux échanges que nous avons eu durant le stage, concernant les résultats des expérimentations et merci pour ta grande implication et tes nombreux conseils lors de la rédaction du rapport.

Et pour conclure, c'est avec une émotion toute particulière que je t'adresse Jonathan, toi mon « grand maître », le plus profond de tous les remerciements. Merci de m'avoir pris sous ton aile (ou devrais-je dire ta nageoire) pendant ces six mois. Ton encadrement, ta présence et ton soutien sans faille m'ont permis d'évoluer et de m'épanouir dans le domaine de la recherche. Merci beaucoup pour tous les moments partagés, je ne pourrai pas les citer car il y en a trop mais je n'en oublierai aucun c'est certain. Merci de m'avoir fait confiance et d'avoir fait de mon expérience professionnelle une priorité pour toi. Je ne te remercierai jamais assez pour tout ce que tu as fait mais je te dédicace cette citation : « La vraie valeur d'un homme réside, non dans ce qu'il a mais dans ce qu'il est » [Oscar Wilde].

Liste des figures :

Figure 1: Carte de l'estuaire de la Gironde montrant les lieux de pêche des poissons pour l'expérimentation (pêche électrique) et pour la collection (campagnes Transect et Capalest)...	3
Figure 2: Le Saucats à Isle-Saint-Georges.....	5
Figure 3: Pêche électrique dans le cours d'eau.....	4
Figure 4: Schéma du protocole expérimental.....	5
Figure 5: L'Esturial avec ses équipements de pêche de surface et de fond permettant la collecte des flets	6
Figure 6 : Dissection d'un flet et localisation des sagittae. Ca, crête ampullaire ; L, lagena ; L mb, labyrinthe membraneux ; ML, macule lagenaire ; MS, macule sacculaire ; MU, macule utriculaire ; S, saccule ; U, utricule.	8
Figure 7: Otolithe poncé et observé au microscope motorisé. Le pronucléus (P.) et les stries journalières (S.) sont bien visibles (trait noir : 100µm).....	8
Figure 8: ICP-MS / Haute Résolution (à gauche) couplé au Laser femtoseconde (à droite)....	9
Figure 9: Concentrations en Cd, Pb et Ni mesurées dans l'eau des 3 bassins (en ppb) durant toute l'expérience. Barres bleues: concentration attendue à T1, T2, T3 et T4.	11
Figure 10: Concentrations de Cd (en ppm) mesurées dans les branchies (A), le foie (B), le muscle (C) et le rein (D) de <i>P. flesus</i> , à différents niveaux de contamination (T1 à T4). Les significativités (lettres au-dessus des histogrammes) sont basées sur les comparaisons entre T, C1 et C2 de chaque niveau de contamination.	12
Figure 11: Concentrations de Pb (en ppm) mesurées dans les branchies (A), le foie (B), le muscle (C) et le rein (D) de <i>P. flesus</i> , à différents niveaux de contamination (T1 à T4). Les significativités sont basées sur les comparaisons entre T, C1 et C2 de chaque niveau de contamination.....	16
Figure 12: Concentrations de Pb mesurées dans les otolithes de flets de l'expérimentation aux différents niveaux de contamination To (Ac), T1, T2, T3 et T4. Les significativités sont basées sur les comparaisons entre T, C1 et C2 de chaque niveau de contamination....	17
Figure 13 : Intensités de Pb mesurées mises en évidence par imagerie laser dans un otolithe témoin (à gauche) et contaminé (à droite) des poissons de l'expérimentation. Les échelles sont exprimées en intensité.....	18
Figure 14 : Concentrations de Pb (ppm) mesurées dans les branchies (A), le foie (B), le muscle (C) et le rein (D) de <i>P. flesus</i> en fonction des concentrations de Pb mesurées dans l'eau des bassins expérimentaux.....	20
Figure 15 : Concentrations de Pb (ppm) mesurées dans les branchies (A), le foie (B), le muscle (C) et le rein (D) en fonction des concentrations de Pb mesurées dans les otolithes de <i>P. flesus</i> de l'expérimentation.....	21
Figure 16: Concentrations de Pb (en ppm) dans les otolithes de flets de la collection (Transect 2007-2014).....	22
Figure 17: Concentrations de Pb (en ppm) mesurées dans les otolithes des poissons de la collection (2007- 2014) pour chacun des mois correspondant à un prélèvement. (*) Données issues de la campagne CAPALEST 2012. Les significativités sont basées sur les comparaisons des mois au sein de chaque année.....	23

Figure 18: Variabilité amont-aval des concentrations de Pb dans les otolithes de flets. Les significativités se basent sur la comparaison des moyennes pour les zones géographiques amont et aval de l'estuaire de la Gironde. Aval = Maubert, Conac, Centrale, Iles et Richard ; Amont=Lamarque.....24

Figure 19: Contamination en Pb dans les otolithes de flets (en ppm) pour chaque station de prélèvement. Les significativités se basent sur les comparaisons entre moyennes de chaque station.....24

Sommaire

1. Introduction	1
2. Matériels et méthodes.....	3
2.1. Approche expérimentale.....	3
2.1.1. Site d'étude.....	3
2.1.2. Échantillonnage des flets pour l'expérimentation en laboratoire	3
2.1.3. Protocole expérimental	4
2.2. Approche <i>in situ</i>	6
2.2.1. Échantillonnage des flets de la collection de 2007 à 2014.....	6
2.3. Analyses des métaux traces Cd, Pb et Ni	7
2.3.1. Analyse de l'eau.....	7
2.3.2. Préparation et analyse des tissus	7
2.3.3. Préparation et analyse des otolithes.....	7
2.4. Analyses morphométriques et statistiques.....	9
3. Résultats	10
3.1. Approche expérimentale.....	10
3.1.1. Suivi de l'eau.....	10
3.1.2. Indices morphométriques	11
3.1.3. Bioaccumulation dans les tissus	12
3.1.4. Microchimie des otolithes.....	13
3.1.5. Relation eau, tissus, otolithes.....	15
3.2. Suivi de la contamination métallique de l'estuaire par microchimie des otolithes	17
3.2.1. Dynamique temporelle du Plomb depuis la dernière décennie	17
3.2.2. Dynamique spatiale du Plomb.....	19
4. Discussion.....	20
4.1. Déroulement de l'expérimentation	20
4.2. Bioaccumulation des métaux traces	21
4.3. Validation de l'outil de traçage	23
5. Conclusion et perspectives	25
Références bibliographiques.....	26
Annexes	30
RESUME.....	32

1. INTRODUCTION

Les estuaires constituent des zones de transition entre la mer et les fleuves (Audry et al., 2007) et sont ainsi caractérisés par d'importantes variations spatio-temporelles tant d'un point de vue physico-chimique que biologique (Elliott & Hemingway, 2002; Selleslagh et al., 2009). Ce sont des écosystèmes complexes, considérés comme parmi les plus productifs au monde (McHugh, 1967; Costanza et al., 1997) et qui fournissent de nombreux biens et services à l'Homme.

Les estuaires sont associés à de nombreuses fonctions écologiques telles que la production primaire, le cycle des nutriments et constituent des zones de nourricerie, de protection et de voie migratoire pour les poissons. Ils ont un rôle essentiel dans le fonctionnement et le maintien de la biodiversité des systèmes aquatiques. En dépit de leur rôle écologique, les estuaires sont soumis à de nombreuses pressions anthropiques (Elliott & Quintino, 2007) telles que les rejets organiques, les ruissellements des eaux usées, l'activité industrielle et la pêche (Post & Lundin, 1996; Elliott & Quintino, 2007).

Les écosystèmes estuariens ont la particularité d'engendrer une dense redistribution des polluants qui y convergent, tels que les métaux traces (Turner et al., 2002), par l'intermédiaire des sédiments et des particules en suspension (Larrose et al., 2010). Il est largement reconnu que ces activités anthropiques ont un effet néfaste sur la qualité des estuaires et de leurs composantes biologiques (Vanderborght et al., 2007).

Malgré un fort stress physique et hydrodynamique, ces écosystèmes présentent une certaine stabilité des ressources disponibles, et supportent d'importants stocks de poissons (Lobry, 2004). Bien que les métaux traces soient des constituants naturels des environnements aquatiques, ils peuvent devenir toxiques pour les organismes résidents à des concentrations élevées.

Dans ce contexte il s'est donc révélé nécessaire de surveiller et de comprendre de tels systèmes afin d'améliorer leur qualité et de préserver leurs stocks biologiques.

L'ichtyofaune, et tout particulièrement les poissons plats, constitue un des compartiments biologiques les plus largement documentés au regard de l'exposition aux contaminants métalliques et sont considérés comme indicateurs pertinents de la qualité d'un milieu (Vinagre et al., 2004; Amara et al., 2009; Kerambrun et al., 2013).

Alors que l'évaluation de l'état chimique d'un environnement aquatique nécessite des échantillonnages et mesures réguliers d'eau et/ou de tissus, les otolithes de poissons ont une caractéristique se révélant intéressante au regard des techniques de mesures habituellement employées. En effet les otolithes offrent un enregistrement séquentiel et permanent de l'exposition des poissons aux métaux traces. De plus, les espèces dont la croissance est rapide, telles que le flet *Platichthys flesus*, rendent le dosage des concentrations métalliques incorporées dans les otolithes, plus efficace.

L'estuaire de la Gironde est connu pour être un système fluvial impacté par une pollution polymétallique due à une forte activité industrielle d'exploitation et de traitements des mines

de zinc et de charbon dans les années 70 (Lanceleur et al., 2011) dans le bassin hydrographique de Decazeville (Audry et al., 2007). À la suite de cet incident historique de contamination des organismes aquatiques par le cadmium, des mesures politiques ont été prises afin d'identifier et de classer les éléments polluants prioritaires. Ils sont désormais répertoriés dans la liste des substances prioritaires de la directive européenne cadre sur l'eau (2000/60/EC) qui établit un cadre pour une politique globale communautaire dans le domaine de l'eau. Le cadmium Cd, le plomb Pb et le nickel Ni en font partie car ils sont considérés comme métaux traces hautement toxiques pour les organismes aquatiques (Lanceleur et al., 2011). Le Cd a, en particulier, montré pendant des décennies, de très fortes concentrations dans l'eau, le sédiment (Lanceleur et al., 2011) et les organismes vivant dans l'estuaire (Durrieu et al., 2005; Maury-Brachet et al., 2007; Daverat et al., 2012;).

Le flet européen, *Platichthys flesus*, a donc été choisi pour cette étude, car c'est un poisson plat ubiquiste connu pour sa plasticité phénotypique et sa résistance aux changements environnementaux. L'abondance de *P. flesus* sur les côtes européennes en a fait un modèle biologique très utilisé dans divers programmes de surveillance depuis les années 70 (Jensen & Cheng, 1987; Cossa et al., 1992).

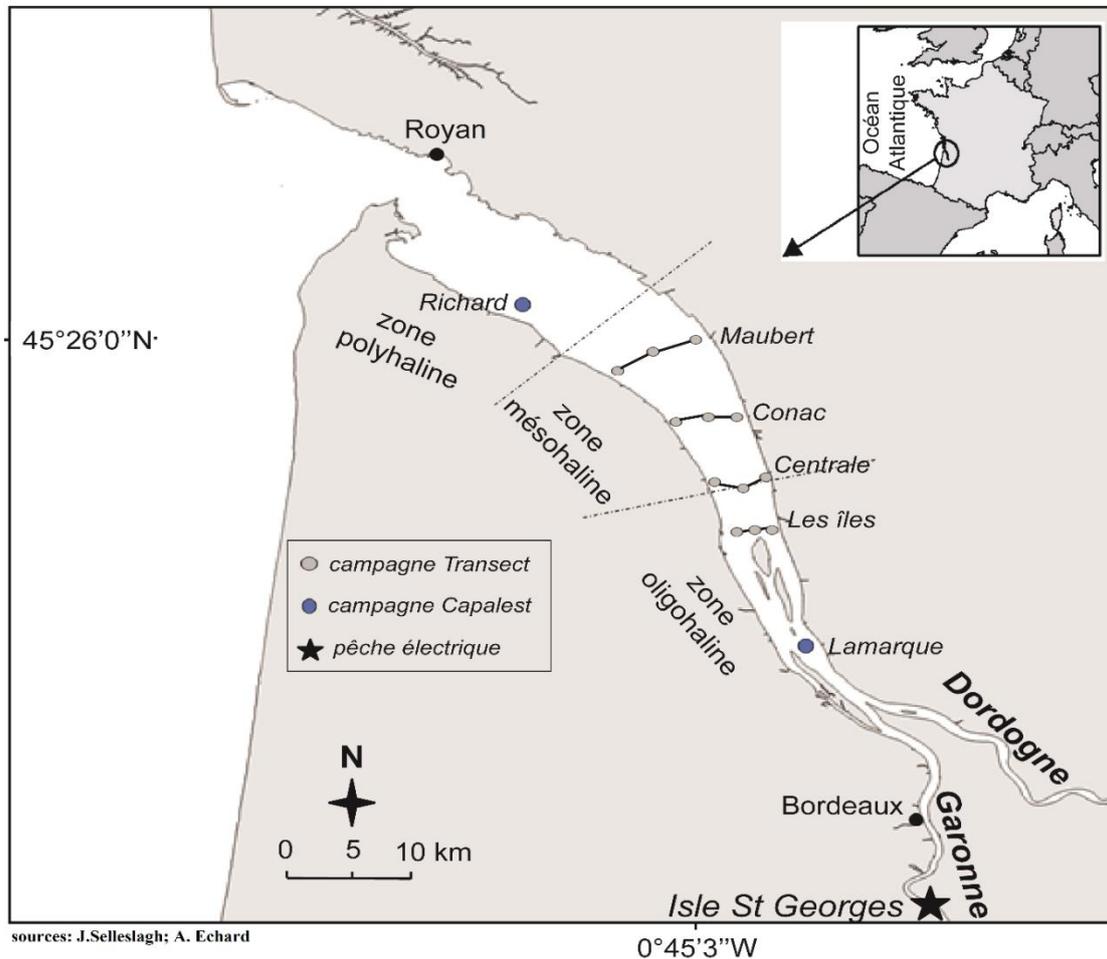
L'objectif de ce travail consiste dans un premier temps, par une approche expérimentale, à 1) évaluer le potentiel d'utilisation des otolithes comme traceurs naturels de la contamination en Cd, Pb et Ni des habitats de poissons et 2) relier les réponses des tissus et de l'otolithe face à une contamination connue de l'eau. Enfin ce travail vise à retracer la contamination métallique de l'estuaire de la Gironde basée sur la microchimie des otolithes, à travers une approche *in situ* à long terme grâce à l'utilisation de flets issus d'une collection d'échantillons de 2007 à 2014.

