HAL open science

Herpetofauna, a sentinel of the accumulation and the effects of environmental contaminants

Héloïse Guillot

To cite this version:

Héloïse Guillot. Herpetofauna, a sentinel of the accumulation and the effects of environmental contaminants. Environmental Sciences. Université de La Rochelle, 2017. English. NNT : . tel-01646379

HAL Id: tel-01646379

https://hal.science/tel-01646379v1

Submitted on 23 Nov 2017

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.

THÈSE

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LA ROCHELLE

École Doctorale : Sciences pour l'Environnement Gay Lussac

Spécialité : Biologie de l'environnement, des populations, écologie

Présentée par :

Héloïse Guillot

L'HERPETOFAUNE, SENTINELLE DE L'ACCUMULATION ET DES EFFETS DES CONTAMINANTS ENVIRONNEMENTAUX ?

Directeurs de thèse : **François Brischoux** & **Xavier Bonnet**

Soutenue le 26 octobre 2017 devant la Commission d'Examen

JURY

Pierre Grève, Professeur, Université de Poitiers	Rapporteur
Yann Voituron, Professeur, Université Lyon 1	Rapporteur
Aurélie Goutte, Maître de Conférences, Université Pierre et Marie Curie	Examinateur
Paco Bustamante, Professeur, Université de La Rochelle	Examinateur
François Brischoux, Chargé de Recherche, CEBC-CNRS	Directeur de Thèse
Xavier Bonnet, Directeur de Recherche, CEBC-CNRS	Directeur de Thèse

« Force et courage !»

REMERCIEMENTS

En premier lieu, je tiens à remercier François et Xavier pour m'avoir fait confiance avec ce sujet et m'avoir accompagnée tout au long de ce projet. François, merci pour ton investissement, ta disponibilité, mais aussi pour la liberté que tu m'as laissé pour mener ce travail à bien, que j'ai essayé d'exploiter au mieux, parfois avec maladresse, et qui m'aura permis d'apprendre énormément de cette expérience. Merci Xavier d'avoir co-encadré cette thèse, pour tous les bons conseils que tu m'as donnés, pour ton humour, et pour le chocolat !

Dans l'ensemble, je remercie tous les membres de l'équipe Ecophy, chercheurs, postdocs, thésards et stagiaires. Merci pour votre bonne humeur, pour tous les petits coups de main, qui auront contribué à créer un environnement de travail très agréable. Un grand merci aux stagiaires qui ont donné quelques-unes de leurs soirées pour m'aider sur le terrain : Robin Drieu, Cyril Scomparin, Guillemette Labadie, Ayala Loisel, Candice Michelot. Merci également à Xavier Duchemin pour ses coups de mains à l'élevage, et à Carine Churlaud et Maud Brault-Favrou pour leur aide lors des analyses. Merci à Laura pour un stage exemplaire et pour ton investissement durant ton stage, mais également durant les mois qui ont suivi. Enfin merci à tout le personnel technique et administratif pour votre disponibilité qui nous permet de travailler dans de bonnes conditions, et à Christophe et Arnaud pour nous régaler tous les jours avec vos petits plats dignes d'un resto 4 étoiles.

Je remercie également la Région Poitou-Charentes, le Conseil Général des Deux-Sèvres et les Agences de l'Eau Loire-Bretagne et Adour-Garonne pour les soutiens financiers nécessaires à cette thèse. Merci au Laboratoire Sèvres-Atlantique pour avoir mené à bien les dosages de contaminants et au personnel de la Réserve naturelle nationale de Chérine et à toutes les autres personnes ayant participé à la collecte des échantillons de serpents et de tortues.

Enfin merci à Pierre Grève, Yann Voituron, Paco Bustamante et Aurélie Goutte d'avoir accepté d'évaluer mes travaux et de faire partie de mon jury de thèse.

Merci à tous les habitants de busard, albatros et ragondin qui se sont succédés pendant ces trois années, de ceux avec qui j'ai passé tout mon temps, à ceux dont j'ai déjà oublié le nom (oups), mais qui auront contribué de près ou de loin à ce que je me sente comme chez moi au CEBC, et qui n'ont jamais rechigné à ce que je m'incruste à leurs repas ou leurs apéros ! Merci Monica, Ayala, Guillemette, Simon, Jacquie, Jessie, Cyril, Robin, Marina, Florian, Alex et tous les autres !

Parmi ces personnes, certaines ont pris plus d'importance, alors merci pour ces amitiés qui sont devenues essentielles. Merci pour les barbec, les apéros, les soirées danses jusqu'au bout de la nuit, les blind tests (dont je reste la reine incontestée, n'est-ce-pas ?), les barbus, les lendemains de chouille un peu moins frais, les week-ends, et surtout merci pour votre soutien ! Merci à Nathan, Candice, Amaury, Fanny et Anthony, je vous aime !

Merci à ma première copine de bureau, devenue colocataire de quelques mois, devenue partenaire obligatoire des soirées sushis ! Merci ma Chloé d'avoir été là dès que j'avais besoin de me changer les idées, de discuter pendant des heures au lieu de bosser ou d'aller faire du shopping ! Merci aussi d'avoir choisi de rester dans les Deux-Sèvres après ton passage à Chizé (faut le vouloir quand même) histoire de rester près de nous un peu plus longtemps !

Evidement merci aussi à mon petit Dragan, sans qui le bureau semble toujours très vide. Thanks for the afternoons of talking instead of working, thanks for the musical discoveries, thanks for the "wine and cheese" evenings, thanks for Макотрпна and thanks for other stuff that I'm sure you know, and that I don't need to write !

Mention spéciale à Juju, colocataire du tonnerre, pour m'avoir supportée pendant 2 ans, pour avoir accepté de m'écouter patiemment déblatérer pendant des heures sur mes angoisses du futur, et pour m'avoir refait découvrir les joies de la philosophie pendant nos quelques longues soirées à thème « existentialisme versus déterminisme », « comment faire de la bonne science », « qu'est-ce que la tolérance » et bien d'autres !

Une pensée particulière pour ma « copine de thèse », celle sans qui les dernières semaines « en mode hardcore » auraient été nettement plus tristes, ma Loy ! Merci pour le soutien mutuel des derniers jours, pour les discussions à deux heures du matin qui permettaient de décompresser, merci de m'avoir réconfortée quand ça n'allait pas fort, et de m'avoir rassurée sur le fait que je n'étais pas la seule à connaitre les effets bizarres du stress chronique ! Evidemment, merci aussi pour tous les bons moments qu'on aura vécu avant les derniers jours d'enfer ! Force et courage !

Merci aussi à ma petite Cécile pour ta folie pendant les cours de zumba, les soirées filles et les cocktails, les samossas, les gâteaux !

Un merci obligatoire également à ceux arrivés à mi-chemin de l'aventure, mais dont la présence s'est vite avérée indispensable Camille, Sam, Rui et David !

Enfin, merci à tous les membres de l'AREB que je n'ai pas encore cité ici ! Flo, Gaetan, Pierre, Juliette, Lucas, Anais, Sophie, Eugénie, Paul. Merci pour cette expérience folle qu'aura été l'organisation des Rencontres « Ecology and Behaviour ». Je suis très fière d'avoir pu participer à ce projet avec vous tous. Vous avez été une équipe géniale, et chacun à votre façon, vous aurez contribué à rendre cette expérience à la fois agréable, intéressante, et enrichissante.

Enfin, un énorme merci à tous les amis d'Alsace, pour ne pas m'avoir oubliée pendant ces trois années, malgré mes retours plutôt rares en mère patrie ! Merci d'avoir toujours été présents quand je revenais, comme si on s'était vu la veille, et d'être toujours là même quand je ne donne pas de nouvelles pendant des mois ! Sarah, Marion, Charlyne, Maïté, Mélanie, Thom, Félicien et les autres… !

Pour finir, il me faut bien évidemment absolument remercier ma petite famille. Merci pour votre foi apparemment inébranlable en moi, votre soutien inconditionnel et pour m'avoir toujours encouragée quels que soient mes projets ! En arriver là aurait été bien difficile, voire impossible, sans vos conseils, votre présence et votre amour. J'espère vous avoir rendu fiers et continuer à le faire.

PUBLICATIONS

Guillot H., Boissinot A., Angelier F., Lourdais O., Bonnet X., and Brischoux F., 2016. Landscape influences the morphology of male common toads (*Bufo bufo*). Agriculture, Ecosystems and Environment. 233, 106-110.

Guillot H., Bonnet X., Bustamante P., Churlaud C., Trotignon J. and Brischoux F., Trace element concentrations in European pond turtles (*Emys orbicularis*) from Brenne Natural Park, France. Soumis à Environmental Monitoring and Assessement.

Guillot H., Bonnet X., Kouyoumjian L. and Brischoux F., The primary metabolite of glyphosate influences tadpole morphology and mobility in the common toad (Bufo bufo). (En preparation)

COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

SETAC Europe 26th Annual Meeting, 22-26 Mai 2016, Nantes – Poster

12ème Rencontres "Ecology & Behaviour", 27 Juin-1er Juillet 2016, Lyon – Poster

4th Young Natural History scientists' Meeting, 7-11 Février 2017, Paris – Oral

ENCADREMENTS ET VULGARISATION

Festival International du Film Ornithologique, 31ème (2015) et 32ème (2016) éditions, Ménigoute – Présentations à l'intention du grand public

Encadrement de projets personnels d'étudiants du M1 "Biologie et Ecologie des Populations" de l'Université de Poitiers, Septembre 2014 et Septembre 2015

Encadrement de Laura Kouyoumdjian, stagiaire de L3 Biologie et Environnement de l'Université Paris-Est, Créteil, Val de Marne, Avril à Juin 2016

Trésorière de l'AREB (Association des Rencontres Ecology & Behaviour), organisation des 13ème Rencontres "Ecology & Behaviour", Septembre 2016 à Juin 2017

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION GENERALE **1**

1. La contamination de l'environnement par les activités humaines 2
2. L'Evaluation du risque environnemental et la notion d'espèces sentinelles 4
3. L'herpétofaune comme sentinelle de la contamination environnementale 6
4. Problématique de la thèse 8

CHAPITRE 1 - BIOACCUMULATION DE CONTAMINANTS ENVIRONNEMENTAUX CHEZ DIFFERENTES ESPECES DE REPTILES **11**

Introduction du chapitre 1 **12**

Partie 1 : Accumulation de polluants organiques chez plusieurs espèces de serpents **15**

1. Introduction de la partie 1 15
2. Matériel et méthode 22
3. Résultats 37
4. Discussion et conclusion de la partie 1 44

Partie 2 - Accumulation des éléments traces chez une espèce de tortue d'eau douce, la Cistude d'Europe (*Emys orbicularis*) **52**

1. Introduction de la partie 2 52
2. Article 1 55

Conclusion du Chapitre 1 **70**

CHAPITRE 2 - INFLUENCE DE L'HABITAT AGRICOLE SUR UNE ESPECE D'AMPHIBIEN, LE CRAPAUD COMMUN (*BUFO BUFO*) **73**

1. Introduction du chapitre 2 74
2. Article 2 79
3. Conclusion du chapitre 2 90

CHAPITRE 3 - IMPACT D'UN METABOLITE DU GLYPHOSATE SUR LE DEVELOPPEMENT LARVAIRE DU CRAPAUD COMMUN (*BUFO BUFO*) 92

1. Introduction du chapitre 3 93
2. Article 3 100
3. Conclusion du chapitre 3 111

CONCLUSION GENERALE 113

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 122

INTRODUCTION GENERALE

1. LA CONTAMINATION DE L'ENVIRONNEMENT PAR LES ACTIVITES HUMAINES

Au cours des derniers siècles les activités humaines ont profondément altéré l'environnement global. Au fur et à mesure de l'expansion de la population, de nouvelles découvertes ont permis à l'homme de dominer et de modifier son milieu, et ont accru son emprise sur celui-ci (Foley et al., 2005 ; Fisher et Lindenmayer, 2007). Les XIXème et XXème siècles ont constitué une période de transformations profondes, marquée par des progrès rapides en science et technologies, qui ont entrainé des avancées majeures dans les domaines de l'industrie et de l'agriculture. Cette évolution a eu des impacts importants sur les écosystèmes, en faisant évoluer l'utilisation de l'espace, en modifiant la structure des paysages, en affectant la diversité biologique, ou encore en modifiant les caractéristiques physico-chimiques des compartiments environnementaux (Sala et al., 2000 ; Fisher and Lindenmayer, 2007). L'altération de l'environnement par les activités humaines est donc considérable et ne cesse d'augmenter. Elle a lieu de façon complexe à travers différents processus qui agissent en interaction les uns avec les autres (Figure 1), parmi lesquels on compte la perte et la fragmentation des habitats, la surexploitation des ressources, les changements climatiques, ou encore la pollution due à la propagation de contaminants (Vitousek, 1997 ; Sparling et al., 2010).

Une des conséquences majeures du développement important des activités industrielles et agricoles du siècle dernier a en effet été l'utilisation massive de substances chimiques ayant des caractéristiques très variées et répondant à divers besoins. L'essor et le développement de ces secteurs a donc conduit à la dispersion d'innombrables composés souvent nouveaux et potentiellement toxiques, considérés comme polluants, dans les milieux naturels. Les polluants sont définis par Moriarty (1988) comme « des substances présentes dans l'environnement, en partie à cause des activités humaines, et qui ont des effets délétères sur les organismes vivants ». Après leur rejet, ces substances contaminent donc les différents compartiments de l'environnement, et peuvent s'accumuler dans les plantes, les sédiments, et le long des chaînes alimentaires (Forbes et Forbes, 1997).

Malgré la contamination générale de l'environnement de plus en plus évidente, la production, la consommation et le rejet de substances chimiques ne cesse d'augmenter. Depuis ces dernières décennies, la pollution environnementale est donc un des problèmes majeurs auquel est confronté le monde moderne (Carson, 1962 ; Moriarty, 1988 ; Sparling et al., 2010).

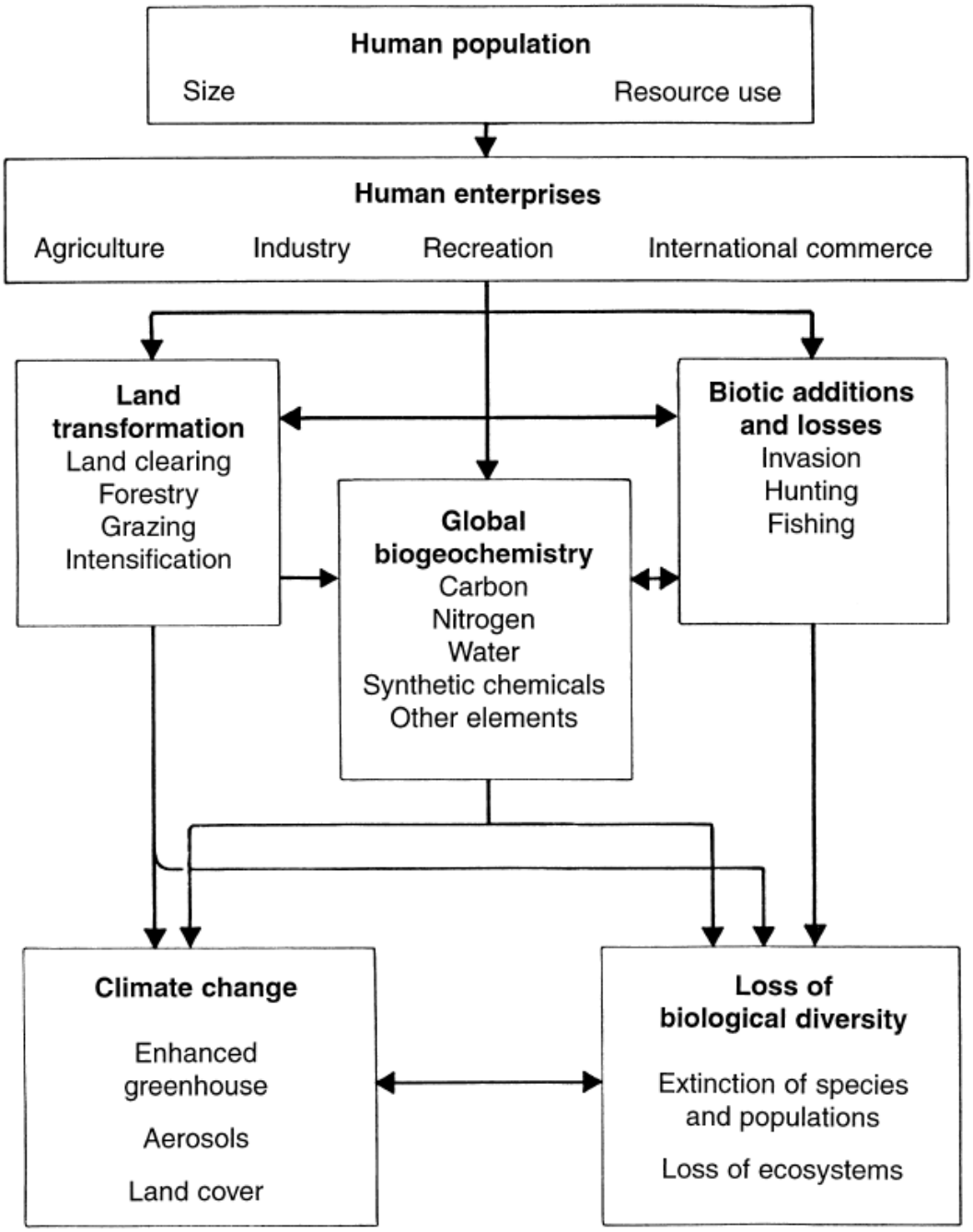


Figure 1. Modèle conceptuel des effets directs et indirects des activités humaines sur l'environnement (Vitousek, 1997)

2. L'EVALUATION DU RISQUE ENVIRONNEMENTAL ET LA NOTION D'ESPECES SENTINELLES

A partir des années 70, on assiste à une prise de conscience quant aux conséquences néfastes sur les milieux naturels et la santé potentiellement associées à la grande quantité de substances chimiques libérée dans l'environnement. De cette prise de conscience, nait une nouvelle discipline, l'écotoxicologie. De manière générale, le rôle de cette discipline est de développer des outils afin de permettre la localisation des zones polluées, l'identification des contaminants présents et l'évaluation du risque qu'ils font courir à la santé des écosystèmes en déterminant leurs effets sur les organismes vivants, y compris l'homme (Moriarty, 1988 ; Hopkins, 2000 ; Sparling et al., 2010). Cet objectif est difficile à atteindre, étant donné que les risques associés à l'entrée d'un composé potentiellement toxique dans un écosystème dépendent d'une part de la toxicité du composé, du degré d'exposition des milieux naturels, de la part de ce composé assimilable par les différents organismes vivants, et enfin des réactions physiologiques et des individus contaminés.

Les progrès de ces dernières années en chimie analytique permettent de mesurer la présence de très nombreux composés dans des matrices diverses (eau, sol, air), mais ces mesures seules ne donnent pas d'informations pertinentes sur le risque toxicologique encouru par le vivant (Rivière, 1993). De ce fait, la recherche a également recours à des tests conduits en laboratoire qui permettent d'établir la nature des effets toxiques et les relations dose-effet observables chez les organismes. Néanmoins, ces tests ne permettent pas de prendre en compte la complexité du fonctionnement d'un écosystème. Pour évaluer efficacement le risque environnemental, une surveillance biologique de l'environnement doit être mise en place en complément de cette approche en laboratoire (Beeby, 2001). Afin de déterminer la disponibilité des contaminants dans l'environnement, d'estimer l'exposition des individus, et d'évaluer les conséquences pour ces organismes, il est nécessaire d'utiliser des outils qui permettent de fournir une image précise, tant quantitative (concentrations des contaminants) que qualitative (nature des contaminants et effets induits chez les organismes) de la pollution des écosystèmes.

En pratique il semble impossible de faire des mesures exhaustives et de surveiller chaque parcelle de terrain et chaque espèce présente. Pour ce faire, il parait donc judicieux d'avoir recours à des espèces sentinelle. Les espèces sentinelles possèdent des caractéristiques qui permettent d'obtenir des informations pertinentes sur le type, les niveaux, la disponibilité et les effets des contaminants environnementaux (Beeby, 2001 ; Basu et al., 2007). Elles peuvent ainsi par exemple indiquer la part de biodisponibilité des contaminants dans un écosystème par la concentration des polluants accumulés dans les tissus. Elles peuvent également informer sur les impacts de différents niveaux de contamination environnementale par leur présence ou absence, leur abondance, ou encore par les effets observables chez leur représentants.

Le choix d'une espèce sentinelle s'effectue selon plusieurs critères. En premier lieu, une espèce sentinelle doit être largement distribuée, afin de permettre une évaluation de la contamination à large échelle et de permettre des comparaisons entre régions. Il est par ailleurs préférable que cette espèce soit sédentaire et vive sur un territoire de surface peu importante, afin que l'information obtenue puisse se rapporter à une zone précise. Il est intéressant que l'espèce en question puisse témoigner de la contamination d'un ensemble d'espèces avec lesquelles elle cohabite. Certains polluants sont sujets à la bioamplification, qui désignes l'augmentation cumulative de la concentration d'un composé à mesure que l'on progresse dans la chaînes alimentaire. De ce fait, il est judicieux de choisir une espèce se situant dans les niveaux supérieurs du réseau trophique, afin d'attester de la présence de polluants dans les tissus des espèces situées dans les niveaux plus bas. Une espèce également longévive pourra témoigner de la capacité d'un contaminant à se bioaccumuler dans un organisme au cours du temps. Le fait que l'espèce choisie vive en sympatrie avec des espèces menacées, peut être judicieux afin que l'évaluation du risque environnemental soit également pertinente pour ces dernières. En effet, l'utilisation directe d'espèce menacées est plus délicate, notamment si elle nécessite le prélèvement et le sacrifice d'individus (Rivière, 1993 ; Beeby, 2001 ; Basu et al., 2007 ; Ciliberti et al., 2011).

3. L'HERPETOFAUNE COMME SENTINELLE DE LA CONTAMINATION ENVIRONNEMENTALE

L'herpetofaune fait communément référence aux espèces appartenant aux deux classes de vertébrés que sont les reptiles et les amphibiens. A travers le monde, de nombreuses espèces de reptiles et d'amphibiens sont menacées. Parmi près de 16 000 espèce d'amphibiens et de reptiles répertoriées, l'IUCN considère en effet que près de deux tiers encourent un risque d'extinction (Sparling et al., 2010). Les causes régulièrement citées pour expliquer ces déclins comptent la perte d'habitat, la compétition ou la prédation par des espèces exotiques entrainant une compétition ou une prédation, le changement climatique, les maladies (pathogènes introduits et augmentation de la prévalence de pathogènes locaux), et enfin, la contamination chimique de l'environnement. En général il est admis que ces facteurs interagissent de manière complexe, mais certains semblent avoir un impact plus important que d'autres, ce qui est le cas de la pollution environnementale (Figure 2). Plusieurs études ont en effet montré une forte corrélation entre la présence de contaminants environnementaux et le déclin de populations d'amphibiens et de reptiles (Gibbons et al., 2000 ; Bank et al., 2006 ; Davidson et Knapp, 2007 ; Schiesari et al., 2007).

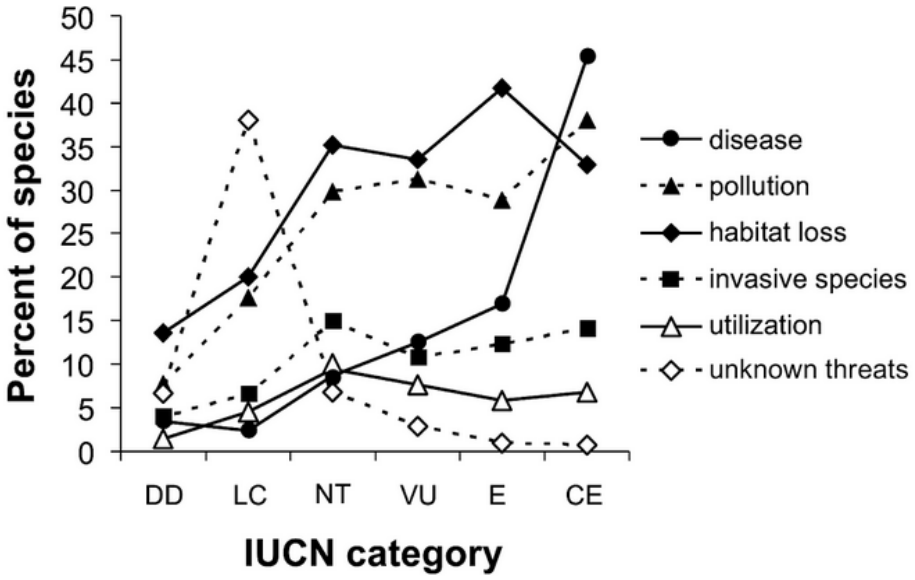


Figure 2 : Proportion d'espèces d'amphibiens, selon leur statut IUCN, menacées par les 6 principales catégories de causes identifiées du déclin des amphibiens. (statuts IUCN présentés selon leur ordre de sévérité : DD = data deficient ; LC = Least Concern ; NT = Near Threatened ; VU = Vulnerable ; E = Endangered : CE = Critically Endangered (Sparling et al., 2010)

Les amphibiens constituent environ 20% et les reptiles 28% des espèces connues de vertébrés. De plus, ce sont deux classes d'organismes écologiquement très importantes dans leurs habitats respectifs (Hopkins, 2000 ; Sparling et al., 2010). Etant donné le rôle majeur joué par la pollution dans le statut précaire de ces espèces, on pourrait s'attendre à ce que les études de l'impact des contaminants environnementaux sur ces organismes soient nombreuses. Cependant, la littérature concernant l'écotoxicologie des amphibiens et des reptiles reste relativement modeste comparé aux autres classes de vertébrés. En 2010, Sparling et al. estiment la part de la littérature en écotoxicologie traitant des amphibiens de seulement 3,8 %, et de moins de 1% concernant les reptiles, face à près de 70% de la littérature concernant les poissons, environ 20% concernant les mammifères, et 9% environ les oiseaux. Plus d'études sont donc nécessaires pour une compréhension complète de l'impact de la contamination environnementale sur les reptiles et les amphibiens.

Pourtant, plusieurs auteurs suggèrent que ces organismes possèdent par ailleurs des caractéristiques écologiques et biologiques qui les rendent particulièrement intéressantes en tant qu'espèces sentinelles (Hopkins, 2000 ; Campbell et Campbell, 2001). Beaucoup d'espèces de reptiles et d'amphibiens ont des domaines vitaux restreints, ce qui permet une analyse du risque très localisée. Si certaines espèces de ces deux classes sont en déclin, d'autres restent largement distribuées et présentes dans un grand nombre de milieu. De plus, la majorité des espèces de reptiles sont carnivores et occupent une position élevée dans les réseaux ce qui les rend sensibles aux contaminants bioamplifiables (Hopkins, 2000 ; Campbell et Campbell, 2001 ; Sparling et al., 2010). Enfin, ce sont des organismes poïkilothermes et ectothermes, dont la température interne varie en fonction de celle du milieu extérieur. Leur physiologie se distingue ainsi de celle des endothermes par deux aspects : pour une même température, ils présentent un métabolisme inférieur, mais un taux de conversion de biomasse plus efficace (Pough, 1983 ; Hop et al., 2002). Or, les potentiels de bioaccumulation et de bioamplification des substances dépendent fortement du taux métabolique de chaque organisme, ce qui peut également influencer les effets associés (Hop et al., 2002).

Il est donc important de ne pas négliger les organismes présentant ces caractéristiques lors de l'analyse du risque environnemental, afin de prendre en compte toutes les particularité des espèces présentes dans un écosystème (Hop et al., 2002 ; Bergeron et al., 2010).

4. PROBLEMATIQUE DE LA THESE

4.1. Objectifs

Dans le cadre de ce travail de thèse, la question qui se pose est donc la suivante : comment mesurer de manière efficace l'exposition des écosystèmes aux substances toxiques issues des activités humaines, et comment en mesurer les effets sur les organismes vivants ? Dans cette thèse, nous avons voulu tenter d'apporter des éléments de réponse en utilisant des espèces sentinelles faisant partie d'un groupe souvent négligé pour ce type d'étude, l'herpetofaune. L'objectif de cette thèse est d'évaluer la contamination de l'environnement par diverses substances potentiellement polluantes, et d'en évaluer les effets sur les organismes en utilisant plusieurs espèces de reptiles et d'amphibiens. Pour ce faire, nous avons travaillé sur trois aspects différents, mais néanmoins complémentaires, d'une évaluation du risque environnemental :

- en déterminant le degré d'exposition des organismes à certains contaminants, par mesure des concentrations accumulées dans les tissus d'espèces reptiles
- en évaluant l'influence d'un habitat potentiellement contaminé sur des traits individuels des individus d'une espèce d'amphibien
- en mesurant de manière expérimentale l'impact d'une molécule fréquemment retrouvée dans l'environnement sur des stades de vie précoce d'une espèce d'amphibien

4.2. Structure du manuscrit

Ainsi, le premier aspect de cette thèse, décrit dans le chapitre 1, a consisté en l'utilisation de plusieurs espèces de serpents et d'une espèce de tortue en tant que sentinelles de la contamination par des polluants organiques et des éléments traces métalliques de deux zones données. Il a été supposé au préalable que ces espèces pouvaient renfermer dans leurs tissus, à des concentrations variables, une certaine diversité de polluants qui permettrait de déterminer leur disponibilité dans le milieu. Nous avons également émis l'hypothèse que certains traits d'histoire de vie (sexe, taille, écologie) pouvaient avoir une influence sur les niveaux de polluants mesurés. Des dosages ont ainsi été effectués sur des tissus prélevés sur plus de 200 cadavres issus d'un échantillonnage opportunistes d'animaux retrouvés morts (tués accidentellement par collision par exemple). Les résultats issus de ces analyses permettent ainsi d'obtenir des informations sur la disponibilité des polluants ciblés dans les zones étudiées, mais ne permettent cependant pas d'établir une causalité entre les niveaux mesurés, et des conséquences sur les individus ou sur les populations. De plus, d'un point de vue logistique, ces dosages sur de grands échantillons nécessitent beaucoup de temps avant d'obtenir les résultats.

C'est pourquoi, le chapitre 2 présente un deuxième aspect de mes travaux de thèse, qui, afin de poursuivre l'évaluation des effets de la présence d'une contamination environnementale sur les organismes, a porté sur l'impact d'un habitat potentiellement contaminé, l'habitat agricole, sur des traits individuels d'une espèce largement répandue. Pour explorer cette question, il a paru judicieux d'utiliser une autre espèce modèle, qui présente des caractéristiques plus pertinentes pour ce type d'étude, à savoir une espèce d'amphibien, le crapaud commun. Nous avons ici émis l'hypothèse selon laquelle la morphologie des individus est différente dans les habitats agricoles, potentiellement pollués par l'utilisation de pesticides, en comparaison avec des habitats où l'activité agricole est plus modérée, et enfin des habitats préservés. Ce chapitre permet de déterminer si vivre dans un environnement pollué affecte les traits des individus, mais ne permet pas d'établir de lien direct ou causal entre la présence d'un contaminant donné et les effets observées.

De ce fait, le chapitre 3 présente une approche expérimentale qui permet d'explorer les effets d'une exposition à des concentrations croissantes d'un composé retrouvé très fréquemment dans l'environnement, sur le développement et la mobilité larvaire du crapaud commun. Afin d'être pertinent pour l'évaluation du risque environnemental, les doses utilisés correspondent à des niveaux retrouvés dans l'environnement. A nouveau ici, il a paru judicieux d'utiliser une espèce d'amphibien comme modèle, du fait de certaines caractéristiques s'accordant bien avec les contraintes de ce type d'expérience (taille d'échantillon, croissance rapide). L'hypothèse émise ici est que l'exposition aux concentrations les plus fortes provoquerait le plus de dommage sur les paramètres étudiés.

Ces trois chapitres présentent ainsi des approches différentes, mais complémentaires, de travaux pouvant être réalisé dans le cadre de l'évaluation du risque environnementale associé à la contamination des écosystèmes, avec l'utilisation d'espèces sentinelles choisies en fonction de leur pertinence selon la problématique explorée.

CHAPITRE 1 - BIOACCUMULATION DE CONTAMINANTS ENVIRONNEMENTAUX CHEZ DIFFERENTES ESPECES DE REPTILES

INTRODUCTION DU CHAPITRE 1

Il existe plusieurs catégories de contaminants environnementaux, dont les polluants organiques (pesticides, PCB, HAP,…) et les polluants inorganiques (nitrates, sels, éléments traces). Les polluants organiques sont des composés carbonés, à l'inverse des substances inorganiques qui ne contiennent pas de carbone. Quelle que soit leur catégorie, il apparait primordial d'effectuer une évaluation du risque écologique associé à leur présence dans les milieux naturels. Mesurer la contamination de l'air, l'eau ou les sols permet d'évaluer l'étendue de la pollution d'un endroit donné, mais ne permet pas d'estimer la biodisponibilité d'une substance, qui désigne sa part présente dans l'environnement, susceptible d'être absorbée et métabolisée par les individus, et donc de s'accumuler dans les tissus et le long des chaînes alimentaires. Pour cela, il est possible de mesurer la concentration en polluant dans tissus des individus d'une espèce sentinelle donnée, afin d'avoir un aperçu du risque d'exposition des autres espèces issues du même écosystème, et du degré de contamination du réseau trophique. Les espèces sentinelles utilisées agissent donc comme des biomoniteurs de l'environnement (Beeby, 2001). Les informations sur l'exposition des espèces aux produits chimiques dangereux fournissent des données de référence pour l'évaluation du risque écologique ou toxicologique (Rivière, 1993).

Il est possible d'utiliser de nombreuses espèces comme biomoniteurs, chaque type d'organismes possédant des avantages propres pour cet usage. Les poissons ont par exemple été parmi les premiers organismes utilisés en tant que biomoniteurs afin de suivre la contamination des écosystèmes aquatiques par différents types de substances (Schmitt et al., 1990 ; Van der Oost et al., 1996 ; Wagner et Boman, 2003). Les oiseaux ont également été largement utilisé pour évaluer la contamination de l'environnement, que ce soit par les polluants organiques (Herzke et al., 2003 ; Lindberg et al., 2004 ; Jaspers et al., 2007) ou les éléments traces (Leonzio et Massi, 1989 ; Dauwe et al., 2000 ; Lucia et al., 2010). La possibilité de mesurer les niveaux de polluants dans les plumes, qui constitue une méthode de suivi non invasive, en fait notamment des organismes intéressants pour ce type d'études (Jaspers et al., 2007).

Les mammifères sont également considérés comme des biomoniteurs utiles dans certains cas. L'utilisation de mammifères marins permet par exemple d'évaluation l'exposition des hauts niveaux trophiques des écosystèmes marins sur de grandes échelles spatiales (Becker et al., 1997). De nombreux travaux ont également utilisé de grands herbivores, du fait de leur large répartition, et de la grande quantité de tissus, sang ou poils disponible sur un animal pour effectuer des analyses (Frank, 1986 ; Wren, 1986 ; Tataruch et Kierdorf, 2003).

Toutes les espèces constituant la faune d'un habitat donné doivent être prises en considération pour évaluer les risques écologiques. Les reptiles sont des espèces souvent négligées, mais ils tiennent une place importante dans la structure et le fonctionnement des écosystèmes aussi bien terrestres qu'aquatiques. De ce fait, ils devraient être inclus dans l'évaluation des risques environnementaux, ou dans toute étude complète de contamination environnementale (Campbell & Campbell, 2001 ; Scott et al., 2013). La raison principale qui fait des reptiles un modèle peu étudié semble se trouver dans leurs traits d'histoire de vie, qui en font des organismes peu pratiques pour des études écotoxicologiques habituelles. En effet, contrairement à la plupart des modèles d'études dans ce domaine, les reptiles n'ont pas un temps de génération court, ils ne produisent pas un grand nombre de descendants dans des intervalles courts, et sont souvent considérés à tort comme difficiles à maintenir en captivité (Hopkins 2000 ; Campbell et Campbell, 2001). Cependant, du fait de certaines caractéristiques biologiques et écologiques, les reptiles peuvent être d'excellents biomoniteurs de la pollution environnementale (Bauerle et al., 1975 ; Rainwater et al., 2005 ; Hopkins, 2000 ; Scott et al., 2013 ; Sparling et al., 2010).

Les reptiles sont largement distribués, et présents dans une grande variété d'habitat (Yadollahvand et al., 2014). Ils sont également relativement sédentaires, et ne se s'éloignent souvent pas plus de quelques kilomètres de leur domaine vital durant leur vie. Comparés aux mammifères et oiseaux, qui ont tendance à se déplacer plus, et sur de plus longues distances, les reptiles permettent donc une évaluation assez précise de l'exposition des organismes à une échelle très localisée (Santos et al., 1999 ; Bauerle et al., 1975 ; Hopkins, 2000; Yu et al., 2011).

Certaines espèces de reptiles ont une espérance de vie élevée, ce qui permet d'évaluer la tendance à la bioaccumulation d'une substance sur le long terme (Allender, 2015). Selon les espèces, ils se nourrissent principalement de vertébrés ou/et d'invertébrés, et se placent ainsi à de hauts niveaux dans les réseaux trophiques. De ce fait, ils sont susceptibles de présenter des phénomènes de bioaccumulation et de bioamplification des contaminants chimiques et peuvent être des témoins de l'état de contamination des réseaux trophiques dans lesquels ils s'insèrent (Sparling et al., 2010 ; Yu et al., 2011).

Quelques études ont déjà fait état du potentiel des serpents comme indicateurs de la contamination de l'environnement (Fleet et al., 1972 ; Bauerle et al., 1975 ; Santos et al., 1999 ; Nagle et al., 2001 ; Rainwater et al., 2005 ; Sparling et al., 2010 ; Scott et al., 2013 ; Allender et al. 2015). Mais les données restent rares et relativement négligeables en comparaison aux données existantes concernant les poissons, mammifères et oiseaux et même les amphibiens (Sparling et al., 2010 ; Hopkins et al., 2000).

Dans ce chapitre, nous nous proposons donc d'utiliser des reptiles comme organismes modèles afin d'évaluer la contamination du milieu par différent polluants. Ainsi, la première partie de ce chapitre traitera de l'accumulation de polluants organiques par différentes espèces de serpents. La deuxième partie quant à elle décrite l'accumulation d'éléments traces chez la cistude d'Europe (*Emys orbicularis*).

PARTIE 1 : ACCUMULATION DE POLLUANTS ORGANIQUES CHEZ PLUSIEURS ESPECES DE SERPENTS

1. INTRODUCTION DE LA PARTIE 1

1.1. Les polluants organiques

Les polluants organiques proviennent principalement de trois types d'activité : industrielle (production d'énergie, industries chimiques, métallurgie…), urbaine (transport, gestion et traitement des déchets..) et agricole (utilisation de pesticides…).