2. MATERIELS ET METHODES

2.1. Approche expérimentale

2.1.1. Site d'étude

La zone d'étude, dans le cadre de cette approche, se situe à Isle-Saint-Georges dans le cours d'eau *le Saucats* (Figures 1 et 2), petit tributaire de la Garonne long de 21,2 km.



sources: J.Selleslagh; A. Echard

0°45'3"W

Figure 1: Carte de l'estuaire de la Gironde montrant les lieux de pêche des poissons pour l'expérimentation (pêche électrique) et pour la collection (campagnes Transect et Capalest).

Le site d'Isle-Saint-Georges, situé entre Langon et Bordeaux ($0^{\circ}28'09.6''\text{O}$; $44^{\circ}43'49.6''\text{N}$) a été identifié comme une importante zone de concentration de juvéniles de flets *Platichthys flesus* (Irstea, com. personnelle) où l'abondance est suffisamment élevée pour récolter le nombre d'individus nécessaire à l'expérimentation. La salinité dans le cours d'eau est nulle à marée basse, tandis qu'elle atteint 5 à marée haute sous l'influence dynamique de l'intrusion saline des eaux estuariennes de la Gironde.

2.1.2. Échantillonnage des flets pour l'expérimentation en laboratoire

L'échantillonnage a été mené les 4 et 5 septembre 2014, par pêche électrique, à marée basse lorsque la hauteur d'eau est inférieure à 50 cm et la visibilité bonne, ce qui facilite la mise en œuvre de l'échantillonnage. Les poissons ont été collectés à l'aide d'un « Martin-pêcheur » à contre-courant (Figure 3).



Figure 2: Le Saucats à Isle-Saint-Georges.



Figure 3: Pêche électrique dans le cours d'eau.

Seuls les juvéniles de flets de taille comprise entre 4 et 8 cm ont été sélectionnés et mis dans des bassines contenant de l'eau du milieu puis immédiatement transférés dans des viviers portatifs et ramenés vivants au laboratoire. Tous les autres poissons ont été immédiatement rejetés dans le cours d'eau. Ces appareils portatifs de pêche électrique créent localement un champ électrique entre deux électrodes afin d'attirer les poissons et d'inhiber momentanément leurs actes volontaires. Une fois retirés du champ électrique, les poissons n'ont présenté aucune séquelle compromettant le bon déroulement de l'expérimentation. Environ 300 flets ont été récoltés au cours de la campagne d'échantillonnage.

Afin de réduire l'effet taille sur les analyses, les juvéniles de flets ont été sélectionnés selon leur longueur totale (Lt, en mm). La longueur moyenne (\pm écart type) des individus destinés à l'expérimentation était de 65.9 ± 10 mm.

2.1.3. Protocole expérimental

Dans l'animalerie de la station marine d'Arcachon les juvéniles de *P. flesus* ont été individuellement marqués par une petite marque fluorescence de 2.8 par 1.2 mm, portant une lettre et un numéro implantée en sous-cutané. Chaque individu a préalablement été mesuré (Lt, mm) et pesé (W, mg) à l'aide d'un ichtyomètre et d'une balance électronique de précision à 0.1 mg près.

Les poissons ont ensuite été placés en acclimatation durant 25 jours dans un grand bassin circulaire contenant 300 litres d'eau à salinité et température contrôlées : salinité de 5 et température maintenue à 18°C afin de reproduire les conditions physico-chimiques du milieu où ont été capturés les flets. Une salinité de 5 a également été choisie afin de réduire le développement de maladies au cours de l'expérimentation. Le bassin est oxygéné par ajout de bulleurs. Du sable fin propre a été dispersé sur 5 cm d'épaisseur au fond du réservoir afin de fournir un substrat d'enfouissement pour les flets. Durant toute l'expérience (de l'acclimatation à la décontamination), les poissons ont été quotidiennement nourris de crevettes blanches surgelées et broyées (*Palaemon longirostris*) provenant du domaine de Certes, site considéré comme peu contaminé en métaux. La nourriture non consommée par les poissons a été siphonnée chaque jour. Un renouvellement d'eau (de 1/3 du volume) a été effectué tous les 3 jours.

Au bout des 25 jours d'acclimatation, deux-cent-dix individus du grand bassin d'acclimatation ont été aléatoirement divisés en trois groupes de 70 individus et répartis dans

trois grands aquariums expérimentaux de 100 litres (Figure 4). Les conditions des aquariums sont les mêmes que décrites précédemment pour le grand réservoir d'acclimatation.

À la fin de l'acclimatation en aquariums (le 29 septembre 2014) un total de 15 individus a été collecté puis congelé à -20°C , en vue des analyses de métaux dans les tissus et les otolithes, afin d'obtenir un point de référence.

Les aquariums ont été respectivement identifiés comme suit : « témoin T, contaminé 1 C1, contaminé 2 C2»; où les bassins C1 et C2 constituent des réplicats de contamination.

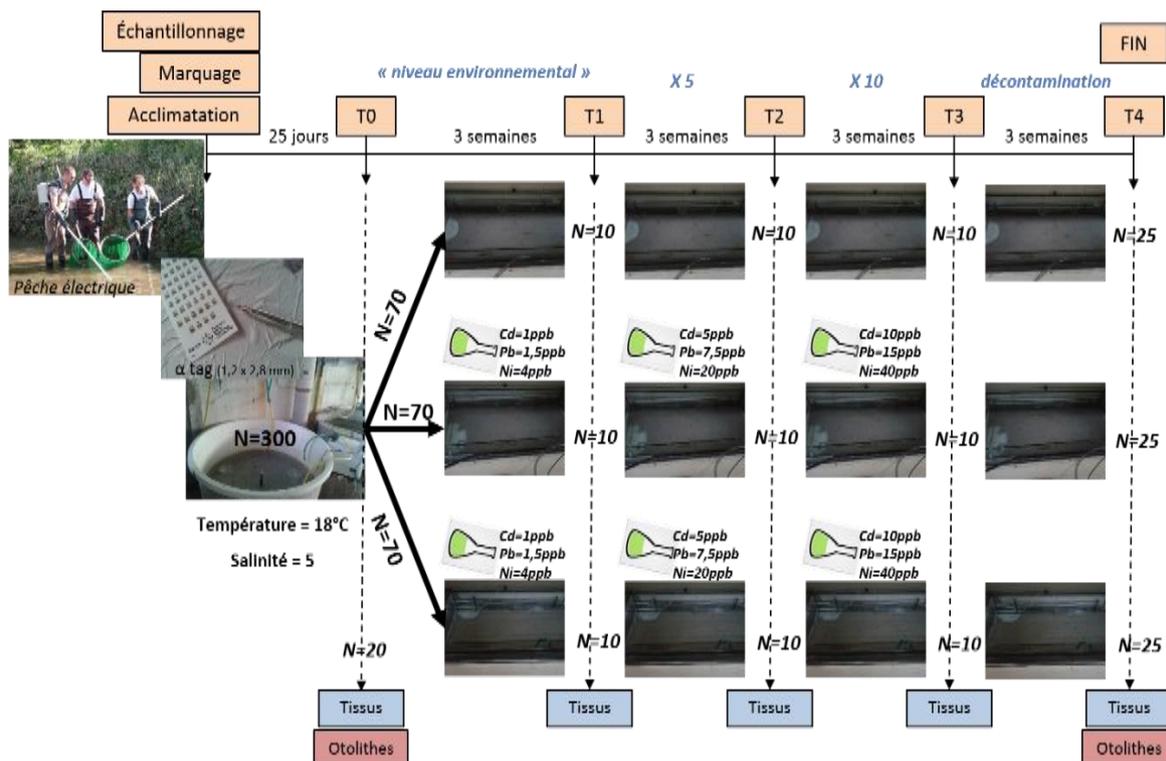


Figure 4: Schéma du protocole expérimental.

Le cadmium, plomb et nickel appartenant à la liste des substances prioritaires dans le domaine de l'eau (décidée par le Parlement européen 2000/C 177 E/11) et dont la présence est avérée dans l'estuaire de la Gironde ont été utilisés pour contaminer les aquariums expérimentaux. L'expérimentation s'est déroulée en quatre périodes successives de trois semaines (où une période était égale à un niveau de contamination). Dans le bac témoin, les conditions sont restées constantes pendant les quatre périodes, c'est-à-dire, qu'il n'y a eu aucun ajout de contaminants métalliques dans l'eau. En revanche, pour les bacs C1 et C2, quatre concentrations différentes, progressives et contrôlées, ont été administrées l'une après l'autre toutes les trois semaines, soit une concentration donnée pour chaque période.

Les concentrations progressives et contrôlées équivalaient à T1 : la moyenne du milieu naturel, T2 : une moyenne supérieure d'un facteur 5 par rapport celle du milieu naturel, T3 : une moyenne supérieure d'un facteur 10 et T4 : une concentration nulle égale à une période de décontamination.

Dans les deux aquariums contaminés les concentrations en contaminants (exprimées en $\text{ppb} = \mu\text{g/L}$) à chaque niveau étaient respectivement pour le Cd, Pb et Ni de **T1**) 1ppb, 1,5ppb,

4ppb; **T2**) 5ppb, 7,5ppb, 20ppb; **T3**) 10ppb, 15ppb, 40ppb et **T4**) 0ppb. Des prélèvements d'eau ont été quotidiennement (ou tous les 3 jours maximum) réalisés dans chaque aquarium, afin de suivre les concentrations réelles et de réajuster les niveaux de contaminants comme désiré. Dix poissons par bassin ont été prélevés à la fin de chaque niveau de contamination T1 à T3 et 25 pour le T4, puis conservés à -20°C en vue de leurs analyses sur les tissus et les otolithes. La fin de l'expérimentation à la fin du niveau T4 a eu lieu le 19 décembre 2015.

2.2. Approche *in situ*

2.2.1. Échantillonnage des flets de la collection de 2007 à 2014

L'échantillonnage des juvéniles de flets a été réalisé dans l'estuaire de la Gironde, lors de chaque période printemps/été depuis l'année 2007 jusqu'en 2015, dans le cadre de la campagne de pêche *Transect* réalisée mensuellement depuis plus de 35 ans par Irstea. Lors de cette campagne, 4 transects sont échantillonnés (Centrale : **Ce**, Conac : **Co**, Maubert : **M** et Les Iles : **I**), chacun représentant un échantillonnage sur chacune des rives de l'estuaire et en son milieu (Médoc : **Me**, Saintonge : **S** et Milieu : **Mi**) (Figure 1). Le temps d'un trait de pêche est de 7 minutes et est réalisé à contrecourant afin d'optimiser la capture des poissons. Deux engins sont simultanément déployés à chaque trait : un traineau suprabenthique et 2 haveneaux de surface (Figure 5).

Une partie des poissons étudiés, provenait des échantillonnages réalisés pendant la campagne *Capalest* 2012. Lors de cette campagne, l'engin de pêche utilisé pour la capture des juvéniles de flets, est le chalut à perche (Figure 5) déployé à contre-courant sur une période de trait de 15 minutes. Les deux stations de prélèvement des poissons sur la campagne *Capalest* étaient Lamarque en amont de l'estuaire et Richard en aval (Figure 1).

L'ensemble des prélèvements a été réalisé à bord du navire scientifique l'*Esturial*, de l'Institut de recherche Irstea (Figure 5).



Figure 5: *L'Esturial* avec ses équipements de pêche de surface et de fond permettant la collecte des flets.

Les poissons sont remontés à bord, manipulés délicatement et conservés en flacon contenant de l'alcool à 75° permettant la conservation à long terme des organismes. Dans le cadre de notre étude, les flacons *Transect* conservés de cette manière depuis près de 7 ans à Irstea, ont été sélectionnés afin de faire un suivi à long terme des concentrations en Cd, Pb et Ni dans les otolithes des juvéniles de *P. flesus*.

2.3. Analyses des métaux traces Cd, Pb et Ni

2.3.1. Analyse de l'eau

Tout au long de l'expérimentation des prélèvements quotidiens (ou tous les 3 jours au maximum) d'eau ont été effectués afin de doser les concentrations en Cd, Pb et Ni dans chacun des aquariums. Pour ce faire, 10 ml d'eau ont été prélevés à la pipette dans chaque aquarium puis acidifiés (ajout de 1,2 ml de HNO₃) et directement analysés par SAA (spectromètre d'absorption atomique) ou ICP-OES (plasma inductif couplé à un spectromètre d'émission optique). A la suite de ces analyses, des ajouts compensés ont été effectués, si nécessaire, afin de maintenir les concentrations en métaux comme désirées dans chaque bassin contaminé.

2.3.2. Préparation et analyse des tissus

En laboratoire, chaque individu de l'expérimentation, conservé à -20°C, a été décongelé puis disséqué de ses branchies, foie, muscle et rein. Sur ces quatre organes les concentrations en Cd, Pb et Ni qui se sont accumulés au fil de l'exposition ont été dosées ultérieurement.

Les dissections se sont déroulées sous une loupe binoculaire, à l'aide de ciseaux et de pinces en plastique afin de diminuer le risque de contamination métallique des tissus des poissons.

Les organes ont été disposés séparément dans des coupelles de plastiques identifiées avant d'être placés 48h à 60°C à l'étuve. Une fois secs, les tissus ont été pesés à l'aide d'une micro-balance électronique précise au 1.10⁻⁴ mg près puis déposés dans des tubes à minéraliser. Les tissus ont été digérés à 100°C (pendant 5h) par minéralisation après ajout d'un volume d'acide nitrique HNO₃ défini selon le poids des tissus (cf. Tableau 1 Annexes). L'étape de minéralisation consiste à séparer les contaminants métalliques de la matière organique qui constituait les tissus pour permettre ainsi leur dosage. Un volume défini (équivalent à 5 fois le volume d'acide nitrique ajouté) d'eau Milli-Q a ensuite été ajouté.