1.1.1 Les pesticides

Les pesticides sont habituellement classés en plusieurs grandes familles, selon leur composition chimique (organochlorés, organophosphorés, carbamates, pyréthrinoïdes de synthèse, dérivés de l'urée, triazines, diazines, défoliants, dicarboximides, néonicotinoïdes, …).

Les premiers pesticides de synthèse sont apparus sur le marché dans les années 40, et ont très vite permis une amélioration notable des rendements agricoles. Une vingtaine d'années plus tard, les premières accusations relatives aux dangers de ces substances envers la santé humaine et l'environnement émergent (Carson, 1962). Depuis, de très nombreux travaux étudient l'impact des nombreux pesticides sur l'environnement. Dans les années 60, les premières études démontrent une toxicité directe d'insecticides organochlorés pour des animaux aquatiques (Carson, 1962 ; Cope, 1965). Durant les années qui suivent, de plus en plus de substances pesticides sont mesurées dans les eaux souterraines (US Environmental Protection Agency, 1984 ; Leistra et Boesten, 1989, Schiavon et al., 1995). Dans les années 70-80, on commence à se soucier du passage de ces substances dans l'atmosphère, et on constate qu'elles peuvent se déposer loin des lieux de traitement (e.g. dans les embruns océaniques, dans les neiges de l'arctique ; van der Werf, 1997).

Une grande partie des pesticides épandus est dispersée dans l'atmosphère, soit lors de l'application, soit par évaporation ou par envol à partir des plantes ou du sol. Ils sont alors disséminés par le vent, parfois loin de leur lieu d'épandage, et retombent sur les sols. Les matières actives peuvent alors atteindre les eaux de surface ou souterraines par lessivage, être absorbées par des organismes, ou rester dans le sol. Le ruissèlement emporte en moyenne 2% des pesticides appliqués sur un sol (Schiavon et al., 1995). Il a également été constaté des pertes allant jusqu'à 90% du produit appliqué par volatilisation (Taylor et Spencer, 1990). En 2013, les analyses des Agences de l'Eau en France montrent la présence d'au moins 10 substances actives de pesticides retrouvées dans plus de la moitié des 2 950 points de surveillance. Les teneurs retrouvées sont globalement faibles, cependant, 14% des points de mesures montre une teneur totale supérieur à 0,5 µg/L. Globalement il existe une pollution chronique et généralisée de l'environnement par un certain nombre de pesticides, dont les teneurs fluctuent d'une année à l'autre et au cours de l'année en fonction des dates d'application, et des conditions météorologiques (Ministère de l'Agriculture, de l'Agroalimentaire et de la Forêt, 2015).

1.1.2 Les Polychlorobyphénils

Les Polychlorobyphénils (PCB) forment une famille de composés aromatiques organochlorés dérivés du biphényl qui regroupe 209 molécules, également appelées congénères. Ces congénères peuvent être répartis en 2 catégories, à savoir les PCB dioxine-like (PCB DL) dont la configuration et le mécanisme d'action est similaire à celui des dioxines (composés industriels considérés comme très toxiques ; INERIS, 2011), et les PCB non dioxine-like (PCB NDL). Les PCB DL sont considérés comme les plus dangereux pour la santé, mais sont néanmoins moins abondants dans les mélanges industriels et retrouvés moins fréquemment dans l'environnement (INERIS, 2011).

La production des PCB (DL et NDL) a débutée dans les années 1930. Ils ont été utilisés dans l'industrie pour leurs propriétés isolantes et leur stabilité physique et chimique (transformateurs électriques, encre, peinture). Au cours des années 70, leur utilisation est progressivement réduite, puis finalement interdite en 1987.

La présence de PCB dans l'environnement est principalement due à des contaminations "accidentelles" (déversements de quantités importantes à la suite de fuites, d'explosions, d'incendies ou de rejets fortuits) et à des procédures inadéquates d'élimination et de gestion des déchets (décharges non contrôlées ou inappropriées, épandage des boues d'épuration). On mesure des PCB partout sur le globe, dont la plus grande partie dans les sols et les sédiments fluviaux ou marins. D'une manière générale, la contamination de l'eau par les PCB résulte d'un lessivage des sols pollués (INERIS, 2011).

Parmi les PCB, six congénères ont été désignés par la Commission Européenne comme étant à rechercher en priorité dans les analyses de matrices organiques du fait de leur persistance et de leur abondance dans l'environnement ainsi que de leurs propriétés toxicologiques (Dargnat et Fisson, 2010). Ces PCB indicateurs (PCBi) représentent près de 50% des PCB retrouvés dans les milieux aquatiques. Ce sont les PCB 28, 52, 101, 118, 138, 153 et 180 (INERIS, 2011)

1.1.3 Les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques

Les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) sont des composés organiques constitués d'au moins deux cycles aromatiques fusionnés. Il en existe 130 identifiés à ce jour. Ils sont principalement issus des phénomènes de pyrolyse de la matière organique, de combustion des charbons et pétroles, et de l'utilisation de carburants fossiles. Les sources de HAP dans l'environnement sont donc principalement d'origines anthropiques, bien qu'elles puissent épisodiquement trouver leur origine dans des processus naturels (feux de forêts, éruptions volcaniques ; diagenèse ; pétrogenèse… ; Veyrand et al., 2007).

Les HAP sont très peu solubles dans l'eau mais sont présents dans les sédiments et les matières en suspension. Il existe également une contamination des sols et des sous-sols où ils sont facilement adsorbés. Ce sont des substances très stables dans le temps (INERIS, 2005 ; Veyrand et al., 2007).

Certains HAP sont considérés prioritaires lors des analyses environnementales du fait de leur toxicité. L'Agence de Protection Environnementale des Etats Unis propose ainsi de suivre de manière prioritaire 16 HAP, parmi lesquels l'Organisation Mondiale de la Santé a identifié 6 composés particulièrement toxiques (Tableau 1; INERIS, 2005).

Tableau 1. Liste des HAP classés prioritaires et des HAP considérés par l'Organisation Mondiale de la Santé (INERIS, 2005)

HAP prioritaires	HAP ciblés par l'OMS
Napthalène	Fluoranthène
Acénaphtylène	Benzo(a)pyrène
Acénaphtène	Benzo(b)fluoranthène
Fluorène	Benzo(k)fluoranthène
Anthracène	Benzo(ghi)pérylène
Phénanthrène	Indeno(1, 2, 3-cd)pyrène
Fluoranthène	
Pyrène	
Benzo(a)anthracène	
Chrysène	
Benzo(a)pyrène	
Benzo(b)fluoranthène	
Dibenzo(ah)anthracène	
Benzo(k)fluoranthène	
Benzo(ghi)pérylène	
Indeno(1, 2, 3-cd)pyrène	

1.1.4 Le cas des Polluants Organiques Persistants

Parmi les polluants organiques, un grand nombre des insecticides organochlorés de la première génération, comme la dieldrine, le DDT, le toxaphène et le chlordane, les PCB, ainsi que les HAP sont considérés comme des Polluants Organiques Persistants (POP). Les composés présentés dans le Tableau 2 font l'objet d'une interdiction de production, de mise sur le marché au sien de l'Union Européenne (Règlement CE n° 850/2004).

Tableau 2. Liste des composés considérés comme Polluants Organiques Persistants et faisant l'objet d'une interdiction de production, mise sur le marché et utilisation (Protocole d'Aarhus, 1998 ; Convention de Stockholm, 2001 ;

Sources agricoles	Sources industrielles/urbaines agricoles
DDT	HAP
Chlordane	Tétra- ; Penta- ; Hexa- ; Hepta- ; bromodiphényléther
HCH	Sulfonates de perflorooctane
Dieldrine	PCB
Endrine	Hexabromobiphényle
Heptachlore	Hexachlorobutadiène
Endosulfan	Napthalènes polychlorés
Hexachlorobenzène	Chloroalcanes
Chlordécone	Dioxines
Aldrine	Furanes
Lindane	
Pentachlorobenzène	
Mirex	
Toxaphène	

Les POP se distinguent des autres polluants organiques par plusieurs critères. Dans un premier temps, ce sont des molécules très stables, très résistantes à la dégradation, qui se caractérisent donc par une grande persistance dans l'environnement. Les POP sont également remarquables par leur semi-volatilité, qui leur permet d'exister sous forme de vapeur ou adsorbés sur des particules dans l'atmosphère. Cela leur permet d'être transportés sur de très longues distances, ce qui implique une capacité à contaminer des lieux très éloignés de leurs sources d'émission. Ainsi, les PCB sont omniprésents sur le globe. On les retrouve sur tous les continents, dans tous types de milieux, incluant des lieux isolés (Arctique, plein océan, déserts… ; Jones et de Voogt, 1999 ; INERIS 2011). Certains sont également hydrophobes et lipophiles, et ont donc une forte affinité avec les tissus lipidiques. De ce fait, ils ont une forte capacité à s'accumuler dans les organismes, ainsi qu'au sein des réseaux trophiques. Ce n'est cependant pas le cas des HAP, qui sont métabolisés.

La bioamplification de certains POP le long de la chaîne alimentaire implique notamment une plus grande exposition des organismes situés en bout de chaîne. Le risque est donc pour ces organismes d'accumuler des quantités suffisantes de ces substances pour subir des effets toxiques (Jones et De Voogt, 1999).

Un certain nombre des substances considérées comme POP sont aujourd'hui interdites à la synthèse et à la commercialisation (POP dits « héritage »), mais leurs caractéristiques en font des molécules présentant un risque écologiques important. Il est donc nécessaire de déterminer les concentrations accumulées par les organismes, afin d'effectuer une évaluation du risque écologique (Rabodonirina, 2015).

1.2. Objectifs de la partie

Depuis le milieu des années 90, des carcasses de serpents le plus souvent tués accidentellement sur les routes sont récoltées et conservées par le Centre d'Etudes Biologiques de Chizé (CEBC). Cet échantillon comprend des centaines d'individus, d'espèce, de sexe et d'âge variés, provenant de plusieurs régions françaises, mais principalement de la région Poitou-Charentes et du Parc Naturel Régional de la Brenne.

On y retrouve notamment des individus de 5 espèces différentes : couleuvre verte et jaune (*Hierophis viridiflavus*), couleuvre à collier (*Natrix natrix*), couleuvre vipérine (*Natrix maura*), couleuvre d'Esculape (*Zamenis longissimus*) et vipère aspic (*Vipera aspis*). Ces espèces présentent des modes de vie différents. En effet, les couleuvres vertes et jaunes et d'Esculape ainsi que les vipères aspic sont des espèces terrestres alors que la couleuvre à collier peut aussi bien vivre en milieu terrestre qu'aquatique, et la couleuvre vipérine est une espèce au mode de vie aquatique.

Ce large échantillon nous donne la possibilité dans un premier temps d'évaluer l'accumulation de plusieurs substances par ces individus, et d'ainsi d'estimer l'exposition de ces espèces dans les zones étudiées. De plus, le nombre d'individus disponibles et leur diversité nous permet étudier les facteurs influençant l'accumulation des substances visées.

En effet, la bioaccumulation des contaminants dépend du métabolisme des individus, ce qui peut entrainer une différence de concentration entre mâle et femelle, du fait d'une mobilisation différente de leurs réserves, notamment lors de la reproduction (Selcer, 2010). L'accumulation et le stockage des polluants organiques ayant lieu tout au long de la vie des individus, il est également intéressant de déterminer s'il existe une relation entre la taille (qui témoigne de l'âge) et la charge en polluants des individus (Santos et al., 1999). Enfin, l'accumulation dépendant de la disponibilité des polluants dans le milieu, et de la part absorbée par les individus, soit directement, ou via leur alimentation, il est intéressant d'explorer l'influence selon l'origine géographique et l'habitat utilisé (i.e. le mode de vie). Dans cette partie, nous explorons donc les questions suivantes :

(i) Quels sont les niveaux des polluants ciblés dans les organismes utilisés

(ii) Y-a-t-il une influence de la taille et du sexe des individus sur les concentrations mesurées ?

(iii) Peut-on observer une différence d'accumulation des substances entre les individus de Brenne et les individus de Deux-Sèvres ?

(iv) Y-a-t-il une différence d'accumulation des substances selon le mode de vie ?

2. MATERIEL ET METHODE

2.1. Echantillonnage et espèces utilisées

Le Centre d'Etudes Biologiques de Chizé bénéficie d'un large échantillonnage de carcasses de serpents réunies de manière opportunistes (Figure 3). Ces carcasses sont récupérées sur les routes, sur le terrain, ou dans des jardins de particuliers, après avoir été victimes de prédation ou de collisions routières (Figure 4). Les carcasses sont rapidement ramenées au CEBC, et conservées en chambre froide, tandis que les informations concernant la date et le lieu de récolte sont répertoriées.

Figure 3. Carcasses de serpents numérotées avant d'être conservées en chambre froide

Figure 4. Exemple d'une carcasse retrouvé sur une route et rapportée au CEBC

Cet échantillonnage comprend des individus de différentes espèces, sexes et âges. Dans le cadre de mes travaux de thèse, nous avons utilisé des individus de cinq espèces locales appartenant à quatre genres et deux familles différentes (Viperidae and Colubridae) (Figure 5).

La couleuvre à collier (*Natrix natrix*) est l'espèce que l'on retrouve le plus fréquemment partout en métropole. C'est une espèce semi-aquatique, qui fréquente généralement des zones humides (bords de cours d'eau, mares, étangs..) mais que l'on peut également retrouver dans des zones plus sèches (landes, haies, clairières forestières, jardins…). Les couleuvres à collier se nourrissent aussi bien d'amphibiens et de poissons que de micromammifères (Boissinot et al., 2015).

La couleuvre vipérine (*Natrix maura*) est un petit serpent aquatique que l'on retrouve dans des zones humides. Elle se nourrit principalement de poissons et parfois d'amphibiens. Cette espèce est largement distribuée le long des cours d'eau de la Région Poitou-Charentes (Boissinot et al., 2015).

La couleuvre verte et jaune (*Hierophis viridiflavus*) est une espèce que l'on retrouve dans tout type d'habitat. On la retrouve en lisières boisées, dans des landes ou des friches, mais également dans des murs de pierres ou des bâtiments en ruines. Son régime alimentaire se compose de petits oiseaux, de micromammifères, ou d'autres reptiles (Boissinot et al., 2015).

La couleuvre d'esculape (*Zamenis longissimus*) est une espèce plutôt discrète que l'on rencontre à la fois dans des habitats où la végétation est dense (haies, boisements) mais aussi dans des zones rocailleuses. Son régime alimentaire est comparable à celui de la couleuvre verte et jaune (Boissinot et al. 2015).

La vipère aspic (*Vipera aspis*) vit dans une grande variété d'habitats. Elle affectionne les zones rocailleuses mais on la retrouve également en lisières forestière, bordures de haies, dans des friches ou à proximité de murs de pierres. Les vipères aspic se nourrissent principalement de micromammifères, d'autres reptiles, et d'oiseaux.

Contrairement aux quatre autres espèces utilisées, qui sont ovipares, la vipère aspic est une espèce vivipare (Boissinot et al. 2015).

Ce large échantillonnage nous permet donc d'avoir accès à des espèces présentant des différences en termes d'habitat, de régime alimentaire ainsi que de mode de reproduction.

Figure 5. Photographie des espèces étudiées. A : couleuvre à collier ; B : couleuvre vipérine ; C : couleuvre verte et jaune ; D : couleuvre d'esculape ; E : vipère aspic

De plus, les individus utilisés durant mes travaux de thèse proviennent de zones géographiques différentes. Certains individus ont été récoltés largement dans la région Poitou-Charentes, d'autres proviennent plus précisément des alentours du CEBC dans le département des Deux-Sèvres. Une autre partie des individus provient du Parc Naturel régional de la Brenne, situé dans la région Centre, qui constitue une des plus grandes zones humides de France.

2.2. Préparation des échantillons et dosages

2.2.1. Choix et dissection des individus

Parmi toutes les carcasses disponibles, plus de 200 individus ont été sélectionnés afin de constituer l'échantillon utilisé pour mes travaux. Les individus de cet échantillon ont été sélectionnés en fonction de leur état général afin de fournir le plus de tissus possible. En effet, certaines carcasses retrouvées sont trop endommagées pour permettre la récolte de suffisamment de tissus pour effectuer les analyses. Les individus ont également été choisis en fonction de leur lieu de récolte, de leur sexe et de leur espèce, afin d'avoir des effectifs suffisants par catégorie pour explorer nos questions de recherche. Les carcasses sélectionnées ont été récupérées entre 2010 et 2015. Chaque individu a été pesé et sa longueur museau-cloaque a été mesurée, puis les individus ont été disséqués afin de récupérer tous leurs organes et tissus. En plus de tous les organes (foie, cœur, reins, gonades, viscères), nous avons donc pu avoir accès au corps gras, aux muscles et à la peau de chaque individu (Figure 6).

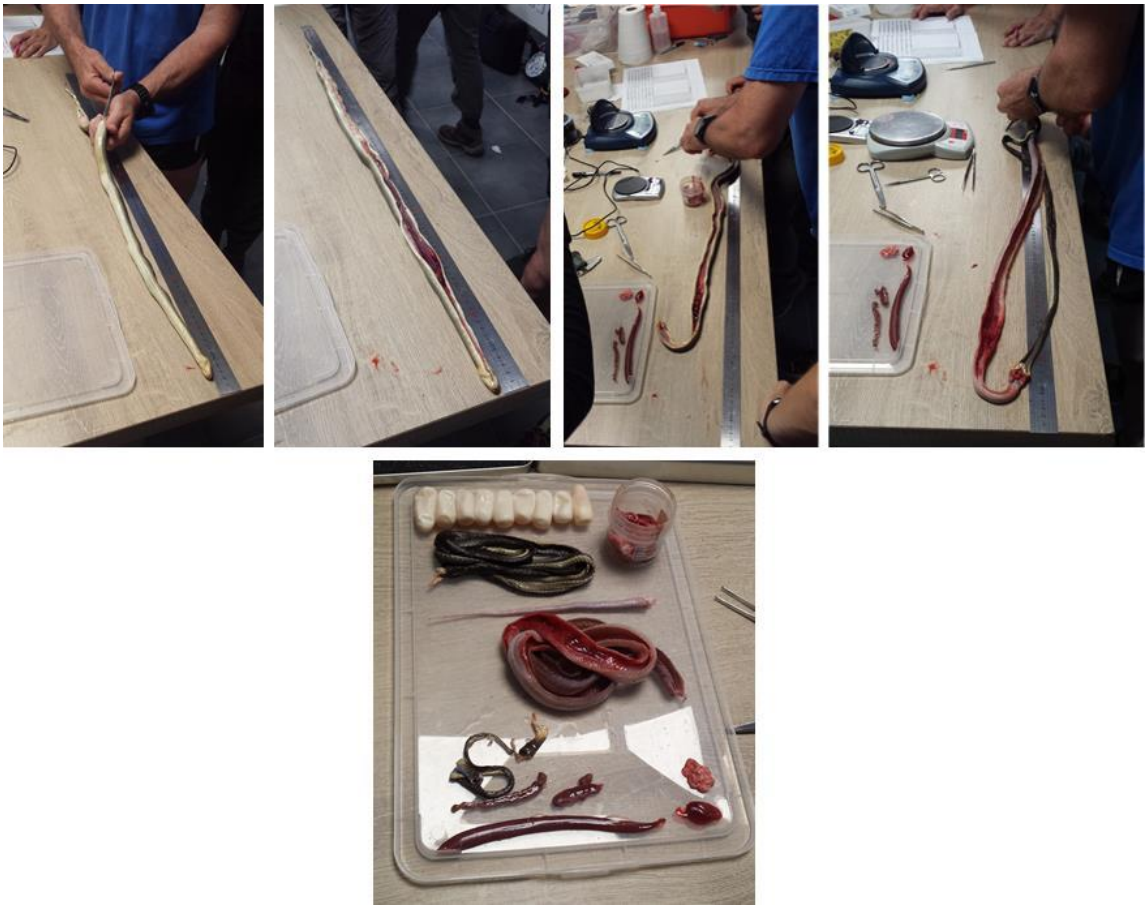


Figure 6. Dissection d'une couleuvre d'Esculape et résultat final

2.2.2. Dosage des substances ciblées

Les tissus ont été analysés au Laboratoire d'Analyses Sèvres-Atlantique (LASAT) en suivant des méthodes adaptées à chaque substance ciblée. Chaque méthode comporte une étape d'extraction de matière grasse (excepté dans le cas du corps gras, considéré comme de la matière grasse), une purification afin d'obtenir des échantillons ne contenant que les molécules ciblées, et une détection des molécules par chromatographie et spectrométrie de masse. Selon les substances, les méthodes diffèrent légèrement.

2.2.2.1. Dosage des pesticides

Pour quantifier les pesticides dans les échantillons, deux méthodes ont été utilisées selon les recommandations de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail.

L'échantillon est dans un premier temps broyé, puis la matière grasse extraite par centrifugation cryogénique (suivant un protocole issu de la norme européenne NF EN 1528-2). Il est ensuite purifié par Extraction sur Phase Solide (EPS). L'endosulfan sulfate, l'endosulfan β et le chlorothalonil sont dosés par chromatographie en phase liquide. Les autres pesticides analysés (Tableau 3) sont dosés par chromatographie en phase gazeuse. Les molécules sont ensuite détectées par spectrométrie de masse en tandem.

Tableau 3. Liste des molécules entrant dans le champ d'application de la méthode décrite

Pesticides organochlorés	Pyréthrinoïdes
Aldrine	Bifenthrine
Chlordane α	Cyfluthrine
Chlordane γ	Cyhalothrine λ
Oxy-chlordane	Cypermethrine
Chlorobenzilate	Deltamethrine
DDD op'	Fanvalerate
DDD pp'	Permethrine cis
DDE op'	Permethrine trans
DDE pp'	

DDT op'
DDT pp'
Dicofol op'
Dicofol pp'
Dieldrine
Endosulfan α
Endrine
HCB
HCH α
HCH β
HCH γ
Heptachlore
Heptachlore epoxy cis
Heptachlore epoxy trans
Métoxychlore
Pendimethalin
Quintozène
Tecnazène
Vinclozolin

2.2.2.2. *Dosage des PCB-NDL et des HAP*

La méthode utilisée pour détecter les six congénères de PCB-NDL recherchés est similaire à celle mis en œuvre pour doser les 14 HAP ciblés (Tableau 4).

Dans un premier temps, les échantillons sont broyés, jusqu'à obtention d'une poudre puis placés dans une étuve thermostatée à environ 80°C jusqu'à évaporation complète de l'eau. L'échantillon est ensuite transféré dans une cellule d'extraction contenant un filtre de célite, et traité à l'aide d'une solution standard de quantification, afin d'en extraire la matière grasse. Le résultat de l'extraction est purifié une première fois manuellement sur une colonne de gel de silice et florisil, puis une deuxième fois sur un système automatisé « MIURA ». Le dosage des substances ciblées est effectué par chromatographie en phase gazeuse, durant laquelle les molécules sont séparées sur une colonne apolaire, en utilisant de l'hélium comme gaz vecteur. Les molécules ciblées sont ensuite détectées par spectrométrie de masse en tandem ou spectrométrie de masse en haute résolution.

L'interprétation des résultats s'appuie en partie sur la norme européenne sur les critères définis dans la norme européenne NF EN 1948-3 et sur les règlements et directives européennes relatifs aux composés à quantifier (598/2014, 278/2012 et 2002/567 CE).

Tableau 4. Liste des molécules entrant dans le champ d'application de la méthode décrite

PCB-NDL	HAP
PCB 28	Benzo[a] anthracène (BaA)
PCB 52	Cyclopentapyrène (CPP)
PCB 101	Chrysène (CHR)
PCB 138	5-Méthylchrysène (5MCH)
PCB 153	Benzo[b] fluoranthène (BbF)
PCB 180	Benzo[k] fluoranthène (BkF)
Somme des 6 PCBi	Benzo[a] pyrène (BaP)
	Dibenzo [a,h] anthracène (dBahA)
	Indeno [1,2,3-c,d] pyrène (IP)
	Benzo [g,h,i] pérylène (BghiP)
	Dibenzo [a,l] pyrène (dBalP)
	Dibenzo [a,e] pyrène (dBaeP)
	Dibenzo [a,i] pyrène (dBaiP)
	Dibenzo [a,h] pyrène (dBahP)

2.3. Comparaison des analyses entre tissus : choix du tissus pour les dosages

Les premiers dosages ont été réalisés à partir d'individus (N=17) appartenant à trois espèces différentes (*Hierophis viridiflavus*, *Zamenis longissimus* et *Natrix natrix*) à la fois sur le corps gras, et un mélange de muscles et de peau, afin de déterminer quel tissu était le plus adapté pour poursuivre les analyses. On peut observer sur les Figure 7, 8 et 9 que les niveaux de contaminants mesurés sont systématique plus importants dans le corps gras que dans le mélange muscles+peau. Le corps gras a donc tendance à accumuler plus facilement les substances ciblées, ce qui est en accord avec leur nature lipophile. Afin d'être certain de détecter la présence de ces substances, il est donc préférable d'effectuer les dosages dans du corps gras.

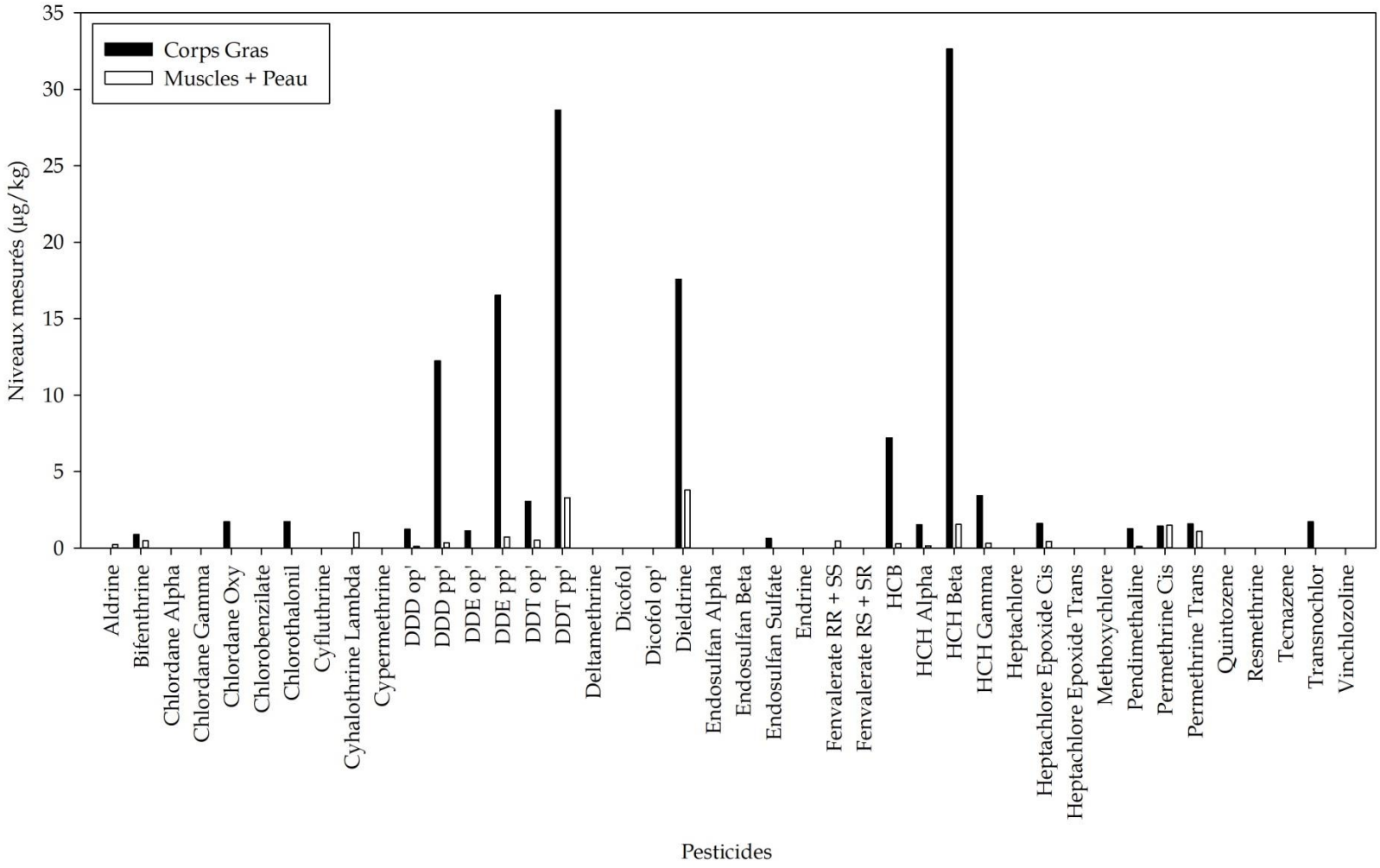


Figure 7. Comparaison des niveaux moyens de pesticides (µg/kg) retrouvés dans du corps gras et un mélange muscles+peau issus des mêmes individus

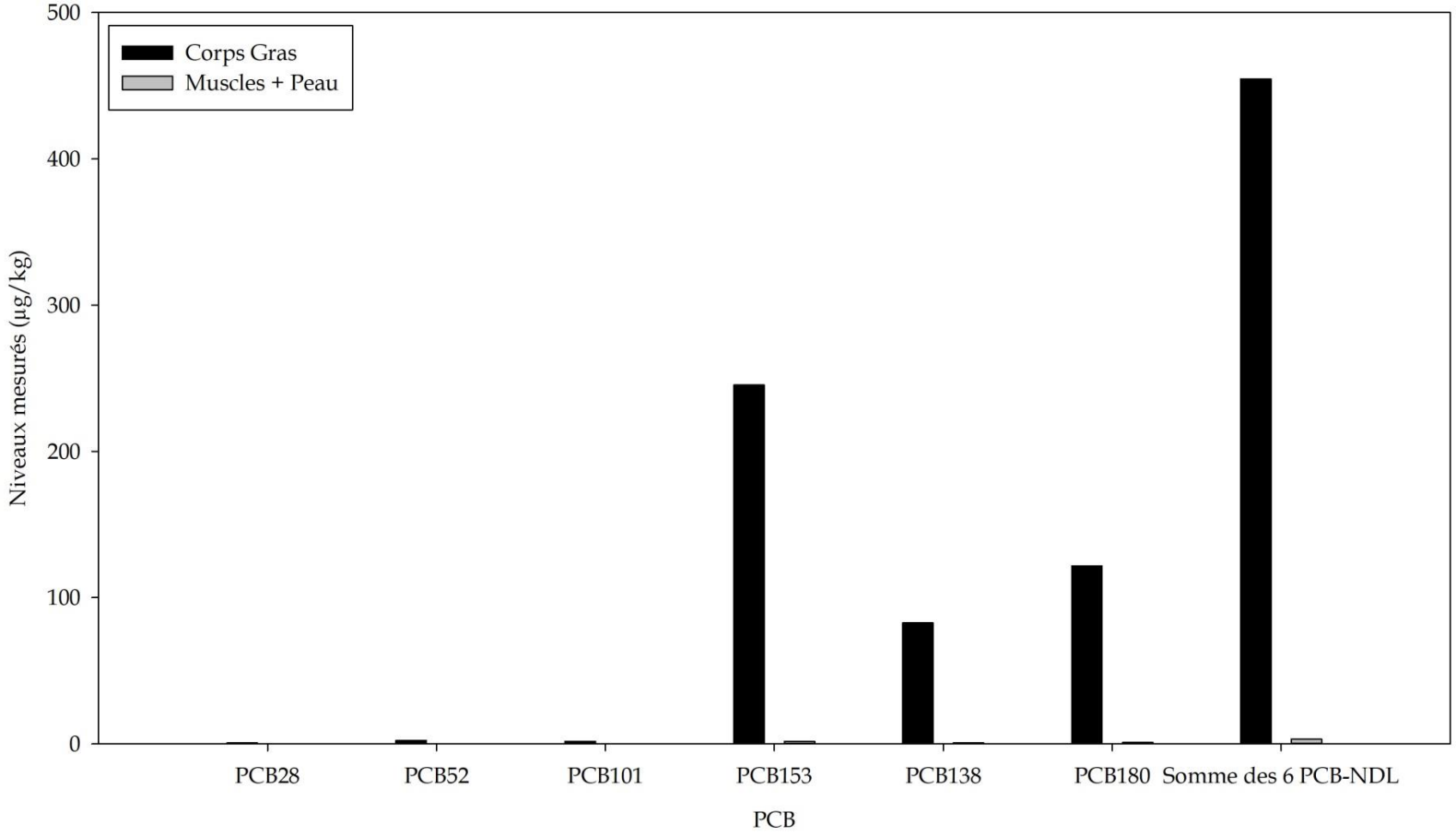


Figure 8. Comparaison des niveaux moyens de PCB (µg/kg) retrouvés dans du corps gras et un mélange muscles+peau issus des mêmes individus

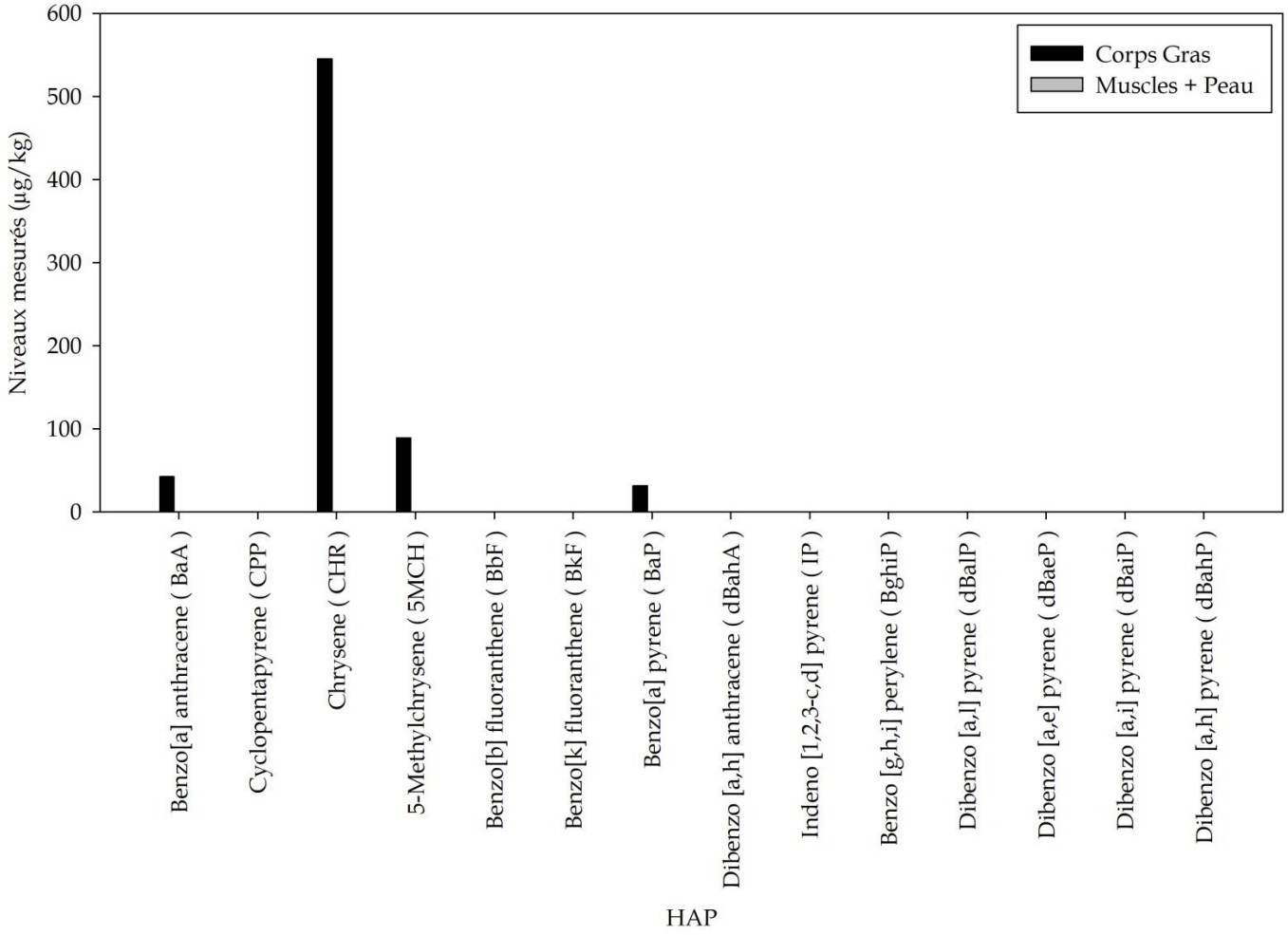


Figure 9. Comparaison des niveaux moyens de HAP (µg/kg) retrouvés dans du corps gras et un mélange muscles+peau issus des mêmes individus

En tout, 175 échantillons de corps gras ont été analysés. Le détail des effectifs par catégorie (origines géographiques, espèces et sexes) est présenté dans le Tableau 5.

Tableau 5. Effectifs par origine géographique, espèce et sexe

	Brenne		Deux-Sèvres		Autre (Poitou-Charentes)		Sous-total		TOTAL
	Mâles	Femelles	Mâles	Femelles	Mâles	Femelles	Mâles	Femelles	
Couleuvre Verte et Jaune	20	4	30	15	9	2	59	21	80
Couleuvre d'Esculape	-	-	21	9	2	1	23	10	33
Couleuvre à collier	4	14	1	12	1	2	6	28	34
Couleuvre vipérine	2	5	5	1	1	7	8	13	21
Vipère Aspic	1	4	0	1	0	1	1	6	7
Sous-total	27	27	57	38	13	13	97	78	
TOTAL	54		95		26				175

2.4. Efficacité des analyses : sélection des substances pour la suite des analyses

Pour effectuer les analyses statistiques, seules les substances pour lesquelles au moins 60% des valeurs sont supérieures à la Limite de Quantification (LQ) ont été conservées (EPA, 2000).

Concernant les pesticides, il s'agit de l'Hexachlorobenzène (HCB ; 68% des valeurs supérieures à la LQ), du β-Hexachlorocyclohexane (HCH β ; 60% des valeurs supérieures à la LQ), et du Dichlorodiphényldichloroéthylène pp' (pp' DDE ; 62% des valeurs supérieures à la LQ), une des formes du DDE, qui constitue le produit de décomposition le plus commun du DDT (Figure 10).

Pour analyser les valeurs de PCB retrouvées dans les tissus, nous utiliserons les résultats des dosages de la somme des six congénères de PCB indicateurs (∑PCBi), pour lesquels les concentrations mesurées sont supérieures à la LQ dans 100% des cas (Figure 11).

Les concentrations obtenues pour les HAP ne dépassent la LQ que dans 21% des cas au mieux (Figure 12). Nous n'effectuerons donc aucune analyse statistique concernant les résultats des analyses pour ce groupe de molécules.