Les concentrations en Cd, Pb et Ni ont été déterminées à l'aide d'un ICP-OES pour les échantillons de grand volume et d'un SAA pour les volumes < 6 ml ou lorsque les dosages des métaux étaient sous la limite de détection de l'ICP. Le spectromètre d'absorption atomique étant plus sensible aux faibles concentrations métalliques que l'ICP-OES, certains tissus ont été de nouveau dosés au SAA afin de déterminer précisément leur teneur en contaminants lorsqu'ils étaient proches de la limite de détection de l'appareil.

2.3.3. Préparation et analyse des otolithes

Les otolithes des poissons (Figure 6) de l'expérimentation et de la collection ont été extraits dans les mêmes conditions techniques que les tissus, puis ont été conservés dans des tubes eppendorf identifiés individuellement.

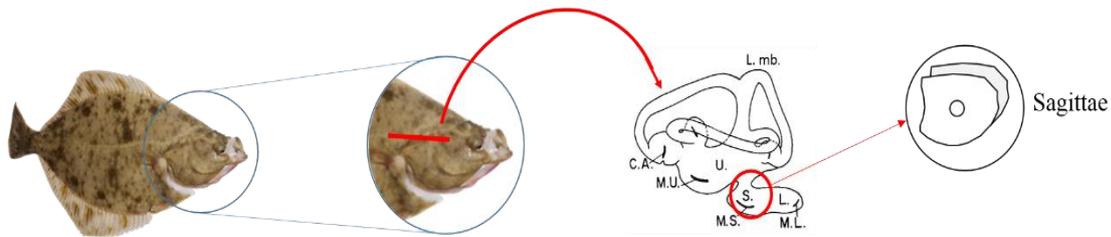


Figure 6 : Dissection d'un flet et localisation des sagittae. Ca, crête ampullaire ; L, lagena ; L mb, labyrinthe membraneux ; ML, macule lagenaire ; MS, macule sacculaire ; MU, macule utriculaire ; U, utricule ; S, saccule ; U, utricule.

Les otolithes sont des concrétions calcaires de carbonate de calcium (CaCO_3), situées au niveau de l'oreille interne des poissons. L'otolithe sert de matrice à la croissance des cristaux d'aragonite et se présente en sections de bandes opaques et claires correspondant à sa croissance journalière ou annuelle. Un otolithe a la particularité de permettre la détermination de l'âge des poissons mais aussi de conserver une trace de la composition chimique de l'eau où les poissons ont résidé.

La préparation consiste à enrober les otolithes dans des petits blocs de résine, neutre en Cd, Pb et Ni, afin d'en avoir une meilleure prise en main. Les otolithes (sagittae droits) ont ensuite été ponçés manuellement (en coupe sagittale) sur des disques de polissage jusqu'à obtention de stries bien visibles et nettes depuis leur centre jusqu'à leur périphérie (Figure 7). Un microscope motorisé *Eclipse Ni-E* a été utilisé dans le but d'observer avec précision l'avancement du ponçage.

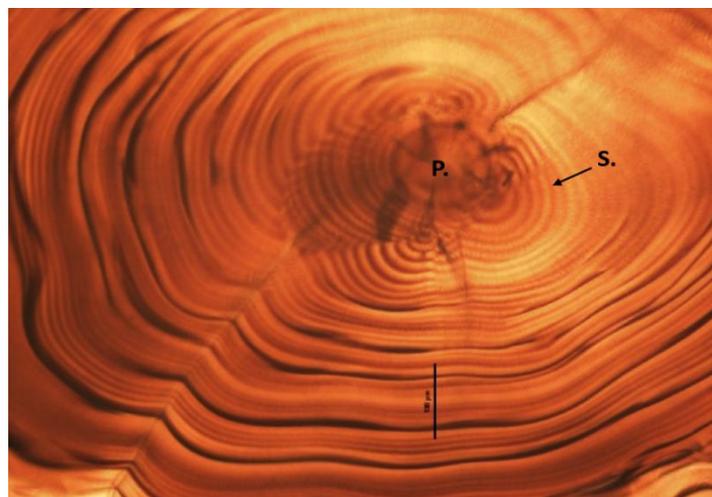


Figure 7: Otolithe poncé et observé au microscope motorisé. Le pronucléus (P.) et les stries journalières (S.) sont bien visibles (trait noir : 100 μm).

Les analyses microchimiques des otolithes ont été menées au laboratoire de chimie analytique de l'IPREM à Pau (LCABIE). Elles ont été réalisées à l'aide d'un laser femtoseconde (fsLA) couplé à un ICP-MS/HR (plasma à couplage inductif à un spectromètre de masse haute résolution) (Figure 8). Pour cela les otolithes ont été ablatés au laser, selon une trajectoire en *Transect* partant du

cœur et allant jusqu'à la périphérie. L'objectif de la trajectoire en transect consistait à observer l'histoire de vie des juvéniles (via les variations des isotopes du Baryum et du Strontium) et l'incorporation des éléments traces depuis la période d'éclosion jusqu'à leur capture *in situ* ou la fin de l'expérimentation. La matière ablatée est transportée par un flux gazeux d'Hélium depuis la chambre d'ablation du laser, jusqu'à la chambre à nébuliser puis jusqu'au spectromètre de masse de l'ICP, via un flux gazeux d'Azote, qui dose les éléments.



Figure 8: ICP-MS / Haute Résolution (à gauche) couplé au Laser femtoseconde (à droite).

Durant les analyses deux calibrations standard ont été mesurées avant et après chaque série d'ablation ainsi que deux certifiés de matériaux de référence d'otolithes. Les concentrations en métaux traces étant exprimées en intensité de coups par seconde, un traitement des données brutes (feuille de calcul FOCAL-Scan) fut nécessaire afin d'obtenir les concentrations en ppm. Une valeur d'intensité était obtenue tous les 5µm d'otolithe ablaté au laser. Cinq microns sur l'otolithe sont équivalents à 1 jour de vie d'un juvénile de flet (soit une strie). Environ 10 valeurs ont ainsi été moyennées afin d'obtenir les concentrations métalliques de Cd, Pb et Ni (en ppm) intégrées dans l'otolithe pour chaque niveau de contamination souhaité.

Des séries d'analyses en imagerie ont également été réalisées sur quelques otolithes témoins et contaminés afin d'observer la répartition globale des éléments traces incorporés sur l'ensemble de l'otolithe.

2.4. Analyses morphométriques et statistiques

L'indice de condition de Fulton Ka été individuellement calculé. Cet indice allométrique, basé sur une relation linéaire entre le poids et le cube de la taille d'un individu, permet de révéler son bon état physiologique (son embonpoint). Ainsi, plus un poisson a un indice K élevé, meilleure est sa condition. Il se calcule selon la formule suivante :

$$K (\text{mg} \cdot \text{mm}^{-3}) = 100 \times (W / Lt^3),$$

avec W le poids en mg et Lt la longueur totale en mm.

La normalité des variables a été testée statistiquement grâce à un test de Shapiro-Wilk, ainsi que l'égalité des variances (« homoscédasticité ») à l'aide d'un test de Bartlett (équivalent au test de Fisher, pour plus de deux variances). Ces deux tests permettent de déterminer s'il est possible d'appliquer des tests paramétriques.

Les données n'étant pas normales, des analyses non-paramétriques de comparaison de moyennes à plusieurs échantillons ont été réalisées afin de tester les différences entre les concentrations en métaux dans les tissus des poissons de l'expérimentation. Pour ce faire, le test de Kruskal-Wallis et le test bilatéral de Dunn ont été utilisés sur les moyennes du cadmium et du plomb dosés dans les branchies, le foie, le muscle et le rein de *P. flesus* à tous les niveaux de contamination.

Des tests de corrélation ont ensuite été appliqués à ces mêmes échantillons afin de déterminer s'il y avait un lien entre les concentrations mesurées dans chacun des tissus et l'eau des bassins échantillonnée tout au long de l'expérience (pour les quatre niveaux de contamination).

Ces trois mêmes tests (Kruskal-Wallis, Dunn et corrélation) ont également servi à déterminer les différences entre les moyennes des concentrations de Pb mesurées dans les otolithes des poissons de l'expérimentation et du milieu naturel. Pour les poissons du milieu naturel l'évolution spatio-temporelle du Pb dans les otolithes des juvéniles de flets a été étudiée et testée entre toutes les stations de prélèvement ainsi qu'entre l'amont et l'aval et les rives de l'estuaire de la Gironde.

L'ensemble de ces tests a été réalisé à l'aide du logiciel XL-Stat 2015. Une significativité au seuil de 5% a été appliquée à tous les tests statistiques réalisés.

3. RESULTATS

3.1. Approche expérimentale

Au cours de l'expérimentation seuls 4 poissons sont morts sur les 210 introduits dans les bassins expérimentaux, ce qui résulte à un taux de mortalité faible, de 2%.

3.1.1. Suivi de l'eau

Les résultats du suivi des concentrations journalières en Cd, Pb et Ni sont exposés en figure 9.

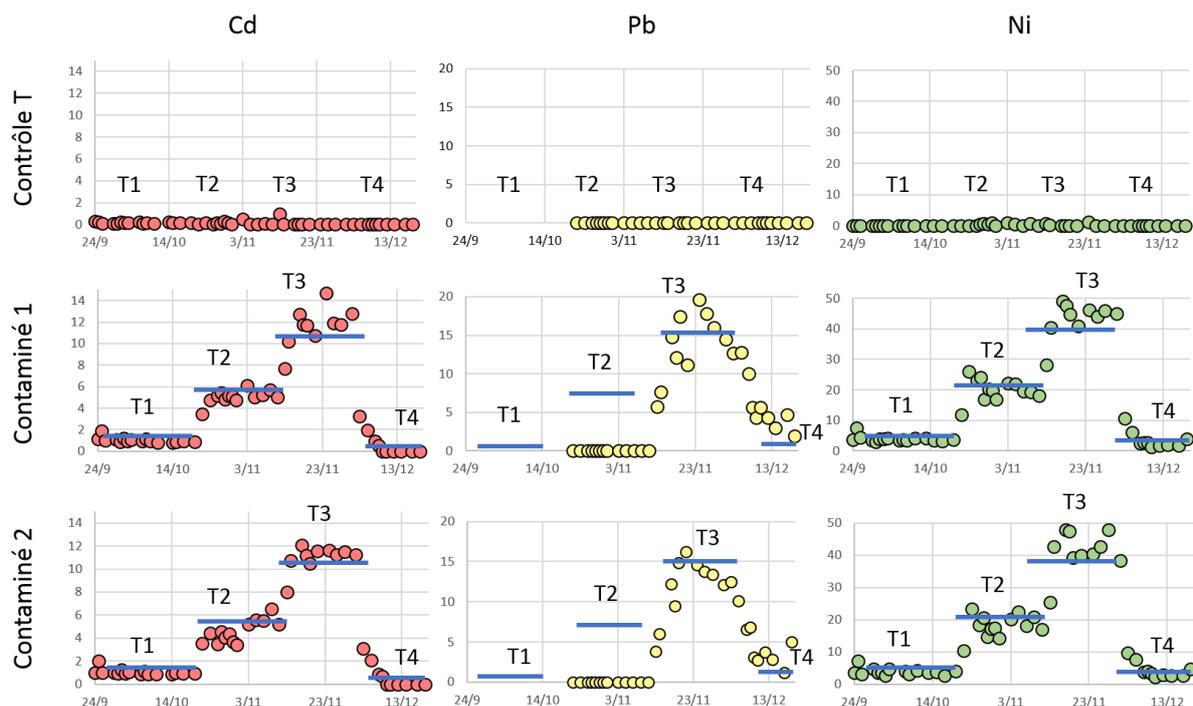


Figure 9: Concentrations en Cd, Pb et Ni mesurées dans l'eau des 3 bassins (en ppb) durant toute l'expérience. Barres bleues: concentration attendue à T1, T2, T3 et T4.

Dans le bassin expérimental contrôle T, les concentrations des trois métaux sont nulles (ou proches de zéro) et constantes tout au long de l'expérimentation. Excepté pour le Pb, les deux bassins contaminés C1 et C2 présentent, en revanche, quatre niveaux de concentrations bien définis, variant toutes les trois semaines pendant la durée totale de l'expérience ; comme désiré. Dans le bassin contaminé C1 pour le niveau T3, par exemple, les concentrations moyennes de Cd, Pb et Ni étaient respectivement de $11,59 \pm 1,83$ ppb ; $13,68 \pm 4,48$ ppb et $43,25 \pm 5,94$ ppb. Les concentrations moyennes de Cd, Pb et Ni, mesurées dans le bassin contaminé C2 pour le niveau T3 étaient respectivement de $10,96 \pm 1,14$ ppb ; $11,65 \pm 4,02$ ppb et $41,21 \pm 6,62$ ppb.

3.1.2. Indices morphométriques

Les indices de condition des juvéniles de *P. flesus* sont compris entre $0,78 \pm 0,08$ et $1,26 \pm 0,50$ tout au long de l'expérimentation avec une tendance progressive à l'augmentation depuis la phase T0 (Acclimatation) jusqu'à T4 (voir Annexes).

Aucune différence significative n'a été observée entre les indices de condition des lots témoins et contaminés pour les niveaux de contamination T1 et T2 (Kruskal-Wallis $p = 0,230$ et $p = 0,739$ respectivement).

Des différences significatives ont cependant été observées entre les indices de condition des lots témoins et contaminés pour les niveaux de contamination T3 et T4 (KW, $p = 0,047$ et $p = 0,007$ respectivement).

3.1.3. Bioaccumulation dans les tissus

Dans cette partie, seuls les résultats du Cd et du Pb sont présentés ; le Ni n'ayant pas encore été dosé (résultats en cours d'acquisition).