En général, les résultats des dosages inférieurs à la LQ sont remplacés par cette valeur de LQ*0,5 (EPA 2000). Dans notre cas, cette solution ne semblait pas adaptée. En effet nos échantillons de corps gras sont de masses très variables. Le plus petit échantillon pèse 0,1g, contre 40,5g pour le plus gros. La méthode citée ci-dessus a pour inconvénient de surestimer la contribution des très petits échantillons, pour lesquelles les LQ sont élevées. Afin d'éviter ce biais, nous avons calculé de nouvelles valeurs pour chaque molécule pour remplacer les résultats inférieurs aux LQ. Cette valeur a été déterminée pour chaque substance analysée à partir des Limite de Quantification des échantillons les plus imposants (> 20g de corps gras) selon le calcul suivant : $Moyenne\ des\ résultats\ pour\ les\ échantillons > 20g\ \times 0{,}5$.

2.5. Analyses statistiques

Afin de comparer les concentrations mesurées entre espèces, sexes, habitats et origines géographiques, des ANOVA ont été utilisées. Dans le cas où un des facteurs testés avait une influence sur les concentrations mesurées, une ANCOVA a été utilisé pour la suite des analyses, en prenant ce facteur en covariable. A la suite de l'ANOVA utilisée pour comparer les concentrations entres espèces, un test post hoc de Tukey HSD a été utilisé pour préciser le résultat.

Afin de déterminer la relation entre la taille des individus et les niveaux en substances ciblées, un test de corrélation de Spearman a été utilisé.

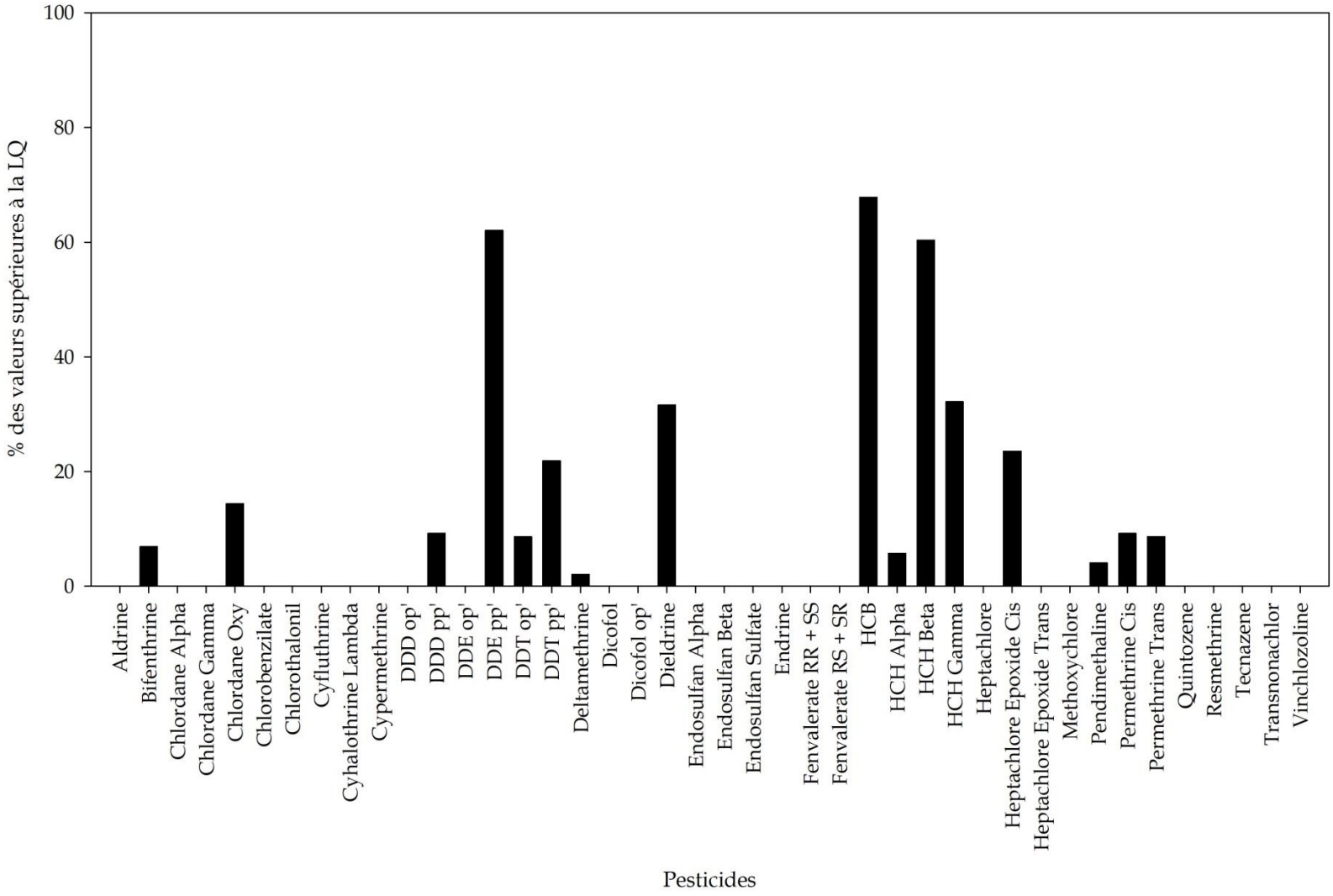


Figure 10 : Pourcentage des résultats de dosage de pesticides supérieurs à la Limite de Quantification fixée pour chaque analyse

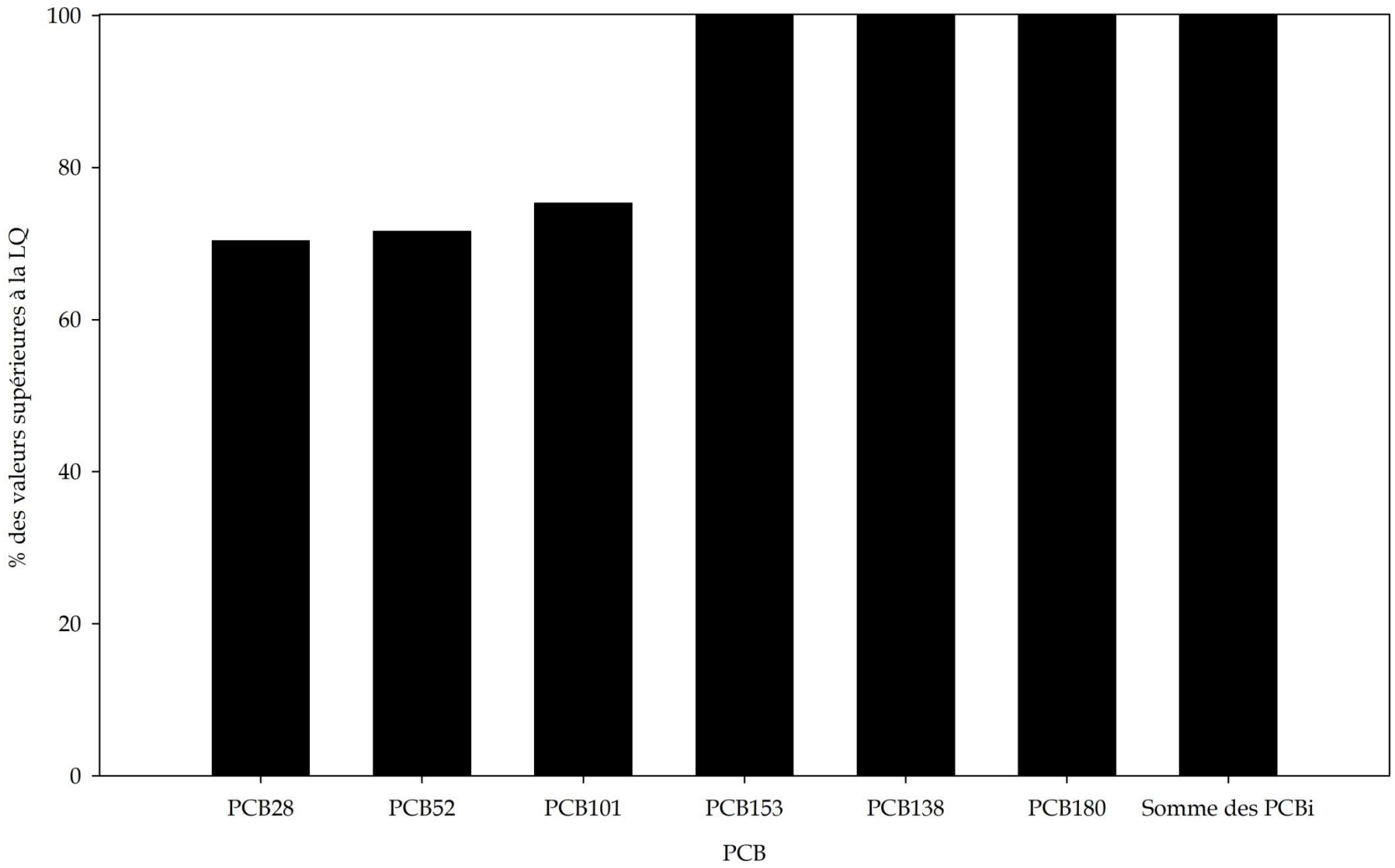


Figure 11 : Pourcentage des résultats de dosage de pesticides supérieurs à la Limite de Quantification fixée pour chaque analyse

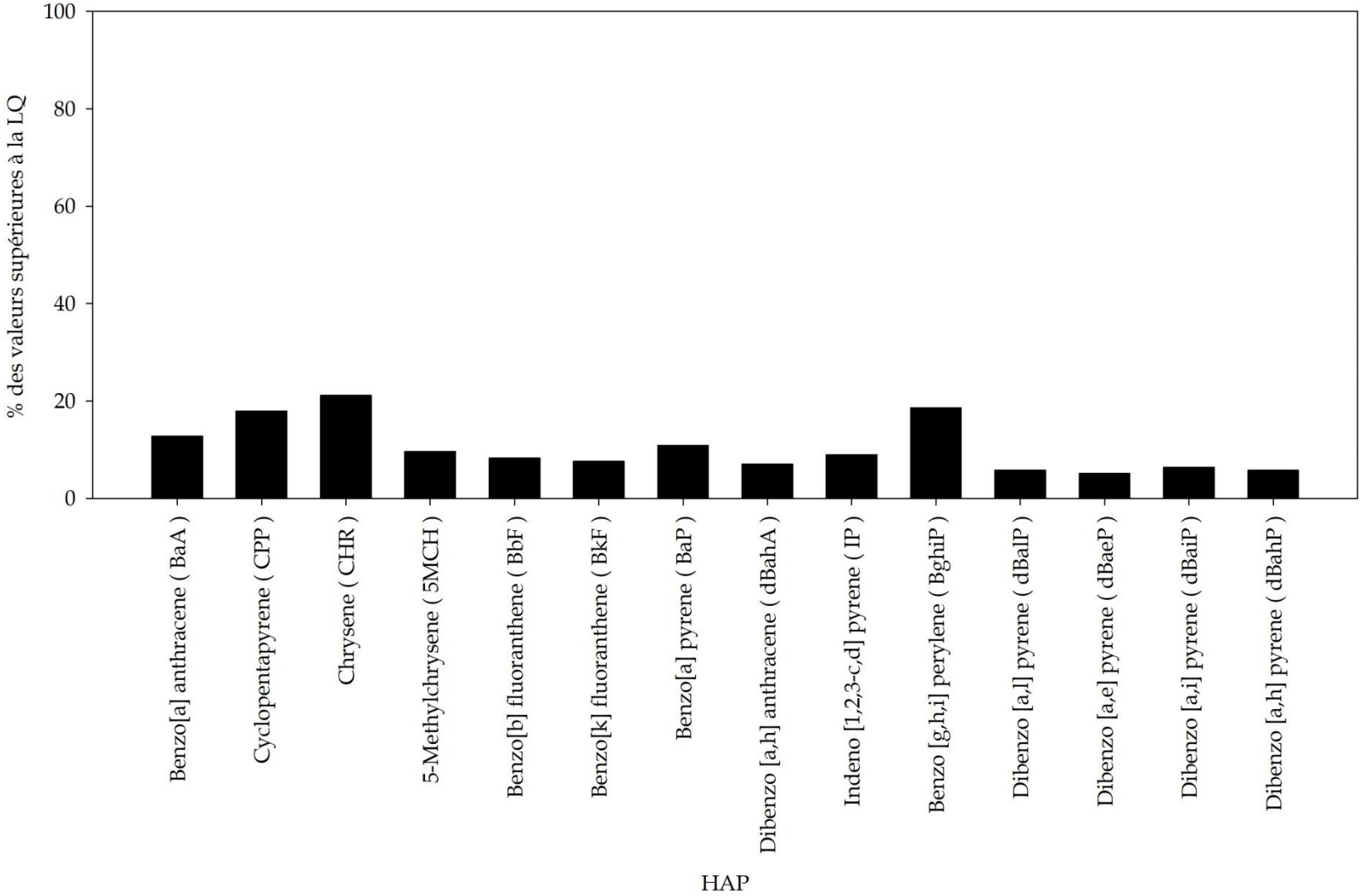


Figure 12 : Pourcentage des résultats de dosage de pesticides supérieurs à la Limite de Quantification fixée pour chaque analyse

3. RESULTATS

3.1. Niveaux moyens retrouvés dans les corps gras

Les valeurs moyennes de chaque molécule recherchée retrouvées dans les corps gras des individus échantillonnés, toutes espèces cumulées, sont présentées dans le Tableau 6. Certaines molécules n'ont jamais été identifiées lors des dosages, et certaines n'ont donné des résultats que pour un individu seulement. Dans certains cas, les dosages n'ont pas pu être réalisés pour certaines molécules par manque de tissus.

Tableau 6. Concentrations moyennes mesurées dans le corps gras pour chaque molécule (µg/kg). N : nombre d'échantillon ayant des concentrations supérieur à la LQ/nombre d'analyses (taille de l'échantillon). Les molécules pour lesquelles rien n'est indiqué n'ont pas été mesurées, ou seulement dans un échantillon.

Pesticides	Moyenne ± Ecart type	N
Aldrine	-	-
Bifenthrine	1,40 ± 1,25	12/174
Chlordane α	-	-
Chlordane γ	-	-
Chlordane Oxy	3,46 ± 4,47	25/174
Chlorobenzilate	-	-
Chlorothalonil	-	-
Cyfluthrine	-	-
Cyhalothrine λ	-	-
Cypermethrine	-	-
DDD op'	-	-
DDD pp'	7,13 ± 15,66	16/174
DDE op'	-	-
DDE pp'	24,62 ± 64,80	108/174
DDT op'	2,81 ± 1,89	15/174
DDT pp'	14,57 ± 34,64	38/174
Deltamethrine	7,25 ± 4,48	3/145
Dicofol	-	-
Dicofol op'	-	-
Dieldrine	18,91 ± 46,62	55/174

Endosulfan α	-	-
Endosulfan β	-	-
Endosulfan Sulfate	-	-
Endrine	-	-
Fenvalerate RR + SS	-	-
Fenvalerate RS + SR	-	-
HCB	5,52 ± 4,75	118/174
HCH α	5,87 ± 13,01	10/174
HCH β	43,02 ± 156,08	105/174
HCH γ	6,68 ± 21,65	56/174
Heptachlore	-	-
Heptachlore Epoxide Cis	15,53 ± 73,74	41/174
Heptachlore Epoxide Trans	-	-
Methoxychlore	-	-
Pendimethaline	3,86 ± 5,48	7/174
Permethrine Cis	2,19 ± 1,35	16/174
Permethrine Trans	2,62 ± 1,88	15/174
Quintozene	-	-
Resmethrine		
Tecnazene	-	-
Transnonachlor	-	-
Vinchlozoline	-	-
PCB		
PCB28	0,35 ± 0,84	114/162
PCB52	0,89 ± 2,43	116/162
PCB101	1,80 ± 4,44	122/162
PCB153	90,80 ± 78,90	162/162
PCB138	30,90 ± 59,98	162/162
PCB180	52,01 ± 27,86	162/162
Somme des 6 PCB-NDL	176,03 ± 50,50	162/162
HAP		
Benzo[a] anthracene (BaA)	20,13 ± 18,41	20/156
Cyclopentapyrene (CPP)	12,48 ± 12,04	26/145
Chrysene (CHR)	83,03 ± 81,97	33/156
5-Methylchrysene (5MCH)	30,20 ± 39,74	15/156
Benzo[b] fluoranthene (BbF)	12,61 ± 16,64	12/145

Benzo[k] fluoranthene (BkF)	12,58 ± 14,20	11/145
Benzo[a] pyrene (BaP)	15,88 ± 14,99	17/156
Dibenzo [a,h] anthracene (dBahA)	10,58 ± 11,87	11/156
Indeno [1,2,3-c,d] pyrene (IP)	15,66 ± 15,83	13/145
Benzo [g,h,i] perylene (BghiP)	17,45 ± 25,33	27/145
Dibenzo [a,l] pyrene (dBalP)	17,80 ± 24,24	9/156
Dibenzo [a,e] pyrene (dBaeP)	24,00 ± 35,50	8/156
Dibenzo [a,i] pyrene (dBaiP)	29,67 ± 36,60	10/156
Dibenzo [a,h] pyrene (dBahP)	13,83 ± 4,98	9/156

La suite des analyses n'est effectuée qu'avec les résultats des dosages pour les molécules suivantes (cf. 2.4) : pp' DDE, HCB, HCH-β et ∑PCBi.

3.2. Comparaison des concentrations mesurées entre espèces

Les concentrations des substances ciblées sont significativement différentes entre les cinq espèces étudiées, toutes zones géographiques cumulées, pour le pp' DDE (ANOVA, $F_{4, 168} = 7.289$, $p<0.001$) et la ∑PCBi (ANOVA, $F_{4, 156} = 3.579$, $p<0.05$. En effet, les niveaux de pp' DDE sont plus importants chez les couleuvres à collier en comparaison aux couleuvres d'Esculape (Tukey HSD, $p<0.001$) et aux couleuvres vertes et jaunes (Tukey HSD, $p<0.001$; Figure 13). A contrario, les PCBi sont significativement plus concentrés chez les couleuvres d'Esculape comparé aux couleuvres à collier (Tukey HSD, $p<0.05$) et aux couleuvres vipérines (Tukey HSD, $p<0.05$; Figure 13).

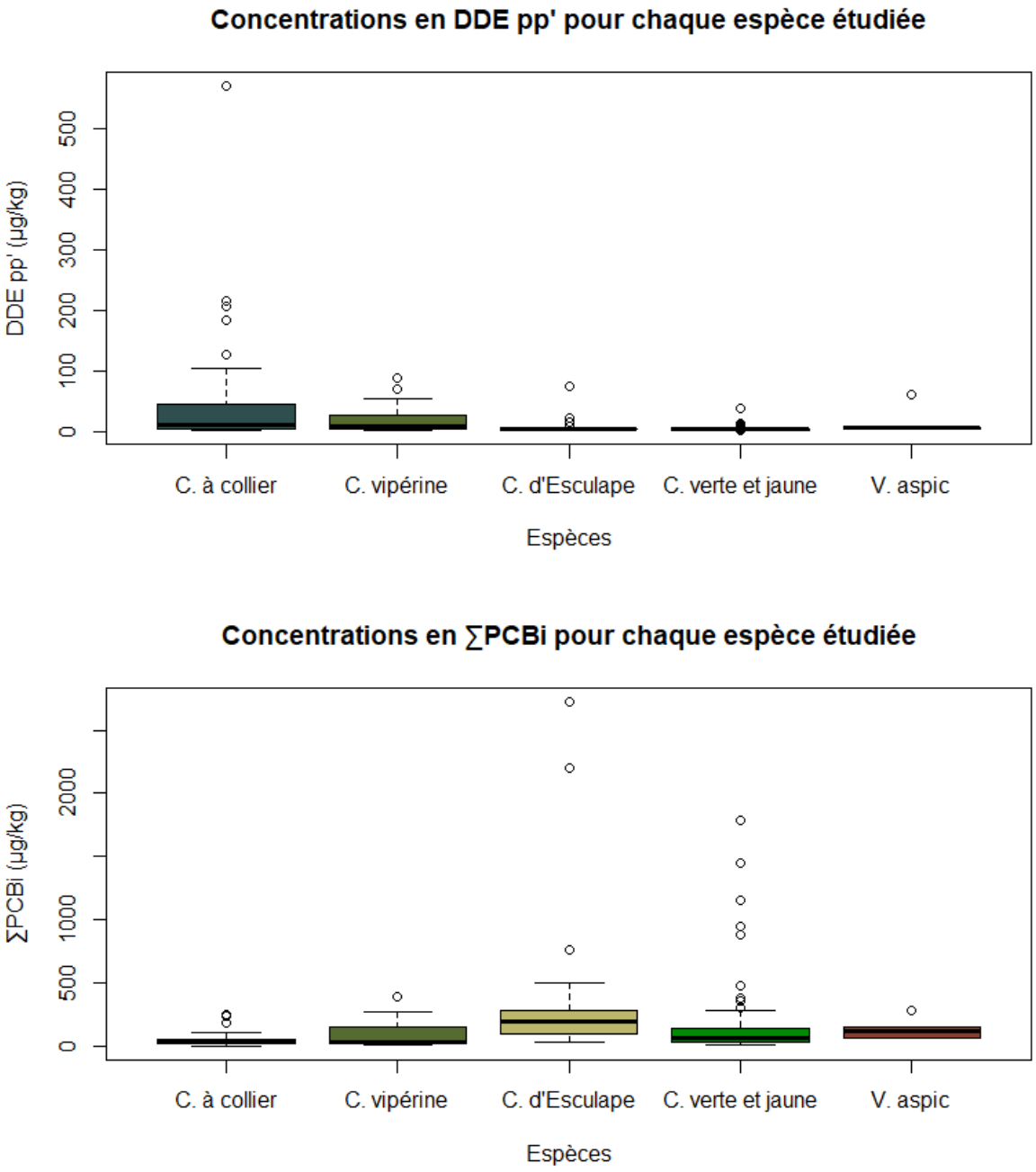


Figure 13. Niveaux mesurés dans chaque espèce pour le pp' DDE et la ∑PCBi (µg/kg)

3.3. Relation entre la taille et les concentrations mesurées

On trouve une relation positive entre la taille et les niveaux mesurés seulement dans le cas de la ∑PCBi chez la couleuvre vipérine (Spearman's rank correlation, r^2=0,50, $p<0,05$; Figure 14). Les autres espèces ne présentent pas de relation entre la taille et les concentrations mesurées.

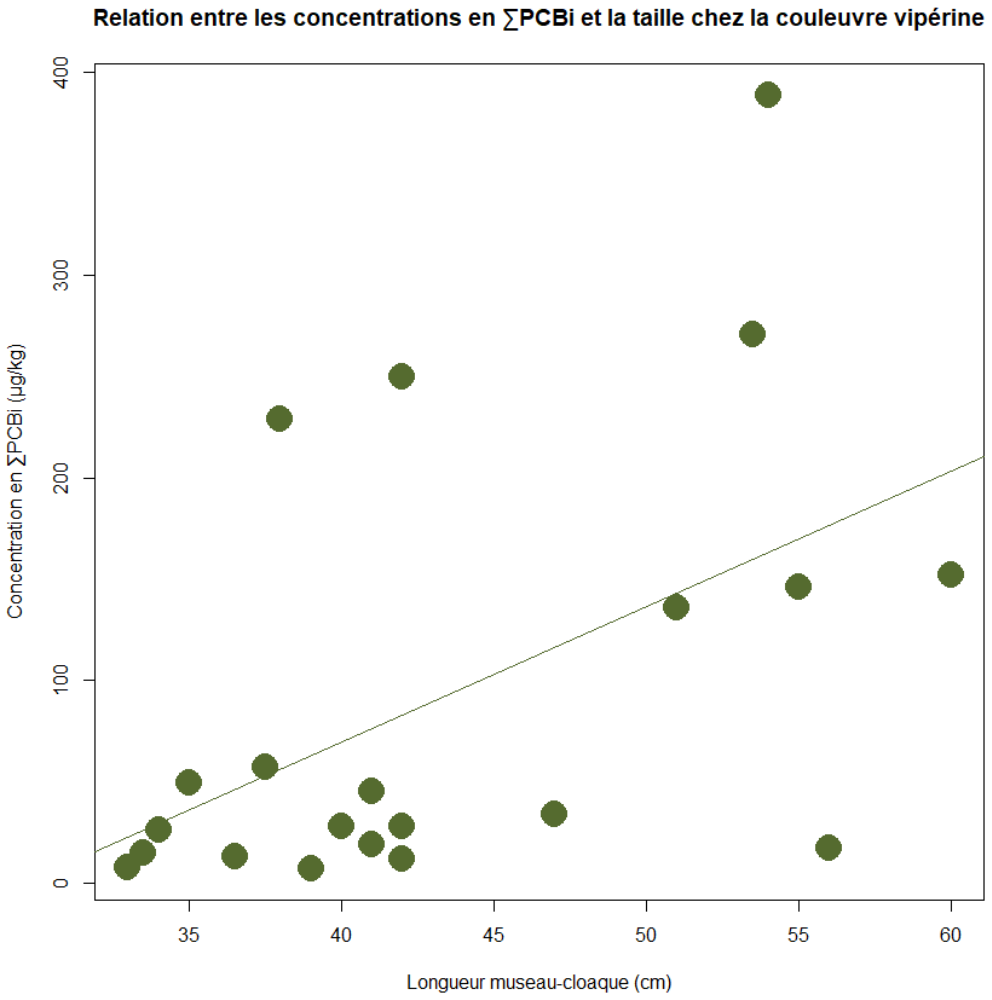


Figure 14. Relation entre la longueur museau cloaque (cm) et les niveaux mesurés pour la ∑PCBi (µg/kg) chez les couleuvres vipérines

3.4. Influence du sexe sur l'accumulation

On ne trouve aucune différence dans les niveaux des molécules analysées entre les sexes, quelle que soit l'espèce, ou l'origine géographique.

3.1. Différence d'accumulation selon l'origine géographique

On observe une différence dans les niveaux de PCBi entre les couleuvres vipérines provenant des Deux-Sèvres, et celles provenant de Brenne (ANCOVA, $F_{1,10}$=9,759, $p<0.05$). Les couleuvres vipérines des Deux-Sèvres sont plus contaminées par les PCBi que celles de Brenne (Figure 15). Pour les autres espèces, quelle que soit la substance considérée, on n'observe pas de différences des concentrations mesurées selon l'origine géographique des individus.

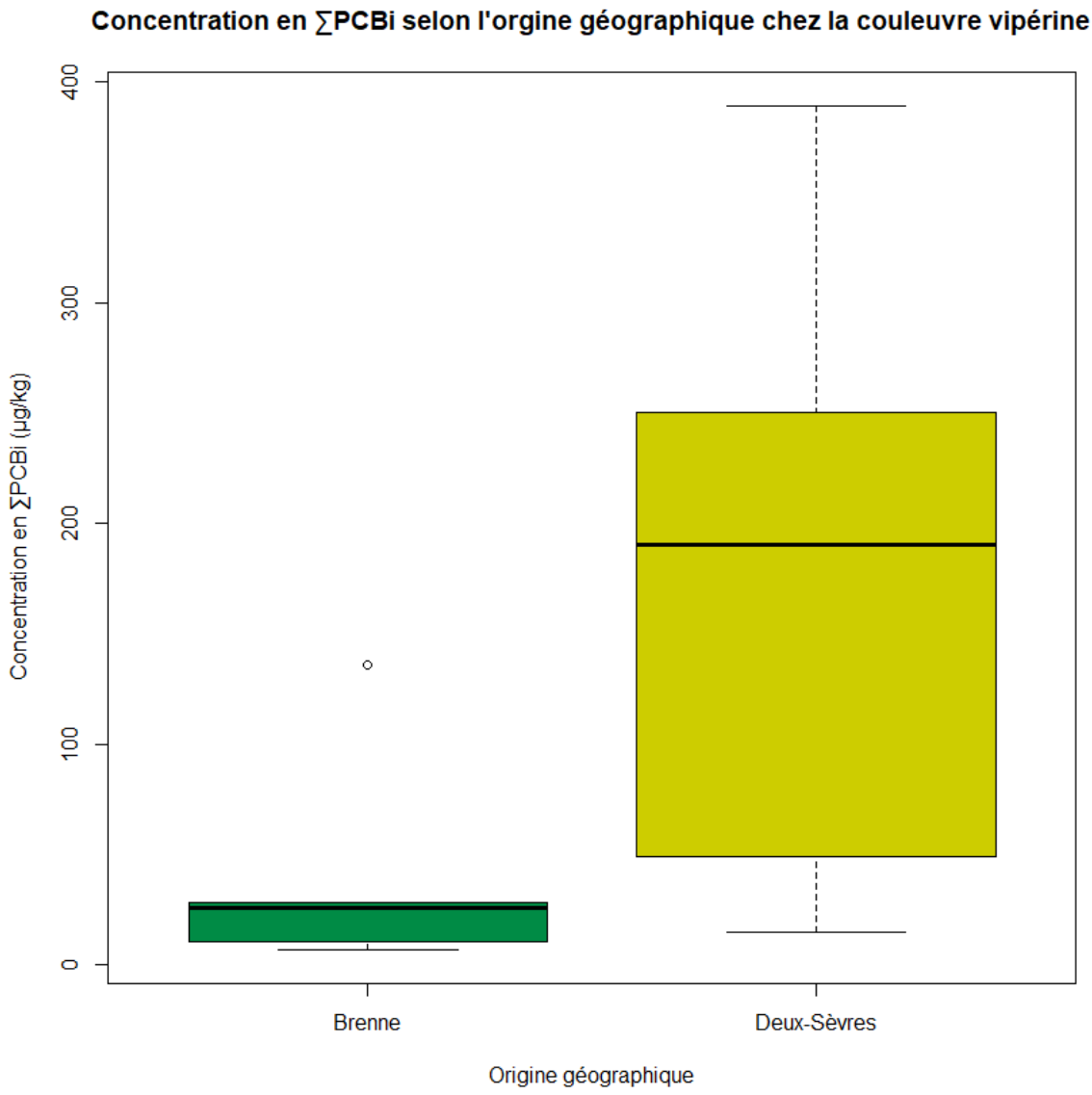


Figure 15. Niveaux de PCBi (µg/kg) mesurés dans les couleuvres vipérines selon leur origine géographique

3.2. Différence d'accumulation selon l'habitat

Pour étudier cette question, en accord avec les habitats des espèces (cf. 2.1.), nous avons utilisé les couleuvres vipérines et les couleuvres à collier pour représenter l'habitat aquatique, et les couleuvres vertes et jaunes, les couleurs d'esculape et les vipères aspics pour représenter l'habitat terrestre. Les couleuvres vipérines et les couleuvres à collier consomment des proies correspondant à leur habitat, à savoir principalement des poissons et des amphibiens, alors que les trois autres espèces se nourrissent principalement d'organismes terrestres, tels que des micromammifères.

On observe une différence entre l'habitat aquatique et l'habitat terrestre pour les concentrations en pp' DDE (ANCOVA, $F_{1,\ 142}$ = 23,200, p<0,001) et en PCBi (ANCOVA, $F_{1,\ 124}$ = 5,607, p<0,05). Les serpents d'habitats aquatiques semblent être plus contaminés par les pp' DDE, alors que les PCBi sont plus concentrés dans les serpents issus d'habitats terrestres (Figure 16).

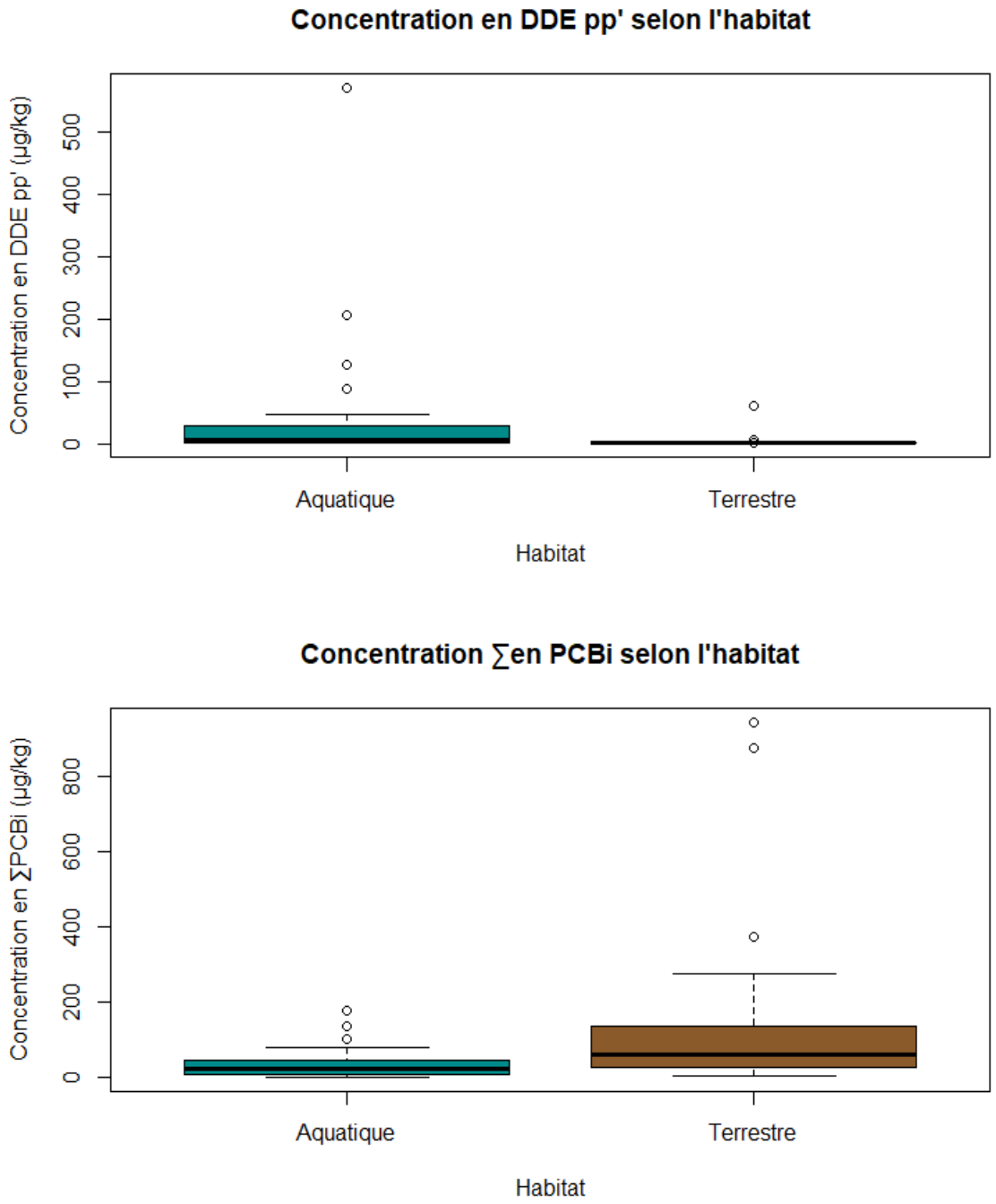


Figure 16. Niveaux de PCBi (µg/kg) mesurés dans les serpents de Brenne selon leur habitat

4. DISCUSSION ET CONCLUSION DE LA PARTIE 1

Les polluants organiques sont principalement issus des activités industrielles, urbaines et agricoles. Ils regroupent certains pesticides, les PCB et les HAP, et certains composés sont classés dans la catégorie des POP. Ces derniers se caractérisent par une forte persistance environnementale ; une toxicité reconnue ; une capacité à être mobiles sur de longues distances ; pour certains une bioaccumulation au sein des êtres vivants et une bioamplification le long des réseaux trophiques. La plupart des POP sont interdits à la synthèse et à la commercialisation depuis des années, mais du fait de leur persistance, sont encore présents dans les écosystèmes (Jones & de Voogt, 1999 ; Harrad, 2009 ; INERIS 2011 ; Rabodonirina, 2015). Il est important d'estimer la présence des polluants organiques dans l'environnement afin d'évaluer le risque associé de manière pertinente. Les travaux présentés dans ce chapitre démontrent la possibilité d'utiliser les serpents comme indicateurs de la contamination du milieu par des polluants organiques.

Dans un premier temps, nous avons identifié le corps gras comme étant un tissu efficace pour détecter les substances ciblées, ce qui est en accord avec la nature lipophiles de celles-ci. Ainsi, la tendance de ces molécules à s'accumuler dans les tissus adipeux en fait un réservoir intéressant à analyser. Cependant, il est toujours utile de connaitre la répartition des polluants dans l'ensemble d'un organisme, afin de comprendre leur métabolisme et de mesurer le risque qu'ils représentent pour des fonctions précises (Fontenot, 1997). De plus, les réserves adipeuses dépendent en général de l'état de nutrition et du statut reproductif de l'individu, puisqu'elles sont fortement mobilisées lors du jeûne, ou dans le cas des femelles, lors de l'ovogenèse ou de la gestation (Hall, 1980 ; Fontenot 1997). D'autres tissus peuvent ainsi être disponibles plus facilement tout au long de l'année quelle que soit l'état de l'individu. Les dosages de contaminants ont un coût non négligeable, ce qui nous a incité à ne rechercher les substances d'intérêt que dans un tissu qui permettrait une détection efficace. Cependant, dans la mesure du possible, il est souhaitable de ne pas négliger les autres organes dont le fonctionnement est susceptible d'être perturbé par les contaminants (foie, reins, muscles...).

Parmi les 42 pesticides organochlorés recherchés, seuls 16 ont été détectés dans les corps gras analysés. Les PCBi ainsi que les HAP ont systématiquement été détectés, cependant les niveaux de HAP mesurés ont rarement dépassé la Limite de Quantification. Du fait des caractéristiques connues de ces composés (prompts à la bioaccumulation et lipophiles) on peut estimer que les niveaux mesurés dans les individus sont représentatifs de l'exposition des individus. On peut donc considérer que si une molécule n'a pas été détectée dans les serpents, c'est qu'elle ne présente pas une biodisponibilité remarquable pour ces espèces dans les zones étudiées, ou qu'elle est présente en quantité trop faible pour être accumulée et mesurée lors des dosages. Cependant, l'absence d'une substance dans les tissus des espèces ciblées ici ne signifie pas que le milieu en est totalement exempt, et elle pourrait être disponible pour d'autres espèces. De plus, une faible exposition des individus est tout de même susceptible d'engendrer des effets, même à faible dose (Scott et al., 2013).

Les molécules les plus fréquemment détectées sont le pp' DDE, HCB, HCH β et les PCBi. L'Hexachlorobenzène (HCB) est un composé utilisé comme fongicide, et dont l'usage est interdit depuis 1981. Le β -Hexachlorocyclohexane (HCH β) est un sous-produit du HCH γ, aussi connu sous le nom de lindane, et utilisé comme insecticide jusqu'à son interdiction en 2007. Le Dichlorodiphenyldichloroethylene (DDE) est l'un des produits de décomposition les plus communs du Dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT), largement utilisé pour ses propriétés insecticides, et dont l'usage est interdit en France depuis 1972. Toutes ces molécules appartiennent à la catégorie des POP. Leur présence actuelle dans l'environnement est donc en accord avec leur nature persistante, et leur capacité à s'accumuler dans les organismes, et montre une contamination du milieu par ces substances, même des années après leur interdiction. Malgré l'arrêt de leur utilisation, ces molécules présentent donc toujours un risque écologique non négligeable, et doivent continuer d'être suivies.