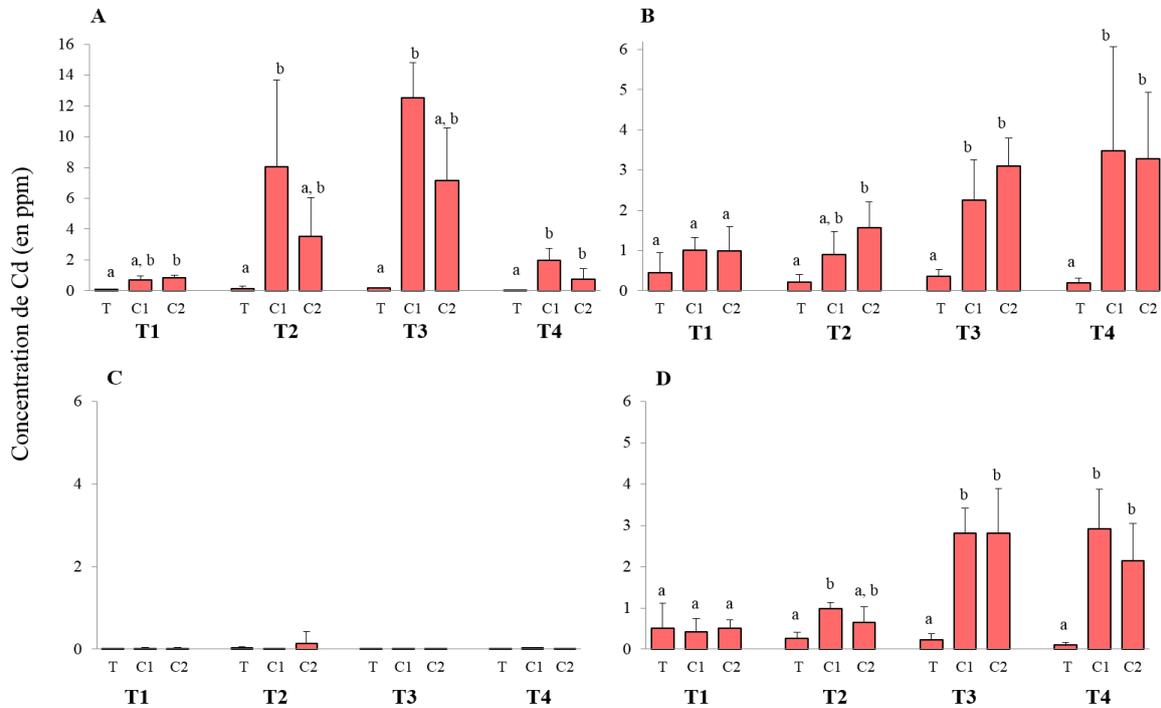


Figure 10: Concentrations de Cd (en ppm) mesurées dans les branchies (A), le foie (B), le muscle (C) et le rein (D) de *P. flesus*, à différents niveaux de contamination (T1 à T4). Les significativités (lettres au-dessus des histogrammes) sont basées sur les comparaisons entre T, C1 et C2 de chaque niveau de contamination.

Des différences significatives de concentrations de Cd entre les lots témoins et contaminés de chacun des trois tissus (branchies, A ; foie, B ; rein, D), ont été observées (Figure 10 ; Kruskal-Wallis : KW, p values $<0,001$). Les valeurs de Cd augmentent dans ces tissus en concordance avec l'augmentation des concentrations de Cd administrées dans l'eau des bassins. Dans les branchies, le lot C1 (contaminés 1), atteint en T3 jusqu'à $12,53 \pm 2,25$ ppm (T3, [Cd] désirée = 10 ppb). Cependant, il semble se produire dans les branchies (en période de décontamination : T4), un retour aux valeurs moyennes de Cd mesurées en T1, atteignant au maximum $1,95 \pm 0,78$ ppm.

Dans le foie et le rein l'accumulation du Cd est plus faible que dans les branchies, mais dure jusqu'au niveau T4 correspondant à la période de décontamination des bassins. Par exemple, les concentrations de Cd dans le foie et le rein pour les lots C2 du T3 sont respectivement égales à $3,09 \pm 0,71$ ppm et $2,80 \pm 1,08$ ppm ; alors que dans les branchies la concentration en Cd pour le lot C2 du T3 est égale à $7,71 \pm 3,42$ ppm. Au niveau du foie et du rein, les lots C1 du T4, atteignent respectivement $3,48 \pm 2,57$ ppm et $2,91 \pm 0,97$ ppm.

Le muscle ne présente, en revanche, aucune différence entre les groupes contaminés et témoins (KW, $p = 0,112$) avec de très faibles valeurs moyennes de Cd atteignant au maximum $0,025 \pm 0,02$ ppm pour le lot C2 (contaminés 2) du T4.

Des différences significatives de concentrations de Pb entre les lots témoins et contaminés pour 3 tissus des 4 étudiés (branchies ; A, du foie ; B et du rein ; D), ont été observées (Figure 11 ; KW, $p < 0,001$; $p < 0,002$ et $p < 0,001$ respectivement).

Les valeurs de Pb augmentent dans ces trois tissus en parallèle avec l'augmentation des concentrations de Pb administrées dans l'eau des bassins expérimentaux. Les concentrations dans les branchies, foie et rein des individus du lot contaminé C1 au niveau T3, atteignent au maximum des valeurs moyennes respectives à $3,90 \pm 0,78$ ppm ; $0,94 \pm 0,40$ ppm et $7,12 \pm 0,22$ ppm. Ce n'est qu'à partir de ce niveau de contamination ([Pb] dans l'eau = 10 ppb) qu'une augmentation significative du Pb a été détectée dans les lots contaminés du foie et du rein par rapport aux lots témoins (KW, $p = 0,007$ et $p = 0,002$ respectivement).

Au niveau de contamination T4 pour les trois tissus, les concentrations de Pb restent environ égales à celles du T3, bien que le T4 corresponde à la phase de décontamination.

Le muscle ne présente pas de différences de concentrations moyennes de Pb entre les témoins et les contaminés (KW, $p = 0,066$). Bien qu'il y ait une différence significative entre les C1 et témoins du T4 (KW, $p = 0,045$), l'ensemble des autres lots contaminés montrent, au cours de l'expérimentation, des concentrations en Pb équivalentes aux témoins et sont comprises entre $0,11 \pm 0,08$ et $0,27 \pm 0,15$ ppm (Figure 11).

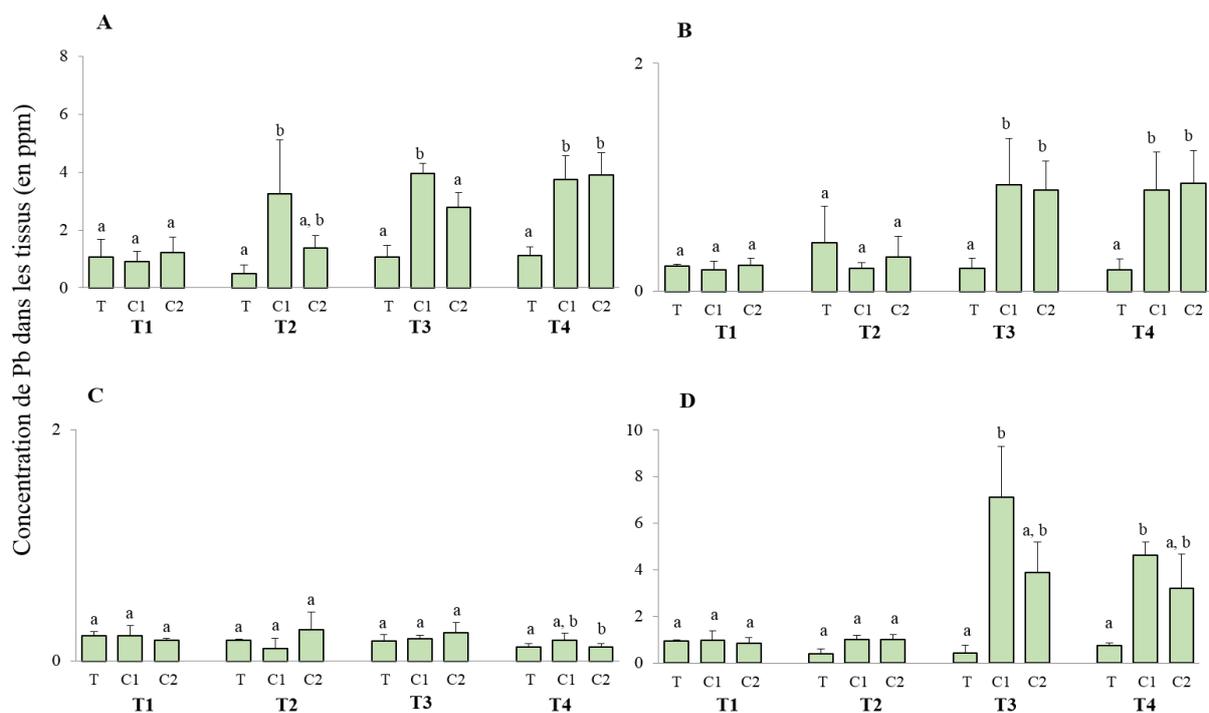


Figure 11: Concentrations de Pb (en ppm) mesurées dans les branchies (A), le foie (B), le muscle (C) et le rein (D) de *P. flesus*, à différents niveaux de contamination (T1 à T4). Les significativités sont basées sur les comparaisons entre T, C1 et C2 de chaque niveau de contamination.

3.1.4. Microchimie des otolithes

Les concentrations de Pb intégré dans les otolithes augmentent au cours de l'expérimentation avec une valeur moyenne maximale de $61 \pm 5,44$ ppm au T4 (Figure 12).

Aucune différence significative n'a été démontrée entre les concentrations de Pb dans les otolithes des lots témoins des quatre niveaux de contamination et l'acclimatation (KW, $p = 0,683$). De la même façon, il n'y a aucune différence entre les lots témoins et contaminés des otolithes dans les niveaux de contamination T1 et T2 (KW, $p = 0,298$ et $p = 0,250$ respectivement).

À partir du T3, des différences significatives ont été observées entre les concentrations de Pb des lots contaminés et témoins aux niveaux T3 et T4 par rapport aux lots contaminés et témoins des niveaux T1 et T2 (KW, $p < 0,0001$).

Les différences observées entre les lots témoins et contaminés à partir du T3 ne sont cependant significatives que pour le niveau de contamination T4 (KW, $p = 0,26$ et $p = 0,004$ respectivement).

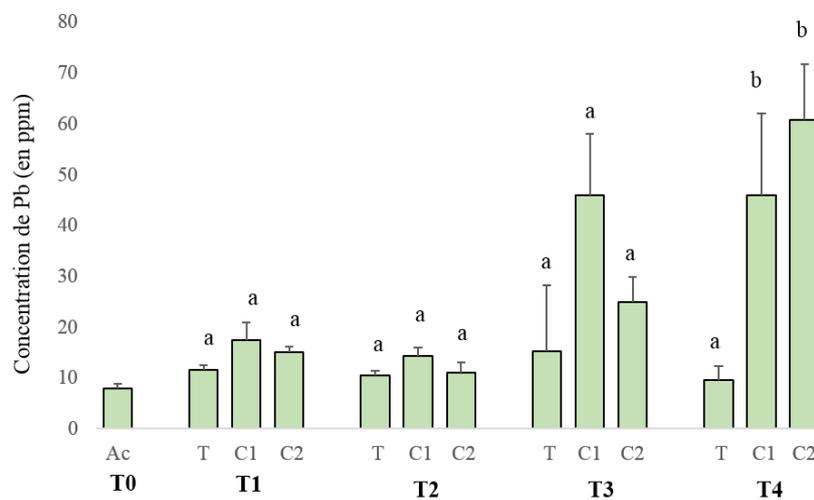


Figure 12: Concentrations de Pb mesurées dans les otolithes de flets de l'expérimentation aux différents niveaux de contamination T0 (Ac), T1, T2, T3 et T4. Les significativités sont basées sur les comparaisons entre T, C1 et C2 de chaque niveau de contamination.

Deux résultats d'imagerie, par ablation laser, sur des otolithes de flets témoins et contaminés du dernier niveau de contamination (T4), sont représentés sur la figure 13. La différence d'intensité entre les otolithes des deux individus étudiés est facilement remarquable et l'intensité par coup affichée sur l'échelle des images a dû être convertie pour obtenir la concentration de Pb (en ppm) dans les otolithes. La bande jaune à la périphérie de l'otolithe « contaminé » est équivalente à une largeur de $80\mu\text{m}$ soit environ égale à une durée de 15 jours de vie avant la fin de l'expérimentation. Durant cette période les valeurs de Pb mesurées sont de 58 ppm dans l'otolithe des poissons contaminés tandis qu'elles sont de 19,11 ppm dans l'otolithe des poissons témoins pour la même période de vie. A sa voir qu'une intensité par coup environ égale à 10 000, équivaut à environ 19,42 ppm.

Ces deux illustrations sont en adéquation avec les résultats précédents (Figure 12) et confirment que les individus témoins présentent nettement moins de Pb dans leurs otolithes que les individus contaminés.

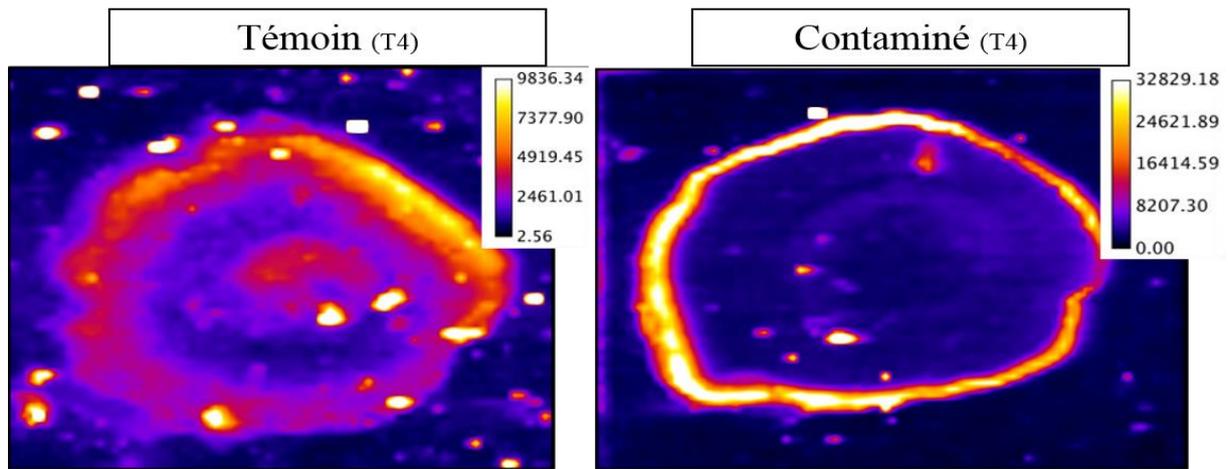


Figure 13 : Intensités de Pb mesurées mises en évidence par imagerie laser dans un otolithe témoin (à gauche) et contaminé (à droite) des poissons de l'expérience. Les échelles sont exprimées en intensité par coup.

3.1.5. Relation eau, tissus, otolithes

Les valeurs de Pb dosées dans les branchies, le foie et le rein augmentent en parallèle à la contamination dans l'eau des bassins d'expérience (Figure 14).

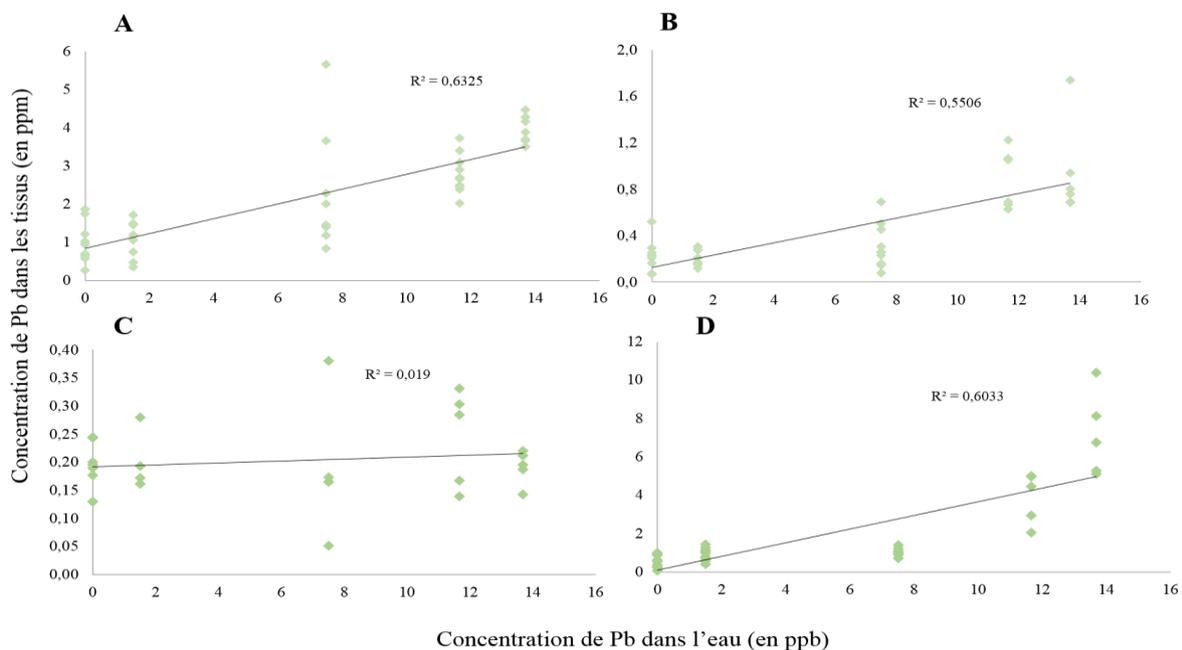


Figure 14 : Concentrations de Pb (ppm) mesurées dans les branchies (A), le foie (B), le muscle (C) et le rein (D) de *P. flesus* en fonction des concentrations de Pb mesurées dans l'eau des bassins expérimentaux.

Des corrélations significatives ont été mises en évidence pour les branchies (A), le foie (B) et le rein (C) de *P. flesus*, avec des coefficients de détermination de Spearman (R^2)

respectivement égaux à 0,632 ; 0,550 et 0,603 (Cor test, p values < 0,0001 pour les trois tissus).

Aucun lien significatif n'a été montré entre les concentrations en Pb mesurées dans le muscle et celles mesurées dans l'eau des bassins expérimentaux ($R^2 = 0,019$; $p = 0,590$).

Comme pour le Pb, les mêmes tendances de bioaccumulation du Cd ont été observées dans les 3 tissus (branchies, foie et reins) de *P. flesus* ($R^2 = 0,652$; 0,539 et 0,778 respectivement ; Cor test, p values < 0,001) Aussi, aucun lien significatif n'a été montré entre les concentrations en Cd mesurées dans le muscle et celles mesurées dans l'eau des bassins ($R^2 = 0,010$; $p = 0,590$).

La relation entre le Pb mesuré dans les tissus et dans les otolithes a été étudiée et exposée dans la figure 15.

De la même manière qu'il y a un rapport entre contaminants (Cd, Pb) dans les tissus (sauf le muscle) et dans l'eau des bassins ; des liens significatifs ont été montrés entre le Pb dans les tissus (branchies, foie et rein) et les otolithes des poissons de l'expérience. Les coefficients de détermination et les p values pour ces trois tissus sont respectivement les suivants ($R^2 = 0,636$; 0,587 et 0,720 et Cor test, $p = 0,029$; $p = 0,047$ et $p = 0,011$).

Par ailleurs, le lien entre le Pb dans les tissus et dans les otolithes n'est pas significatif ($R^2 = 0,021$ et Cor test, $p = 0,947$) pour le muscle.

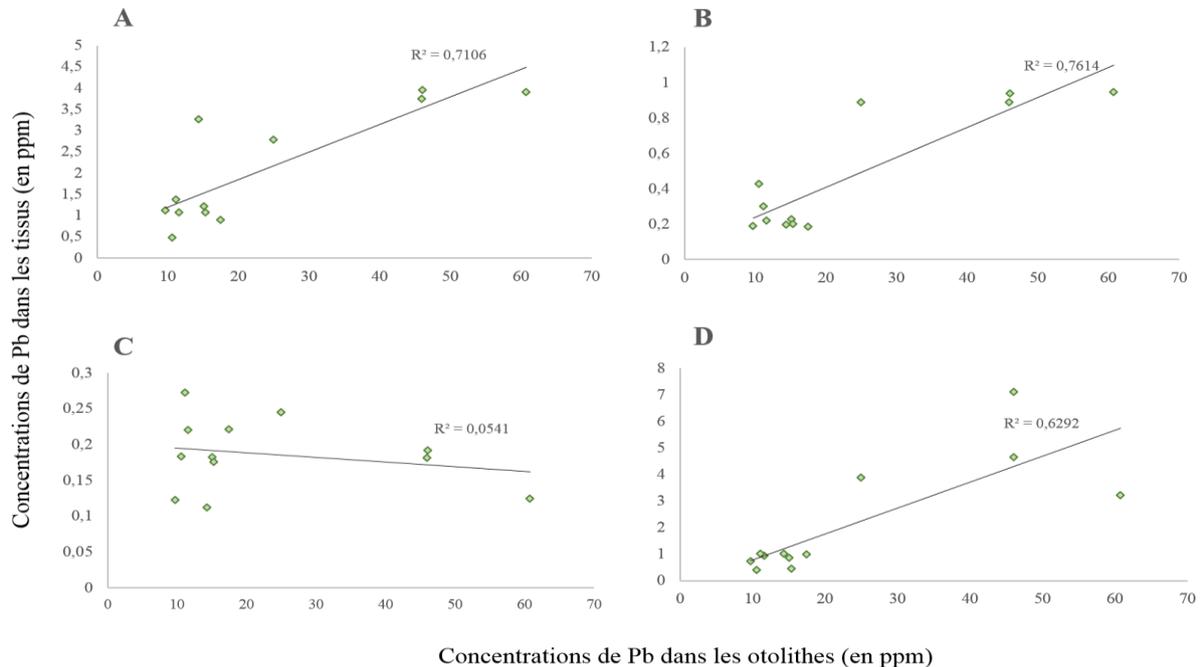


Figure 15 : Concentrations de Pb (ppm) mesurées dans les branchies (A), le foie (B), le muscle (C) et le rein (D) en fonction des concentrations de Pb mesurées dans les otolithes de *P. flesus* de l'expérience.

Concernant le Cd, ce lien entre les concentrations mesurées dans les tissus et dans les otolithes des flets n'a pas pu être démontré dans l'expérience car le métal n'était pas détecté dans les otolithes ablatés.

Enfin, cette expérimentation n'a montré aucun lien direct entre les concentrations de Pb dans les otolithes et dans l'eau des bassins expérimentaux (Cor test, $p = 0,30$ et $R^2 = 0,09$).

3.2. Suivi de la contamination métallique de l'estuaire par microchimie des otolithes

Les otolithes de flets de la collection de l'Irstea antérieurs à l'année 2007 n'ont pas pu être traités car leur conservation au formol a entraîné leur dissolution.

Aussi, les données manquantes de contamination métallique pour les années 2008 et 2011, s'expliquent par l'absence de capture de flets au cours des campagnes *Transect* pour ces années.

Enfin, dans cette partie, seules les valeurs obtenues pour le Pb seront exposées car le Cd et le Ni n'ont pas été ou très rarement détectés dans les otolithes des juvéniles de flets.

3.2.1. Dynamique temporelle du Plomb depuis la dernière décennie

La figure 16 résume, à l'aide de valeurs moyennées, les concentrations en Pb qui ont été mesurées dans les otolithes des flets de la collection.

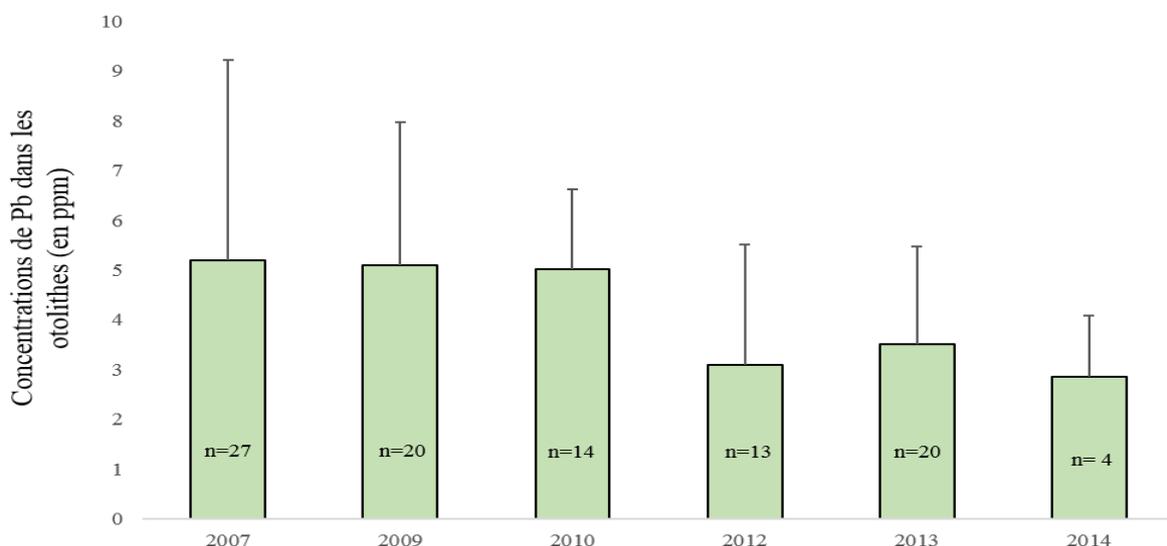


Figure 16: Concentrations de Pb (en ppm) dans les otolithes de flets de la collection (Transect 2007-2014).

Des différences significatives sont observées entre les différentes années d'échantillonnage des poissons du milieu naturel (KW, $p = 0,006$). La figure montre des différences entre les années 2007-2009-2010 et les années 2012-2013-2014.

La concentration maximale de Pb est atteinte pour l'année 2007 avec une valeur de $5,20 \pm 4,01$ ppm et la concentration minimale pour l'année 2014 avec une valeur de $2,85 \pm 1,23$ ppm. L'histogramme semble mettre en évidence une tendance à la baisse progressive, de la concentration de Pb intégré dans les otolithes.

La figure 17 met en évidence la variabilité des concentrations de Pb au sein de chacune des années étudiées dans cette approche *in situ*. La seule constante entre ces 6 ans est assurée par la présence de données au mois de juin. Les valeurs de plomb sont comprises entre $2,77$ ppm et $12,64 \pm 6,63$ ppm pour les mois respectifs de mai 2014 et juin 2007.

Chaque année semble différente des autres au vu des grandes variabilités intra-annuelles. Une différence significative (KW, $p = 0,007$) a d'ailleurs été déterminée entre le mois de mai et le mois de juillet de l'année 2012 ; tandis que les variations intra-annuelles des cinq autres années ne présentent aucune différence significative (2007 : $p = 0,626$; 2010 : $p = 0,611$; 2013 : $p = 0,378$ et 2014 : $p = 0,655$). De plus, les fortes variabilités interindividuelles au sein de chaque mois étudié, entraînent de grands écarts-types visibles dans la figure 18.

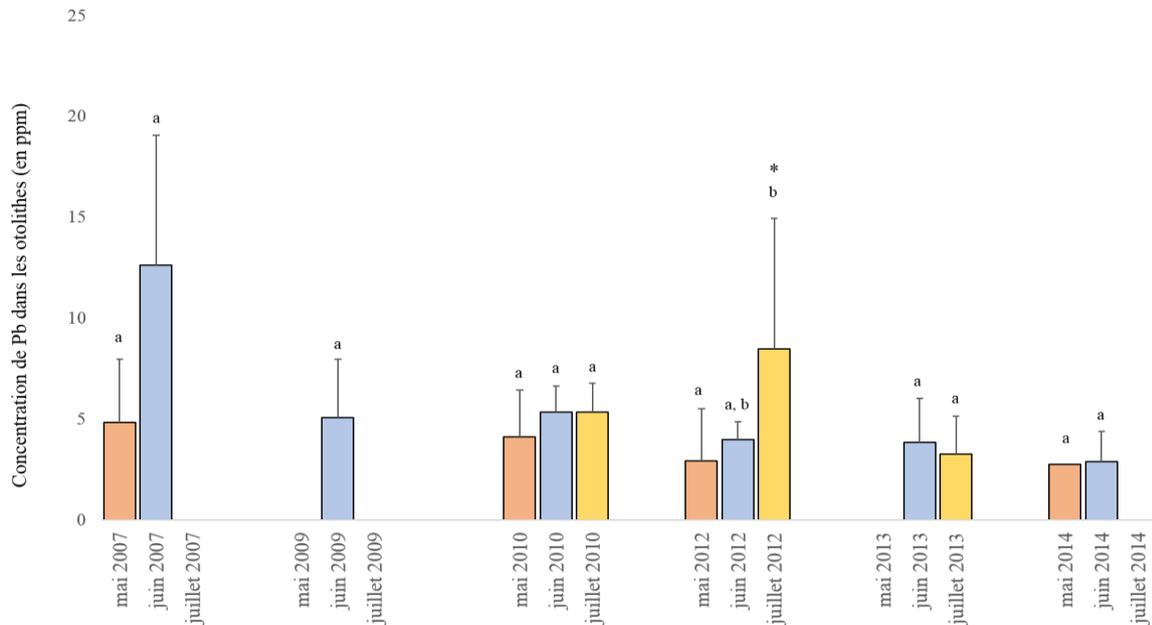


Figure 17: Concentrations de Pb (en ppm) mesurées dans les otolithes des poissons de la collection (2007- 2014) pour chacun des mois correspondant à un prélèvement. (*) Données issues de la campagne CAPALEST 2012. Les significativités sont basées sur les comparaisons des mois au sein de chaque année.