On observe une différence des concentrations en pp' DDE et PCBi selon l'espèce. Les couleuvres à collier accumulent plus de pp' DDE que les couleuvres d'Esculape et les couleuvres vertes et jaunes, alors que les couleuvres d'Esculape accumulent plus de PCBi que les couleuvres à collier et les couleuvres vipérines.

Le régime alimentaire de ces espèces est différent. La couleuvre d'Esculape et la couleuvre verte et jaune se nourrissent principalement de micromammifères, alors que la couleuvre à collier et la couleuvre vipérine se nourrissent plus facilement d'amphibiens et de poissons. Il est donc possible que les concentrations en pp' DDE et PCBi varient initialement dans les proies, ce qui se répercute ensuite dans les niveaux plus hauts des réseaux trophiques. Ainsi, les amphibiens et poissons seraient plus chargés en pp' DDE et les micromammifères en PCBi, ce qui peut également être le résultat de leur propre régime alimentaire. De ce fait, la couleuvre à collier est représentative d'une chaîne alimentaire donnée, contaminée par le pp' DDE, et la couleuvre d'Esculape témoigne de la contamination aux PCBi d'une autre chaîne alimentaire. La contamination préférentielle de certains organismes par une molécule plutôt qu'une autre peut provenir de la disponibilité de celle-ci selon le milieu. En effet, la couleuvre d'Esculape et la couleuvre verte et jaune sont exclusivement terrestres, alors que la couleuvre à collier est semi-aquatique et la couleuvre vipérine aquatique. Or nous observons également une différence d'accumulation en fonction de l'habitat quelle que soit l'espèce, pour ces composés. Les individus qui utilisent des habitats terrestres accumulent plus de pp' DDE que les individus inféodés à l'habitat aquatique, et vice versa pour les PCBi. Que ce soit via une exposition directe selon la disponibilité du polluant dans le milieu, ou via l'alimentation, les serpents aquatiques reflètent mieux la contamination par le pp' DDE et les serpents terrestres, la contamination par les PCBi. Selon leur propriétés physico-chimiques, les substances ciblées ne se comportent peut être pas de la même manière selon les matrices de l'environnement. Les PCB sont par exemple des composés particulièrement peu solubles dans l'eau, et sont facilement adsorbés sur les sédiments, ce qui les rendent peu biodisponibles dans ce milieu. Ainsi le pp' DDE semble être plus disponible en environnement aquatique, et les PCB plus présents en milieu terrestre (Dargnat et Fisson, 2010 ; INERIS, 2011).

De plus, les couleuvres d'Esculape et les couleuvres vertes et jaunes rassemblées lors de notre échantillonnage opportuniste sont en général retrouvées dans des villages, alors que les couleuvres à collier et les couleuvres vipérines sont souvent récupérées aux abords d'étangs, ou sur des routes, mais pas forcément dans des zones particulièrement habitées. Etant donné que les PCB étaient utilisés dans l'industrie pour fabriquer entre autre des condensateurs, des transformateurs électriques ou encore des matériaux isolants, ou des peintures, on peut supposer que ce type de matériel est surtout présent dans des zones urbanisées, mais moins aux abords de mares, d'étangs, ou en plein champ. Il serait donc logique que les couleuvres d'Esculape ou vertes et jaunes présentent un risque d'exposition plus important à ces composés que leurs congénères aquatiques. De manière similaire, on peut penser que le pp' DDE, métabolite du DDT, est plus présent en dehors des villages, dû à l'utilisation de ce derniers dans les pratiques agricoles.

Dans la majeure partie des cas, on n'observe pas de différence dans l'accumulation des molécules ciblées selon l'origine géographique, quelle que soit l'espèce. Cela peut être dû au fait qu'une même espèce occupe une même position trophique dans les deux régions étudiées et que la biodisponibilité des polluants recherchés ici est la même dans les deux régions (Fontenot, 1997). En d'autres termes, le risque d'exposition des espèces étudiées serait assez semblable dans les Deux-Sèvres et en Brenne. Pourtant la Brenne étant une région relativement préservée, sans activité industrielle ou agricole intense on attendrait des différences. Il est possible que ce phénomène s'explique par la grande mobilité des polluants étudiés, qui peuvent être transportés sur de longues distances, et ainsi contaminer des régions éloignées de leur source d'émission. Il n'est pas rare en effet de retrouver des polluants organiques dans des zones situées loin de toute source d'émission, et à des concentrations relativement élevées (Baker, 1992 ; Jones et de Voogt, 1999). La seule exception à cette tendance est le cas de la couleuvre vipérine et de la contamination par les PCBi. Les couleuvres vipérines de Brenne sont moins concentrées en PCBi que celles des Deux-Sèvres. Cette tendance n'étant observable que pour une espèce, il est peu probable que cela soit représentatif de la contamination globale de ces deux régions, sinon le même phénomène devrait être observable chez les autres espèces.

La différence observée peut donc provenir de caractéristiques propres aux couleuvres vipérines. Il est possible que le régime alimentaire des couleuvres vipérines diffère entre les deux régions étudiées. En l'occurrence, les couleuvres vipérines de Brenne vivent dans un milieu caractérisé par des mares et des étangs, ce qui est associé à un régime alimentaire composé principalement d'amphibiens. Les couleuvres vipérines des Deux-Sèvres vivent généralement à proximité de petits cours d'eau, et présentent un régime alimentaire plus riche en poissons. Cette hypothèse semblerait donc indiquer que les poissons accumulent plus les contaminants étudiés que les amphibiens, ce qui se répercute donc sur les niveaux mesurés plus haut dans le réseau trophique (Norstrom, 2002).

De manière intéressante, on observe une relation entre les niveaux mesurés et la taille, à nouveau seulement dans le cas de la couleuvre vipérine et des concentrations en PCBi. Ces résultats sont étonnants étant donné la capacité des polluants étudiés à être bioaccumulé par les organismes. Un serpent plus long, et de ce fait plus âgé, devrait donc montrer des niveaux de contamination plus élevés. A nouveau, il peut s'agir d'une différence de régime alimentaire entre individus. Il est possible que celui-ci évolue au long de la vie des individus, et que les proies consommées par les juvéniles de cette espèce ne soient pas les même pour les adultes, ce qui ne permettrait pas de distinguer une tendance linéaire entre l'augmentation de la taille (i.e. de l'âge) et les niveaux de contaminants.

On n'observe pas d'influence du sexe des individus sur les niveaux mesurés, ce qui signifie que les différences de métabolisme entre les mâles et les femelles n'influencent pas l'accumulation des contaminants. Plusieurs auteurs émettent pourtant l'hypothèse que les femelles devraient être capables de détoxifier une partie des polluants qu'elles absorbent au moment de l'ovogenèse, et transférant ces substances dans leurs œufs (Santos et al., 1999 ; Hopkins, 2000 ; Nagle et al., 2001). Nos résultats n'indiquent pas que ce mécanisme aurait lieu pour les composés étudiés ici. De plus, quelques dosages complémentaires effectués sur des œufs durant mes travaux montrent des concentrations très basses par rapport aux niveaux mesurés dans les femelles correspondantes (Figure 17).

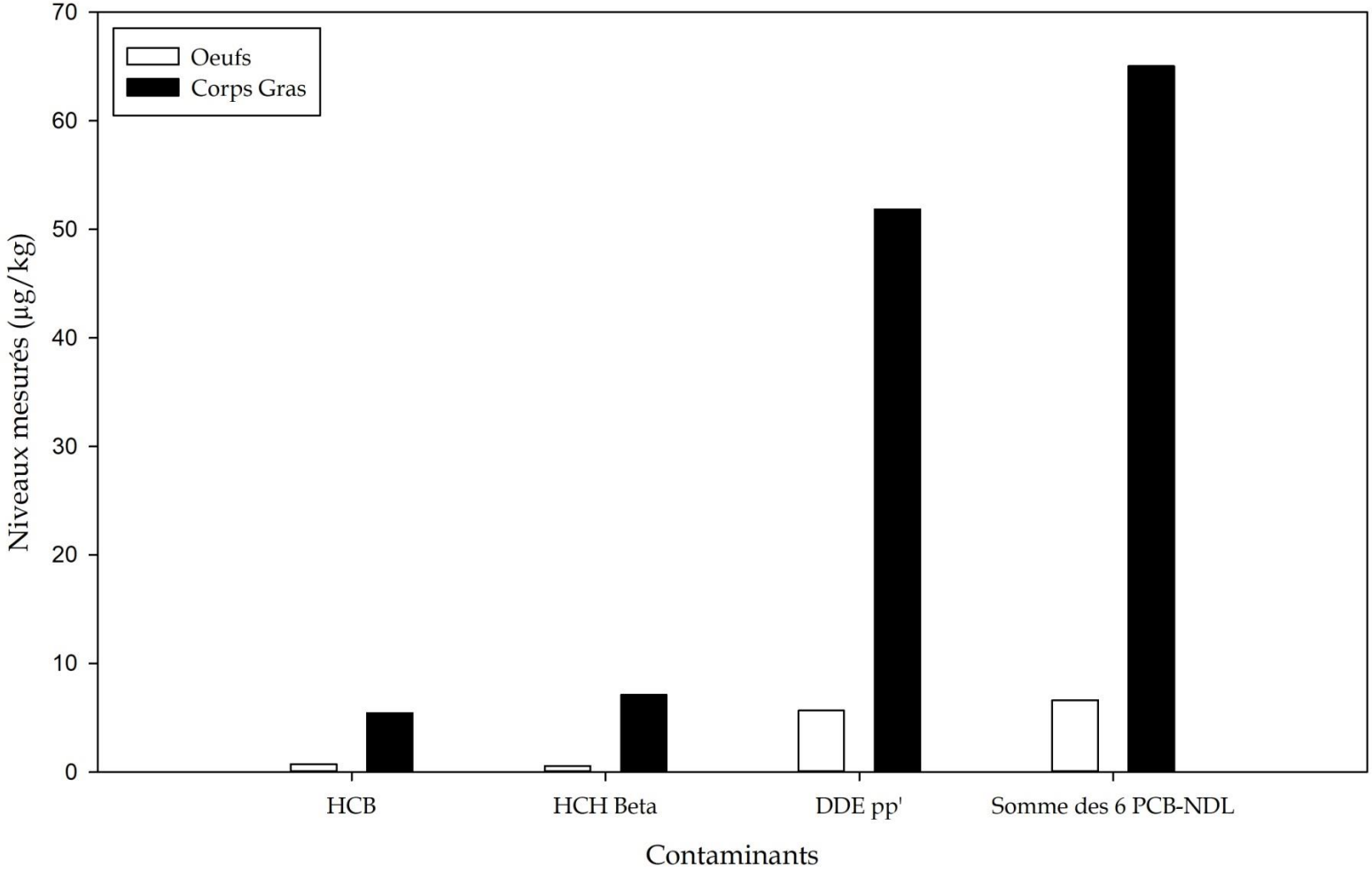


Figure 17. Comparaison des niveaux moyens de HCH, HCH β, pp' DDE et ∑PCBi (µg/kg) retrouvés dans du corps gras et dans les oeufs issus des mêmes individus

Globalement, les niveaux moyens de contaminant mesurés lors de cette étude ne sont pas particulièrement élevés en comparaison avec la bibliographie (Bauerle et al., 1975 ; Fontenot, 1997 ; Santos et al., 1999 ; Campbell & Campbell, 2001 ; Scott et al., 2013). Cependant, ces études s'intéressent la plupart du temps à des régions particulièrement touchées par des problèmes de pollution, notamment dans le cas des polluants issus d'activités industrielles (friches industrielles, bassins miniers etc…) ce qui n'est pas notre cas, particulièrement dans le cas de la Brenne. De plus, nombre de ces travaux ne sont pas récents et se situent donc moins loin dans le temps de l'interdiction de ces substances que nos travaux. Malgré la persistance des molécules étudiées, elles se dégradent au cours du temps. La contamination générale mis en évidence ici n'est donc pas à prendre à la légère puisqu'il s'agit de niveaux mesurés des décennies après l'interdiction de ces substances.

De plus, même si les niveaux moyens mesurés n'apparaissent pas alarmants en comparaison avec la littérature, certains individus montrent de fortes concentrations, témoignant d'une pollution ponctuelle importante, qu'il ne faut pas négliger. La concentration maximale mesurée en pp' DDE est par exemple de 570,40 µg/kg (contre une concentration moyenne de 24,62 µg/kg) et celle en PCBi est de 2 727,80 µg/kg (contre une concentration moyenne de 176,03 µg/kg), ces valeurs étant bien au-delà des normes alimentaires ou environnementales pour ces composés (INERIS, 2011). Ces résultats montrent que les serpents peuvent être utilisés pour mesurer une contamination globale moyenne à l'échelle d'une région par exemple, mais également pour détecter des micro-variations locales dans les niveaux de contaminants, et mettre ainsi en évidence des pollutions localisées et ponctuelles. Ils présentent donc un intérêt non négligeable en tant qu'indicateurs pour effectuer une cartographie des niveaux en contaminants, présentant un degré de précision pertinente.

Nos travaux montrent qu'il existe bien une contamination des serpents par certains polluants organiques, principalement ceux faisant partie de la catégorie des POP, et ce, même des années après leur interdiction. Les serpents peuvent donc être utiles comme organismes indicateurs de la contamination du milieu, et des organismes appartenant au même réseau trophique. Ils semblent être efficaces pour détecter la contamination à la fois des milieux terrestres, mais aussi aquatiques. Ce sont également des indicateurs très intéressants pour évaluer la contamination d'une zone à large échelle, mais aussi pour mettre en évidence des pollutions ponctuelles très localisées. Il faut cependant être prudent quant à l'espèce utilisée, en fonction de son mode de vie

PARTIE 2 - ACCUMULATION DES ELEMENTS TRACES CHEZ UNE ESPECE DE TORTUE D'EAU DOUCE, LA CISTUDE D'EUROPE (*EMYS ORBICULARIS*)

1. INTRODUCTION DE LA PARTIE 2

1.1. Les éléments traces métalliques

Les polluants organiques ne sont pas les seules substances polluantes présentant un risque important pour l'environnement. Les polluants inorganiques sont en effet également à prendre en considération, et parmi eux, les éléments traces métalliques (ETM), plus connu sous le terme de « métaux lourds ». On désigne ainsi des métaux et métalloïdes réputés toxiques quand ils sont présents en trop grande quantité.

Ces éléments sont généralement présents de manière naturelle en quantité faible dans les écosystèmes. Tous les sols contiennent en effet des éléments traces métalliques (fond géochimique), qui se retrouvent ensuite dans toutes les matrices de l'environnement. La quantité d'éléments dans un milieu non contaminé par l'homme dépend alors de la géologie du lieu. En général, elle ne dépasse pas 1g/kg (INERIS, 2006 ; Gouzy et Ducos, 2008). Cependant, certains ETM présentent des niveaux anormalement élevés, généralement dus aux activités anthropiques ou à des phénomènes naturels particuliers (volcanisme…). Mais le développement de l'industrie est étroitement lié à l'utilisation des éléments traces en grandes quantités. Depuis le début de l'ère industrielle, les relargages anthropogéniques d'éléments métalliques tels le plomb, le mercure, le zinc ou le cadmium ont été multipliés par trois, et la consommation de ces éléments a augmenté de 300% durant la seconde moitié du XXème siècle (INERIS, 2006 ; Gouzy et Ducos, 2008).

Les ETM présents à fortes concentrations de manière non naturelle dans l'environnement peuvent avoir plusieurs origines : industrielle, urbaine et agricole. Ils peuvent provenir d'une pollution locale, due à la présence de friches industrielles. La contamination peut également provenir des stations d'épuration, des effluents industriels, des ruissèlements urbains, des moyens de transports.

L'activité agricole peut également être responsable de l'entrée de certains éléments traces dans l'environnement. En effet, certains produits phytosanitaires et engrais contiennent des éléments métalliques. L'épandage sur les cultures de lisiers ou de boues de station d'épuration provoque également une contamination des sols (INERIS, 2006 ; Gouzy et Ducos, 2008 ; Papp, 2011).

A l'instar des POP, les ETM sont également caractérisés par une longue persistance, une capacité à la bioaccumulation dans les organismes et à la bioamplification dans les réseaux trophiques, et, pour certains, par une toxicité importante (Papagiannis et al., 2004). De ce fait, il est également important d'évaluer le risque écologique qui leur est associé, par le biais d'organismes indicateurs.

1.2. Objectifs de la partie

Les zones humides sont considérées comme des habitats d'une importance primordiale grâce aux divers services écosystémiques qu'elles fournissent (Keddy, 2000; Brinson and Malvarez, 2002; Dudgeon et al., 2006), mais elles font également partie des écosystèmes les plus menacés au monde, notamment en raison de leur contamination par divers polluants (Dugan, 1993). Durant les travaux de cette thèse nous nous sommes intéressés à une zone supposément peu contaminée : le Parc Naturel Régional de la Brenne. Il s'agit d'une des plus grandes zones humides de France. Elle abrite notamment la plus grande population de Cistude d'Europe (*Emys orbicularis*) de France (Figure 18). C'est une petite tortue d'eau douce vivant dans les étangs, mares et marais. Il s'agir de la seule tortue d'eau douce naturellement présente dans l'Ouest de la France (Boissinot et al., 2015).

Figure 18. Cistude d'Europe (Emys orbicularis)

Pour des raisons similaires à celles liées à l'utilisation des serpents, les tortues constituent de bons indicateurs pour évaluer la contamination des écosystèmes. Nous avions également la possibilité de récupérer des carcasses de tortues retrouvées mortes sur les routes ou sur le terrain en Brenne. Nous avons donc saisi l'opportunité de pouvoir utiliser ces carcasses pour évaluer la contamination par certains EMT (Tableau 7) d'une des plus grandes zones humides de France en utilisant la Cistude d'Europe comme organisme indicateur. Le travail réalisé dans le cadre de cette deuxième partie du premier chapitre a fait l'objet de la rédaction d'un article. C'est pourquoi le contexte global, la méthodologie les résultats et la discussion de ces résultats sont présentés dans l'Article 1 ci-dessous.

Eléments traces métalliques essentiels	Eléments traces métalliques non-essentiels
Arsenic (As)	Argent (Ag)
Cobalt (Co)	Cadmium (Cd)
Chrome (Cr)	Mercure (Hg)
Cuivre (Cu)	Plomb (Pb)
Fer (Fe)	
Manganèse (Mn)	
Nickel (Ni)	
Selenium (Se)	
Vanadium (V)	
Zinc (Zn)	

Tableau 7. Liste des éléments traces métalliques essentiels et non essentiels étudiés ici

2. ARTICLE 1 : TRACE ELEMENT CONCENTRATIONS IN EUROPEAN POND TURTLES (EMYS ORBICULARIS) FROM BRENNE NATURAL PARK, FRANCE - SOUMIS A ENVIRONMENTAL MONITORING AND ASSESSMENT

Héloïse Guillot[1], Xavier Bonnet[1], Paco Bustamante[2], Carine Churlaud[2], Jacques Trotignon[3], François Brischoux[1]

1. Centre d'Etudes Biologiques de Chizé, CEBC UMR 7372 CNRS-ULR, 79360 Villiers en Bois, France

2. Littoral Environnement et Sociétés (LIENSs), UMR 7266 CNRS-Université de La Rochelle, 2 rue Olympe de Gouges, 17000 La Rochelle, France

3. Réserve Naturelle Nationale de Chérine, Maison de la Nature et de la Réserve, 36290 Saint-Michel-en-Brenne, France

Corresponding author:

H. Guillot (heloise.guillot@cebc.cnrs.com)

Centre d'Etudes Biologiques de Chizé, CEBC-CNRS UPR 1934, 79360 Villiers en Bois, France

Manuscript for consideration in *Environmental Monitoring and Assessment*

Abstract

Trace elements are well-known for their ability to contaminate aquatic environments through various pathways. The continuity of aquatic systems facilitates the transfer of elements, and thus the contamination of areas apparently unscathed from direct sources of pollution; which in turn complicates contamination assessments in the field. We opportunistically sampled road-killed European pond turtles (*Emys orbicularis*, N=46) to monitor trace elements contamination in a Natural Park (Brenne, France). We measured the concentrations of 4 non-essential elements (Ag, Cd, Hg, and Pb) and of 10 essential elements (As, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Se, V and Zn) in different tissues: muscle, skin, liver and claws. Body size (thus presumably age) or sex did not influence the concentrations of most trace elements; except for levels of Zn (muscle) and Hg (claws, liver and skin) which increased with body size. High levels of Hg were observed, possibly caused by the methylating activity of bacteria in freshwater environment. Relatively high levels of Zn were likely induced by piscicultural activities (i.e., food pellets containing ZnO). These results indicate that *E. orbicularis* accumulate trace elements. Relatively high concentrations of Hg and Zn deserve future investigations to evaluate if they are related to toxic effects.

Key-words: trace elements; contamination; wetlands; *Emys orbicularis*

Introduction

Wetlands are recognized as important habitats for different reasons; they are characterised by a high biodiversity, high productivity, and they play essential roles for water supply (Keddy 2000; Brinson and Malvarez 2002; Dudgeon et al. 2006). Nevertheless they are among the most endangered ecosystems in the world, suffering from a drastic reduction of their surface and from a degradation of water quality due to pollution by various environmental contaminants (Dugan 1993). Accordingly, wetlands are considered as ecosystems that require priority conservation actions (Gayet et al. 2016).

Monitoring environmental contaminations in wetlands is difficult because wetlands are connected to complex and large hydric networks composed by both surface and underground waters. Contaminants originate from various sources and can enter aquatic ecosystems through various pathways: atmospheric deposition, agricultural drainage, mining activity, or industrial effluents can be simultaneously involved for example (Förstner and Wittman 1981). Thes variety of pathways combined with the connectivity of aquatic systems can induce a flow of elements that contaminates distant areas that otherwise appear unscathed from direct sources of pollution (Baker 1992). Among environmental contaminants, trace elements are well-known for their ability to enter and move across aquatic environments (Agarwal 2009; Förstner and Wittman 1981). These elements comprise both non-essential elements (e.g., Cd, Hg, Pb) and essential elements (e.g., Cu, Mn, Zn). Non-essential elements exhibit high toxicity at low concentrations, while essential elements are crucial to many biological processes but may become toxic when they exceed normal levels (Förstner and Wittman 1981). Overall, trace elements represent a threat to aquatic ecosystems because of their high toxicity, long persistence, bioaccumulation in organisms and biomagnification in the food chain (Agarwals 2009). Biological monitoring is useful to assess chemical contamination of natural environments (Meyers-Schönne et al., 1993; Overmann and Krajicek 1995).

Freshwater turtles are suitable organisms to survey contamination levels in aquatic ecosystems (Nagle et al. 2001; Yu et al. 2011; Malik et al. 2013; Yadollahvand et al. 2014; Allender et al. 2015). First, they are widely distributed and occupy a variety of habitats (Yadollahvand et al. 2014). Second, they have a long life expectancy, which allows studying bioaccumulation processes and long-term trends of contaminants (Allender 2015). Third, they occupy high trophic levels in the food web, thereby enabling to integrate information about accumulation in underlying trophic levels (Yu et al. 2011). Finally, most species are sedentary and provide information on the contamination at a precise location (Yadollahvand et al. 2014; Yu et al. 2011). Accordingly, several species of freshwater turtles have been successfully used as biomonitors for environmental contaminations, including trace elements contamination (Meyers-Schönne et al. 1993; Overmann and Krajicek 1995; Ayub et al. 2001; Nagle et al. 2001; Yu et al. 2011; Malik et al. 2013; Yadollahvand et al. 2014; Allender et al. 2015).

In this study, we used opportunistic sampling of road-killed European pond turtles (*Emys orbicularis*) to study trace elements contamination of one of the largest French wetlands: the Brenne Natural Park, located in the Center of France. Specifically, the goals of our study were:

i) To document the concentrations of 4 non-essential trace elements (Ag, Cd, Hg, and Pb) and 10 essential trace elements (As, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Se, V and Zn) in the muscle, skin, liver and claws of *E. orbicularis*.

ii) To investigate the relationship between the concentration of these elements and the sex and the size (age) of the turtles.

iii) To compare trace elements concentration with values found in other species of freshwater turtles.

Material and methods

Study species and sampling

Emys orbicularis is a small European freshwater turtle species occurring in Central and South France (Priol et al., 2008). A large population is located in the Brenne region which is one of the largest wetlands in France. This area is characterized by a matrix of large ponds and wetland habitats (Arvy and Servan, 1998). Carcasses of pond turtles were found on roads situated in vicinity of the Réserve Naturelle Nationale de Chérine (46°47'25.23"N, 1°12'3.54"E) between 2008 and 2014. A total of 46 turtles were collected including 38 adults (17 females, 16 males, 5 damaged individuals that could not be sexed) and 8 juveniles (not sexed). The length of the carapace and the plastron were measured when possible. Because of the condition of the road killed turtles, we could precisely measure carapace length on only 24 individuals while plastron length was available on 42 individuals. Plastron and carapace length are highly correlated in chelonians (Bonnet et al. 2001); therefore we used plastron length as an index of body size to investigate possible relationships between trace elements concentration and turtle size.

Sample preparation and trace elements analyses

All individuals were dissected to take samples of leg muscles, leg skin, liver and the whole claws were collected when possible, according to the condition of the individuals (Table 1). We were able to collect 39 muscles samples, 44 skin samples, 17 liver samples and 43 claws samples. Because of the limiting mass of the claw samples, only Hg concentrations were measured in this tissue.

The muscles, skin and liver samples were lyophilized and hand-grinded with a porcelain mortar and pestle. Claws were washed with a mixture of 2:1 chloroform/methanol solution in an ultrasonic cleaner and rinsed in milli-Q quality water. Claws were then dried for 48 h at 50 °C. The average weights of the tissue samples used were 200 mg for muscles samples, 215 mg for skin samples, 119 mg for liver samples and 12 mg for claws.

Total Hg concentration measurements were performed using and atomic absorption spectrophotometer (Advanced Mercury Analyser-254, Altec) on dried tissue aliquots (ranging from 2 to 10 mg). The analytical process consists in a drying period, prior to a combustion phase at 750°C which leads to the release of Hg from the samples. Subsequently, the Hg vapour produced is carried by an oxygen flow to a gold amalgamator, and trapped in its surface. Thereafter, the collected Hg is liberated from the amalgamator by a short heat-up and then detected by an atomic absorption spectrophotometer. All analyses were repeated 2 to 3 times until having a relative standard deviation below 10%. Accuracy was checked using TORT-2 Lobster Hepatopancreas (NRC, Canada) as certified reference material (CRM). Blanks were analysed at the beginning of each set of samples and the detection limit of the method was 0.05 ng. Other elements (silver, Ag; arsenic, As; cadmium, Cd; cobalt, Co; chromium, Cr; copper, Cu; iron, Fe; manganese, Mn; nickel, Ni; lead, Pb; selenium, Se; vanadium, V and zinc, Zn) were analysed using a Varian Vista-Pro ICP-OES and a Thermo Fisher Scientific X Series 2 ICP-MS (following Métian et al., 2008). Aliquots of liver, muscle, and skin samples (30–300 mg) were digested with 6 ml 67–70% HNO_3 and 2 ml 34–37% HCl (Fisher Scientific, trace element grade quality), except for the samples with a weight below 0.1g (3 ml HNO_3 and 1 ml HCl). Acidic digestion was carried out overnight at room temperature and then in a Milestone microwave (30 min with constantly increasing temperature up to 120 °C, and finally 15min at this maximal temperature). Each sample was completed to 50 ml (25 ml for samples with a weight below 0.1g) with milli-Q water. CRM (DOLT-4 dogfish liver (NRC, Canada) and TORT-3 Lobster Hepatopancreas (NRC, Canada) and blanks treated and analysed in the same way as the samples were included in each analytical batch. The recovery ratio were in good agreement with DOLT-4: 94%(Ag); 99%(As); 105%(Cd); 104%(Cu); 90%(Fe); 99%(Ni); 87%(Pb); 101%(Se) and 101%(Zn) and TORT-3: 109%(As); 101%(Cd); 101%(Co); 95%(Cr); 103%(Cu); 86%(Fe); 96%(Mn); 97%(Ni); 93%(Pb); 101%(Se); 99%(V) and 96%(Zn)). The limits of quantification (µg/g) are 0.01(Ag); 0.12(As); 0.01(Cd); 0.01(Co); 0.12(Cr); 0.02(Cu); 5.03(Fe); 0.01(Mn); 0.05(Ni); 0.01(Pb); 0.5(Se); 1.26(V) and 5.03(Zn). Trace element concentrations are expressed in µg g^{-1} dw.

Statistical analyses

Trace elements for which concentrations were lower than the Limit of Detection (LoD) in more than 30% of the samples (Table 1, Cd in muscle and skin samples; Cr in liver samples; Ag in muscle, skin and liver samples and V in muscle, skin and liver samples) were excluded from statistical analyses (EPA 2000). For the other samples, concentration below the limit of detection were replaced by (LoD)*0.5 for statistical analyses (EPA 2000).

We used Analyses of Variance (ANOVAs) to compare trace element concentration among tissues.

To investigate the influence of sex on trace element concentrations, possible sexual size dimorphism was considered: plastron length was compared between sexes (when sex was known) with a Kruskal Wallis test (data were not normally distributed). Because females were larger than males (see results), we used ANCOVAs to test for sex effects in trace element concentrations (normality and homoscedasticity were respected), using plastron length as the covariate.

To investigate the influence of body size (hence presumably age) on trace element concentrations, and thus the bioaccumulation of these elements through time, we used Spearman rank's correlation between trace elements and plastron length.

Results

Summary statistics

The mean concentrations of each trace element in muscles, skin and liver, and of Hg in claws are presented in Table 1. All trace elements investigated were detected in the organs of European pond turtles. Among them, only four elements (Cd in muscle and skin; Cr in liver; Ag in muscle, skin and liver and V in muscle, skin and liver) were below the LoD in >30% of individuals (Table 1).

	Muscles		Skin		Liver		Claws		
Essential trace elements	N	Mean ± SD	N	Mean ± SD	N	Mean ± SD	N	Mean ± SD	Test
As	35/39	0.64 ± 0.39	42/44	1.17 ± 1.02	15/16	0.56 ± 0.57	-	-	$F_{2, 96}$=5.311, p<0.01
Co	39/39	0.14 ± 0.09	44/44	0.18 ± 0.19	16/16	0.48 ± 0.91	-	-	$F_{2, 95}$=0.85, p=0.431
Cr	39/39	7.36 ± 4.55	42/43	4.00 ± 2.04	8/16	3.87 ± 12.68	-	-	$F_{1,80}$=19.73, p<0.001
Cu	39/39	5.00 ± 0.82	44/44	3.02 ± 0.92	16/16	11.98 ± 4.54	-	-	$F_{2, 96}$=122.1, p<0.001
Fe	39/39	279 ± 115	42/42	316 ± 173	11/11	464 ± 164	-	-	$F_{2, 89}$=6.476, p<0.005
Mn	34/34	6.79 ± 4.72	40/40	14.32 ± 13.68	16/16	10.44 ± 13.41	-	-	$F_{2, 87}$=4.233, p<0.05
Ni	39/39	2.72 ± 2.13	43/43	1.61 ± 0.82	15/16	0.63 ± 1.42	-	-	$F_{2, 94}$=11.13, p<0.001
Se	38/38	3.17 ± 1.03	44/44	2.25 ± 0.83	16/16	7.56 ± 7.89	-	-	$F_{2, 95}$=15.95, p<0.001
V	-	-	2/44	0.99 ± 0.12	5/17	9.64 ± 4.51	-	-	-
Zn	39/39	161 ± 30	44/44	64 ± 15	16/16	139 ± 36	-	-	$F_{2, 96}$=154.4, p<0.001
Non-essential trace elements									
Ag	15/39	0.019 ± 0.010	25/44	0.026 ± 0.021	11/17	0.027 ± 0.016	-	-	-
Cd	26/39	0.015 ± 0.012	24/44	0.013 ± 0.012	15/15	0.129 ± 0.123	-	-	-
Hg	39/39	0.662 ± 0.375	44/44	0.484 ± 0.367	17/17	1.128 ± 1.077	43/43	1.346 ± 0.939	$F_{3,139}$=13.28, p<0.001
Pb	39/39	0.21 ± 0.19	44/44	0.36 ± 0.31	16/18	0.74 ± 2,51	-	-	$F_{2, 95}$=7.685, p<0.001

Table 1. Trace elements concentrations (µg/g dw) in skin, muscle, liver and claws (Hg only) of Emys orbicularis. *N: sample with concentration above the LoD /sample size. Test results indicate the comparison of the concentrations of each element between tissues.*

Sex and size effects

The mean body size of females and males (16.1±1.3cm vs 12.7±2.4cm, respectively) was significantly different (Kruskal-Wallis chi-squared = 19.7449, df = 1, $p < 0.01$).

We did not detect any influence of the sex on the concentrations of trace elements in all any of the studied tissues (all $p > 0.12$).

We found positive relationships between body size and [Zn] in muscle ($F_{1, 34}$=22.12, r^2=0.39, p<0.0001, Fig. 1) and [Hg] in skin, liver and claws ($F_{1, 38}$=4.16, r^2=0.10, p=0.04, $F_{1, 15}$=4.02, r^2=0.21, p=0.06, $F_{1, 37}$=7.16, r^2=0.16, p=0.01 respectively, Fig. 2).

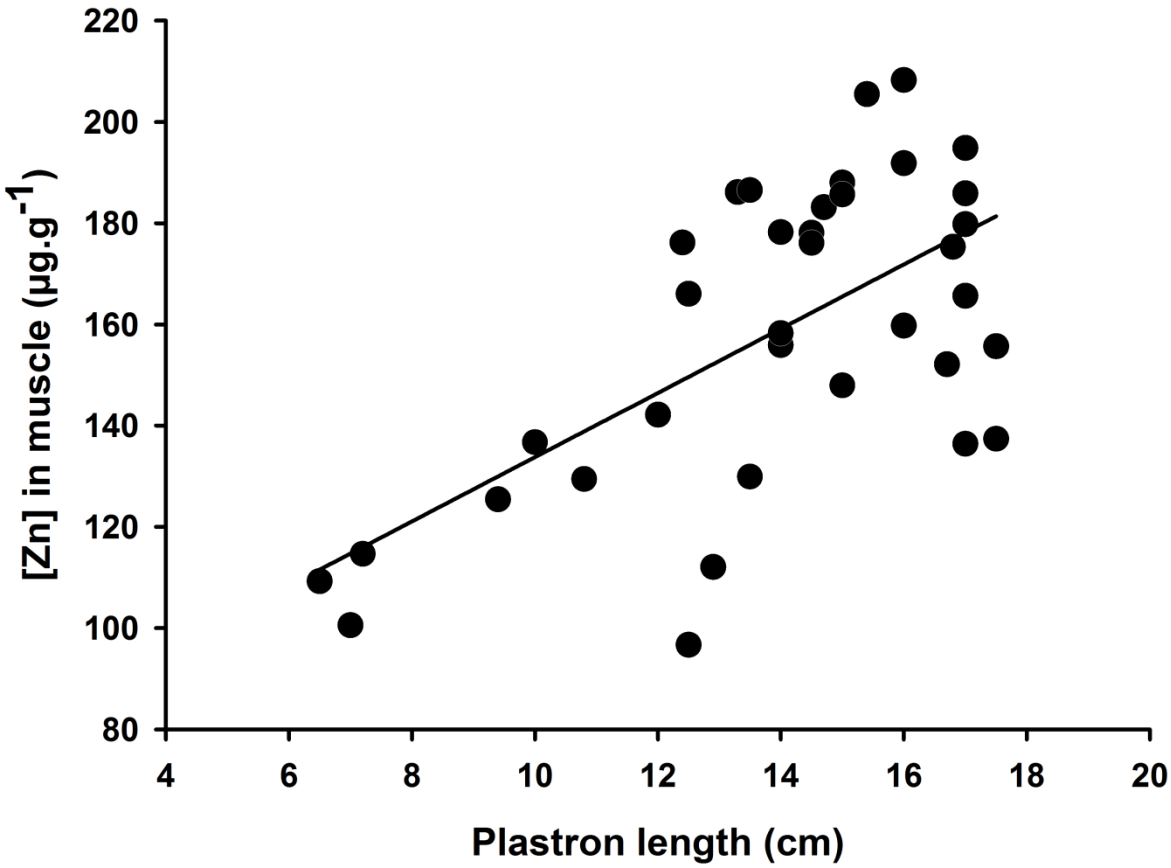


Fig. 1. Relationship between turtle size (plastron length) and concentrations of Zn in muscles (r^2=0.39)

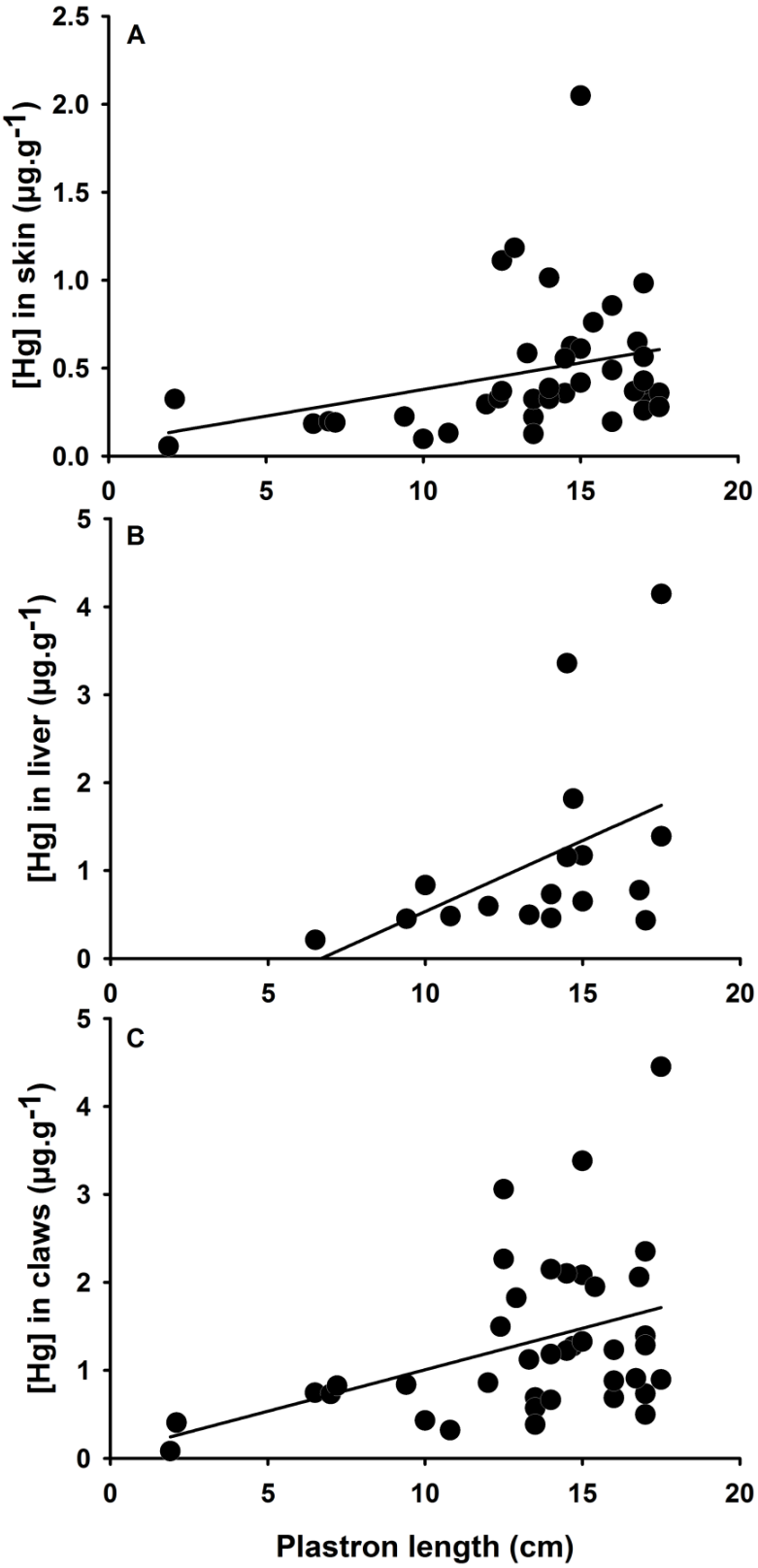


Fig. 2. Relationship between turtle size (plastron length) and concentrations of Hg in (A) skin (r^2=0.10), (B) liver (r2=0.21) and (C) claws (r2=0.16)

Discussion

In this study, the concentrations of all the trace elements targeted were sufficiently elevated to be effectively measured (i.e. 4 toxic non-essential elements and 10 essential trace elements). Trace elements were successfully assayed in different body tissues of European pond turtles sampled in one of the largest wetland of France. Therefore, this chelonian provided information that offers comparison values for future investigations in a major European aquatic ecosystem.

Freshwater turtles can achieve life span of over 40 years and have therefore a potential to bioaccumulate trace elements and other pollutants (Allender, 2015). Our review of the concentrations of trace elements in muscles and liver of other freshwater turtle species (Tables 2 and 3) highlights the relatively high concentrations of some trace elements in *E. orbicularis* from Brenne Natural Park, and the relatively low concentrations for other elements. For instance, we detected relatively high values of Cr, Cu, Hg, Mn, Ni and Zn in the muscles as well as relatively elevated concentrations of Hg, Mn and Zn in the liver (Tables 1 & 2).

We did not detect any sex effect on trace element concentrations in *E. orbicularis*, suggesting that feeding, metabolism or growth rates were broadly similar for both genders as shown in other freshwater species (Albers et al. 1986; Allender et al. 2015; Bishop et al. 2010; Yu et al. 2011). In addition, this further suggests that eggs may not be used as a major excretion pathway in female *E. orbicularis* (Burger and Gochfeld 1991; Burger 1994; Russel et al. 1999; Nagle et al. 2001). However, the condition of the road killed turtles did not allow us to assess the developmental status of the gonads or the eggs, which would be needed to make a definitive conclusion on the maternal transfer of trace elements.

	Aspideretes gangeticus (Malik et al., 2013)		*Trachemys callirostris* (Zapata et al., 2014)[c]		*Mauremys caspica* (Yadollahvand et al., 2014)	*Trachemys scripta elegans* (Yu et al., 2011)	*Emys orbicularis* (Present study)
As	-	-	-	-	-	-	0.71 ± 0.36 [b]
Cd	0.23 ± 0.03[a]	0.05 ± 0.01 [a]	-	-	2.51±0.24[b]	-	0.021 ± 0.012 [b]
Co	3.71 ± 0.04 [a]	4.12 ± 0.05 [a]	-	-	-	-	0.14 ± 0.09 [b]
Cr	0.94 ± 0.06 [a]	0.71 ± 0.16 [a]	-	-	-	1.524 ± 0.197 [a]	7.36 ± 4.55 [b]
Cu	2.57 ± 0.11 [a]	1.61± 0.27 [a]	-	-	4.50±1.09 [b]	4.331 ± 0.895 [a]	5.00 ± 0.82 [b]
Fe	370.25 ± 38.60 [a]	164.6 ± 25.41 [a]	-	-	-	-	279 ± 115 [b]
Hg	-	-	0.08 ± 0.03 [a.c]	0.05 ± 0.04 [a.c]	-	-	0.662 ± 0.375 [b]
Mn	5.56 ± 0.63 [a]	2.35 ± 0.15 [a]	-	-	-	-	6.79 ± 4.72 [b]
Ni	1.02 ± 0.16 [a]	1.4 ± 0.56 [a]	-	-	-	-	2.72 ± 2.13 [b]
Pb	1.23 ± 1.40 [a]	1.03 ± 0.48 [a]	-	-	27.45 ± 3.69 [b]	0.327 ± 0.078 [a]	0.21 ± 0.19 [b]
Se	-	-	-	-	-	-	3.17 ± 1.03 [b]
Zn	71.99 ± 9.27 [a]	38.63 ± 3.53 [a]	-	-	150.67 ± 35.49 [b]	-	161 ± 30 [b]

Table 2. Review of trace elements concentrations (µg/g dw) found in the muscles of freshwater turtle species. a indicates values expressed as mean±SE. b indicates values expressed as mean±SD. c indicates that the values have been converted form wet weight to dry weight (considering a net content of 79% of water in muscles, Maffucci et al. 2005)

	Aspideretes gangeticus (Malik et al., 2013)		*Trachemys scripta* (Nagle et al., 2001)	*Mauremys caspica* (Yadollahvand et al., 2014)	*Trachemys scripta elegans* (Yu et al., 2011)	*Emys orbicularis* (Present study)
As	-	-	9.56 ± 2.42 [a]	-	-	0.61 ± 0.56 [b]
Cd	0.25 ± 0.04[a]	0.18 ± 0.05 [a]	3.57 ± 1.46 [a]	5.80 ± 2.32 [b]	-	0.129 ± 0.122 [b]
Co	5.12 ± 0.05 [a]	0.37 ± 0.06 [a]	-	-	-	0.48 ± 0.90 [b]
Cr	0.39 ± 0.1 [a]	0.39 ± 0.09 [a]	6.19 ± 1.39 [a]	-	3.321 ± 0.559a	1.45 ± 2.74 [b]
Cu	21.23 ± 2.36 [a]	16.24 ± 2.54 [a]	102.23 ± 44.86 [a]	6.14 ± 3.89 [b]	12.213 ± 1.829 [a]	11.98 ± 4.54 [b]
Fe	1110.8 ± 203.32 [a]	837.55 ± 147.23 [a]	-	-	-	464 ± 164 [b]
Hg	-	-	-	-	0.719 ± 0.100 [a]	1.13 ± 1.08 [b]
Mn	5.79 ± 0.71 [a]	5.50 ± 0.29 [a]	-	-	-	10.44 ± 13.41 [b]
Ni	1.67 ± 0.15 [a]	0.54 ± 0.19 [a]	-	-	-	0.63 ± 1.42 [b]
Pb	1.93 ± 0.32 [a]	2.33 ± 0.42 [a]	-	33.41 ± 6.22 [b]	1.111 ± 0.255 [a]	0.79 ± 2.59 [b]
Se	-	-	37.18 ± 10.92 [a]	-	-	7.56 ± 7.89 [b]
Zn	60.52 ± 4.57 [a]	32.62 ± 2.61 [a]	-	66.89 ± 22.59 [b]	-	139 ± 36 [b]

Table 3.Review of trace elements concentrations µg/g dw) found in the liver of freshwater turtle species. a indicates values expressed as mean±SE. b indicates values expressed as mean±SD

The concentrations of most investigated trace elements were unrelated with body size (thus presumably with age). It is possible that *E. orbicularis* do not accumulate these contaminants over time as showed for other turtle species (Maffucci et al. 2005; Yadollahvand 2014). However, we found two notable exceptions to this trend, Zn concentrations (in muscle) and Hg concentrations (in skin, liver and claws) were significantly correlated with body size (Figs. 1 & 2). These results suggest that these elements bioaccumulate during growth attaining high values in older individuals. Interestingly, these two elements are among those that were found in relatively high concentrations.

Although the sources of such contamination remain unknown, several hypotheses can be proposed the high levels of Hg and Zn detected. For instance, anoxic waters and sediments are important sources of methylmercury in aquatic ecosystems (Morel et al. 1998). In Brenne, *E. orbicularis* lives in large ponds characterised by still (or very slow moving) waters and thick layers of sediments (Servan 1988). As a consequence, the levels of Hg we detected may be related to a natural contamination due to the methylating activity of microorganisms rather than a direct anthropogenic source of contamination (Morel et al. 1998). The resulting methylmercury is indeed likely to biomagnify through the food chain and reach high concentrations in predators (Morel et al. 1998). Future studies are required to investigate both the origin of Hg as well as the physiological consequences for *E. orbicularis* (Meyer et al. 2014). Regardless of the origin of Hg, the relationship between claws *versus* liver or skin Hg (see Fig. 2) supports the use of claws as an efficient non-invasive sampling method to assess Hg contamination in turtles (Green et al. 2010; Hopkins et al. 2013a, 2013b).

The relatively high concentrations of Zn we detected may be related to aquacultural activities in Brenne. Many ponds are indeed used for fish farming. This practice sometimes involves food supplementation with fish pellets that may be enriched with Zn oxide (Zn compounds E6, EFSA 2012). Future studies should explore the possible physiological consequences of high Zn concentrations (up to 208 µg/g dwt in muscle in our study) in the pond turtle.

Although our study did not investigate the toxicity of the trace elements quantified, our results revealed relatively high concentrations of different non-essential (Hg) and essential trace elements (Cr, Cu, Mn, Ni and Zn). These results indicate that *E. orbicularis* can be used to identify the presence of trace elements and that claws are suitable tissues to monitor Hg bioaccumulation. They prompt further studies to compare contamination levels in other wetlands (*Emys orbicularis* exhibits an extended distribution range) and to monitor contamination levels over time.

Acknowledgments

We warmly thank the staff from the Réserve Naturelle Nationale de Chérine for collecting roadkill turtles. We thank M. Brault-Favrou from the Plateforme Analyses Elémentaires of LIENSs for her assistance with trace element analyses and the CPER (Contrat de Projet Etat-Région) for funding the ICPs and AMA. Funding was provided by the Région Poitou-Charentes, the Conseil Départemental des Deux-Sèvres,the CNRS, the Agence de l'Eau Loire-Bretagne and the Agence de l'eau Adour-Garonne.

CONCLUSION DU CHAPITRE 1

Dans ce chapitre, nous nous sommes intéressés à la contamination du milieu par divers polluants, et à l'utilisation d'espèces de reptiles comme organismes indicateurs pour participer à l'évaluation du risque associé à cette contamination.

Nous avons ainsi mesuré les niveaux de plusieurs polluants organiques dans cinq espèces de serpents (couleuvre à collier, couleuvre vipérine, couleuvre d'Esculape, couleuvre verte et jaune et vipère aspic) provenant de deux régions différentes (la Brenne et les Deux Sèvres). Nous nous sommes également intéressés à la contamination de cistudes d'Europe de Brenne par des éléments traces métalliques. Les espèces de serpents utilisées dans la première partie du chapitre accumulent de manière marquée plusieurs polluants organiques, à savoir le pp' DDE, le β-HCH et le HCB ainsi que les PCB. Les niveaux mesurés semblent varier entre les espèces principalement selon leur mode de vie et leur régime alimentaire. Les cistudes d'Europe utilisées en deuxième partie quant à elles ont permis de mesurer la présence d'éléments traces métalliques dans les écosystèmes de Brenne. Certains résultats indiquent une contamination des individus plutôt légère, proche de niveaux traces, alors que d'autres individus montrent des niveaux très élevés, mettant en évidence de fortes contaminations localisées. Les résultats obtenus permettent donc de déterminer qu'il existe une contamination des zones étudiées par des substances potentiellement polluantes, en l'occurrence par des pesticides organochlorés, et dans le cas de la Brenne, également par des éléments traces métalliques. Les variations dans les niveaux mesurés indiquent la possibilité d'utiliser les reptiles comme indicateurs discriminants de pollution par différents composés, ici les polluants organiques et les éléments traces métalliques, pour une large gamme de concentrations.

Les travaux présentés ici montrent en effet que les reptiles prélevés dans le milieu naturel constituent des outils de qualité pour estimer la pollution des zones ciblées (Deux-Sèvres et Brenne) et permettent de distinguer différents degrés de contamination, en mettant notamment en évidence des pollutions localisées, dont il serait intéressant de déterminer la source. Les espèces utilisées étant relativement sédentaires, ces données permettraient une cartographie de la pollution par les composés étudiés assez précise. Etant donné le peu d'intérêt porté aux espèces reptiles dans les études en écotoxicologie, ces travaux donnent des arguments en faveur d'une utilisation plus systématique de ces espèces dans le cadre d'évaluation du risque environnemental. La généralisation de ces conclusions à l'ensemble des espèces de reptiles doit se faire de manière prudente, mais d'autres études corroborent ces résultats concernant d'autres catégories de reptiles comme les lézards, les crocodiliens ou les varanidés (Boman et al., 2001 ; Campbell & Campbell, 2001 ; Campbell 2003 ; Lambert, 2005 ; Berny et al., 2006 ; Ciliberti et al., 2011).

Nos travaux portent notamment sur des molécules dont l'usage a été interdit. Malgré le fait que nos résultats montrent une persistance de ces produits dans l'environnement, puisque encore présents dans les organismes analysés, il serait intéressant d'effectuer ce même type d'études en se focalisant sur les substances utilisées actuellement. Il serait par exemple judicieux de se pencher sur les pesticides actuellement appliqués sur les cultures, ou sur les polluants émergents, dont l'évaluation de l'impact sur l'environnement représente un nouvel enjeu majeur (Geissen et al., 2015).

Cependant ces résultats ne permettent pas d'établir des liens de causalité entre les niveaux mesurés et d'éventuels impacts sur les organismes. De ce fait, parallèlement aux quantifications de contaminants, il serait judicieux de mettre en place par exemple un suivi de biomarqueurs afin de mieux connaitre l'influence de la contamination des individus sur leur organisme. Cependant selon le marqueur choisi, cette étape peut s'avérer impossible, notamment dans le cas de l'utilisation de cadavres. Dans le cas d'utilisation d'animaux vivants, il serait préférable de privilégier l'utilisation d'indices non destructeurs (Hopkins et al., 2001 ; 2013a).

De la même manière développer des méthodes afin d'effectuer des dosages de manière non invasive pour les individus pourrait s'avérer très utile. Dans les travaux effectués sur les cistudes, les résultats obtenus par le dosage d'éléments traces métalliques dans les griffes de cistudes montrent par exemple la possibilité d'utiliser les griffes sans avoir besoin d'avoir accès à des tissus qui nécessiterait le sacrifice de l'animal. Cet aspect témoigne d'autant plus de l'intérêt d'utiliser cette espèce pour le monitoring de la contamination par les éléments traces, notamment par le mercure. Il serait intéressant de développer d'autres indices non destructifs notamment pour les autres espèces de reptiles, qui permettraient un suivi des individus au long terme. L'usage de marqueurs non destructifs pour d'autres contaminants que les ETM restent également à déterminer (Hopkins et al., 2013b).

Evaluer la biodisponibilité des contaminants environnementaux par la mesure des concentrations retrouvées dans les tissus de certains organismes est une première étape dans l'analyse du risque encouru par les espèces. Un autre aspect de l'évaluation du risque environnemental consiste à déterminer si cette contamination affecte les organismes qui y sont exposés. Cette approche est développée dans les chapitres suivants.

CHAPITRE 2 - INFLUENCE DE L'HABITAT AGRICOLE SUR UNE ESPECE D'AMPHIBIEN, LE CRAPAUD COMMUN (*BUFO BUFO*)

1. INTRODUCTION DU CHAPITRE 2

1.1. Contexte général

La surface de la planète a été profondément modifiée par l'utilisation du sol, que ce soit la transformation de paysages naturels en zones exploitées, ou des changements dans l'utilisation de zones dominées par l'homme. En éliminant des forêts, en étendant les zones urbaines, ou en intensifiant la production agricole, les activités humaines modifient les paysages de manière profonde (Chapin et al., 2000 ; Foley et al., 2005). Les terres cultivées et les pâtures représentent désormais un des plus vastes biomes de la planète (Figure 19). C'est le cas en Europe, où les terres agricoles constituent l'habitat le plus étendu, puisqu'elles recouvrent environ 43% de la surface des états membres de l'Union Européenne. La grande superficie occupée par les cultures arables fait de l'activité agricole le plus grand utilisateur des sols. Ces terres hébergent ainsi une grande part de la biodiversité européenne (Chapin et al., 2000 ; Stoate et al., 2001 ; Foley et al., 2005 ; Geiger et al., 2010).

Cependant, ces dernières décennies, l'intensification de l'agriculture a largement contribué à l'appauvrissement de la biodiversité de l'habitat agricole. La seconde moitié du XXème siècle a été marquée par l'extinction ou le déclin de plusieurs espèces animales et végétales du fait de la perte des habitats naturels et semi-naturels, de la diminution de l'hétérogénéité à l'échelle du paysage, mais aussi de l'utilisation croissante de produits chimiques de synthèse (Stoate et al., 2001 ; Benton et al., 2003 ; Geiger et al., 2010). L'intensification agricole se caractérise par plusieurs phénomènes, comme la perte d'éléments du paysage, l'augmentation de la surface des cultures et l'application de plus grandes quantités d'intrants. Il est difficile de différencier les impacts de la gestion intensifiée des cultures locales (utilisation de pesticides et fertilisants, mécanisation, etc…) des changements dans l'utilisation des sols à l'échelle du paysage (i.e. consolidation des parcelles), puisque ces deux phénomènes se produisent de manière simultanée dans la plupart des paysages agricoles (Benton et al., 2003 ; Geiger et al., 2010).

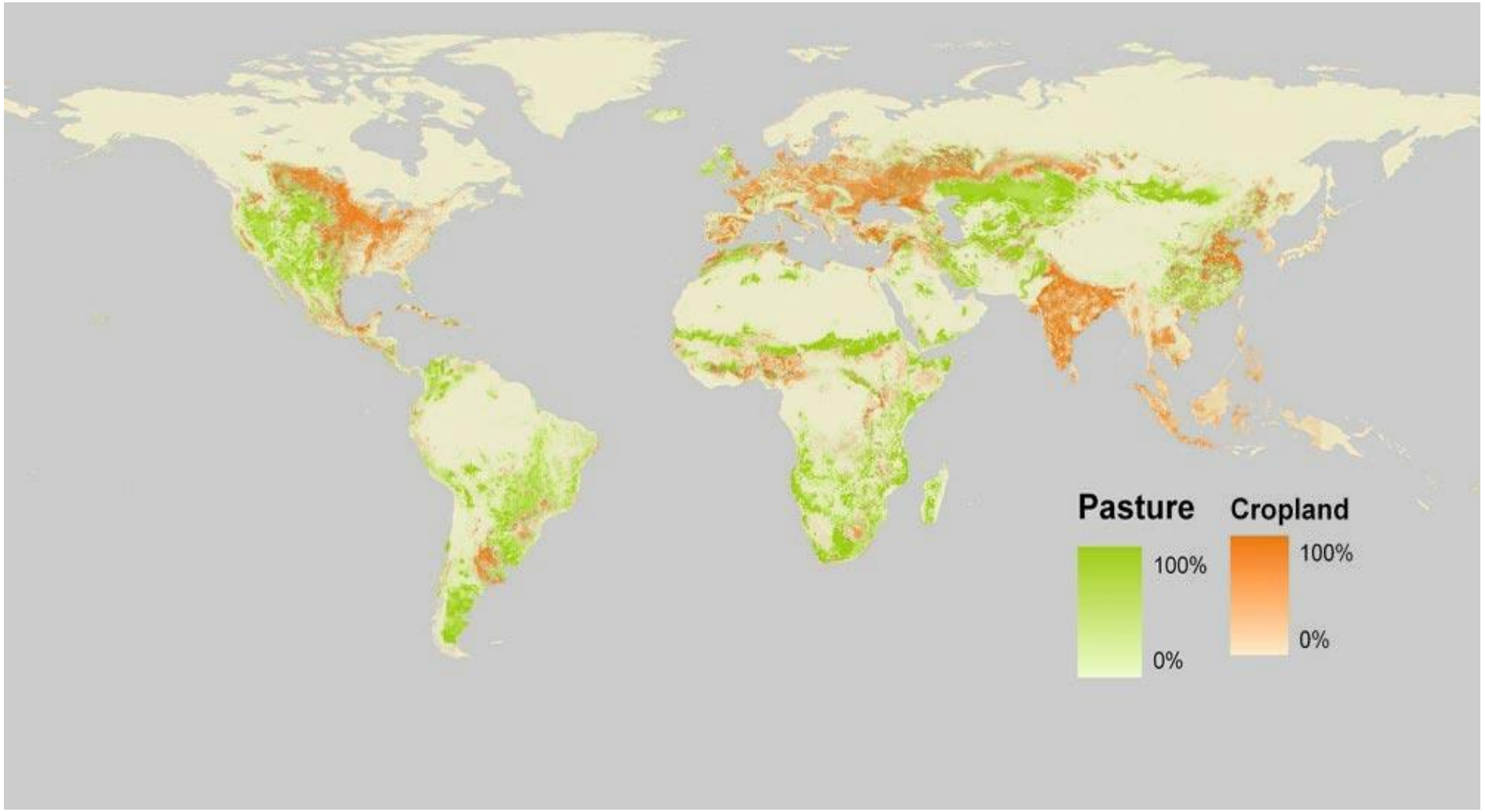


Figure 19. Carte du monde des terres cultivées et pâturages (Center for Sustainability and the Global Environment)

L'habitat agricole est donc touché par de fortes doses de produits chimiques, appliqués sur les cultures pour améliorer leur rendement. Une grande quantité de pesticides, d'herbicides ou de fongicides sont notamment utilisés pour contrôler les organismes dits nuisibles, les plantes adventices et les maladies des cultures et du bétail (Brühl et al., 2013). L'utilisation de ces composés a entrainé une contamination des agroécosystèmes, et explique, en partie au moins, la perte de biodiversité qui a accompagné l'intensification de l'agriculture (Stoate et al., 2001 ; He et al., 2005 ; Geiger et al., 2010 ; Brühl et al., 2013). L'impact négatif des pesticides a ainsi été observé dans plusieurs taxa. Par exemple, une étude menée par Geiger et al en 2010 à l'échelle de l'Europe, dans huit pays différents, montre un effet délétère de l'utilisation d'insecticides et de fongicides sur la diversité en plantes, carabidés et espèces d'oiseaux. Plusieurs auteurs questionnent également la responsabilité des pesticides dans le déclin des amphibiens observé ces dernières décennies (Beebee and Griffiths, 2005 ; Brühl et al., 2013). Les conséquences négatives de l'utilisation de pesticides sont moins évidentes depuis l'arrêt de l'utilisation de certaines substances toxiques, notamment celles appartenant aux Polluants Organiques Persistants (Stoate et al., 2001). Cependant, comme nous l'avons vu dans le premier chapitre, ces molécules sont toujours présentes dans l'environnement, et dans les organismes. De plus, les molécules utilisées actuellement présentent des effets toxiques plus subtils, mais sont tout de même soupçonnées d'avoir des impacts négatifs (Stoate et al., 2001 ; Relyea, 2005 ; Geiger et al., 2010).

La présence de composés chimiques potentiellement toxiques n'est pas la seule menace présente dans les agroécosystèmes pour la biodiversité, la santé et le fonctionnement des écosystèmes. L'utilisation des terres pour les cultures, l'augmentation de la production et la consolidation des parcelles ont engendré une mutation profonde des paysages agricoles ces dernières décennies (Foley et al., 2005). On a en effet pu observer une homogénéisation du paysage, avec une transition d'un paysage de type bocage, caractérisé par des petites parcelles cultivées et des prairies bordées de haies, utilisés pour de la polyculture et pour l'élevage, à de très grands champs de monocultures (Benton et al., 2003; Tscharntke et al., 2005).

Cependant, malgré les défis présentés par l'habitat agricole, certaines espèces sont capables de se maintenir dans ce contexte. Les populations présentes dans ces écosystèmes fortement modifiés subissent des pressions qui diffèrent de celles subies dans des environnements plus préservés. Au vue de la contamination de ces écosystèmes, et des contraintes supplémentaires encourues par les organismes, il est donc primordial de connaitre l'impact de l'habitat agricole sur les espèces qui ont la capacité de s'y maintenir, en comparaison aux populations dont l'environnement montre une évolution moindre.

1.2. Objectifs du chapitre

Les travaux présentés dans le premier chapitre de cette thèse nous ont permis d'identifier la présence de contaminants dans l'environnement par le biais de mesures dans des espèces de reptiles. Parmi ces composés nous avons notamment mesuré des niveaux de substances issues de l'activité agricole, à savoir des pesticides organochlorés. A la contamination de l'environnement agricole, se rajoute d'autres contraintes pour les organismes qui s'y maintiennent. A la suite de ces résultats, nous avons donc voulu déterminer si l'habitat agricole et les défis qu'il apporte (i.e. pollution par des composés chimiques) avaient un impact sur les individus.

Pour tenter de répondre à cette question, nous nous sommes ainsi intéressés à l'influence du paysage agricole sur une espèce répandue d'amphibien : le crapaud commun (*Bufo bufo* ; Figure 20). Nous nous sommes posés la question de savoir si la morphologie des individus est la même entre des populations vivant dans des habitats soumis à une activité agricole à des degrés différents d'intensification (i.e. terres cultivées et bocage) et des populations issues d'un habitat préservé de l'agriculture, à savoir l'habitat forestier, qui constitue également un habitat naturel du crapaud commun. Nous avons utilisé comme espèce modèle le crapaud commun car il possède des avantages notables pour ce type d'observations sur le terrain. Ces caractéristiques ainsi que les objectifs de ce chapitre sont présentés plus en détails dans l'article 2.

Figure 20. Crapaud commun (Bufo bufo)

2. ARTICLE 2 : LANDSCAPE INFLUENCES THE MORPHOLOGY OF MALE COMMON TOADS (BUFO BUFO) - PUBLIÉ DANS AGRICULTURE, ECOSYSTEMS AND ENVIRONMENT

Héloïse Guillot[a], Alexandre Boissinot[a], Frédéric Angelier[a], Olivier Lourdais[a], Xavier Bonnet[a], François Brischoux[a]

[a] Centre d'Etudes Biologiques de Chizé, CEBC-CNRS UMR 7372, 79360 Villiers en Bois, France

Corresponding author:

H. Guillot (heloise.guillot@cebc.cnrs.com)

Centre d'Etudes Biologiques de Chizé, CEBC-CNRS UPR 1934, 79360 Villiers en Bois, France

Manuscript published in *Agriculture, Ecosystems and Environment*

Abstract

In Europe, the recent agricultural intensification has strongly homogenised the landscape. This loss in habitat diversity and the use of agrochemicals are considered as major causes of the global erosion of biodiversity. Landscape changes may also favour phenotypic variation with divergences between populations even at a small spatial scale. We investigated this notion in the common toad (*Bufo bufo*), a species that inhabits a wide variety of rural habitats. Specifically, we compared the morphology of male adult toads from three contrasting landscapes: forests, traditional farming landscape (bocage) and intensive farmlands. Overall, individuals from open landscapes were larger and heavier, had longer hind legs and larger parotoid glands than their forest counterparts; suggesting that open landscapes positively influence body size in this species. However, toads from intensive farmland were less symmetrical, suggesting that these individuals may have experienced environmental stress during larval and/or post-metamorphic development. Overall, our results suggest that landscape-specific traits can influence the morphology of male toads in complex ways. Further studies are required to comprehensively assess the impacts of environmental and anthropogenic pressures on amphibians in agroecosystems.

Key-words: agroecosystems; amphibians; landscape homogenisation; morphology; fluctuating asymmetry

Introduction

During the last century, strong changes in land-use priorities have provoked a shift from natural or ancestral rural landscapes to large scale agricultural and urban systems (Chapin et al., 2000; Foley et al., 2005). In Europe, the revolution in agricultural practices that occurred after World War II led to land consolidation, which has strongly homogenised the landscape, from a complex matrix of small fields and meadows bordered by hedges ("bocage"), to very large fields hosting monocultures (intensive farmland; Benton et al., 2003; Tscharntke et al., 2005). In addition, agricultural intensification is also characterised by considerable use of agrochemical substances (Geiger et al. 2010). Overall, these changes in land-use and landscape structure are considered as driving forces in the global biological diversity loss that affects most taxonomic groups at a global scale (Vitousek et al., 1997; Fischer and Lindenmayer, 2007).

Although biodiversity and population trends (declines or outbreaks) seem to be influenced by landscape heterogeneity (Van Burskirk and Arioli, 2004), changes in landscape structure might also bear other consequences on organisms. For instance, the locomotor capacities required to live in a forest may strongly diverge from those required to successfully forage in an extended monoculture. Similarly, the strategy adopted by an individual to evade predation should vary depending on landscape structure (Murdoch et al. 1996; Krivan, 1998). Finally, in agricultural environment, species must face the presence of many agrochemical substances (Berger et al. 2012), which have been suggested to induce trait changes in nontarget species (Lawrence and Isioma, 2010; Relyea, 2012). Taken together, these elements suggest that landscape changes should be responsible for new pressures that could lead to phenotypic divergence between populations from different habitats (Van Burskirk and Arioli, 2004; Phillips et al., 2006; Janin et al., 2011).

We investigated this notion using the common toad (*Bufo bufo*) for several reasons. First this widespread species can live in a variety of habitats and persist even in highly modified agricultural landscapes, thereby allowing comparisons between landscapes.

Second, as most amphibians, it displays a high level of phenotypic plasticity, thereby allowing to investigate the impact of landscapes on phenotype (Newman, 1992; Brady and Griffiths, 2000). Third, it is an explosive breeder which allows sampling individuals in large numbers (Janin et al., 2011). Importantly, the remaining part of the cycle occurs within 2 km from the breeding sites, which allow straightforward classification of the surrounding landscapes (Janin et al., 2011).

We compared the morphology of adult male toads from forest, traditional bocage and intensive farmland. Specifically we predicted that 1) Body condition should be lower in altered intensive agricultural landscapes where trophic resources are expected to be poorer and scarcer, 2) locomotion-related traits (body size, relative limb size) should be greater in intensive farmland, because toads should need to move more to forage successfully or to evade predation, 3) defensive attributes (parotoid glands which secrete an alkaloid substance to deter predators) should be larger in altered agricultural landscapes where the refuges needed to evade predation are scarcer, and 4) asymmetry should be greater in farmlands, because of altered developmental conditions (i.e., suboptimal habitats, agrochemical substances).

Materials and Methods

Study species

The common toad, *Bufo bufo*, is one of the most common anuran species in Europe. Toads emerge from hibernation in early spring (March) and massively migrate towards aquatic breeding sites (Reading and Clarke, 1983). Breeding toads usually come back to the sites at which they were spawned (Reading, 1991). Males remain at the breeding site for several weeks, while females leave shortly after mating and egg-laying (Reading and Clarke, 1983). The remaining part of the annual cycle occurs in various terrestrial environments usually within 2 km from the breeding site (Janin et al., 2011). Because males can be captured in larger numbers at breeding sites, we restricted our sampling to adult males.

Sampling sites and landscape classification

Sampling took place in March 2015 in an area centred on the Centre d'Etudes Biologiques de Chizé (46°09'N, 0°24'W) in France. Reproduction sites (e.g. ponds) were identified using Google Earth, and surveyed during the day to determine accessibility and toad presence. A total of 12 non-overlapping sites were sampled. Study sites were classified into three landscape categories following the main structures of our study area: forest, traditional farming landscape composed by a complex matrix of small fields and meadows bordered by hedges (hereafter bocage) and intensive farmland composed by extended arable fields (hereafter farmland).

To create landscape categories relevant at the spatial scale used by a toad, for each study site we applied three buffers that span the potential distance travelled by a toad to reach a breeding site (radii of 500 m, 1000 m and 2000 m; Janin et al., 2011). Classification was done using the "BD Ortho" and "BD Topo" vector databases provided by the Institut Géographique National (IGN, available at http://professionnels.ign.fr/bdortho and http://professionnels.ign.fr/bdtopo). Using QGIS (version 2.8.1), we assessed the quantity of hedges ($m.ha^{-1}$) and the tree cover (%) for each radius. We classified each sampling site according to the dominant surrounding landscape: Sites around which the hedge linear exceeded 40 $m.ha^{-1}$ were classified as "bocage" (Baudry et al., 2000), sites around which the tree cover exceeded 30% were classified as "forest", and the remaining sites were considered as "farmland". In practice, no conflicts emerged using these threshold values (e.g., no site was characterized by more than 40 $m.ha^{-1}$ of hedge and more than 30% tree cover). Classification of a given site varied very slightly according to the size of the buffer used (one site shifted from agricultural at 500m to forest at 1000 and 2000 m and one site shifted from forest at 500m to hedgerows at 1000 and 2000 m), but overall our classification method remained relatively stable across spatial scales. Classification was identical for buffers of 1000 and 2000 m and we kept only the 2000 m buffer in our final analysis.

Capture and measurements

Sampling was conducted at night by patrolling slowly along the breeding sites. Toads were captured with nets and stored in large buckets and individuals were measured and released, usually within an hour since capture. This process prevented the capture and measurement of the same individuals multiple times. All individuals were weighed (± 0.1 g), and their snout-vent length, forearms length (left and right), tibias length (left and right), length and width of parotoid glands (left and right) were measured with an electronic calliper (± 0.01 mm). The value of all paired characters was simply the mean of the left and right value. For each paired character, we produced a fluctuating asymmetry index (FA) following the formula of Palmer & Strobeck (1986) FA=(ABS(C_l-C_d))/mean (C_l, C_d), where C_l and C_d are respectively the size of the left and right character and ABS is the absolute value of the expression. For consistency, measurements were all collected by HG.

Statistical analyses

We tested the difference between each parameter according to their landscape type. The snout-vent length and all the FA indexes were analysed using analysis of variance (ANOVA). As they are correlated to the snout-vent length, all the other parameters were analysed using analysis of covariance (ANCOVA) using the snout-vent length as a covariate. These analyses were followed by Fisher's LSD post-hoc tests.

Results

Statistical analyses are summarized in Appendix 1.

Within a radius of 500 m, forest toads were smaller (Fisher's LSD, $p<0.001$), exhibited lower body condition (size-adjusted mass, $p<0.001$), and had proportionately smaller hind legs ($p<0.001$) compared to the other groups (Fig. 1). The length of the parotoid glands was significantly different between the three landscapes (all $p<0.02$, Fig. 1). Forest toads had forelegs that were more symmetrical on average than toads from open landscapes ($p=0.008$).

Within a radius of 2000 m, forest toads were smaller ($p<0.001$), exhibited lower body condition ($p<0.001$), and had smaller parotoid glands (all $p<0.001$). Farmland toads had less symmetrical hind legs than forest toads ($p=0.01$), and less symmetrical forelegs than toads from either bocage or forest (all $p<0.02$) (Fig. 2).

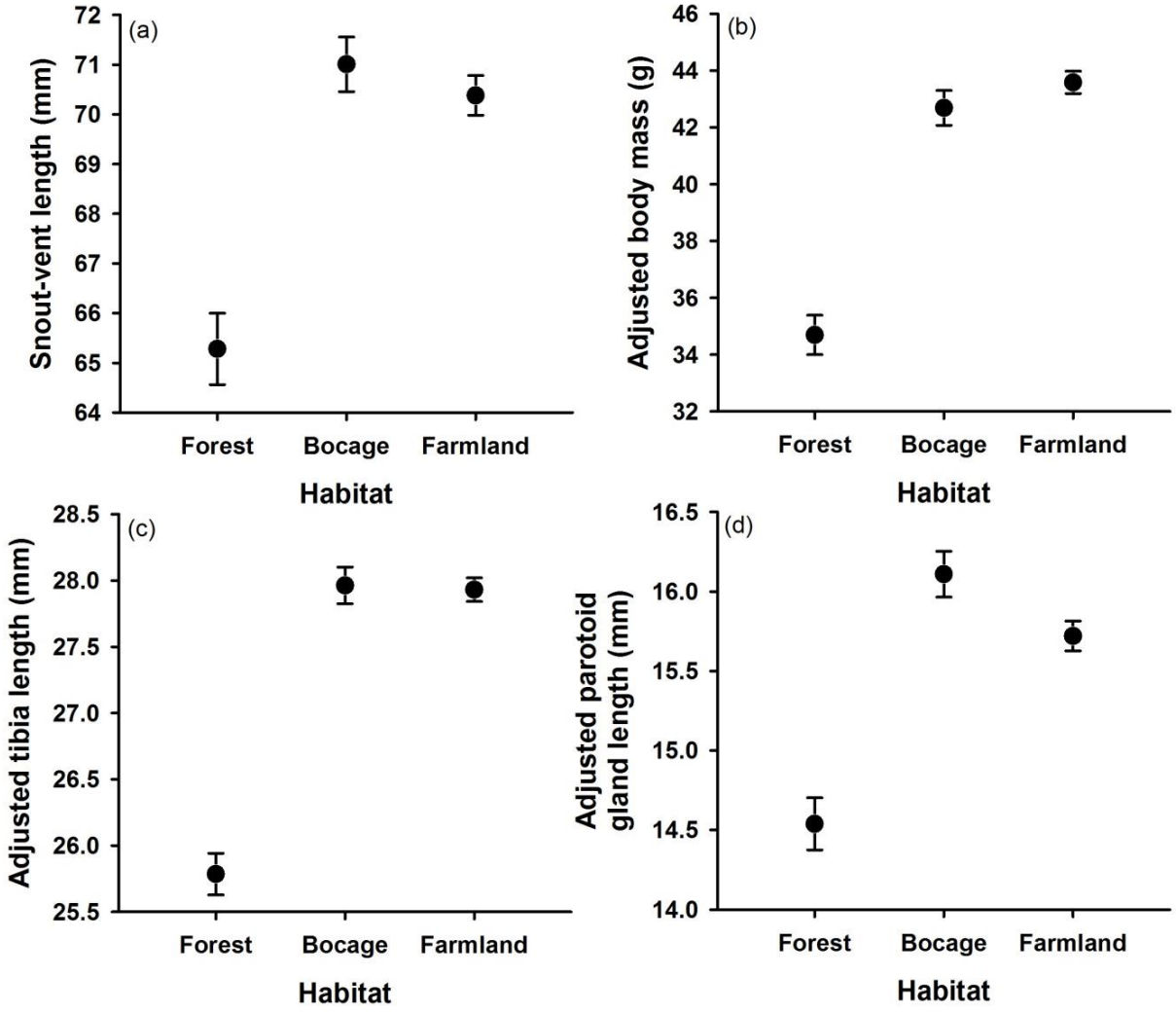


Figure 1. Morphological traits of toads from three landscapes measured at a spatial scale of 500 m. (a) snout-vent length, (b) adjusted body mass, (c) tibia length and (d) parotoid gland length. Data are presented as their mean ±S.E.