De manière générale, il est facile de retrouver dans cette figure, la légère tendance décroissante de la concentration de Pb dans les otolithes des poissons de la collection issus des campagnes « transect », bien que la valeur élevée de juillet 2012 corresponde à une moyenne des individus issus de la campagne Capalest 2012.

3.2.2. Dynamique spatiale du Plomb

Des variations des concentrations en Pb entre l'amont et l'aval de l'estuaire ont été étudiées précisément pour l'année 2012 (seule année ayant des données de la campagne Capalest). La figure met nettement en évidence une différence de concentrations de Pb dans les otolithes des poissons de la collection, avec une valeur moyenne plus élevée en amont qu'en aval.

Les résultats de cette comparaison sont exposés dans la figure 18.

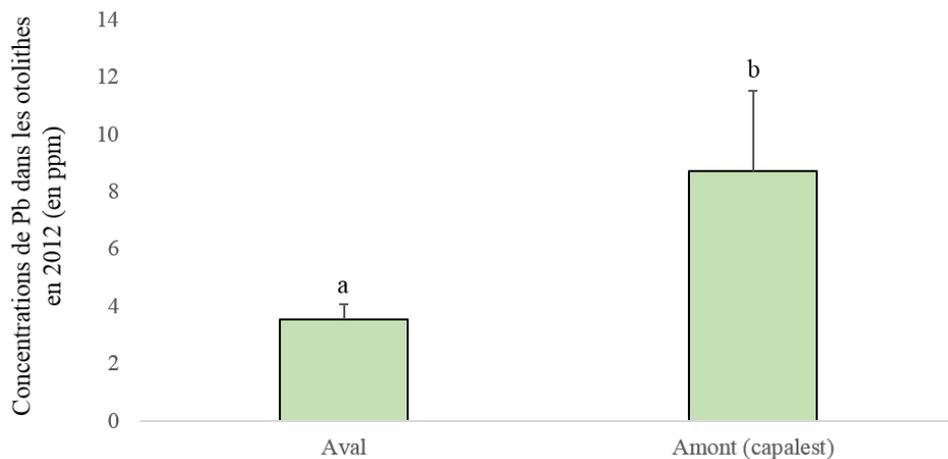


Figure 18: Evolution amont-aval des concentrations de Pb dans les otolithes de flets. Les significativités se basent sur la comparaison des moyennes pour les zones géographiques amont et aval de l'estuaire de la Gironde. Aval = Maubert, Conac, Centrale, Iles et Richard ; Amont = Lamarque.

Une différence significative entre les deux échantillons « Amont » et « Aval » est montrée statistiquement (KW, $p = 0,005$).

Les deux groupes apparaissent clairement distincts avec pour moyennes $3,53 \pm 0,54$ ppm de plomb en Aval et $8,74 \pm 2,79$ ppm pour le groupement Amont.

L'évolution spatiale a été étudiée pour les six stations de prélèvement (Figure 19).

Les stations Maubert, Conac, Centrale et Iles correspondent aux lieux de prélèvements de la campagne *Transect* ; tandis que Richard et Lamarque sont les sites de la campagne *Capalest* où Richard correspond à la station la plus en aval dans l'estuaire et Lamarque la station la plus en amont.

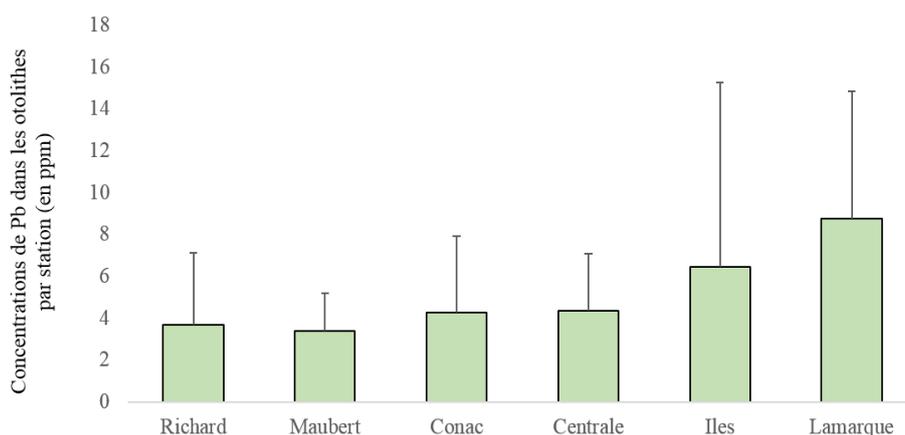


Figure 19: Contamination en Pb dans les otolithes de flets (en ppm) pour chaque station de prélèvement. Les significativités se basent sur les comparaisons entre moyennes de chaque station.

La figure 19 montre des concentrations en Pb plus élevées dans la station amont (Lamarque) que pour les autres stations proches de l’aval comme Maubert et Richard. Les valeurs de concentrations maximales et minimales sont comprises entre $3,35 \pm 1,18$ ppm à la station de Maubert, et $8,74 \pm 6,1$ ppm pour la station Lamarque (en amont).

Bien que les variabilités interindividuelles soient élevées dans chaque station, des différences significatives ont été observées entre les stations (KW, $p = 0,014$). Des différences sont notables entre les deux groupes des stations les plus en amont (Iles et Lamarque) et celles plus en aval (Richard, Maubert, Conac et Centrale).

4. DISCUSSION

4.1. Déroulement de l’expérimentation

Le faible taux de mortalité (<2%) des flets durant l’expérimentation ainsi que l’indice de condition K élevé (≈ 1) attestent du bon état des poissons et d’un stress réduit tout au long de l’expérimentation. [Selleslagh & Amara \(2013\)](#) ont montré expérimentalement qu’un individu avec un indice K proche de 1 est en bonne condition. Les indices K des individus sont plus faibles au début de l’expérimentation car ils ne s’alimentaient pas pendant la période d’acclimatation et ont donc peu grandi pendant les premières semaines. C’est pourquoi l’indice K augmente au cours de l’expérience.

Les concentrations nulles et constantes observées dans le bac « contrôle T » pour les trois métaux, montrent le bon déroulement de l’expérimentation. En revanche des difficultés ont été rencontrées pour maintenir le plomb dans les deux bassins contaminés. En effet, le Pb n’a pas été maintenu aux concentrations désirées pour les niveaux de contamination T1 et T2. Il est fort probable que ceci soit lié à des phénomènes d’adsorption par les parois des bassins et le système de filtration. Les trois métaux n’ont pas pu être absorbés de manière importante par

le substrat des bassins expérimentaux car il a été montré que la rétention métallique par un substrat grossier (tel que le sable utilisé pour l'expérimentation) est très faible; contrairement au sédiment fin, de type vase (Ranaldi & Gagnon, 2008).

Néanmoins, même si les dosages quotidiens de plomb ont indiqué des concentrations nulles ou inférieures au seuil de détection du spectromètre, nous savons que le métal était disponible, à l'accumulation par les flets, pendant un court laps de temps après l'ajout quotidien du métal. En effet, durant l'expérimentation une petite analyse a été faite pour étudier la cinétique du plomb dans l'eau d'un bassin contaminé au cours du T1. Les dosages ont montré que les concentrations en Pb diminuaient de moitié 4 heures après son ajout. Il n'est donc pas surprenant de ne plus doser de plomb 24 heures plus tard.

4.2. Bioaccumulation des métaux traces

Des différences significatives de concentrations en Pb et en Cd ont été observées dans les tissus entre individus exposés et non exposés. Dans notre expérience, les branchies sont les organes ayant le plus accumulé de métaux traces, suivies par le foie et le rein. En revanche, le muscle n'a pas accumulé les métaux considérés dans cette étude malgré leurs niveaux de concentrations croissants au cours de l'expérimentation. Ces résultats sont en accord avec l'étude de Durrieu et al. (2005), basée sur l'analyse des métaux dans les tissus de 8 espèces de poissons de l'estuaire de la Gironde capturés en 2001 ; qui a montré que les tissus accumulent le Cd dans l'ordre croissant suivant : le muscle (0,01 à 0,05 ppm) < les branchies (0,39 à 0,97 ppm selon les espèces) < le foie (environ 40 ppm) < le rein (4,2 à 72 ppm). La faible accumulation des métaux dans le muscle est due au fait que chez les poissons, ce dernier n'est pas considéré comme organe de stockage (Andres et al., 2000; Durrieu et al., 2005). Geffen et al. (1998) ont d'ailleurs démontré la très faible affinité entre le muscle et le cadmium. Même s'ils accumulent peu les métaux, les muscles de flets peuvent être utilisés comme outils de surveillance de la qualité chimique des environnements aquatiques (Cossa et al., 1992).

Les fortes concentrations en Cd et Pb, accumulées dans les branchies (12,53 ppm et 3,90 ppm dans notre étude, respectivement) reflètent la contamination par voie directe. Nous voyons également que les concentrations mesurées dans les branchies sont fortement reliées à celles injectées dans les bassins, y compris lors de la phase de dépuración. Ces résultats sont en accord avec plusieurs études qui ont indiqué que les branchies sont sensibles aux contaminants et reflètent les niveaux dans l'eau, car elles sont directement exposées à l'environnement extérieur (Winter, 1996; Arini et al., 2011, 2014a). Le Cd et le Pb se sont accumulés dans le rein puis dans le foie avec lesquels ils ont généralement une très forte affinité ionique ; probablement car ce sont des organes de métabolisation et d'élimination. En T4, phase de dépuración, ces deux tissus présentent toujours de fortes concentrations en contaminants. Ces résultats sont en accord avec d'autres études qui ont montré expérimentalement chez *Danio rerio*, qu'en phase de dépuración les métaux étaient transférés vers le foie et le rein, définis comme organes de stockage, prioritairement (Arini et al., 2015). Ils indiquent que le temps de dépuración nécessaire à l'élimination d'un métal dans les organes peut être de plus de 75 jours et dépend de l'organe et de la présence d'autres métaux.

Il n'est donc pas anormal que les concentrations en Cd et Pb dans le foie et le rein soient élevées, même lors de la dépuración, dans le cadre de notre étude où cette phase n'a duré que 15 jours.

Il ne serait pas improbable que l'accumulation dans les différents tissus dépende également du comportement des contaminants dans l'organisme. En effet, les métaux qui passent d'abord par les branchies, sont transportés dans le sang via des protéines de séquestration (les métalloprotéines : MT) avant d'être redistribués aux organes pour s'accumuler dans ceux avec lesquels ils ont les plus fortes affinités (Arini et al., 2015). Langston et al. (2002) et Van Campenhout et al. (2008) ont reporté dans leurs conclusions que le Cd était largement séquestré dans les MT et que la proportion de liaison avec cette protéine augmentait avec l'exposition du Cd.

La liaison des ions métalliques avec les métalloprotéines est nécessaire afin d'activer le processus d'élimination dans les tissus des poissons. S'il n'est pas séquestré, l'ion métallique reste chargé dans le sang, peut entrer dans les cellules par des pompes actives spécifiques à d'autres ions et potentiellement provoquer un dysfonctionnement des organites tels que le noyau, le réticulum endoplasmique et les mitochondries. C'est notamment le cas du Cd sur l'anguille européenne *A. anguilla* (Jacobson & Turner, 1980; Cannino et al., 2009; Moulis, 2010). Certains de ces effets sont le résultat des interactions entre le Cd et les métalloenzymes, menant à des changements de conformation ou au remplacement d'éléments essentiels aux cellules tels que: Zn^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} , Fe^{2+} , Mg^{2+} , et Ca^{2+} (Moulis, 2010). Ces résultats prouvent qu'il demeure encore assez difficile de comprendre la façon dont sont véhiculés ou interagissent les ions métalliques tels que le Cd et le Pb dans les organismes des poissons.

C'est grâce aux mécanismes de détoxification que les poissons en période de décontamination (sans exposition aux contaminants), peuvent faire diminuer les concentrations des métaux accumulés dans leurs organismes. Des études ont montré que la décroissance rapide de la bioaccumulation dans les branchies résultait du transfert des métaux traces vers les organes de stockage et d'excrétion tels que le foie et les reins (De Conto Cinier et al., 1999). Cela semblerait apporter une explication aux concentrations élevées observées en T4 dans ces deux tissus des poissons de l'expérimentation.

En effet, les métaux traces s'accumuleraient préférentiellement dans les organes dont le métabolisme produit de nombreuses quantités de protéines de séquestration. Jeziarska & Witeska. (2006) affirment que cela expliquerait pourquoi, longtemps après le début de la dépuration, les tissus de stockage seraient encore chargés en métaux alors que d'autres (comme les branchies) seraient déjà épurés. Une autre étude, sur le bivalve *Corbicula fluminea*, a montré qu'une période de détoxification égale à 1 an, n'a pas été suffisante pour éliminer les résidus de Cd et de Zn dans la masse viscérale suite à une exposition de deux mois à ces métaux (Arini et al., 2014b).

Les raisons et les mécanismes fondamentaux des affinités entre métaux et organes restent, cependant, encore mal connus et la bioaccumulation du Cd et du Pb semble varier entre contaminants, tissus et espèces. L'accumulation des éléments métalliques dans les tissus de poissons dépendrait de manière générale de plusieurs facteurs incluant notamment la biodisponibilité et la teneur en métaux de l'environnement, la voie trophique et la condition physiologique des individus (Geffen et al., 1998; Ranaldi & Gagnon, 2010; Pokorska et al., 2012).

4.3. Validation de l'outil de traçage

Notre étude a montré dans les otolithes de juvéniles de flets, expérimentaux et du milieu naturel, une bioaccumulation du Pb uniquement. Il est probable que le Cd et Ni n'aient pas été détecté du fait de leur très faible concentration dans l'otolithe ou de leur non incorporation dans celui-ci.