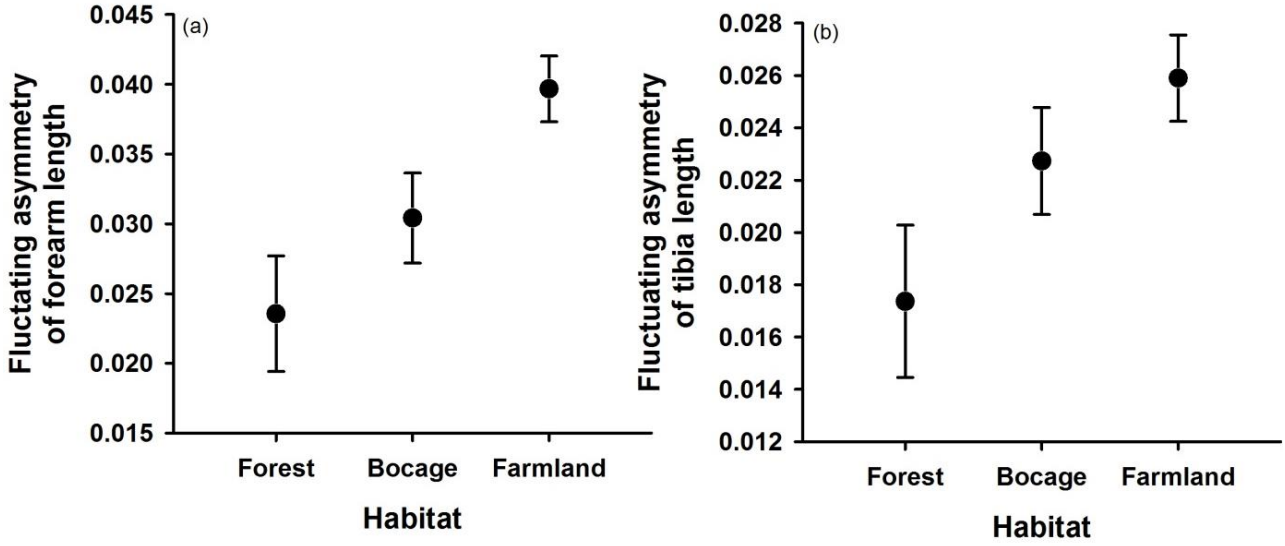


Figure 2. Fluctuating asymmetry of foreleg (a) and hind leg (b) of male common toads from three landscapes measured at a spatial scale of 2000 m. Data are presented as their mean ±S.E.

Discussion

Our results highlight a morphological similarity between toads from open landscapes as compared to individuals from forest (Fig. 1). Overall, individuals from both bocage and farmland are larger and heavier, have longer hind legs and larger parotoid glands than their forest counterparts. Importantly, forested areas constitute the original habitat of toads (Janin et al., 2011). This suggests that some specificities of open agroecosystems enhanced body size and condition and modified body proportions in male toads. Alternatively, differences in body size may reflect differential mortality and different age structure. However, demographic variation can hardly be invoked to explain the differences in body condition and body proportion we found.

Farmland and hedgerows may exhibit a reduced intra- and/or interspecific competition for these resources, and therefore better food availability, that would allow individuals from agricultural habitats to reach larger body size and better body condition.

It is plausible that agricultural landscapes harbour less dense populations of toads (Bishop et al., 1997; Janin et al., 2011) or decreased diversity and abundances of other, potentially competing, species. Future studies should investigate the consequences of landscape-dependent levels of intra- and/or interspecific competition and their consequences on toad morphology (Evans, 2004; Kauffman et al., 2007). Open landscapes may also impose significant locomotor constraints on male toads, favouring larger body size and relative leg size. For instance, because resources are scarcer and poorer in agricultural environment (Tews et al., 2004), individuals may need to move much more in these landscapes to forage successfully, thereby selecting for very mobile individuals (larger and with relatively longer hind legs, Choi et al., 2003; Phillips et al. 2006). Furthermore, forests are characterized by higher soil and air moisture than open areas (Chen et al., 1993). Because smaller toads have a larger surface-area to volume ratio, they may be more susceptible to desiccation in open environment (Rothermel and Semlitsch, 2002). Finally, open landscapes may be characterized by higher predation pressure because of a lower availability of refuges (Murdoch et al., 1996; Krivan, 1998). This would favour locomotion-related traits (body size and hind leg length, see above) and defence-related traits (parotoid glands), both of which would expedite escape.

Our results show a strong influence of farmland on fluctuating asymmetry (Fig. 2), a proxy of developmental stress, and thus of individual quality (Tomkins and Kotiaho, 2001). We found that on average, farmland toads had the least symmetrical legs (either hind of forelegs), while forest toads were the more symmetrical (Fig. 2). These results suggest that male toads from agroecosystems, have experienced higher environmental stress during larval and/or post-metamorphic growth resulting in altered development (Söderman et al., 2007). Whether these results are due to direct effects of agricultural practices (Brunelli et al., 2009; Berger et al. 2012), or indirect consequences of morphological changes (Brown et al., 2007) remain to be assessed.

To conclude we found that toads from open landscapes differ from individuals from forested areas. Our study focused on males and future studies should investigate whether these results apply on females.

In addition, common garden experiments should help disentangling the relative contributions of phenotypic plasticity *versus* local adaptation on the morphological divergences we found (Shine et al. 2011, Luquet et al., 2015). A comprehensive assessment of the influences of environmental and anthropogenic factors on common toads requires both empirical and experimental approaches.

Acknowledgments

We thank Leïla Migault, Robin Drieu, Cyril Scomparin, Candice Michelot, Guillemette Labadie, Julien Tilly and Ayala Loisel for their help in the field. Funding was provided by the Région Poitou-Charentes, the Conseil Départemental des Deux-Sèvres and the CNRS.

Variable	500 m				2000 m			
	Forest	Bocage	Farmland	Test	Forest	Bocage	Farmland	Test
Snout-vent length	**65.2±5.8**	**71.0±5.0**	**70.4±5.8**	**$F_{2,348}$=24.43, p<0.001**	**66.0±6.3**	**70.2±5.2**	**70.4±6.0**	**$F_{2,348}$=13.04, p<0.001**
Body mass[a]	**34.6±9.6**	**42.6±8.5**	**43.9±11.5**	**$F_{2,347}$=3.99, P=0.01**	36.3±10.8	42.0±8.6	43.7±12.0	$F_{2,347}$=1.35, p=0.26
Parotoid gland length[a]	**14.5±1.6**	**16.1±1.4**	**15.7±1.5**	**$F_{2,347}$=5.69, P=0.004**	14.7±1.7	15.8±1.5	15.7±1.5	$F_{2,347}$=2.11, p=0.12
Parotoid gland width[a]	5.7±0.6	6.0±0.6	5.9±0.7	$F_{2,326}$=1.21, p=0.29	5.7±0.5	5.9±0.6	5.9±0.7	$F_{2,326}$=0.42, p=0.65
Forearm length[a]	20.8±1.7	22.2±1.7	22.0±1.8	$F_{2,326}$=0.30, p=0.74	21.0±1.8	21.9±1.6	22.0±1.8	$F_{2,326}$=0.19, p=0.83
Tibia length[a]	**25.7±2.1**	**27.9±1.9**	**27.9±2.0**	**$F_{2,347}$=7.02, P=0.001**	26.6±2.4	27.5±2.1	27.9±2.0	$F_{2,347}$=2.67, p=0.07
FA Parotoid gland length	0.07±0.05	0.09±0.06	0.09±0.07	$F_{2,347}$=2.01, p=0.13	0.07±0.06	0.09±0.06	0.08±0.07	$F_{2,347}$=1.22, p=0.29
FA Parotoid gland width	0.11±0.11	0.10±0.09	0.10±0.07	$F_{2,326}$=0.44, p=0.64	0.12±0.09	0.11±0.10	0.10±0.07	$F_{2,326}$=1.39, p=0.25
FA forearm length	**0.02±0.02**	**0.03±0.02**	**0.03±0.03**	**$F_{2,325}$=3.73, P=0.02**	**0.02±0.02**	**0.03±0.02**	**0.04±0.03**	**$F_{2,325}$=6.69, P=0.001**
FA tibia length	0.02±0.01	0.02±0.02	0.02±0.02	$F_{2,348}$=1.37, p=0.25	**0.01±0.01**	**0.02±0.02**	**0.02±0.02**	**$F_{2,348}$=3.35, P=0.03**

Appendix 1. Mean values (±S.D.) of morphological traits measured on toads from forest (500m radius: N=65, 2000m radius: N=57), bocage (500m radius: N=84, 2000m radius: N=116) or intensive farmlands (500m radius: N=202, 2000m radius: N=178). Test indicates the results from statistical comparisons. a indicates traits which were compared using an ANCOVA with the snout-vent length as the covariate. FA stands for fluctuating asymmetry. Bold face highlights significant differences.

3. CONCLUSION DU CHAPITRE 2

Dans le cadre de l'analyse du risque environnemental, une approche consiste à mesurer l'effet de la contamination sur les organismes qui y sont exposés. Les dosages de molécules dans les carcasses de reptiles ne permettant pas de lier les niveaux mesurés à des effets observés, nous avons décidé d'effectuer d'autres travaux pour essayer d'évaluer l'impact de l'utilisation d'un habitat potentiellement contaminé sur la morphologie des organismes. Pour cela nous avons choisi une autre espèce modèle, dont les caractéristiques paraissaient plus adaptées à cette étude. Ainsi, dans ce chapitre, nous nous sommes intéressés à l'influence de l'habitat agricole sur la morphologie du crapaud commun. Suite aux résultats du chapitre 1, nous voulions déterminer si la contamination du milieu agricole, couplée aux autres pressions exercées par cet habitat sur les organismes, pouvait engendrer des divergences entre les crapauds évoluant dans les terres cultivées et ceux issus d'habitat plus préservés.

Nos résultats suggèrent que l'habitat agricole influence effectivement la morphologie des individus. En effet, les individus issus de l'habitat agricole sont en meilleure condition physique, et possèdent des membres plus longs, ainsi que des attributs de défense plus développés. Ces résultats étant observables dans les deux paysages agricoles étudiés, il est possible qu'ils soient la conséquence de l'exposition à des produits phytosanitaires. Cependant, les différences morphologiques observées vont à l'encontre des résultats obtenus dans d'autres études, qui montrent des effets délétères des produits agrochimiques sur les amphibiens, caractérisés par des retards de développement, une condition corporelle diminuée ou des malformations (Carey et Bryant 1995 ; Kloas, 2002 ; Mandrillon et Saglio, 2005). Notre hypothèse est donc que ces caractéristiques se sont développées pour faire face aux nombreuses contraintes présentées par les agroécosystèmes en comparaison à l'habitat forestier, telles qu'une nécessité de se déplacer sur de plus longues distances pour avoir accès aux ressources, et une vulnérabilité accrue du fait de l'ouverture des paysages agricoles, qui ne permet pas d'échapper facilement à la prédation.

Nos résultats montrent également un gradient dans l'asymétrie des individus, ceux ayant été capturés en milieu agricole intensif présentant une asymétrie plus importante que ceux capturés en milieu bocager (agriculture modérée), eux même étant plus asymétriques que les individus provenant de paysage forestier. Mesurer l'asymétrie est une manière indirecte de mesurer l'effet du stress que les individus ont subi durant leur développement. Les crapauds capables de se maintenir dans les environnements agricoles seraient donc soumis à un stress accru durant leur phase de développement larvaire, ou juste après la métamorphose. Malgré le fait que les origines du stress peuvent être multiples, une des caractéristiques de ces milieux, en comparaison avec l'habitat forestier, est la présence de substances contaminantes, ce qui peut être source de stress pour les stades larvaire et juvéniles. L'ensemble de nos résultats montrent donc la possibilité que l'habitat agricole ait une influence sur certaines caractéristiques individuelles des organismes, conséquence possible de l'influence d'une combinaison de facteurs, qui englobent la présence de substances chimiques.

Cependant, nos résultats ne permettent aucune conclusion définitive sur le fait que la présence de contaminants ait un rôle sur les différences morphologiques observées entre les habitats. Pour cela, il serait intéressant d'effectuer des dosages du milieu dans lequel évoluent les individus, pour vérifier la contamination différentielle du milieu, mais surtout, d'effectuer un dosage dans les tissus des individus mesurés, ou du moins dans un sous-échantillon de ces individus, pour déterminer si on observe effectivement une accumulation de contaminants dans leur tissus, qui pourrait donc être à l'origine de conséquences sur leur morphologie. Toutefois la démarche expérimentale reste la plus puissante pour répondre à ce type de problématiques, elle fait justement l'objet du troisième chapitre, dernière partie de ce travail.

CHAPITRE 3 - IMPACT D'UN METABOLITE DU GLYPHOSATE SUR LE DEVELOPPEMENT LARVAIRE DU CRAPAUD COMMUN (*BUFO BUFO*)

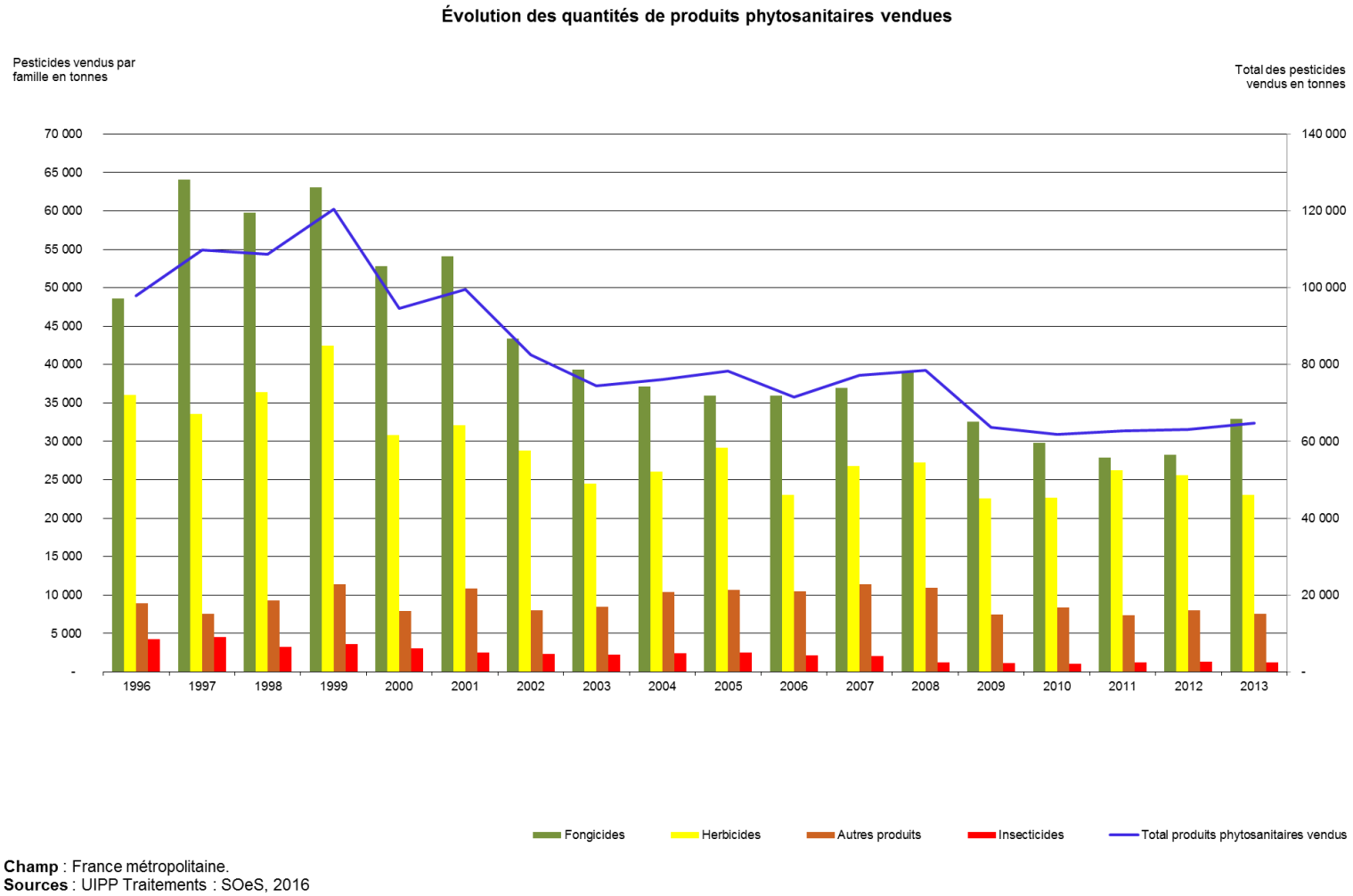
1. INTRODUCTION DU CHAPITRE 3

1.1. Contexte général

A la fin du XXème siècle, la consommation mondiale de pesticides s'élevait à près de 3 millions de tonnes. En 2014, elle s'élevait toujours à environ 2 millions de tonnes. De cette quantité, 45% est utilisée par l'Europe, 25% par les Etats Unis, et 25% par le reste du monde (Ministère de l'Agriculture, de l'Agroalimentaire et de la Forêt, 2015). La France est le quatrième consommateur mondial de produits phytosanitaires, après les Etats-Unis et le Japon. Sur le marché européen, elle se place en deuxième position après l'Espagne. La consommation française de pesticides atteint son maximum en 1999 avec plus de 120 000 tonnes de produits phytosanitaires vendues. Au début des années 2000, on observe une diminution de la consommation de ces substances, mais depuis 2011, les ventes de pesticides sont à nouveau en hausse. Entre 2011 et 2014, la consommation de produits phytosanitaires a ainsi augmenté de 5,8%, avec une augmentation de 9,4% entre 2013 et 2014 seulement (Figure 21). Ainsi, en 2014, la consommation totale en pesticides de la France s'élevait à près de 67 000 tonnes. Cette augmentation concerne principalement les produits herbicides, qui représentent maintenant la majeure partie du marché des produits phytosanitaires (Tableau 8). L'usage agricole de ces substances actives constitue la part la plus importante de cette consommation, avec près de 59 000 tonnes en 2014 utilisées sur les cultures, à savoir 4,16 kg/ha. (Ministère de l'Agriculture, de l'Agroalimentaire et de la Forêt, 2015).

Fonction	Tonnes/an
herbicides	27 805
fongicides	21 168
substances de croissance	2 614
nématicides	2 515
insecticides	931
Autres (molluscicides, rodenticides)	3 861

Tableau8. Répartition des substances actives par fonction en usage agricole pour l'année 2014 en France (Ministère de l'Agriculture, de l'Agroalimentaire et de la Forêt, 2015).



Champ : France métropolitaine.
Sources : UIPP Traitements : SOeS, 2016

Figure 21. Quantité de produits phytosanitaires vendus en France entre 1996 et 2013 (http://www.statistiques.developpement-durable.gouv.fr)

Parmi toutes les substances actives utilisées pour le contrôle des adventices, le glyphosate est le composé le plus utilisé au monde (Borggaard et al., 2008). Le glyphosate, ou N-(phosphonomethyl)glycine, appartenant à la famille chimique des acides aminés, est l'ingrédient actif de nombreuses formulations herbicides non sélectives (ou large spectre). Il a une action létale sur la plupart des espèces de plantes par inhibition de la production d'une enzyme (5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase) nécessaire à la synthèse d'acides aminés aromatiques. Cette voie de synthèse est uniquement présente chez les plantes (Nandula et al., 2005 ; Dill et al. 2010 ; INERIS, 2013). Ce composé a été créé par l'entreprise Monsanto Company en 1970 et commercialisé en 1974 dans différentes formulations sous la marque Roundup®. Depuis 2000, le brevet concernant le glyphosate n'est plus en vigueur, et ce composé peut donc être utilisé par d'autres marques (Borggaard et al., 2008 ; Dill et al., 2010). Depuis sa commercialisation, l'utilisation du glyphosate à travers le monde n'a fait qu'augmenter (Figure 22). Il est actuellement utilisé dans plus de 130 pays, et appliqué sur une centaine de types différents de cultures (Battaglin et al., 2014). Actuellement en France, le glyphosate est utilisé à hauteur de 10 000 tonnes par an, représentant ainsi la majeure partie des herbicides utilisés (Agence de l'Environnement et de la Maitrise de l'Energie).

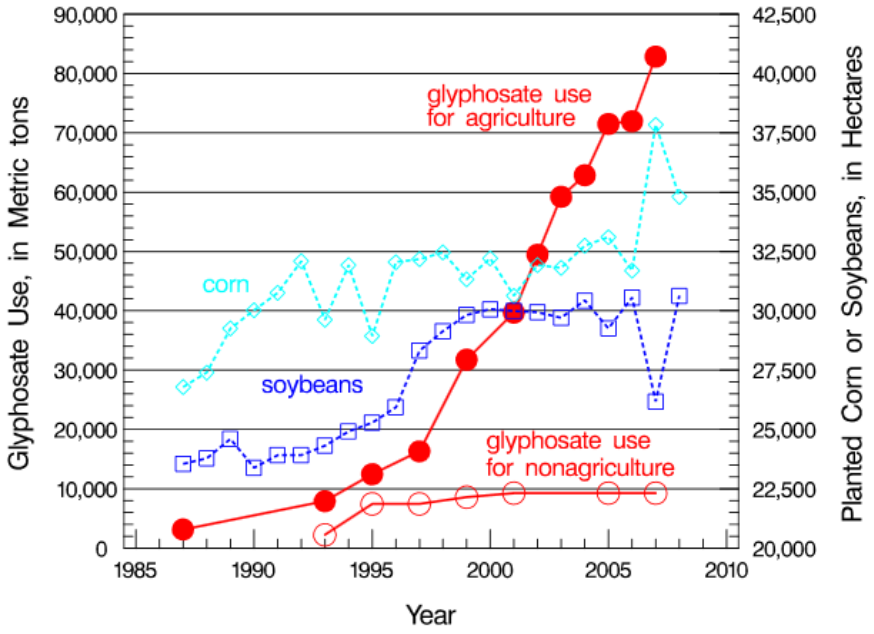
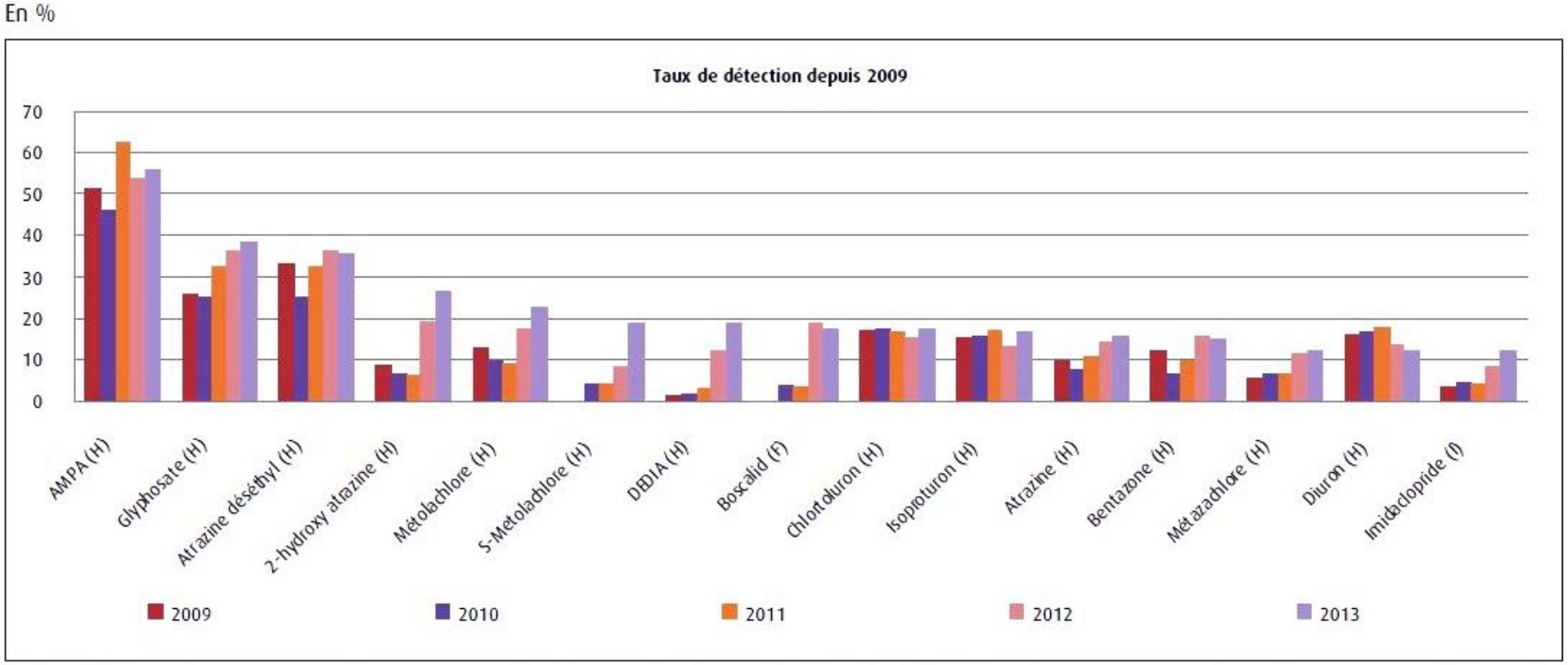


Figure 22. Utilisation du glyphosate et hectares de soja et de maïs cultivés aux Etats Unis entre 1985 et 2008 (Battaglin et al., 2014)

Le glyphosate a fait l'objet d'un intérêt particulier de la recherche notamment concernant son impact sur différents taxons. Il est ainsi suggéré que, selon l'espèce étudiée, le glyphosate pourrait agir au niveau individuel sur le comportement, la reproduction ou encore la mortalité (Evans et al., 1986 ; Releyea , 2005 ; Glusczak et al., 2007 ; Evans et al., 2010 ; Kelly et al., 2010), mais également sur la structure des communautés (Morrison et Meslow, 1984 ; Evans et al., 1986). Le Roundup a notamment été accusé de toxicité sur les amphibiens en conditions naturelles. Plusieurs études font ainsi état d'une mortalité accrue à l'état larvaire et juvénile, de retard de développement, et d'une condition corporelle plus faible chez les individus exposé au glyphosate (Cauble et Wagner, 2005 ; Releyea, 2005) ainsi que d'effets délétères additifs à d'autres pressions, comme la prédation, le parasitisme ou la densité (Releyea, 2005 ; Rohr et al., 2008 ; Jones et al., 2011).

Que ce soit en conditions aérobies ou anaérobies, le principal métabolite du glyphosate est l'acide aminométhylphosphonique (AMPA) qui se dégrade en amoniac, phosphate et dioxyde de carbone (Dick and Quinn, 1995 ; Balthazor and Hallas, 1986 ; Borggaard et al., 2008). Le glyphosate et l'AMPA font partie des substances les plus fréquemment retrouvées dans les eaux de surface. Aux Etats-Unis et au Canada, plusieurs études font l'état de concentration de glyphosate et d'AMPA pouvant aller de concentrations inférieures à 0,1 µg/L, à plusieurs dizaines de µg/L (World Health Organization, 1997 ; Schribner et al., 2007 ; Coupe et al., 2011 ; Battaglin et al., 2014). En France, le glyphosate et l'AMPA sont fréquemment identifiés dans les eaux de surface et les eaux souterraines à des concentrations supérieures à 0,1 µg/L et pouvant aller jusqu'à hauteur de 10µg/L (INERIS, 2011 ; Figure 23). En général, l'AMPA est détecté dans des concentrations supérieures que le glyphosate. L'AMPA est également détecté plus fréquemment en absence de glyphosate, alors que l'inverse est très rare (INERIS, 2011 ; Battaglin et al., 2014). L'AMPA possède en effet une demi-vie plus longue que son composé parent, quelle que soit la matrice environnementale concernée (Dominguez et al., 2016).



Notes : H : herbicide ou son produit de dégradation, F : fongicide, I : insecticide. À ce stade, la distinction entre métolachlore et S-métolachlore a été conservée mais les substances sont en réalité très proches, le métolachlore étant un mélange de R et S-métolachlore.

Sources : agences de l'eau ; Ineris, BNVD. Traitements : SOeS, 2015

Figure 23. Taux de détection des 15 pesticides les plus fréquemment détectés dans les cours d'eau de 2009 à 2013 (INERIS, 2015)

La plupart des études concernant l'effet des pesticides sur les écosystèmes se concentrent sur l'ingrédient actif, ou sur le produit commercialisé. Cependant, les métabolites issus de la dégradation du composé parent peuvent donner lieu à des composés également toxiques (Björklund et al., 2011 ; Guilherme et al., 2014). Malgré la fréquence à laquelle on le retrouve dans l'environnement, les études sur l'impact de l'AMPA sur les organismes sont rares. Une étude de Guilherme et al. en 2014 met en évidence un risque génotoxique de ce composé chez l'anguille d'Europe (Ang*uilla anguilla*) quand elle est exposée à des concentrations réalistes par rapport à celles mesurées dans l'environnement. En 2016, Dominguez et al. constatent une mortalité accrue et une condition corporelle plus faible chez des vers de l'espèce *Eisenia andrei* exposés à de fortes concentrations d'AMPA. D'autres études montrent une toxicité légère, à des concentrations bien supérieures à celles retrouvées dans la nature (Daouk et al., 2013 ; Levine et al., 2015). Un intérêt commence donc à être porté à ce composé, mais très peu d'informations sur la toxicité de l'AMPA sont actuellement disponibles. Cependant, étant donné sa présence dans les écosystèmes, il est important d'en évaluer le risque environnemental.

1.2. Objectifs du chapitre

Lors de l'étude présentée dans le chapitre 2, nous avons pu constater chez des mâles adultes de crapauds communs, une asymétrie fluctuante marquée chez les individus issus de paysages agricoles, en comparaison avec les individus issus de paysages plus préservés. L'asymétrie fluctuante témoigne d'un stress subi par les organismes durant les premiers stades de vie, à savoir développement embryonnaire, larvaire et stade juvénile.

Suite à ces observations, nous avons donc voulu nous intéresser au stress induit par les substances utilisées en agriculture sur le développement embryonnaire et larvaire d'une espèce d'amphibien. Nous avons pour ce faire choisi une approche expérimentale, afin d'exposer des têtards de crapauds communs à l'un des composés les plus fréquemment retrouvés dans les eaux de surface, l'AMPA (Figure 24).

Nous avons choisi d'utiliser des concentrations relativement faibles, afin de garder une cohérence entre notre étude, et les niveaux généralement mesurés dans l'environnement. Nous avons ainsi suivi la croissance et la mobilité de têtards de *Bufo bufo* (Figure 25) exposés à différentes concentrations d'AMPA, jusqu'à leur métamorphose. Ce travail a fait l'objet de la rédaction d'un article présenté ci-après.

Figure 24. Installation expérimentale utilisée durant cette étude

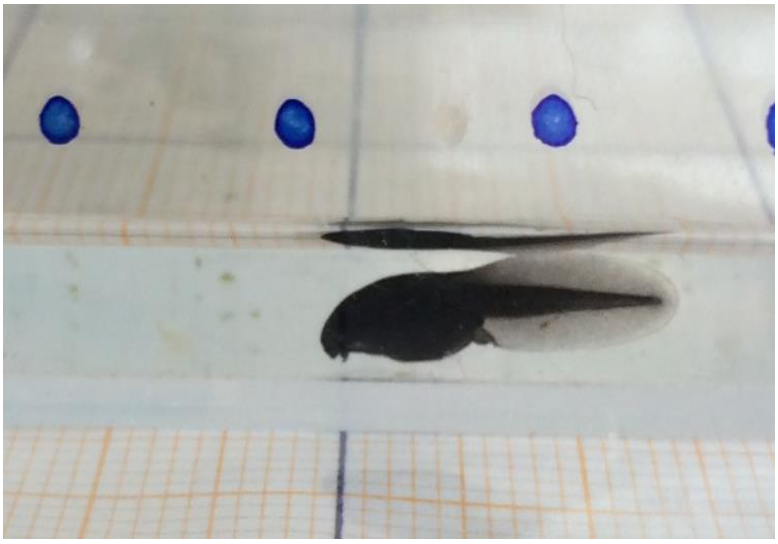


Figure 25. Têtard de crapaud commun

2. ARTICLE 3 : THE PRIMARY METABOLITE OF GLYPHOSATE INFLUENCES TADPOLE MORPHOLOGY IN THE COMMON TOAD (BUFO BUFO) – EN PRÉPARATION

Héloïse Guillot[a], Laura Kouyoumdjian[a], Xavier Bonnet[a], François Brischoux[a]

[a] Centre d'Etudes Biologiques de Chizé, CEBC-CNRS UMR 7372, 79360 Villiers en Bois, France

Corresponding author:

H. Guillot (heloise.guillot@cebc.cnrs.com)

Centre d'Etudes Biologiques de Chizé, CEBC-CNRS UPR 1934, 79360 Villiers en Bois, France

Manuscript in preparation

Abstract

Glyphosate has been used extensively throughout the world and it now accounts for a remarkable share of the world's broad-spectrum herbicide. Its main metabolite AMPA (amino-methyl-phosphonic acid) usually occurs in the environment at higher concentrations compared to glyphosate, but both are among the most frequently found agrochemicals in the field. Consequently many non-target organisms (e.g. animals) may experience chronic exposure to glyphosate and AMPA. However, very few studies investigated the possible effects of AMPA on non-target species. In this study we investigated the effects of chronic exposure to environmentally relevant concentrations of AMPA on the development of the tadpoles of the common toad. Tadpoles in contact with AMPA early during embryonic development were significantly smaller compared to the individuals from the control groups, regardless of AMPA concentrations. But the tadpoles treated with AMPA after hatching tended to be larger. This suggests that relatively low doses of AMPA influence amphibians' development in a complex way. Our study showed that common toad tadpoles are sensitive to exposure to relatively low, albeit environmentally relevant AMPA concentrations. The doses we used are likely to occur in many aquatic habitats spread in agricultural landscapes. We observed marked responses on body size; this could have long term consequences for wild amphibian populations in agro-ecosystems.

Key-words: Glyphosate – Aminomethylphosphonic acid – tadpoles - development

Introduction

Since it was commercialized in 1974, glyphosate has been used extensively throughout the world and it now accounts for a remarkable share of the world's broad-spectrum herbicide market (Vijay et al. 2005 ; Lajmanovich et al. 2010; Bach et al., 2016; Baier et al. 2016). Although glyphosate has a relative short half-life, its main metabolite AMPA (amino-methyl-phosphonic acid) remains longer in the environment. Thus, AMPA usually occurs at higher concentrations compared to glyphosate (Battaglin 2005; Hanke et al. 2008). Both are among the most frequently found agrochemicals in the field, they can be transported (e.g. by running water) and detected in many landscapes (Villeneuve et al. 2011; Battaglin et al. 2014). Consequently many non-target organisms (e.g. animals) may experience chronic exposure to glyphosate and AMPA, especially in the fields regularly treated. In many cases this chronic exposure corresponds to doses lower than those used to test for toxicity and more subtle effects than death might be observed (Struger et al. 2008).

Some non-target organisms might be particularly at risks because of a remarkable temporal coincidence between the occurrence of sensitive life-history stages (e.g. development) and the main periods of herbicide application in agroecosystems (Lenhardt et al. 2015). This is notably the case for amphibians where tadpoles precisely develop during the periods of intensive phytosanitary treatment (e.g., late winter/early spring); this period also coincides with seasonal migrations to breeding ponds. More generally, agrochemicals affect freshwater systems used by amphibians for reproduction (Relyea and Hoverman, 2006). Accordingly, the strong population decline of this taxon is suspected to be partly a consequence of the extensive use of agrochemicals worldwide (Blaustein et al., 2003; Wagner et al. 2016).

Recently, as for most widely and intensively used agrochemicals, the putative consequences of glyphosate on the environment and on human health have been the subject of active debates (Williams et al. 2000; Battaglin et al. 2014).

An increasing body of research focused on the effects of glyphosate on wildlife (Smith, 2001; Lajmanovich et al. 2003; Relyea et al.2005b; Lenkowski et al. 2010; Jones et al. 2011; Yadav et al. 2013), including studies examining the impact of low concentrations (Lenkowski et al. 2010). However, very few studies investigated the possible effects of AMPA at environmentally relevant concentrations on non-target species (Battaglin et al. 2014).

In this study we investigated the effects of chronic exposure to environmentally relevant concentrations of AMPA on the development of the tadpoles of the common toad. The common toad (*Bufo bufo*) is a widespread European species that lives in diverse habitats. Common toads frequently spawn in ponds located near agricultural areas, or need to cross these landscapes during their migrations toward breeding sites; hence, they are frequently exposed to pesticides (Baier et al., 2016). Although this species can persist in highly modified agricultural landscapes, several morphological traits can be altered in agricultural landscapes suggesting possible influences of agricultural practices (e.g., agrochemical application) on toad development (Guillot et al. 2016). Both climatic conditions (e.g. precipitation timing) and breeding phenology (e.g. egg-laying) can vary and thus the exact stage at which the toads are the most exposed to glyphosate/AMPA may also vary (Brühl et al., 2013). Therefore we tested two realistic scenarios regarding tadpoles' exposure to AMPA. A first group was exposed to AMPA just after egg laying (i.e., from embryonic development to metamorphosis). A second group was exposed to AMPA just after hatching (i.e., from early tadpole growth to metamorphosis). The possible effects of AMPA on development were tested using body size and mobility of tadpoles. These traits bear long-lasting effects until adulthood and thus can influence individual fitness (Van Buskirk and McCollum, 2000; Jara and Perotti 2010).

Materials and Methods

Exposure conditions

The study was performed in a typical agricultural landscape in western central France where glyphosate is intensively used (Agence de l'Eau Loire Bretagne). The common toad (*Bufo bufo*) occurs in a wide array of habitats, ranging from well-protected forests to intensively cultivated areas.

Two clutches, which consist in gelatinous string of eggs, were collected from ponds situated in a non-cultivated area, nearby the Centre d'Etudes Biologiques de Chizé (46_090N, 0_240W) and were subjected to different treatments. The first clutch (group 1) was represented by individuals collected upon laying. Individuals were exposed to AMPA at different stages: during embryonic development while inside the eggs, during hatchling, and then as tadpoles until metamorphosis. The second (group 2) was represented by individuals collected just before hatchling. Individuals were exposed to AMPA from hatchling to metamorphosis, during tadpole development solely. The metamorphosis of the first tadpole in each group was used to stop the experiment. Overall, the experiment lasted 58 days for group 1 and 73 days for group 2.

In each group, three concentrations of AMPA (0.1µg.l^{-1}, 1µg.l^{-1} and 10µg.l^{-1}) plus a control without AMPA were tested. Solutions were obtained by dissolving commercial (Aminomethyl) phosphonic acid (purity 99%, ACROS Organics™) in the form of crystalline powder in tap water. The concentrations were chosen because they span the variation range found in the environment (World Health Organization, 1997), including in the vicinity of our study sites, with concentrations ranging from less than 0.1 µg.L^{-1} up to 6.6 µg.L^{-1} (data provided by the Agence de l'Eau Loire Bretagne). Each concentration and the control (normal tap water) were tested in three replicate tanks for each group. Each tank was provided with about 60 recently laid eggs (group 1) or near hatchling eggs (group 2), to take into account the fact that some eggs would never hatch, whether because of natural causes, or the manipulation of the strings to separate the eggs. After hatching, the number of tadpoles per tank was even up to 20.

Overall 24 tanks hosting 20 tadpoles each were used for our experimental design. Because of AMPA half-life of 7 to 14 days in water (Battaglin et al., 2005), water was changed weekly to maintain steady contamination levels throughout the experimentation. Tadpoles were fed ad libitum with lettuce. One clutch was used for each group in order to limit possible influence from uncontrolled sources (e.g. maternal effects). Clutch size varies from 3,000 to 6,000 eggs on average; 240 eggs per clutch were collected for our experimental purpose and the remaining eggs were released at their location of origin.

Body size and swimming performances

Following hatchling, every five days until metamorphosis, ten tadpoles were randomly taken from each tank and were placed above a scale (1 mm grid) and photographed. Body length (from the tip of the snout to the tip of the tail), body width, and tail length were measured (± 0.2 cm) using Image J software. Overall we recorded 1,320 body size measures in the group 1 and 1,080 in the group 2.

Swimming performances of the tadpoles was assessed every seven day from hatchling to metamorphosis. Ten tadpoles were randomly taken from each tank and were individually placed in a separate transparent tank. A grid of two by two centimeters squares was placed underneath. Tadpoles were stimulated with a brush to induce displacement during ten seconds; we counted the number of squares crossed. Overall we recorded 960 swimming measures for group 1 and 720 for group

Statistical analyses

In the course of the experiment the tadpoles increased in size along with their swimming performances. Body size did not influence swimming performance. Therefore we used RM-ANOVAs (Repeated Measures Analysis of Variance) to examine if the experimental treatment influenced body size and swimming performances over time in each group. A different clutch was used in each group precluding direct comparison between the two groups.

Results

In the experimental group 1, AMPA concentrations significantly influenced the increase of body size over time (RM-ANOVA, effect of the treatment: $F_{3, 116}$=3.72, p=0.01; effect of time: $F_{10, 1160}$=121.25, p<0.001; interaction: $F_{30, 1160}$=1.58, p=0.02, Fig. 1). Post-hoc tests (Fisher's LSD) showed that tadpoles from the control batch were significantly smaller compared to the tadpoles submitted to AMPA concentrations of 0.1µg.l^{-1} and 1µg.l^{-1}, but similar in size compared to those from the 10µg. l^{-1} group (p<0.001, p=0.01 and p=0.18 respectively). Results were identical for the other morphological measurements, as expected from the strong correlations between the morphological traits we recorded (Table 1).

Tadpole mobility varied over time but was not influenced by our experimental treatment (RM-ANOVA, effect of treatment: $F_{3,116}$=1.32, p=0.26; effect of time: $F_{7,812}$=7.76, p<0.001; interaction: $F_{21,812}$=1.58, p=0.04).

In the experimental group 2, AMPA concentrations significantly influenced the increase of body size over time (RM-ANOVA, effect of treatment: $F_{3, 108}$=3.59, p=0.01; effect of the time: $F_{10, 1080}$=73.18, p<0.001; interaction: $F_{30, 1080}$=1.39, p=0.08, Fig. 1). Post-hoc tests (Fisher's LSD) showed that tadpoles submitted to AMPA concentrations of 10µg. l^{-1} were significantly smaller compared to the control tadpoles and to the tadpoles submitted to concentration of 0.1µg.l^{-1} (p=0.01 and p=0.002). Tadpoles submitted to AMPA concentrations of 1µg.l^{-1} were marginally smaller than tadpoles submitted to concentration of 0.1µg.l^{-1} (p=0.06). Similarly to group 1, results were identical for the other morphological measurements, as expected from the strong linear relationships between body traits (Table 1).

Tadpole mobility was not influenced by our experimental treatment (RM-ANOVA, effect of treatment: $F_{3, 116}$=1.83, p=0.14; effect of time: $F_{7, 812}$=27.02, p<0.001; interaction: $F_{21, 812}$=1.01, p=0.45).

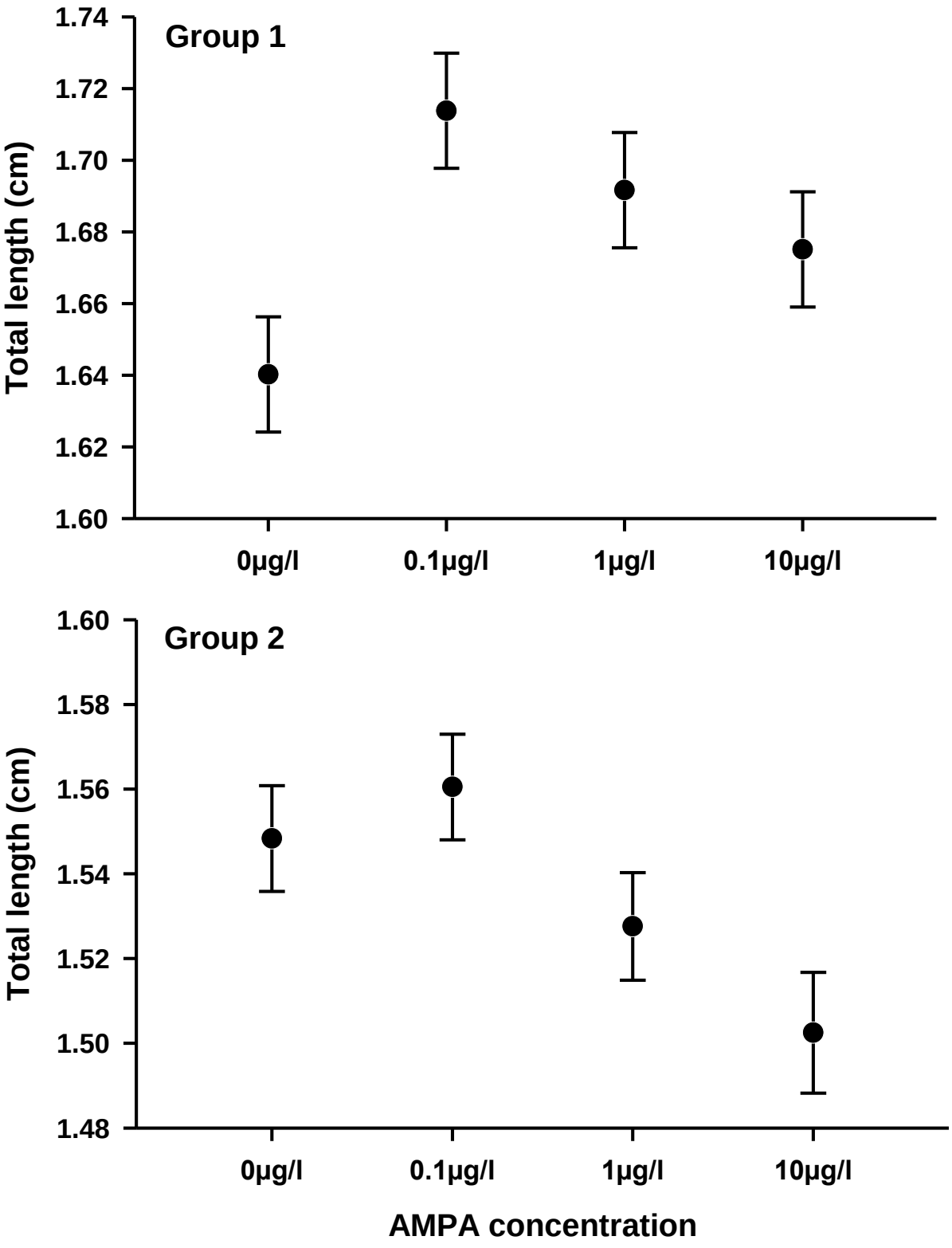


Figure 1. Total length of tadpoles according to the concentrations of AMPA.

		Head length	Head width	Tail length
Group 1	Effect of treatment	$F_{3,116}$=4.71, p=0.004	$F_{3,116}$=4.99, p=0.003;	$F_{3,116}$=3.03, p=0.03
	Effect of time	$F_{10,1160}$=76.15, p<0.0001	$F_{10,1160}$=63.92, p<0.0001	$F_{10,1160}$=123.16, p<0.001
	Interaction	$F_{30,1160}$=1.53, p=0.03;	$F_{30,1160}$=1.22, p=0.19;	$F_{30,1160}$=1.75, p=0.008
Group 2	Effect of treatment	$F_{3,115}$=3.90, p=0.01;	$F_{3,115}$=1.94, p=0.12;	$F_{3,1086}$=3.61, p=0.01
	Effect of time	$F_{10,1150}$=75.55, p<0.0001	$F_{10,1150}$=118.82, p<0.0001	$F_{10,1080}$=56.89, p<0.0001
	Interaction	$F_{30,1150}$=1.55, p=0.03;	$F_{30,1150}$=2.16, p=0.0003	$F_{30,1080}$=1.36, p=0.09

Table 1. Results of statistical comparison (RM-ANOVA) of tadpoles head length, head width and tail length between tested concentrations of AMPA and control

Discussion

This study is one of the first to examine the effects of main metabolite of glyphosate, AMPA, on the larval development of an amphibian species. Our results provide evidence that environmentally relevant exposure to AMPA influences the morphology of developing common toads, *Bufo bufo*.

Tadpoles in contact with AMPA early during embryonic development were significantly smaller compared to the individuals from the control groups when exposed to 1µg.L^{-1} and10 µg.L^{-1}. But the tadpoles treated with AMPA after hatching tended to be larger. This suggests that low albeit different doses of AMPA influence amphibians' development in a complex way. The patterns we observed revealed differential influence of AMPA on body size depending on the timing of treatment in interaction with the doses used. We cannot explain these complex patterns, yet the impact in terms of growth was marked. In the field, reduced larval growth may affect important life history traits because body size determines susceptibility to predation and the timing for metamorphosis. Slow growth rate may induce a delayed metamorphosis and/or could result in small metamorphs. In general adult body size is influenced by body size at metamorphosis and it impacts fitness (Booneand Semlitsch, 2002; refs).

Regardless of the timing of exposure and the control group, we observe a distinct tendency showing the decrease of the tadpoles' total length with the increase of exposure concentrations. This shows that there is a dose-dependant effect of AMPA on tadpoles' growth, whether it is due to a direct or indirect consequence. The difference observed between the control group and the lowest concentration tested could be the consequence of the influence of AMPA on parameters such as pH, water oxygenation or trophic resources (Baier et al., 2016). A low concentration of AMPA could impact those parameters in a way that would positively influence the tadpoles' growth, before reaching levels that would have a direct negative impact on their development.

Unexpectedly, we did not find any significant effect of AMPA on the swimming performances measured. Swimming activity is considered as an ecologically relevant parameter since it indicates underlying physiological stress (Rosenshield et al., 1999; Semlitsch et al., 1995). In our case, though, this ability does not seem to be influence by AMPA exposure. Thus, the consequences observed on body length seem to not have an impact on the mobility of the tadpoles.

In amphibians, the duration of exposure to pesticides can considerably affect their physiological and behavioral impact (Greulich and Pflugmacher, 2003). Our results revealed more severe consequences on individuals exposed during two developmental stages (eggs + tadpoles) and during a longer period of time compared to the individuals exposed during the tadpole stage only. Our experimental design does not permit to tease apart the effect of exposure duration from the effect of the stage at exposure. However our results confirm that early exposure to chemicals tends to provoke stronger effects compared to late exposure (Mikó et al., 2017). Although further experiments are needed, this result is important due to the elevated risk for a strong temporal coincidence between amphibian laying period and the application of pesticides in the field (Brühl et al., 2013).

Our study showed that common toad tadpoles are sensitive to exposure to low albeit environmentally relevant AMPA concentrations. The doses we used are likely to occur in many aquatic habitats spread in agricultural landscapes. Whatever the underlying causes (i.e. direct impact on tadpoles or indirect impact on their trophic resources) we observed marked responses on body size; this could have long term consequences for wild amphibian populations in agro-ecosystems. Future studies should investigate long-term effects of a change in the tadpoles' size on their fitness, vulnerability to predation, and ultimately, their survival, which could affect, in the long run, adult life-stage and population dynamics (Van Buskirk and McCollum, 2000; Jara and Perotti 2010; Guillot et al. 2016). Furthermore, other environmental parameters affect larval development, such as density, temperature or predation (Boone et Semlitsch, 2001 ; Relyea 2003 ; Relyea 2004). As it has been show for other substances, including glyphosate (Relyea, 2005c ; Baier et al., 2016), these factors are likely to interact with AMPA exposure to result in adverse effects. Therefore, studies investigating combined effects of AMPA contamination with other parameters would be needed in the future.

Acknowledgments

Funding was provided by the Région Poitou-Charentes, the Conseil Départemental des Deux-Sèvres and the CNRS.

3. CONCLUSION DU CHAPITRE 3

Dans ce chapitre, nous avons voulu déterminer expérimentalement l'impact d'une exposition chronique à des concentrations croissantes d'AMPA sur des têtards de crapaud commun. Au vu des résultats observés dans le chapitre 2, nous voulions déterminer si ce composé représentait un stress potentiel au moment du développement embryonnaire et larvaire pour cette espèce d'amphibien. Nous nous sommes intéressés à ce composé car il est issu du métabolisme de la substance herbicide la plus utilisée au monde, le glyphosate, et qu'on le retrouve très fréquemment dans l'environnement notamment les eaux de surface. Les concentrations utilisées ont été choisies pour correspondre à des niveaux mesurés dans l'environnement.

Ces travaux nous ont principalement permis de déterminer que les effets observés du fait de l'exposition à l'AMPA ne sont pas les mêmes selon le moment de la mise en contact avec le produit. En effet, les têtards mis en contact avec l'AMPA après l'éclosion des œufs ne présentent pas les même effets que les têtards mis en contact avant l'éclosion, et ayant donc subit une exposition au stade embryonnaire. Les têtards en contact avec le composé dès le stade embryonnaire ont une taille réduite par rapport au lot contrôle alors que ceux traités après l'éclosion ont tendance à être plus grands. Il y a donc une influence différente de l'AMPA selon le stade auquel commence la contamination. Cela constitue une information intéressante à prendre en compte dans l'évaluation du risque environnemental puisqu'elle peut permettre de mesurer la dangerosité d'une coïncidence temporelle entre les différents stades de développement et l'application de glyphosate sur les cultures, associée à des pics dans les concentrations de ce composé et de son métabolite dans le milieu.

De plus, nos résultats montrent une relation dose dépendante entre les concentrations d'AMPA testées et la taille des têtards. En effet, en dehors du groupe contrôle, plus les doses d'AMPA sont élevées, moins la taille des têtards est importante. Les mécanismes expliquant ces phénomènes ne peuvent pas être déterminé par nos travaux, mais nous avons pu mettre en évidence un effet net de l'AMPA sur la croissance des têtards.

De nombreuses études ont été menées sur d'autres catégories de contaminants environnementaux et ont également observé un impact de ces substances sur le développement larvaire. Un bon nombre de ces travaux suggèrent que les têtards manifestant des problèmes durant leur développement présentaient par la suite des anormalités morphologiques en tant qu'adultes, ce qui pourrait avoir des conséquences majeures sur leur survie ou leur reproduction, et au long terme, un impact délétère à l'échelle de la population (LeBlanc et Bain, 1997 ; Releyea, 2005).

Ces résultats montrent que même des concentrations faibles d'AMPA, comparables à celles mesurées en routine dans la nature, semblent affecter la croissance des têtards de crapauds communs. Encore très peu d'études se penchent sur les effets de ce composé sur les organismes qui y sont potentiellement exposés. Ces travaux apportent donc une contribution intéressante à cette problématique, et montrent que, étant donné l'utilisation massive du glyphosate et la fréquence à laquelle l'AMPA est mesuré dans l'environnement, il est nécessaire de continuer à étudier la toxicité de ce composé, et d'obtenir des données supplémentaires afin d'évaluer de façon pertinente le risque écologique associé.

Enfin, le crapaud commun semble être une espèce adaptée pour étudier ces problématiques. En effet, les têtards de crapaud commun sont faciles à prélever et à maintenir en conditions contrôlées, sont relativement aisés à manipuler, et semble être sensibles et montrer des effets facilement observables, même pour des concentrations testées faibles.

CONCLUSION GENERALE

L'ampleur de la contamination de l'environnement par les produits chimiques générés par les activités humaines est devenue une évidence au cours des dernières décennies. Protéger l'environnement face à cette pollution nécessite une évaluation du risque associé à la présence des contaminants dans les écosystèmes. Une estimation pertinente de ce risque requiert une stratégie d'évaluation permettant de mesurer le degré d'exposition, de bioaccumulation, et les effets potentiels (O'Brien et al., 1993 ; Basu et al., 2007).

L'approche habituelle dans l'évaluation écotoxicologique a pendant longtemps été de mesurer les concentrations en polluants dans les compartiments environnementaux (sols, eau) et de formuler des jugements sur la toxicité de ces substances basés sur les effets sur la santé des organismes en accord avec des références connues, déterminées en situation contrôlée, comme la dose sans effets observables, ou la dose létale 50 (LeBlanc et Bain, 1997). Les mesures de contaminants dans l'eau ou le sol donnent une indication sur le devenir des composés polluants mais ne permettent pas de déterminer la part de ces composés biodisponibles pour les organismes vivants, et de ce fait ne donne pas d'indication fiable sur le risque toxique encouru par les espèces (Rivière, 1993). Les études de modèles sous conditions expérimentales contrôlées sont utiles pour déterminer les relations dose-réponses et les mécanismes précis (i.e. échelles moléculaire ou cellulaire) de la toxicité (Basu et al., 2007). Cependant, elles ne nous apprennent pas précisément quelles sont les réponses biologiques intégrées face à l'exposition chronique à des concentrations pertinentes de composés potentiellement toxiques au niveau des réseaux trophiques (Fox, 2001).

Afin de compléter ces approches, l'utilisation de certaines espèces sauvages représente une excellente opportunité pour mieux cerner les problèmes liés à la pollution environnementale. En effet certains organismes permettent de fournir des données intégratives, à la fois sur la présence de différents types de contaminants dans un environnement et leur biodisponibilité, mais également sur les effets induits, à l'échelle fine de l'individu, ou à celles plus larges de la population ou de la communauté (Rivière, 1993 ; Beeby, 2001 ; Basu et al., 2007).

Ce type d'organismes a été utilisé à l'occasion de nombreuses évaluations écologiques associées à des pollutions ponctuelles de zones présentant un risque (bassins miniers, friches industrielles, marées noires… ; Wiens, 1996 ; Pihan et de Vaufleury, 2000 ; Yu et al., 2011). Cependant, il est également indispensable de suivre la présence de polluants dans des zones ne présentant pas de sinistres évidents, notamment à cause de la circulation des contaminants, qui se déposent non seulement à proximité des sources de pollution, mais peuvent également contaminer des zones éloignées (Förstner and Wittman, 1981). Des suivis plus globaux, permettant une cartographie de la présence de contaminants et de leurs effets à l'échelle de paysages ou de régions entières, sont nécessaires. L'utilisation d'espèces sentinelles parait particulièrement adaptée, mais ces espèces doivent remplir quelques conditions particulières pour remplir cet objectif.

Les travaux présentés ici mettent en évidence la possibilité d'utiliser certaines espèces de reptiles et d'amphibiens pour contribuer à l'évaluation de la contamination de l'environnement, et ce à travers plusieurs approches différentes complémentaires. Nos résultats confirment l'intérêt d'utiliser des espèces de reptiles et d'amphibiens en tant qu'espèces sentinelles, qui présentent des avantages non négligeables pour les études en écotoxicologie.

La première partie de nos travaux montre en effet que certaines espèces de reptiles sont capables d'accumuler certaines catégories de polluants dans leurs tissus. Utiliser ces organismes pourrait donc permettre d'évaluer la biodisponibilité d'un composé dans un écosystème, à condition toutefois de connaitre les niveaux initiaux d'exposition. Leur position trophique élevée les soumet à la bioamplification, ce qui permet de mesurer l'étendue de la contamination d'une chaîne alimentaire, et donc d'une partie des autres espèces vivant dans le même milieu. Ainsi, nous avons pu mesurer une différence dans l'accumulation de certains composés selon des espèces ne possédant pas le même régime alimentaire.

De plus, un des avantages importants de ces vertébrés est leur forte sédentarité. Cette caractéristique permet de les utiliser pour évaluer la contamination d'une zone précise. Nos résultats montrent ainsi qu'il est possible d'utiliser ces organismes non seulement pour faire un état des niveaux moyens de polluants d'une zone donnée mais également de pollutions importantes très ponctuelles. Dans notre cas par exemple, si les niveaux moyens de la somme des PCB mesurés dans les serpents utilisés ne dépassent pas 180 µg/kg, certains individus présentaient des niveaux plus de dix fois plus élevés (concentrations maximales mesurée : 2.727,80 µg/kg), ce qui place ces individus bien au-delà des normes alimentaires ou de qualité environnementale (INERIS, 2011). L'utilisation de ces organismes comme espèces sentinelles pourrait donc permettre d'identifier des sources précises de pollution dans des zones bien définies, et d'établir une cartographie de la contamination d'une zone, ce qui n'est pas toujours possible avec d'autres organismes parfois utilisés comme espèces sentinelles, trop mobiles comme les oiseaux.

Les chapitres 2 et 3 montrent que les espèces d'amphibiens sont de bons organismes modèles dans le cadre d'études de l'effet des contaminants sur les caractéristiques individuelles. Ce sont des organismes faciles à manipuler, à échantillonner et qui se prêtent aux études expérimentales, les stades embryonnaires et larvaires sont faciles à maintenir en environnement contrôlé. De même que pour les reptiles, ce sont des organismes sédentaires, qui permettent donc de juger des conséquences de paramètres choisis, ici l'activité agricole, et la présence de contaminants dans le milieu dans des zones bien définies. De plus, les amphibiens présentent une plasticité phénotypique intéressante, qui permet d'observer rapidement les effets de facteurs extérieurs sur leurs traits individuels (Newman, 1992 ; Brady and Grifiths, 2000). Ces organismes présentent également l'avantage notable de permettre le suivi des effets dus à la pollution sur plusieurs stades de vie de manière relativement aisée. Cela pourrait permettre des études à long terme, afin de mesurer l'étendue de l'impact des effets observables sur les stades larvaires ou juvéniles sur les stades adultes, et leurs répercussions potentielles à l'échelle de la population.

Enfin, beaucoup d'espèces de reptiles et d'amphibiens à travers le monde subissent un déclin de leur population. Dans le cas des amphibiens comme des reptiles, la contamination de l'environnement par des substances potentiellement polluantes fait partie des principales causes identifiées pour expliquer cette diminution des effectifs (Hopkins, 2000 ; Campbell et Campbell, 2001 ; Sparling et al., 2010). Il apparait donc important de fournir un effort de recherche sur la capacité de ces espèces à accumuler des polluants et sur les effets que la présence de contaminants dans l'environnement peut engendrer sur les organismes, et au long terme, sur les populations. Mieux comprendre ces phénomènes pourrait en effet permettre de prendre des mesures de protection et de conservation plus efficaces (Brühl et al., 2013 ; Aldrich et al., 2016).

Les trois chapitres de cette thèse correspondent à trois aspects différents de l'analyse d'un risque environnemental associé à la présence de contaminants dans les écosystèmes. Ces trois approches sont complémentaires, mais sont néanmoins à distinguer les unes des autres, puisqu'elles ne correspondent pas à une approche méthodologique continue. Les espèces modèles utilisées ici ne sont pas les mêmes, le premier chapitre traitant d'espèces de reptiles alors que les travaux décrits dans les chapitres 2 et 3 ont nécessité l'utilisation d'une espèce d'amphibiens. Les résultats issus de chaque chapitre n'ont donc pas de liens directs entre eux et une généralisation directe des résultats d'un chapitre à l'autre n'est pas possible, l'accumulation observée chez les reptiles dans le premier chapitre ne pouvant pas expliquer les effets observés chez le crapaud commun présentés dans les autres chapitres. Il est possible que les crapauds communs n'accumulent pas les substances de la même manière que les serpents ou les cistudes, ou n'accumulent pas les mêmes composés. De même, pour une même substance, les effets observés chez les reptiles pourraient être différents chez les amphibiens.

Le choix d'organismes modèles différents s'explique aussi par des contraintes logistiques et financières. Les carcasses de reptiles utilisées dans le chapitre 1 étaient disponibles et constituaient une occasion unique d'exploiter ce matériel pour explorer les questions d'accumulation par ces organismes. Il aurait été intéressant de continuer les travaux sur les effets du paysage agricole et de l'AMPA sur le même type d'organismes, cependant, les protocoles mis en place ne se prêtaient pas bien à l'utilisation d'espèces de reptiles. Le crapaud commun en revanche présentait des avantages pour ce type d'étude, avec un échantillonnage relativement aisé d'un grand nombre d'individus sur le terrain et une manipulation assez simple et surtout rapide des stades embryonnaire et larvaire pour les travaux présentés dans le chapitre 3. Ces travaux sont donc le résultat de l'utilisation opportuniste de matériel biologique disponible, en l'occurrence, les carcasses de reptiles utilisés dans le premier chapitre, et de contraintes d'ordre logistique, ayant nécessité une adaptation des organismes modèles selon les questions posées, afin de faciliter la mise en place des protocoles.

Toutefois, ces travaux ont permis la mise en évidence de l'intérêt de chacun des modèles selon l'étude concernée, et donnent une vue d'ensemble intéressante de l'étendue des travaux qu'il est possible de mener en écotoxicologie sur les espèces de reptiles et d'amphibiens, auxquelles la recherche dans ce domaine ne prête pas encore une attention égale à celle d'autres vertébrés. Il serait évidemment particulièrement intéressant d'effectuer ce type d'étude en établissant une cohérence entre les approches, utilisant la même espèce, voire les mêmes individus. Cela permettrait par exemple de confirmer la relation entre l'accumulation de polluants, l'effet sur le développement des stades larvaires ou juvéniles et les conséquences sur la morphologie des adultes (Relyea, 2012).

Il serait judicieux de poursuivre l'utilisation de ces espèces dans les évaluations de risques écotoxicologiques pour le suivi d'autres substances que celles étudiées durant cette thèse, ce qui nécessite également un suivi et une estimation des effets potentiels associés à leur présence dans les écosystèmes. De nouveaux polluants émergents représentent un nouveau défi pour l'évaluation des risques environnementaux (Geissen et al., 2015). Cependant, si les substances traitées dans le chapitre 1 sont, pour la plupart interdites d'usage depuis des années, l'AMPA nécessite un intérêt accru dans les études futures, étant donné sa forte prévalence dans le milieu, et le peu d'informations actuellement disponibles sur sa biodisponibilité, son potentiel de bioaccumulation, ou les effets induits, notre étude étant une des premières à mettre en évidence une conséquence de l'exposition à ce composé sur une espèce d'amphibien.

Le développement de méthodes non invasives pour la mesure des substances constitue également une prochaine étape afin de permettre des suivis sur le long terme de la contamination d'une même population, voire des mêmes individus. Les résultats obtenus durant cette thèse sur les griffes de cistudes montrent par exemple la possibilité d'utiliser ce type de tissu pour obtenir une information représentative de la contamination des individus, comme cela est fait avec les plumes chez les oiseaux (Dauwe et al., 2000 ; Jaspers et al., 2007 ; Carravieri et al., 2014). D'autres études suggèrent l'utilisation d'échantillons sanguins, ou le prélèvement de portion de queue chez les serpents ou les salamandres (Clark et al., 2000 ; Hopkins et al., 2001 ; Burger et al., 2005 ; Bergeron et al., 2010). Les prélèvements sanguins permettraient également le suivi de biomarqueurs spécifiques. En effet, le développement et l'utilisation plus systématique de biomarqueurs chez l'herpetofaune, comme l'activité de certaines hormones, l'activité de certaines enzymes ou des dommages génétiques (LeBlanc et Bain, 1997 ; Amaral et al., 2012) serait judicieux, afin de mesurer de manière plus précise à une échelle plus fine l'impact des substances toxiques sur les organismes.

Les travaux effectués ici ont été réalisés à l'aide d'espèces présentes dans de nombreux types de milieux, ce qui les rendait particulièrement intéressantes pour les questions traitées. Ces espèces sentinelles sont des outils adéquats, et la recherche en écotoxicologie a tout intérêt à continuer à les utiliser. Cependant, il est possible que certaines zones particulièrement sinistrées par la pollution environnementale ne permettent déjà plus l'utilisation d'organismes vivants comme outils de suivi. En effet, l'utilisation d'une espèce sentinelle sous-entend sa présence dans la zone étudiée. Or, dans les régions les plus touchées par la destruction des paysages (e.g. grandes plaines céréalières), la diversité biologique est souvent très faible, les reptiles et amphibiens peuvent ainsi être absents, les espèces ayant souffert des conséquences directes ou indirectes de la présence de contaminants (Sparling et al., 2010). Dans ces environnements particulièrement touchés, les espèces résistantes aux effets directs des polluants pourraient être victimes du manque de ressources trophiques, de micro-habitats et de refuges. Ce phénomène pourrait éventuellement engendrer un manque de précision dans l'évaluation de la contamination d'une région, ignorant les zones où les niveaux de polluants seraient potentiellement les plus élevés. C'est pourquoi l'utilisation d'espèces sentinelles n'est pas une fin en soi, mais doit constituer une étape à coupler à d'autres approches, afin d'obtenir une estimation la plus précise possible du risque écotoxicologique.

De même, l'utilisation d'une seule catégorie d'espèces indicatrices pour évaluer le risque environnemental restreint et simplifie la complexité des interactions observables dans un écosystème. Le choix des indicateurs s'effectue selon plusieurs critères pour une efficacité optimale de l'information. Cependant, afin d'obtenir une image globale et précise de l'impact de la contamination sur l'ensemble d'un écosystème il est important de sélectionner plusieurs indicateurs provenant de plusieurs niveaux dans les réseaux trophiques et écologiques (Dale et Beyeler, 2001).

Les travaux présentés ici apportent des éléments qui montrent l'utilité de certaines espèces de reptiles et d'amphibiens comme espèces sentinelles de la présence de contamination dans l'environnement et l'impact potentiel sur les espèces associées à cette pollution. Les travaux en écotoxicologie qui portent sur ces organismes restent trop rares, et il est impératif de développer la recherche dans ce domaine, pour participer de manière efficace à l'évaluation du risque environnemental.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

Agarwal S. K., 2009. Heavy Metal Pollution. APH Publishing Corporation. 270p.

Albers P.H., Sileo L. and Mulhern B.M., 1986. Effects of Environmental Contaminants on Snapping Turtles of a Tidal Wetland. Archives of Environmental Contamination and Toxicology 15, 39-49.

Aldrich A., Junghans M., Aeberli C., Brühl C.A., Streissl F. and Schmidt B.R., 2016, Amphibians and plant-protection products: what research and action is needed? Environmental Science Europe 28, 17.

Allender M.C., Dreslik M.J., Patel B., Luber E.L., Byrd J., Phillips C.A. and Scott J.W., 2015. Select metal and metalloid surveillance of free-ranging Eastern box turtles from Illinois and Tennessee (*Terrapene Carolina carolina*). Ecotoxicology 24, 1269–1278.

Amaral M.J., Bicho R.C., Carretero M.A., Sanchez-Hernandez J.C., Faustino A.M.R., Soares A.M.V.M. and Mann R.M., 2012. The use of a lacertid lizard as a model for reptile ecotoxicology studies: Part 2 – Biomarkers of exposure and toxicity among pesticide exposed lizards. Chemosphere 87, 765-774.

Arvy C. and Servan J., 1998. Imminent competition between *Trachemys scripta* and *Emys orbicularis* in France. Proceedings of The Emys Symposium, Dresden 96, Mertensiella, 33–40.

Ayub M., Khan W.A. and Tabinda A.B., 2001. Determination of some heavy/trace metals in two species of turtles (Lissemys punctata and Trionyx Gangeticus) collected from different spots of Hadiara drain. Pakistan Journal of Fisheries 2, 43-48.

B

Bach N.C, Natale G.S. and Ronco A.E., 2016. Effect on the growth and development and induction of abnormalities by a glyphosate commercial formulation and its active ingredient during two developmental stages of the South-American Creole fro, *Leptodactylus latrans*. Environmental Science and Pollution Research. Publised online.

Baier F., Gruber E., Hein T., Bondar-Kunze E., Ivanković M., Mentler A., Brühl C.A., Spangl B., Zaller J.G., 2016. Non-target effects of a glyphosate-based herbicide on Common toad larvae (*Bufo bufo*, Amphibia) and associated algae are altered by temperature. PeerJ 4:e2641 https://doi.org/10.7717/peerj.2641.

Baker L.A., 1992. Introduction to nonpoint source pollution in the United States and prospects for wetland use. Ecological Engineering 1, 1-26.

Balthazor T.M. and Hallas L.E., 1986. Glyphosate-Degrading Microorganisms from Industrial Activated Sludge. Applied and Environmental Microbiology 51, 432-434.

Bank M.S., Crocker J.B., Davis S., Brotherton D.K., Cook R., Behler J. and Connery B., 2006. Population decline of northern dusky salamanders at Acadia National Park, Maine, USA. Biological Conservation 130, 230-238.

Battaglin W.A., Kolpin D.W., Scribner E.A., Kuivila K.M. and Sandstrom M.W., 2005. Glyphosate, Other Herbicides, and Transformation Products In Midwestern Streams, 2002. USGS Staff - Published Research. Paper 599.

Battaglin W.A., Meyer M.T., Kuivila K.M. and Dietze J.E., 2014. Glyphosate and Its Degradation Product AMPA Occur Frequently and Widely in U.S. Soils, Surface Water, Groundwater, and Precipitation. Journal of the American Water Resources Association 50, 275-290.

Baudry J., Bunce R.G.H. and Burel F., 2000. Hedgerow diversity: an international perspective on their origin, function, and management. Journal of Environmental Management 60, 7–22.

Bauerle B., Spencer D.L. and Wheeler W., 1975. The use of snakes as a pollution indicator species. Copeia 366-368.

Basu N., Scheuhammer A.M., Bursian S.J., Elliott J., Rouvinen-Watt K. and Man Chan H., 2007. Mink as a sentinel species in environmental health. Environmental Research 103, 130-144.

Becker P.R., Mackey E.A., Demiralp R., Schantz M.M. Koster B.J. and Wise S.A., 1997. Concentrations or chlorinated hydrocarbons and trace elements in marine mammals tissues archived in the U.S. National Biomonitoring Specimen Bank. Chemosphere 34, 2067-2098.

Beebee T.J.C. and Griffiths R.A., 2005. The amphibian decline crisis: A watershed for conservation biology? Biological Conservation 125, 271-285.

Beeby A., 2001. What do sentinels stand for ? Environmental Pollution 112, 285-298.

Benton T.G., Vickery J.A. and Wilson J.D., 2003. Farmland biodiversity: is habitat heterogeneity the key ? Trends in Ecology and Evolution 18, 182-188.

Berger G., Graef F. and Pfeffer H., 2012. Temporal coincidence of migrating amphibians with mineral fertilizer applications on arable fields. Agriculture, Ecosystems and Environment 155, 62-69.

Bergeron C.M., Bodinof C.M., Unrine J.M., Hopkins W.A., 2010. Mercury accumulation along a contamination gradient and nondestructive indices of bioaccumulation in amphibians. Environmental Toxicology 29, 980-988.

Berny P.J., de Buffrénil V. and Hémery G., 2006. Use of the Nile Monitor, Varanus niloticus L. (Reptilia; Varanidae), as a bioindicator of organochlorine pollution in African wetlands. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 77, 359-366.

Bishop C. A., Mahony N.A., Struger J., Ng P. and Pettit K.E., 1997. Anuran development, density and diversity in relation to agricultural activity in the

Holland river watershed, Ontario, Canada, 1990-1992. Environmental Monitoring and Assessment 57, 21.43.

Bishop B.E., Savitzky B.A. and Abdel-Fattah T., 2010. Lead bioaccumulation in emydid turtles of an urban lake and its relationship to shell disease. Ecotoxicology and Environmental Safety 73, 565–571.

Björklund E., Anskjær G.G., Hansen M., Styrishave B. and Halling-Sørensen B., 2011. Analysis and environmental concentrations of the herbicide dichlobenil and its main metabolite 2,6-dichlorobenzamide (BAM): A review. Science of the Total Environment 409, 2343-2356.

Blaustein A.R., Romansic J.M., Kiesecker J.M. and Hatch A.C., 2003. Ultraviolet radiation, toxic chemicals and amphibian population declines. Diversity and Distributions 9, 123–140.

Boissinot A., Doré F., Grillet P., Swift O. et Lourdais O., 2015. Les amphibiens et les reptiles des bocages de l'ouest de la France. Editions Centre d'Etudes Biologiques de Chizé. 129p.

Boman J., Wagner A., Brauer H. and Viet Binh D., 2001. Trace elements in tissues from Vietnamese animals. X-Ray Spectrom 30, 388-392.

Bonnet X., Lagarde F., Henen B. T., Corbin J., Nagy K. A., Naulleau G., Balhou K., Chastel O., Legrand A., and Cambag R., 2001. Sexual dimorphism in steppe tortoises: influence of the environment and sexual selection on body shape and mobility. Biological Journal of the Linnean Society 72, 357-372.

Boone M.D. and Semlitsch R.D., 2002. Interaction of an insecticide with competition and pond drying in amphibian communities. Ecological Applications 12, 307-316.

Borggaard O.K. and Gimsing A.L., 2008. Fate of glyphosate in soil and the possibility of leaching to ground and surface waters: a review. Pest Management Science 64, 441-456.

Brady L.D. and Grifiths R.A., 2000. Developmental responses to pond desiccation in tadpoles of the British anuran amphibians (*Bufo bufo, B. calamita* and *Rana temporaria*). Journal of Zoology 252, 61-69.

Brinson M.M. and Malvarez A.I., 2002. Temperate freshwater wetlands: types, status and threats. Environmental Conservation 29, 115-133.

Brown G.P., Shilton C.M., Phillips B.L. and Shine R., 2007. Invasion, stress, and spinal arthritis in cane toads. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 104, 17698–17700.

Brühl C., Schmidt T., Pieper S. and Alscher A., 2013. Terrestrial pesticide exposure of amphibians: An underestimated cause of global decline? Scientific Reports 3, 1135.

Brunelli E., Bernabò I., Berg C., Lundstedt-Enkel K., Bonacci A. and Tripepi S., 2009. Environmentally relevant concentrations of endosulfan impair development, metamorphosis and behaviour in *Bufo bufo* tadpoles. Aquatic Toxicology 91, 135–142.