Les quelques études expérimentales qui ont été menées afin de tester la réponse des otolithes de poissons à une exposition (multi-)métallique ont toutes montré une augmentation nette et significative des concentrations du métal considéré chez les individus exposés. (Geffen et al., 1998; Ranaldi & Gagnon, 2008, 2009; Barbee et al., 2013). Il faut noter qu'à la différence de notre travail, ces études ont également toutes utilisé des concentrations d'exposition extrêmement élevées et presque irréalistes en comparaison à ce que l'on peut observer dans le milieu naturel même lors d'une pollution aiguë.

Barbee et al. (2013) ont exposé au cuivre Cu des embryons de *Galaxias maculatus* à des concentrations de 100 à 1500 ppb pendant quelques semaines. Leur étude n'a montré une augmentation significative entre lots témoin et exposé qu'à partir d'une exposition de 200 ppb de Cu. Dans une autre étude expérimentale portée sur des juvéniles de plie, sole et gobie exposés au mercure Hg et Pb (100 et 200 ppb) séparément pendant 45 jours, Geffen et al. (1998) ont montré une différence dans les otolithes entre individus témoins et exposés avec des valeurs de 4,7 ; 5,8 et 2,5 ppm pour 100 ppb et 6,8 ; 2,5 et 1,6 ppm pour 200 ppb de Pb injecté dans l'eau. Selon ces auteurs, l'accumulation du Pb est plus importante dans les otolithes à de faibles niveaux d'exposition (100 ppb). Notre étude qui a utilisé des concentrations beaucoup plus faibles, a montré dans les otolithes une concentration moyenne en Pb de 52 ppm en fin d'expérimentation, soit après 3 mois d'exposition, pour des concentrations dans l'eau de 15 ppb au maximum. Cette différence pourrait s'expliquer par la différence d'espèce considérée, de temps d'exposition ainsi que de cocktail de métaux.

Barbee et al., (2013) ont montré que le Pb acheminé par les MT dans la circulation sanguine peut entrer en compétition avec le carbonate de calcium, lui aussi, transporté par des protéines jusqu'à l'endolymphe dans laquelle flotte l'otolithe en développement. Il a également été montré que le Pb, Cd et Ni ne sont pas des éléments essentiels au métabolisme des poissons (Rosabal et al., 2015) ni à la concrétion des otolithes. En grandes concentrations, les métaux pourraient être incorporés dans cette structure calcique à la place les éléments essentiels. L'incorporation d'éléments métalliques tels que le Pb serait due à la substitution du calcium ou à une co-précipitation d'un autre carbonate de l'otolithe, comme cela a été montré avec le magnésium (e.g. MgCo₃) par Fritz et al. (1990) et Campana (1999).

Par ailleurs, le Cd accumulé dans les quatre tissus et dans les otolithes n'a pas pu être mis en lien avec les niveaux d'exposition. Ce résultat peut être expliqué par la présence d'un effet seuil de concentration en dessous duquel le Cd ne pourrait pas franchir la barrière de la membrane protectrice de l'otolithe afin de précipiter à la place du carbonate de calcium (Campana, 1999). Si la détection du Cd avait été possible dans les otolithes, il est probable

que la réponse des otolithes auraient été similaire à celle observée pour le Pb ; c'est-à-dire à une hausse de l'élément dans l'otolithe en fonction du niveau de contamination de l'eau.

L'analyse de la collection de poissons de l'estuaire a montré que le Pb, polluant commun dans les environnements urbains et naturellement présent en milieu aquatique, est plus élevé chez les poissons collectés en amont de l'estuaire de la Gironde. Ces résultats sont en accord avec les travaux de [Kraepiel et al. \(1997\)](#) qui ont montré que le plomb dissous est principalement biodisponible en grande concentration dans les zones de faible salinité. C'est le phénomène de désorption du Pb depuis la phase particulaire qui permet sa libération sous forme dissoute. En revanche la complexation du Pb avec les colloïdes inorganiques, augmente avec la salinité, et rend le métal moins biodisponible sous forme dissoute dans les zones à forte salinité ([Kraepiel et al., 1997](#)). La biodisponibilité du Pb, de ce fait, inversement corrélée à la salinité ([Baysoy et al., 2012](#)), entraînerait une plus forte accumulation des métaux traces dans les otolithes des organismes exposés en amont plutôt qu'en aval.

D'un point de vue interannuel, les concentrations en Pb mesurées dans les otolithes de flets de 2007 à 2014 montrent une tendance à la baisse avec des valeurs plus faibles ces dernières années, suggérant une diminution de la contamination métallique, du moins en plomb, dans l'estuaire de la Gironde. Ces résultats sont en accord avec les données du réseau ROCCH ([Synthèse Nationale de la Surveillance 2012, Ifremer](#)) indiquant la baisse sur la dernière décennie, des concentrations en métaux (Pb et Cd) mesurées sur les huîtres et les moules.

Les résultats des réglementations de la DCE se sont traduits par une baisse générale des niveaux de concentrations de Pb et de Cd observés chez les moules et les huîtres sur la décennie actuelle ([Synthèse Nationale de la Surveillance 2012, Ifremer](#)).

Chez la moule, *Mytilus edulis* et *Mytilus galloprovincialis*, aucune tendance ne se dessine pour le nickel qui demeure constant depuis plus de 10 ans à environ à 1,3 mg/kg (ppm). En revanche les valeurs de plomb et de cadmium ont montré une baisse depuis les années 90 avec des concentrations respectives de 2,7 ppm (Pb) et 1,5 ppm (Cd) en 1990 contre 1,7 ppm (Pb) et 0,6 ppm (Cd) en 2012. En revanche chez la moule, *M. edulis* et *M. galloprovincialis*, aucune tendance ne se dessine pour le nickel qui demeure constant depuis plus de 10 ans à environ à 1,3 mg/kg (ppm). Par contre chez l'huître, *Crassostrea gigas* et *Ostrea edulis*, les mêmes tendances, que pour la moule, stables et à la baisse sont observées avec une moyenne de 1,2 ppm de Ni depuis 1999. Pour le plomb et le cadmium, les valeurs sont respectivement les suivantes : 1,6 ppm (Pb) et 3,1 ppm (Cd) en 1990 contre 1,3 ppm (Pb) et 1,5 ppm (Cd) en 2012.

Les baisses de contamination indiquées par ces organismes sont à relier à l'abandon du plomb-tétraéthyle dans les essences, au renforcement des réglementations de l'usage du cadmium ou autres métaux menant à l'arrêt de certaines activités notoirement polluantes. Malgré ces efforts de gestion, les plus fortes contaminations restent toujours observées à la sortie de Bordeaux, qui reste sous l'effet des apports en cadmium et autres métaux transportés dans les sédiments fluviaux du bassin versant de la Garonne.

5. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les résultats obtenus dans le cadre de ce travail ont montré une accumulation progressive du Pb et du Cd dans les tissus des flets *P. flesus* en parallèle aux niveaux de contamination des bassins de l'expérimentation. Le foie et le rein ont cependant montré un stockage des métaux même pendant la phase de décontamination alors que le muscle n'a pas accumulé les métaux. Au niveau des otolithes, une augmentation significative des concentrations en Pb a été observée entre individus témoins et exposés uniquement en T3 et T4, résultant d'un phénomène de rétention du métal par les parois des bassins et entraînant un délai d'intégration.

L'utilisation des otolithes de flets du milieu naturel a permis de mettre en évidence une tendance à la baisse de la contamination par le plomb au cours de la dernière décennie dans l'estuaire de la Gironde. De même, des différences significatives ont été observées entre l'amont et l'aval de l'estuaire.

L'ensemble de ces résultats, mis en comparaison à d'autres études montrent que l'otolithe semble être potentiellement un bon traceur de la pollution métallique (ici pour le plomb) dans les écosystèmes aquatiques. Cet outil « boîte noire » se présente comme une alternative innovante aux méthodes couramment employées dans la surveillance de la qualité chimique des environnements aquatiques. Des études complémentaires validant son utilisation sont néanmoins nécessaires. Il serait intéressant de mener des expériences de décontamination sur des périodes plus longues, afin de comprendre les cinétiques de détoxification dans les tissus et d'intégration dans les otolithes. D'autre part, il serait aussi intéressant de reproduire un protocole similaire à la présente approche expérimentale, mettant en œuvre différents bassins exposés chacun à un niveau défini de contamination et sur différents temps, afin d'étudier plus particulièrement les seuils de détection des métaux traces dans les otolithes. Cela permettrait de définir au-dessus de quelle concentration et après combien de temps d'exposition le Cd, Pb et Ni seraient détectés.

Enfin, l'étude de l'origine du plomb, dosé dans nos otolithes, pourrait être déterminée grâce à l'isotopie, via l'utilisation du laser femtoseconde couplé à un multicollecteur. Une telle démarche analytique permettrait de déterminer la source de contamination responsable de l'apport en plomb dans la Gironde et ainsi rendrait le traçage de la contamination à long terme, plus complet.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Amara, R., J. Selleslagh, G. Billon, and C. Minier. 2009. "Growth and Condition of 0-Group European Flounder, *Platichthys Flesus* as Indicator of Estuarine Habitat Quality." *Hydrobiologia* 627.
- Andres, S., F. Ribeyre, J. -N. Tourencq, and A. Boudou. 2000. "Interspecific Comparison of Cadmium and Zinc Contamination in the Organs of Four Fish Species along a Polymetallic Pollution Gradient (Lot River, France)." *Science of The Total Environment* 248 (1): 11–25.
- Arini, A., P. Y. Gourves, P. Gonzalez, and M. Baudrimont. 2015. "Metal Detoxification and Gene Expression Regulation after a Cd and Zn Contamination: An Experimental Study on *Danio Rerio*." *Chemosphere* 128 (June): 125–133.
- Arini, A., C. Daffe, , P. Gonzalez, , A. Feurtet-Mazel, and M. Baudrimont. 2014a. "What are the Outcomes of an Industrial Remediation on a Metal-Impacted Hydrosystem? A 2-year field Biomonitoring of the Filter-Feeding Bivalve *Corbicula fulminea*." *Chemosphere* 108. 214–224.
- Arini, A., C. Daffe, P. Gonzalez, A. Feurtet-Mazel, and M. Baudrimont. 2014b. "Detoxification and Recovery capacities of *Corbicula fulminea* after an Industrial Metal Contamination (Cd and Zn) : a one-year depuration experiment." *Environ. Pollut.* 192. 74–82.
- Arini, A., M. Baudrimont, A. Feurtet-Mazel, A. Coynel, G. Blanc, M. Coste, and F. Delmas. 2011. "Comparison of Periphytic Biofilm and Filter-Feeding Bivalves Metal Bioaccumulation (Cd and Zn) to Monitor Hydrosystem Restoration after Industrial Remediation: a year of Biomonitoring." *J. Environ. Monit.* 13, 3386–3398.
- Audry, S., G. Blanc, J. Schäfer, F. Guérin, M. Masson, and S. Robert. 2007. "Budgets of Mn, Cd and Cu in the Macrotidal Gironde Estuary (SW France)." *Marine Chemistry* 107 (4): 433–448.
- Barbee, N. C., K. Ganio, and S. E. Swearer. 2014. "Integrating Multiple Bioassays to Detect and Assess Impacts of Sublethal Exposure to Metal Mixtures in an Estuarine Fish." *Aquatic Toxicology* 152 (July): 244–255.
- Barbee, N. C., A. Greig, and S. E. Swearer. 2013. "Validating the Use of Embryonic Fish Otoliths as Recorders of Sublethal Exposure to Copper in Estuarine Sediments." *Environmental Pollution* 178 (July): 441–446.
- Baysoy, E., G. Atli, C. Ö. Gürler, Z. Dogan, A. Eroglu, K. Kocalar, and M. Canli. 2012. "The Effects of Increased Freshwater Salinity in the Biodisponibility of Metals (Cr, Pb) and Effects on Antioxidant Systems of *Oreochromis Niloticus*." *Ecotoxicology and Environmental Safety* 84 (October): 249–253.
- Campana, S.E. 1999. "Chemistry and Composition of Fish Otoliths : Pathways, Mechanisms and Applications." *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 183, 263–297.
- Cannino, G., E. Ferruggia, C. Luparello, and A.M. Rinaldi. 2009. "Cadmium and Mitochondria." *Mitochondrion* 9 (6): 377–84.
- Cossa, D., D. Auger, B. Averty, M. Lucon, P. Masselin, and J. Noel. 1992. "Flounder (*Platichthys flesus*) Muscle as an Indicator of Metal and Organochlorine Contamination of French Atlantic Coastal Waters." *Ambio* 21. 176–182.
- Costanza, R., R. d' Arge, R. de Groot, S. Farber, M. Grasso, B. Hannon, K. Limburg, et al. 1998. "The Value of the World's Ecosystem Services and Natural Capital." *Ecological Economics* 25 (1): 3–15.
- Daverat, F., L. Lanceleur, C. Pécheyran, M. Eon, J. Dublon, M. Pierre, J. Schäfer, M. Baudrimont, and S. Renault. 2012. "Accumulation of Mn, Co, Zn, Rb, Cd, Sn, Ba, Sr, and Pb in the Otoliths and Tissues of Eel (*Anguilla Anguilla*) Following Long-Term Exposure in an Estuarine Environment." *Science of The Total Environment* 437 (October): 323–330.

- De Conto Cinier, C., M. Petit-Ramel, R. Faure, D. Garin, Y. Bouvet. 1999. "Kinetics of Cadmium Accumulation and Elimination in Carp *Cyprinus carpio* tissues." *Comp. Biochem. Physiol. C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 122; 345-352.
- Durrieu, G., R. Maury-Brachet, M. Girardin, E. Rochard, and A. Boudou. 2005. "Contamination by Heavy Metals (Cd, Zn, Cu, and Hg) of Eight Fish Species in the Gironde Estuary (France)." *Estuaries* 28 (4): 581–591.
- Edmond, J.M., A. Spivack, B.C. Grant, H. Ming Hui, C. Zegiam, C. Sung, Z. Xiushau. 1985. "Chemical Dynamics of the Changjiang Estuary." *Cont. Shelf. Res.* 4, 17-36.
- Elliott, M., & V. Quintino. 2007. "The Estuarine Quality Paradox, Environmental Homeostasis and the Difficulty of Detecting Anthropogenic Stress in Naturally Stressed Areas." *Marine Pollution Bulletin* 54 (6): 640–645.
- Elliott, M., & Hemingway, K.L., 2002. "Fishes in Estuaries. *Blackwell Science*, Oxford, 636 pp.
- Fritz, L.W., 1990. "Biomineralization of Barite in the Shell of the Freshwater Asiatic clam *Corbicula fluminea* (Mollusca; Bivalva). *Limnol Oceanogr.* 35: 756-762.
- Geffen, A.J., Pearce, N.J.G., Perkins, W.T., 1996. "Metal Concentrations in Fish otoliths in relation to Body Composition after Laboratory exposure to Mercury and Lead." *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 165. 235_245.
- Ifremer, 2013. "Qualité du Milieu Marin Littoral. Synthèse Nationale de la Surveillance 2012". 35-43.
- Jacobson, K. Bruce, and J. E. Turner. 1980. "The Interaction of Cadmium and Certain Other Metal Ions with Proteins and Nucleic Acids." *Toxicology* 16. 1-37.
- Jensen, Arne, & Zuolian Cheng. 1987. "Statistical Analysis of Trend Monitoring Data of Heavy Metals in Flounder (*Platichthys Flesus*)." *Marine Pollution Bulletin* 18 (5): 230–238.
- Jeziarska, B., & Witeska, M., 2006. "The Metal Uptake and Accumulation in Fish Living in Polluted Waters." Reference to chapter in an edited book; Twardowska, I., Allen, H., Haggblom, M., Stefaniak S., (Eds.) *Soil and Water Pollution Monitoring, Protection and Remediation: NATO Science Series. Springer, Netherlands*, pp. 107-114.
- Johnson, A., E. Carew, and K. A. Sloman. 2007. "The Effects of Copper on the Morphological and Functional Development of Zebrafish Embryos." *Aquatic Toxicology* 84 (4): 431–438.
- Kamunde, C. 2009. "Early Subcellular Partitioning of Cadmium in Gill and Liver of Rainbow Trout (*Oncorhynchus Mykiss*) Following Low-to-near-Lethal Waterborne Cadmium Exposure." *Aquatic Toxicology* 91 (4): 291–301.
- Kerambrun, E., F. Henry, V. Cornille, L. Courcot, and R. Amara. 2013. "A Combined Measurement of Metal Bioaccumulation and Condition Indices in Juvenile European Flounder, *Platichthys Flesus*, from European Estuaries." *Chemosphere* 91 (4): 498–505.
- Kraepiel, A. M. L., J. Chiffolleau, J. Martin, and F. M. M. Morel. 1997. "Geochemistry of Trace Metals in the Gironde Estuary." *Geochimica et Cosmochimica Acta* 61 (7): 1421–1436.
- Lanceleur, L., J. Schäfer, J. Chiffolleau, G. Blanc, D. Auger, S. Renault, M. Baudrimont, and S. Audry. 2011. "Long-Term Records of Cadmium and Silver Contamination in Sediments and Oysters from the Gironde Fluvial–estuarine Continuum – Evidence of Changing Silver Sources." *Chemosphere* 85 (8): 1299–1305.
- Langston, W. J, B. S. Chesman, G. R. Burt, N. D. Pope, and J. McEvoy. 2002. "Metallothionein in Liver of Eels *Anguilla Anguilla* from the Thames Estuary: An Indicator of Environmental Quality?" *Marine Environmental Research* 53 (3): 263–293.
- Larrose, A., A. Coynel, J. Schäfer, G. Blanc, L. Massé, and E. Maneux. 2010. "Assessing the Current State of the Gironde Estuary by Mapping Priority Contaminant Distribution and Risk Potential in Surface Sediment." *Applied Geochemistry* 25 (12): 1912–1923.
- Lobry, J. 2004. "Quel Référentiel de Fonctionnement pour les Ecosystèmes Estuariens ? Le cas des Cortèges de Poissons fréquentant l'Estuaire de la Gironde." *PhD thesis*, Université Bordeaux 1, 218 pp.

- Maury-Brachet, R., E. Rochard, G. Durrieu, and A. Boudou. 2007. "The 'Storm of the Century' (December 1999) and the Accidental Escape of Siberian Sturgeons (*Acipenser Baerii*) into the Gironde Estuary (Southwest France)." *Environmental Science and Pollution Research* 15 (1): 89–94.
- McHugh, J.L. 1967. "American Association for the Advancement of Science Publication." *Estuarine nekton*. Vol 83.
- Moulis, J.M. 2010. "Cellular Mechanisms of Cadmium toxicity related to the Homostasis of essential metals". *Biometals* 23, 877-896.
- Pokorska, K., M. Protasowicki, K. Bernat, and M. Kucharczyk. 2012. "Content of Metals in Flounder, *Platichthys flesus* L., and Baltic herring, *Clupea harengus membras* L., from the Southern Baltic Sea." *Arch. Pol. Fish.* 20: 51-53.
- Post, J.C., & C.G. Lundin. 1996. "Guidelines for Integrated Coastal Zones Management." In: *Environmentally Sustainable Development Studies and Monographs Series No. 9. World Bank, Washington, DC*, 16 pp.
- Ranaldi, M. M., and M. M. Gagnon. 2010. "Trace Metal Incorporation in Otoliths of Pink Snapper (*Pagrus Auratus*) as an Environmental Monitor." *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 152 (3): 248–55.
- Ranaldi, M. M., and M. M. Gagnon. 2008. "Trace Metal Incorporation in Otoliths of Black Bream (*Acanthopagrus Butcheri* Munro), an Indicator of Exposure to Metal Contamination." *Water, Air, and Soil Pollution* 194 (1-4): 31–43.
- Rosabal, M., F. Pierron, P. Couture, M. Baudrimont, L. Hare, and P. G. C. Campbell. 2015. "Subcellular Partitioning of Non-Essential Trace Metals (Ag, As, Cd, Ni, Pb, and Tl) in Livers of American (*Anguilla Rostrata*) and European (*Anguilla Anguilla*) Yellow Eels." *Aquatic Toxicology* 160 (March): 128–141.
- Sárria, M. P., M. M. Santos, M. A. Reis-Henriques, N. M. Vieira, and N. M. Monteiro. 2011. "Drifting towards the Surface: A Shift in Newborn Pipefish's Vertical Distribution When Exposed to the Synthetic Steroid Ethinylestradiol." *Chemosphere* 84 (5): 618–624.
- Sloman, K. A., & P.L. McNeil. 2012. « Using Physiology and Behaviour to Understand the Responses of Fish Early Life Stages to Toxicants. *J. Fish Biol.* 81. 2175-2198.
- Selleslagh, Jonathan, & Rachid Amara. 2013. "Effect of Starvation on Condition and Growth of Juvenile Plaice *Pleuronectes Platessa*: Nursery Habitat Quality Assessment during the Settlement Period." *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 93 (Special Issue 02): 479–488.
- Selleslagh, J., R. Amara, P. Laffargue, S. Lesourd, M. Lepage, and M. Girardin. 2009. "Fish Composition and Assemblage Structure in Three Eastern English Channel Macrotidal Estuaries: A Comparison with Other French Estuaries." *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 81 (2): 149–159.
- Turner, A., M. Martino, S.M. Le Roux. 2002. "Trace Metal Distribution Coefficients in the Mersey Estuary UK.": Evidence for Salting of Metal Complexes. *Environ. Sci. Technol.* 36, 4578-4584.
- Van Campenhout, K., H. Goenaga Infante, G. Goemans, C. Belpaire, F. Adams, R. Blust, and L. Bervoets. 2008. "A Field Survey of Metal Binding to Metallothionein and Other Cytosolic Ligands in Liver of Eels Using an on-Line Isotope Dilution Method in Combination with Size Exclusion (SE) High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) Coupled to Inductively Coupled Plasma Time-of-Flight Mass Spectrometry (ICP-TOFMS)." *Science of The Total Environment* 394 (2–3): 379–389.
- Vanderborcht, J., I. M. Folmer, D. R. Aguilera, T. Uhrenholdt, and P. Regnier. 2007. "Reactive-Transport Modelling of C, N, and O₂ in a River–estuarine–coastal Zone System: Application to the Scheldt Estuary." *Marine Chemistry*, Special issue: Dedicated to the memory of Professor Roland Wollast, 106 (1–2): 92–110.

- Vinagre, C., S. França, M. J. Costa, and H. N. Cabral. 2004. "Accumulation of Heavy Metals by Flounder, *Platichthys Flesus* (Linnaeus 1758), in a Heterogeneously Contaminated Nursery Area." *Marine Pollution Bulletin* 49 (11–12): 1109–1113.
- Winter, S. 1996. "Cadmium Uptake Kinetics by Freshwater Mollusc Soft Body under Hard and Soft Water Conditions." *Chemosphere* 32 (10): 1937–1948.

ANNEXES

L'indice de condition (moyenne \pm ET), ainsi que la taille et le poids moyen est présenté dans le tableau 1 pour des individus de l'expérimentation par bassin et niveau de contamination.

Tableau 1: Lt, longueur totale (mm) ; W, poids (mg) et indice de condition K de Fulton des juvéniles de *P. flesus* au cours de l'expérimentation. Ac, acclimatation, T, témoins, C1/C2, contaminés 1et 2.

Niveaux de contamination	Bassins	Significativités	Lt (mm)	W (mg)	K (mg.mm ⁻³)
T0	Ac	a	65,50 \pm 6,75	2087,58 \pm 1112,26	0,79 \pm 0,04
T1	T	a	74,80 \pm 9,68	3482,68 \pm 1713,07	0,78 \pm 0,08
	C1	a	70,40 \pm 10,06	3008,86 \pm 940,38	0,84 \pm 0,07
	C2	a	67,40 \pm 5,94	2873,00 \pm 1197,84	0,90 \pm 0,16
T2	T	a	72,80 \pm 6,91	3733,90 \pm 943,37	0,96 \pm 0,08
	C1	a	72,30 \pm 9,49	3766,40 \pm 1612,82	0,95 \pm 0,10
	C2	a	72,90 \pm 6,17	3690,03 \pm 1194,11	0,92 \pm 0,11
T3	T	a, b	80,60 \pm 10,50	6590,04 \pm 2415,39	1,26 \pm 0,50
	C1	b	77,60 \pm 9,01	5391,97 \pm 1800,92	1,12 \pm 0,07
	C2	a	77,40 \pm 7,57	4767,58 \pm 1105,90	1,02 \pm 0,10
T4	T	b	73,67 \pm 4,37	4815,92 \pm 701,30	1,20 \pm 0,06
	C1	a	72,83 \pm 6,21	4089,50 \pm 1066,75	1,04 \pm 0,08
	C2	b	65,20 \pm 5,81	3547,24 \pm 955,67	1,26 \pm 0,09

Les volumes d'acide et d'eau Milli-Q ajoutés aux échantillons, sont représentés dans le tableau 2.

Tableau 2 : Volumes d'acide nitrique et d'eau Milli-Q ajoutés aux tissus respectivement avant et après la minéralisation ; selon leur poids

Poids sec (mg)	2	2 - 5	5 - 20	20 - 50	50 - 100	> 100
Volume HNO ₃ (ml)	0,2	0,3	1	2	3	5
Volume eau Milli-Q (ml)	1	1,5	5	10	15	25

RESUME

L'estuaire de la Gironde est un écosystème historiquement pollué par de nombreux contaminants potentiellement toxiques pour l'ichtyofaune. La contamination métallique a souvent été mesurée en système aquatique par dosages de l'eau et/ou des tissus biologiques alors qu'ils nécessitent des prélèvements réguliers et que les tissus éliminent les contaminants en se régénérant. L'objectif de ce travail consiste à évaluer, par approche expérimentale, le potentiel d'utilisation des otolithes comme traceurs naturels permanents de la contamination métallique des habitats de poissons. La bioaccumulation du Cd, Pb et Ni administrés à 210 juvéniles de *P. flesus* a été analysée dans les tissus (par ICP-OES ou SAA) et les otolithes (par couplage laser femtoseconde/ICPMS-HR) après 3 mois d'exposition progressive (T1 : concentration environnementale, T2 : x 5 ; T3 : x10 ; T4 : dépuration) et contrôlée aux métaux. Les résultats ont montré de manière générale une accumulation des métaux dans les tissus (excepté pour le muscle) en lien avec le niveau de contamination des bassins. Au cours de la dépuration, le foie et le rein montrent des niveaux toujours élevés, indiquant un transfert des métaux vers ces organes de stockage. Les résultats ont montré également une incorporation du plomb dans les otolithes avec un retard de 15 jours, qui augmente significativement et progressivement à T3 et T4. Ces résultats expérimentaux soulignent la potentialité d'utilisation des otolithes comme indicateur de la contamination métallique des habitats de poissons. La microchimie des otolithes de *P. flesus* capturés dans l'estuaire de la Gironde a mis en évidence une variation interannuelle du niveau de contamination métallique avec une tendance à la baisse ces dernières années observée pour le plomb; expliquée par les récents efforts de gestion.

Mots clés : *Platichthys flesus*, microchimie des otolithes, contamination métallique, tissus, expérimentation, Gironde.

ABSTRACT

The Gironde estuary is an ecosystem historically polluted by numerous and potentially toxic contaminants for ichthyofauna. Metal contamination has often been measured in aquatic system by dosages of water and or biological tissues while they require regular samplings and that tissues remove contaminants by regenerating. The aim of this study was to assess, by experimental approach, the potential use of otolith as permanent and natural tracers of metal contamination of fish habitats. Bioaccumulation of Cd, Pb and Ni administered to 210 European flounder juveniles, *Platichthys flesus*, was analyzed in tissues (by ICP-OES and AAS) and otoliths (by High-Resolution ICPMS coupled with a femtosecond laser) after 3 months of increasing (T1 : environmental concentration, T2 : x 5 ; T3 : x10 ; T4 : depuration) and controlled exposure to metals. Results showed generally a metal accumulation in the tissues (except muscle), linked to the contamination levels. Liver and kidney showed high metal levels even during depuration, revealing a metal transfer to these storage organs. Microchemistry showed accumulation of Pb in otoliths with a 15-days delay, increasing gradually and significantly at T3 and T4. These experimental results highlight the potential use of otolith as an indicator of metal contamination of fish habitats. The use of otolith microchemistry of *P. flesus* collected in the Gironde estuary, revealed interannual changes of metal contamination with a Pb concentration decreasing trend, probably explained by recent management efforts.

Keywords: *Platichthys flesus*, otolith microchemistry, metal pollution, tissues, experiment, Gironde.