Burger J., 1994. Heavy metals in avian eggshells: another excretion method. Journal of Toxicology and Environmental Health 41, 207–220.

Burger J., Campbell K.R., Campbell T.S., Shukla T., Jeitner C. and Gochfeld M., 2005. Use of Skin and Blood as Nonlethal Indicators of Heavy Metal Contamination in Northern Water Snakes (*Nerodia sipedon*). Archives of Environmental Contamination and Toxicology 49, 232-238.

Burger J. and Gochfeld M., 1991. Cadmium and lead in common terns (Aves: *Sterna hirundo*): relationship between levels in parents and eggs. Environmental Monitoring and Assessment 16, 253–258.

C

Campbell K.R. and Campbell T.S., 2000. Lizard contaminant data for ecological risk assessment. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology 165, 39-116.

Campbell K.R. and Campbell T.S., 2001. The accumulation and effects of environmental contaminants on snakes: a review. Environmental Monitoring and Assessment 70, 253-301.

Campbell K.R. and Campbell T.S., 2002. A logical starting point for developing priorities for lizard and snake ecotoxicology: A review of available data. Environmental Toxicology and Chemistry 21, 894-898.

Campbell K.R., 2003. Ecotoxicology of crocodilians. Applied Hepetology 1, 45-163.

Carey C., Bryant C.J., 1995. Possible iterrelations among environmental toxicants, amphibian development, and decline of amphibian populations. Enviuronemntal Health Pespectives 105, 65-80.

Carravieri A., Cherel Y., Blévin P., Brault-Favrou M., Chastel O. and Bustamante P., 2014. Mercury exposure in a large subantarctic avian community. Environmental Pollution 190, 51-57.

Carson R.L., 1962. Silent spring. Riverside Press, Cambridge, MA, USA.

Cauble K. and Wagner R.S., 2005. Sublethal Effects of the Herbicide Glyphosate on Amphibian Metamorphosis and Development . Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 75, 429–435.

Chapin S.F., Zavaleta E.S., Eviner V.T., Naylor R.L., Vitousek P.M., Reynolds H.L., Hooper D.U., Lavorel S., Sala O.E. , Hobbie S.E., Mack M.C. and Díaz S., 2000. Consequences of changing Biodiversity. Nature 405, 234-242.

Chen J., Franklin J.F. and Spies T.A., 1993. Contrasting microclimates among clearcut, edge, and interior of old-growth Douglas-fir forest. Agricultural and Forest Meteorology 63, 219–237.

Choi I., Shim J. H. and Ricklefs R. E., 2003. Morphometric relationships of take-off speed in anuran amphibians. Journal of Experimental Zoology 299, 99–102.

Ciliberti A., Berny P., Delignette-Muller M.L. and de Buffrénil V., 2011. The Nile monitor (*Varanus niloticus*; Squamata: Varanidae) as a sentinel species for lead and cadmium contamination in sub-Saharan wetlands. Science of the Total Environment 409, 4735-4745.

Clark D. R.Jr., Bickham J.W., Baker D.L. and Cowman D.F., 2000. Environmental contaminants in Texas, USA, wetlands reptiles: Evaluation using blood samples. Environmental Toxicology and Chemistry 19, 2259-2265.

Convention de Stockholm sur les Polluants Organiques Persistants. 2001.

Cope O.B., 1965. Agricultural chemicals and freshwater ecological systems. In C. Chichester : Research in pesticides. Academic Press, New York, USA, 115-128.

Coupe R.H., Kalkhoff S.J., Capel P.D. and Gregoire C., 2011. Fate and transport of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in surface waters of agricultural basins. Pest Management Sciences 68, 16-30.

D

Dale V.H. and Beyeler S.C., 2001. Challenges in the development and use of ecological indicators. Ecological Indicators 1: 3-10.

Daouk S., Copin P.J., Rossi L., Chèvre N. and Pfeifer H.R., 2013. Dynamics and environmental risk assessment of the herbicide glyphosate and its metabolite AMPA in a small vineyard river of the Lake Geneva catchment. Environmental Toxicology and Chemistry 32, 2035-2044.

Dargnat, C. et Fisson C., 2010. Les PolyChrloroBiphényles (PCB) dans le bassin de la Seine et son estuaire. Groupement d'Interêt Public Seine aval.

Dauwe T., Bervoets L., Blust R., Pinxten R. and Eens M., 2000. Can Excrement and Feathers of Nestling Songbirds Be Used as Biomonitors for Heavy Metal Pollution? Archives of Environmental Contamination and Toxicology 39, 541-549.

Davidson C. and Knapp R.A., 2007. Multiple stressors and amphibian declines: dual impact of pesticides and fish on yellow-legged frogs. Ecological Applications 17, 587-597.

Dick R.E. and Quinn J.P., 1995. Glyphosate-degrading isolates from environmental samples: occurrence and pathways of degradation. Applied Microbiology and Biotechnology 43, 545-550.

Dill G.M., Sammons R.D., Feng P.C.C., Kohn F., Kretzmer K., Mehrsheikh A., Bleeke M., Honegger J.L., Farmer D., Wright D. and Haupfear E.A., 2010. "Glyphosate: Discovery, development, applications and properties" in Glyphosate Resistance in Crops and Weeds. Wiley.

Dominguez A., Brown G.G., Sautter K.D., Ribas de Oliveira C.M., Carvalho de Vasconcelos E., Niva C.C., Bartz M.L.C. and Bedano J.C., 2016. Toxicity of AMPA to the earthworm *Eisenia andrei* Bouché, 1972 in tropical artificial soil. Scientific Reports 6, 19731.

Dudgeon D.D., Arthington A.H., Gessner M.O., Kawabata Z., Knowler D.J., Lévêque C., Naiman R.J., Prieur-Richard A., Soto D., Stiassny M.L.J. and Sullivan C.A., 2006. Freshwater biodiversity: importance, threats, status and conservation challenges. Biological Reviews 81, 163-182.

Dugan P.J., 1993. Wetlands in Danger. New York, USA: Oxford University Press.

E

EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP), 2012. Scientific Opinion on safety and efficacy of zinc compounds

(E6) as feed additive for all animal species: Zinc oxide, based on a dossier submitted by Grillo Zinkoxid GmbH/EMFEMA. EFSA Journal 10, 2970-2994.

El-Shahawi M.S., Hamza A., Bashammakh A.S. and Al-Saggaf W.T., 2010. An overview on the accumulation, distribution, transformations, toxicity and analytical methods for the monitoring of persistent organic pollutants. Talanta 80, 1587-1597.

EPA (U.S. Environmental Protection Agency), 2000. Guidance for Data Quality Assessment: Practical Methods for Data Analysis (EPA/600/R-96/084) (Washington, DC).

Evans D.D. and Batty M.J., 1986. Effects of high dietary concentrations of glyphosate (roundup®) on a species of bird, marsupial and rodent indigenous to Australia. Environmental Toxicology and Chemistry 5, 399-401.

Evans K.L., 2004. The potential for interactions between predation and habitat change to cause population declines of farmland birds. Ibis 146, 1-13.

Evans S.C., Shaw E.M. and Rypstra A.L., 2010. Exposure to a glyphosate-based herbicide affects agrobiont predatory arthropod behaviour and long-term survival. Ecotoxicology 19, 1249–1257.

F

Fischer J. and Lindenmayer D.B., 2007. Landscape modification and habitat fragmentation: a synthesis. Global Ecology and Biogeography 16, 265–280.

Fleet R.R., Clark Jr. D.R. and Plapp Jr F.W., 1972. Residues of DDT and Dieldrin in Snakes from Two Texas Agro-Systems. BioScience 22, 664-665.

Foley J.A., DeFries R., Asner G.P., Barford C., Bonan G., Carpenter S.R., Chapin F.S., Coe M.T., Daily G.C., Gibbs H.K., Hellowski J.H., Holloway T., Howard E.A., Kicharik C.J., Monfreda C., Patz J.A., Prentice I.C., Ramankutty N and Snyder P.K., 2005. Global consequences of land use. Science 309, 570-574.

Fontenot L.W., Noblet G.P., Akins J.M., Stephens M.D. and Cobb G.P., 1997. Bioaccumulation of polychlorinated biphenyls in ranid frogs and northern water snakes from a hazardous waste site and a contaminated watershed. Chemosphere 40, 803-809.

Forbes V.E., et Forbes T.L., 1997. Ecotoxicologie – Théorie et applications. INRA Editions.

Förstner U. and Wittman G.T.W., 1981. Metal pollution in the aquatic environment. Berlin, Heidelberg. Germany: Springer-Verlag, 272-486.

Fox G.A., 2001. Wildlife as sentinels of human health effects in the Great Lakes–St. Lawrence basin. Environmental Health Perspectives 109, 853–861.

Frank A., 1986. In search of biomonitors for cadmium: cadmium content of wild Swedish fauna during 1973-1976. The Science of the Total Environment 57, 57-65.

G

Gayet G., Baptist F., Baraille L., Caesstecker P., Clement J.C., Gaillard J., Gaucherand S., Isselin-Nondedeu F., Poinsot C., Quetier F., Touroult J. et Barnaud G., 2016. Méthode nationale d'évaluation des fonctions des zones humides – version 1.0. Fondements théoriques, scientifiques et techniques. Service du patrimoine naturel, Muséum national d'histoire naturelle, Paris, 310 p.

Geiger F., Bengtsson J., Berendse F., Weisser W.W., Emmerson M., Morales M.B., Ceryngier P., Liira J., Tscharnkte T., Winqvist C., Eggers S., Bommarco R., Pärt T., Bretagnolle V., Plantegenest M., Clement L.W., Dennis C., Palmer C., Oñate J.J., Guerrero I., Hawro V., Aavik T., Thies C., Flohre A., Hänke S., Fischer C., Goedhart P.W. and Inchasti P., 2010. Persistent negative effects of pesticides on biodiversity and biological control potential on European farmland. Basic and Applied Ecology 11, 97-105.

Geissen V., Mol H., Klumpp E., Umlauf G., Nadal M., van der Ploeg M., van de Zee S.E.A.T.M. and Ritsema C.J., 2015. Emerging pollutants in the environment: A challenge for water resource management. International Soil and Water Conservation Research 3, 57-65.

Gibbons J.W., Scott D.E. and Ryan T.J., 2000. The global decline of reptiles, déja`vu amphibians. Bioscience 50, 653–666.

Glusczak L., dos Santos Miron D., Moraes B.S., Simões R.R., Schetinger M.R.C., Morsch V.M. and Loro V.L., 2007. Acute effects of glyphosate herbicide on metabolic and enzymatic parameters of silver catfish (Rhamdia quelen). Comparative Biochemistry and Physiology 146, 519-524.

Gosner K.L., 1960. A simplified table for staging anouran embryos and larvae with notes on identification. Herpetologica 16, 183-190.

Gouzy A. et Ducos G., 2008. La connaissance des éléments traces métalliques : un défi pour la gestion de l'environnement. Air pur 75, 6-10.

Green A.D., Buhlmann K.A., Hagen C., Romanek C. and Gibbons J.W., (2010). Mercury contamination in turtles and implications for human health. Journal of Environmental Health 72, 14-22.

Greulich K. and Pflugmacher S., 2003. Differences in susceptibility of various life stages of amphibians to pesticide exposure. Aquatic Toxicology 65, 329–336.

Guilherme S., Santos M.A., Gaivão I. and Pacheco M., 2014. DNA and chromosomal damage induced in fish (*Anguilla anguilla* L.) by aminomethylphosphonic acid (AMPA)—the major environmental breakdown product of glyphosate. Environmental Science and Pollution Research. Published online.

Guillot H., Boissinot A., Angelier F., Lourdais O., Bonnet X., and Brischoux F., 2016. Landscape influences the morphology of male common toads (*Bufo bufo*). Agriculture, Ecosystems and Environmenet. 233, 106-110.

Gyllenhammar I., Holm L., Eklund R. and Berg C., 2009. Reproductive toxicity in Xenopus tropicalis after developmental exposure to environmental concentrations of Ethynylestradiol. Aquatic Toxicology 91, 171–178.

H

Hall R.J., 1980. Effects of environmental contaminants on reptiles: a review. US Fish and Wildlife Service, Special Scientific Report Wildlife, 228.

Hanke I., Snger H. and Hollender J., 2008. Ultratrace-level determination of glyphosate, aminomethylphosphonic acid and glufosinate in natural waters by solid-phase extraction followed by liquid chromatography–tandem mass spectrometry: performance tuning of derivatization, enrichment and detection. Analytical and Bioanalytical Chemistry 391, 2265-2276.

Harrad S., 2009. Persistent Organic Pollutants. Wiley-Blackwell.

He Z.L., Yang X.E. and Stoffela P.J., 2005. Trace elements in agroecosystems and impact on the environment. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology 19, 125-140.

Herzke D., Berger U., Nygard T. and Vetter W., 2003. Organochlorines, organobromines and their metabolites in effs of Norwegian birds of prey. Organohalogen Compound 67, 466-469.

Hilton-Brown D. and Oldham R.S., 1991. The status of the widespread amphibians and reptiles in Britain, 1990, and changes during the 1980s. Nature Conservancy Council Contract Survey no.131.Nature Conservancy Council, Peterborough, London, UK.

Hop H., Borga K. Gabrielsen G.W., Kleivane L. and Skaare J.U., 2002. Food web magnification of persistent organic pollutants in poikilotherms and homeotherms from the Barents Sea. Environmental Sciences and Technology 36, 2589-2597.

Hopkins W.A., 2000. Reptile toxicology: challenges and opportunities on the last frontier in vertebrate ecotoxicology. Environmental Toxicology and Chemistry 19, 2391-2393.

Hopkins W.A., Roe J.H., Snodgrass J.W., Jackson B.P., Kling D.E., Rowe C.L. and Congdon J.D., 2001. Nondestructive indices of trace element exposure in squamate reptiles. Environmental Pollution 15, 1-7.

Hopkins W.A., Bodinof C., Budischlak S. and Perkins C., 2013a. Nondestructive indices of mercury exposure in three species of turtles occupying different trophic niches downstream from a former chloralkali facility. Ecotoxicology 22, 22–32.

Hopkins B.C., Hepner M.J., Hopkins W.A., 2013b. Non-destructive techniques for biomonitoring of spatial, temporal, and demographic patterns of mercury bioaccumulation and maternal transfer in turtles. Environmental Pollution 77, 164-170.

I

INERIS, 2006. Elements traces métalliques. Guide Méthodologique. Recommandations pour la modélisation des transferts des éléments traces métalliques dans les sols et les eaux souterraines. DRC-06-66246/DESP-R01a. 138p.

INERIS, 2005. Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques. Guide Méthodologique. Rapport d'étude n°66244-DESP-R01. 99p.

INERIS, 2011. Données technico-économiques sur les substances chimiques en France : Les PolyChloroBiphenyles (PCB). DRC-11-118962-11081A. 89 p.

J

Janin A., Léna J. P. and Joly P., 2011. Beyond occurrence: Body condition and stress hormone as integrative indicators of habitat availability and fragmentation in the common toad. Biological Conservation 144, 1008-1016.

Jara F.G. and Perotti M.G., 2010. Risk of predation and behavioural response in three anuran species; influence of tadpole size and predator type. Hydrobiologia 644, 313-324.

Jaspers V.L.B., Voorspoels S., Covaci A., Lepoint G. and Eens M., 2007. Evaluation of the usefulness of bird feathers as a non-destructive biomonitoring tool for organic pollutants: ac comparative and meta-analytical approach. Environment International 33, 328-337.

Jones D.K., Hammond J.I. and Relyea R.A., 2010. Competitive stress can make the herbicide Roundup® more deadly to larval amphibians. Environmental Toxicology and Chemistry 30, 446-454.

Jones K.C. and De Voogt P., 1999. Persistent organic pollutants (POPs): state of the science. Environmental Pollution 209-221.

Juc L., 2007. Etude des risques liés àl'utilisation des pesticides organochlorés et impact sur l'environnement et la santé humaine. Sciences de la Terre. Université Claude Bernard - Lyon I.

K

Kauffman M.J., Varley N., Smith D.W., Stahler D.R., MacNulty D.R. and Boyce M.S., 2007. Landscape heterogeneity shapes predation in a newly restored predator–prey system. Ecology Letters 10, 690–70.

Keddy P.A., 2000. Wetland Ecology : Principles and Conservation. Cambridge UK: Cambridge University Press.

Kelly D.W., Poulin R., Tompkins D.M. and Townsend C.R., 2010. Synergistic effects of glyphosate formulation and parasite infection on fish malformations and survival. Journal of Applied Ecology. 47, 498-504.

Kloas W., 2002. Amphibians as a model for the study of endocrine disruptors. International Review of Cytology 216, 1-57.

Krivan V., 1998. Effects of optimal antipredator behavior of prey on predator-prey dynamics: the role of refuges. Theoretical Population Biology 53, 131-142.

L

Lajmanovich R.C., Attademo A.M., Peltzer P.M., Junges C.M. and Cabagna M.C., 2010. Toxicity of Four Herbicide Formulations with Glyphosate on *Rhinella renarum* (Anura: Bufonidae) Tadpoles: B-esterases and Glutathione S - transferase Inhibitors. Archives of Environmental Contamination and Toxicology 36, 193-199.

Lambert M.R.K., 2005. Lizards used as bio-indicators to monitor pesticide contamination in sub-Saharan Africa : a review. Applied Herpetology 2, 99-107.

Lawrence E. and Isioma T., 2010. Acute toxic effects of endosulfan and diazinon pesticides on adult amphibians (*Bufo regularis*). Journal of Environmental Chemistry and Ecotoxicology 2, 73-78.

LeBlanc G.A., Bain L.J., 1997. Chronic toxicity of environmental contaminants sentinels and biomarkers. Environmental Health Perspectives 105, 65–80.

Leistra M., Boesten J.J.T.I., 1989. Pesticide contamination of groundwater in western Europe. Agriculture, Ecosystems and Environment. 26, 369-389.

Leonzio C. and Massi A., 1989. Metal biomonitoring in bird eggs: A critical experiment. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 43, 402.-406.

Lenhardt P.A., Brühl C. and Berger G., 2015. Temporal coincidence of amphibian migration and pesticide applications on arable fields in spring. Basic and Applied Ecology 16, 54–63.

Lenkowski J.R., Sanchez-Bravo G, McLaughlin K.A., 2010. Low concentrations of atrazine, glyphosate, 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid, and triadimefon exposures have diverse effects on Xenopus laevis organ morphogenesis. Journal of Environmental Sciences 22, 1305-1308.

Levine S.L., von Mérey G., Minderhout T., Manson P., Sutton P., 2015. Aminomethylphosphonic acid has low chronic toxicity to Daphnia magna and Pimephales promelas. Environmental Toxicology and Chemistry 34, 1382-1389.

Lindberg P., Sellström U., Häggberg L. and de Witt C.A., 2004. Higher brominated diphenyl ethers and hexabromocyclododecane found in eggs of peregrine falcons (*Falco peregrinus*) breeding in Sweden. Environmental Sciences and Technology 38, 93-96.

Lucia M., Andre J.M., Gontier K., Diot N., Veiga J. and Davail S., 2010. Trace Element Concentrations (Mercury, Cadmium, Copper, Zinc, Lead, Aluminium, Nickel, Arsenic, and Selenium) in Some Aquatic Birds of the Southwest Atlantic Coast of France. Archives of Environmental Contamination and Toxicology 58, 844-853.

Luquet E., Léna J.P., Miaud C. and Plénet S., 2015. Phenotypic divergence of the common toad (*Bufo bufo*) along an altitudinal gradient: evidence for local adaptation. Heredity 114, 69–79.

M

Maffucci, F., Caurant, F., Bustamante, P. and Bentivegna, F., 2005. Trace element (Cd, Cu, Hg, Se, Zn) accumulation and tissue distribution in loggerhead turtles

(*Caretta caretta*) from theWestern Mediterranean Sea (southern Italy). Chemosphere 58, 535–542.

Malik R.N., Ghaffar B. and Hashmi M.Z., 2013. Trace metals in Ganges soft-shell turtle (*Aspideretes gangeticus*) from two barrage: Baloki and Rasul, Pakistan. Environmental Science and Pollution Research 20, 8263–8273.

Mandrillon A.L. et Saglio P., 2005. Une revue des effets des pesticides sur la morphologie, le comportement et les traits d'histoire de vie des amphibiens. Bulletin de la Société Herpétologique de France 116, 5-29.

Metian M., Bustamante P., Hédouin L., Warnau M., 2008. Accumulation of nine metals and one metalloid in the tropical scallop *Comptopallium radula* from coral reefs in New Caledonia. Environmental Pollution 152, 543-552.

Meyers-Schöne L., Shugart L.R., Beauchamp J.J. and Walton B.T., 1993. Comparison of two freshwater turtle species as monitors of radionuclide and chemical contamination: DNA damage and residue analysis. Environmental Toxicology and Chemistry 12, 1487–1496.

Meyer E., Eagles-Smith C.A., Sparling D. and Blumenshine S., 2014. Mercury Exposure Associated with Altered Plasma Thyroid Hormones in the Declining Western Pond Turtle (*Emys marmorata*) from California Mountain Streams. Environmental Science and Technology 48, 2989–2996.

Mikó Z., Ujszegi J. and Hettyey A., 2017. Age-dependent changes in sensitivity to a glyphosate-based pesticide in tadpoles of the common toad (Bufo bufo). Aquatic Toxicology 187, 48–54.

Ministère de l'Agriculture, de l'Agroalimentaire et de la Forêt. Note de suivi 2015. Tendances du recours aux produits phytopharmaceutiques de 2009 à 2014.

Morel F.M.M., Kraepiel A.N.L. and Amyot M., 1998. The Chemical Cycle and Bioaccumulation of Mercury. Annual Review of Ecology and Systematics 29, 543-566.

Moriarty F., 1988. Ecotoxicology : The study of pollutants in ecosystems. Academix Press, 1999, 347p.

Murdoch W.W., Swarbrick S.L., Luck R.F., Walde S and Yu D.S., 1996. Refuge dynamics and metapopulation dynamics: an experimental test. American Naturalist 147, 424-444.

Morrison M.L. and Meslow E.C., 1984. Effects of the Herbicide Glyphosate on Bird Community Structure, Western Oregon. Forest Science 30, 95-106.

N

Nagle R.D., Rowe C.L. and Congdon J.D., 2001. Accumulation and Selective Maternal Transfer of Contaminants in the Turtle *Trachemys scripta* Associated with Coal Ash Deposition. Archives of *Environmental Contamination and Toxicology* 40, 531–536.

Nandula V.K., Reddy K.N., Duke S.O. and Poston D.H., 2005. Glyphosate-resistant weeds: current status and future outlook. Outlook on Pest Management, 153.

Newman R.A., 1992. Adaptative Plasticity in amphibian metamorphosis. BioSciences 42, 971-678.

Norstrom R.J., 2002. Understanding bioaccumulation of POP in food webs. Environmental Science and Pollution Research 9, 300-303.

O

O'Brien D.J., Kaneene J.B. and Poppenga R.H., 1993. The use of mammals as sentinels for human exposure to toxic contaminants in the environment. Environmental Health Perspectives 99, 351–368.

Overmann S.R. and Krajicek J.J., 1995. Snapping Turtles (*Chelydra serpentine*) as biomonitors of lead contamination of the Big River in Missouri's old lead belt. Environmental Toxicology and Chemistry 14, 689-695.

P

Palmer A.R. and Strobeck C., 1986. Fluctuating asymmetry: measurement, analysis, pattern. Annual Review of Ecology and Systematics 17, 391-421.

Papp R., 2011. Les propriétés environnementales des éléments traces. Particularités et conséquences pour l'analyse de risque. Collège National d'Experts en en Environnement de l'Industrie Chimique.

Papagiannis I., Kagalou I., Leonardos J., Petridis D. and Kalfakakou V., 2004. Copper and zinc in four freshwater fish species from Lake Pamvotis (Greece). Environment International 30, 357–362.

Pavignano I. and Giacoma C., 1990. Una valutazione ecologica dello stato di conservazione delle zone umide minori della pianura Piemontese–Atti VI Conv. naz. Ass. "A. Chigi", Torino, 1989. Mus. reg. Sci. Nat. Torino, 91–104 (in italian).

Phillips B.L., Brown G.P., Webb J.K. and Shine R., 2006. Invasion and the evolution of speed in toads. Nature 439, 803.

Pihan F., de Vaufleury A., 2000. The Snail as a Target Organism for the Evaluation of Industrial Waste Dump Contamination and the Efficiency of Its Remediation. Ecotoxicology and Environmental Safety 46, 137-147.

Pough F.H., 1983. "Amphibians and reptiles as low energy systems" in Behavioral energetics, the cost of survival in vertebrates. Edited by Wayne P. Aspey and Sheldon I. Lustick. Ohio State University Press.

Priol P., Coic C. et Servan J., 2008. Répartition de la cistude d'Europe (*Emys orbicularis*) en Aquitaine. Bulletin de la Société Herpetologique de France 127, 23-34.

Protocole d'Aarhus. Protocole à la convention sur la pollution atmosphérique transfrontière à longue distance, de 1979, relatif aux polluants organiques persistant.

R

Rainwater T.R., Reynolds K.D., Canas J.E., Cobb G.P., Anderson T.A., McMurry S.T. and Smith P.N., 2005. Organochlorine pesticides and mercury in cottonmouths (*Agkistrodon piscivorus*) from north- eastern Texas, USA. Environmental Toxicology and Chemistry 24, 665–673.

Reading C.J. and Clarke R.T., 1983. Male breeding behavior and mate acquisition in the common toad, *Bufo bufo*. Journal of Zoology 201, 237-246.

Reading C.J., 1991. The relationship between body length, age and sexual maturity in the common toad, *Bufo bufo*. Ecography 14, 245-249.

Relyea R.A. and Mills N., 2001. Predator-induced stress makes the pesticide carbaryl more deadly to gray treefrog tadpoles (*Hyla versicolor*). Proceedings of the Nationall Academy of Sciences.U.S.A. 98, 2491–2496.

Relyea R.A., 2003. Predator cues and pesticides: a double dose of danger for amphibians. Ecological Applications 13, 1515–1521.

Relyea R.A., 2004. Synergistic impacts of malathion and predatory stress on six species of North American tadpoles. Environmental Toxicology and Chemistry 23, 1080–1084.

Relyea R.A., 2005a. The impact of insecticides and herbicides on the biodiversity and productivity of aquatic communities. Ecological Applications 15, 618-627.

Relyea R.A., 2005b. The lethal impact of roundup on aquatic and terrestrial amphibians. Ecological Applications 15, 1118–1124.

Relyea R.A., 2005c. The Lethal Impacts of Roundup and Predatory Stress on Six Species of North American Tadpoles. Archives of Environmental Contamination and Toxicology 48, 351–357

Relyea R.A. and Hoverman J.T., 2006. Assessing the ecology in ecotoxicology: a review and synthesis in freshwater systems. Ecology Letter 9, 1157–1171.

Relyea R.A., 2012. New effects of roundup on amphibians: predators reduce herbicide mortality; herbicides induce antipredator morphology. Ecological Applications 22, 634-647.

Rivière J.L., 1993. Les animaux sentinelles. Courrier de l'Environnement de l'INRA 20, 59-67.

Robodonirina S., 2015. Contaminants organiques (HAP, Me-HAP, PCB) en environnement : Etude de milieu naturel et de faisabilité de bioremédiation. Thèse de doctorat : physico-chimie. Université d'Antananarivo.

Rohr J.S., Raffel T.R., Sessions S.R. and Hudson P.J., 2008. Understanding the net effects of pesticides on amphibian trematode infections. Ecological Applications 18, 1743–1753.

Rothermel B.B. and Semlitsch R.D., 2002. An Experimental investigation of landscape resistance of forest versus old-field habitats to emigrating juvenile amphibians. Conservation Biology 16, 1324-1332.

Russel R.W., Gobas F.P.C. and Haffner G.D., 1999. Maternal transfer and in ovo exposure of organochlorines in oviparous organisms: model and field verifications. Environmental Science and Technology 33, 416-420.

S

Sala O.E., Chapin S., Armesto J.J., Berlow E., Bloomfield J., Dirzo R., Huber-Sanwald E., Huenneke L.F., Jackson R.B., Kinzig A., Leemans R., Lodge D.M., Mooney H.A., Oesterheld M., Poff N.L., Sykes M.T., Walker B.H. and Walker M., Wall

D.H., 2000. Global Biodiversity Scenarios for the Year 2100. Science 287, 1770-1774.

Santos X., Pastor D., G.A. Llorente and Albaigès J., 1999. Organochlorine levels in viperine snake *Natrix maura* carcassesfrom the Ebro delta (Spain): Sexual and size-related differences. Chemosphere 39, 2641-2650.

Schiavon M., Perrin-Ganier C. and Portal J.M., 1995. La pollution de l'eau par les produits phytosanitaires : état et origine. Agronomie 15, 157-170.

Schiesari L., Grillitsch B. and Grillitsch H., 2007. Biogeographic Biases in Research and Their Consequences for Linking Amphibian Declines to Pollution. Conservation Biology 21, 465–471.

Schmitt C.J., Zajicek J.L. and Peterma P.H., 1990. National Contaminant Biomonitoring Program: Residues of Organochlorine Chemicals in U.S. Freshwater Fish, 1976-1984. Archives of Environmental Contamination and Toxicology 19, 748-781.

Scott M.W., Dobrovolny M., Torres C., Torres C., Goode, M., Rainwater T.R., Salice C.J. and Anderson T.A., 2013. Organochlorine pesticides in Squamate Reptiles from Southern Arizona, USA. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 90, 654-659.

Scribner E.A., Battaglin W.A., Gilliom R.J. and Meyer M.T., 2007, Concentrations of glyphosate, its degradation product, aminomethylphosphonic acid, and glufosinate in ground- and surface-water, rainfall, and soil samples collected in the United States, 2001–06: U.S. Geological Survey Scientific Investigations Report 2007–5122, 111.

Selcer K.W., 2010. Reptile ecotoxicology; studying the effect of contaminants on population, in “Toxicology of Reptiles”. CRC Press.

Servan J., 1988. La cistude d’Europe, Emys orbicularis, dans les étangs de Brenne, France. Mésogée 48, 91-95.

Shine R., Brown G.P. and Phillips B.L., 2011. An evolutionary process that assembles phenotypes through space rather than through time. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 108, 5708–5711.

Smith G.R., 2001. Effects of Acute Exposure to a Commercial Formulation of Glyphosate on the Tadpoles of Two Species of Anurans. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 67, 483-488.

Söderman F., Van Dongen S., Pakkasmaa S. and Merilä J., 2007. Environmental stress increases skeletal fluctuating asymmetry in the moor frog *Rana arvalis*. Oecologia 151, 593-604.

Sparling D.W., Fellers F.M. and McDonnell L., 2001. Pesticides and amphibian population declines in California, USA. Environmental Toxicology and Chemistry 7, 1591–1595.

Sparling D.W., Linder G., Bishop C.A. and Krest S., 2010. Ecotoxicology of Amphibians and Reptiles, Second Edition. CRC Press.

Stoate C., Boatman NDN, Borralho R.J., Carvahlo C.R., de Snoo G.R. and Eden P., 2001. Ecological impacts of arable intensification in Europe. Journal of Environmental Management 63, 337-365.

Struger J., Thompson D., Staznik B., Martin P., McDaniel T. and Marvin C., 2008. Occurrence of glyphosate in surface waters of southern Ohio. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 80, 378-384.

T

Tataruch F. and Kierdorf H., 2003. Mammals as Biomonitors. Trace Metals and Other Contaminants in the Environment 6, 737-772.

Taylor A.W. and Spencer W. F., 1990. Volatilization and vapor transport processes. In Pesticides in the soil environment. Soil Science Society of America Book Series, n°2, Madison, WI, USA, 213-269.

Tews J., Brose U., Grimm V., Tielborger K., Wichmann M.C., Schwager M. and Jeltsch F., 2004. Animal species diversity driven by habitat heterogeneity/diversity: the importance of keystone structures. Journal of Biogeography 31, 79-92.

Tomkins J.L., and Kotiaho J.S., 2001. Fluctuating asymmetry. Encyclopedia of life sciences (pp. 1–5). London: Macmillan Publishers Ltd.

Tscharntke T., Klein A.M., Kruess A., Steffan-Dewenter I. and Thies C., 2005. Landscape perspectives on agricultural intensification and biodiversity – ecosystem service management. Ecology Letters 8, 857–87.

U

U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA), 1984. Estimating concern levels for concentrations of chemical substances in the environment. USEPA, Washington, DC, USA.

V

Van Buskirk J. and McCollum A., 2000, Influence of tail shape on tadpole swimming performance. The Journal of Experimental Biology 203, 2149-2158.

Van Burskirk J. and Arioli M., 2004. Habitat specialization and adaptative phenotypic divergence of anuran populations. Journal of Evolutionary Biology 18, 596-608.

Van der Oost R., Opperhuizen A., Satumalay K., Heida H.,Vermeulen N.P.E., 1996. Biomonitoring aquatic pollution with feral eel (*Anguilla anguilla*). Aquatic toxicology 35, 21-46.

Van der Werf H.M.G., 1997. Evaluer l'impact des pesticides sur l'environnement. Les courriers de l'INRA 31, 5-22.

Veyrand B., Brosseaud A., Sarcher L., Varlet V., Monteau F., Marchand P., Andre F. and Le Bizec B., 2007. Innovative method for determination of 19 polycyclic

aromatic hydrocarbons in food and oil samples using gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry based on an isotope dilution approach. Journal of Chromatography 1993, 333-344.

Villeneuve A., Larroudé S. and Humber J.F., 2011. Herbicide contamination of fresh-water ecosystems: Impact on microbial communities. Margarita Stoytcheva. Pesticides – Formulations, Effects, Fate, InTech Open, 285-312.

Vitousek P.M., Mooney H.A., Lubchenco J. and Melillo J.M., 1997. Human domination of earth's ecosystems. Science 277, 494-499.

W

Wagner A. and Boman J., 2003. Biomonitoring of trace elements in muscle and liver tissue of freshwater fish. Spectrochimica Acta Part B 58, 2215–2226.

Wagner N., Veith M., Lötters S. and Viertel B., 2016. Population and life-stage specific effects of two herbicide formulations on the aquatic development of European Common Frogs (*Rana temporaria*).Environmental Toxicology and Chemistry 9999, 1-11.

Wiens J.A., 1996. Oil, seabirds, and science: the effects of the Exxon Valdez oil spill. BioScience 46, 471–497.

Williams G.M., Kroes R. and Munro I.C., 2000. Safety evaluation and risk assessment of the herbicide Roundup and its active ingredient, glyphosate, for humans. Regulatory Toxicology and Pharmacology 31, 117–165.

World Health Organization, 1997. Glyphosate and AMPA in Drinking-water. Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality.

Wren C.D., 1986. Mammals as biological monitors of environmental metal levels. Environment Monitoring and Assessment 6, 127-144.

Y

Yadav S.S., Giri S, Singha U., Boro F. and Giri A., 2013.Toxic and genotoxic effects of Roundup on tadpoles of the Indian skittering frog (*Euflictis cyanophlyctis*) in the presence and absence of predator stress. Aquatic Toxicology 132–133, 1–8.

Yadollahvand R., Kami H.G., Mashroofeh A. and Riyahi Bakhtiari A., 2014. Assessment trace elements concentrations in tissues in Caspian Pond Turtle (*Mauremys caspica*) from Golestan province, Iran. Ecotoxicology and Environmental Safety 101, 191–195.

Yu S., Halbrook R.S., Sparling D.W. and Colombo R., 2011. Metal accumulation and evaluation of effects in a freshwater turtle. Ecotoxicology 20,1801–1812.

ABSTRACT

The development of industrial and agricultural activities over the last century has resulted in the release of chemicals into the environment, which contaminate ecosystems and can accumulate in plants, sediments and across food webs. As such, it is essential to conduct an assessment of the ecological risk associated with the presence of these compounds in natural environments. Achieving this can be aided through the study of sentinel species, which can be used to determine exposure rates of individuals and assess how these subsequently impact wildlife. Amphibians and reptiles display ecological and biological characteristics that may make them particularly attractive as sentinel species. The collection of studies presented in this thesis aims to determine the availability of contaminants in the environment and estimate the effects of this on individual traits of living organisms. Across several species of reptiles and amphibians we, (i) measured levels of pollutants accumulated in the tissues of several reptile species; (ii) assessed how contaminated habitats impact the morphology of adult common toads (*Bufo bufo*); and (iii) experimentally measured the influence of a molecule frequently detected in the environment on common toad tadpoles' growth. Results show that reptiles efficiently accumulate organic pollutants and metal trace elements in their tissues, and thereby allow efficient evaluation of the global contamination of an area, as well as the occurrence of localized pollution events. In addition, our work shows an influence of the agricultural habitat on the morphology of adult common toads, which is potentially a consequence of the presence of chemicals in these environments. Finally, we were able to demonstrate an effect of low concentrations of AMPA, the main metabolite of glyphosate, on the development of common toad tadpoles. Amphibians are therefore efficient organisms to study the impact of environmental contamination on individual characteristics. Our work shows the usefulness of certain species of reptiles and amphibians as sentinel species for the presence of contaminants in the environment, and their potential impact on organisms. Ecotoxicological studies on these organisms remain too scarce, and it is imperative to develop research in this field, to participate effectively in the assessment of environmental risk.

Key-words: ecotoxicology - accumulation - contaminants – environment – sentinel species – bioindicators - biomonitors – reptiles - amphibians

RESUME

Le développement des activités industrielles et agricoles du siècle dernier a eu pour conséquence le rejet de substances chimiques dans l'environnement, qui contaminent les écosystèmes, et peuvent s'accumuler dans les plantes, les sédiments, et le long des chaînes alimentaires. Il apparait primordial d'effectuer une évaluation du risque écologique associé à la présence de ces composés dans les milieux naturels et les espèces sentinelles sont des outils judicieux pour déterminer l'exposition des individus et évaluer les conséquences sur les organismes. Les amphibiens et les reptiles possèdent des caractéristiques écologiques et biologiques qui les rendent potentiellement intéressants en tant qu'espèces sentinelles. L'objectif des études présentées dans cette thèse est de déterminer la disponibilité de certaines substances dans l'environnement, et d'évaluer les effets de la contamination environnementale sur les organismes en utilisant plusieurs espèces de reptiles et d'amphibiens, (i) en mesurant les niveaux de polluants accumulés dans les tissus d'espèces de reptiles ; (ii) en évaluant l'influence d'un habitat contaminé sur la morphologie d'adultes de crapaud commun (*Bufo bufo*) ; (iii) en mesurant de manière expérimentale l'impact d'une molécule fréquemment retrouvée dans l'environnement sur le développement de têtards de crapaud commun. Nos résultats montrent d'une part que les reptiles accumulent efficacement les polluants organiques et les éléments traces métalliques dans leurs tissus, et permettent d'évaluer efficacement la contamination globale d'une zone, mais aussi de mettre en évidence des pollutions ponctuelles localisées. D'autre part, nos travaux montrent une influence de l'habitat agricole sur la morphologie du crapaud commun, potentiellement causé par la présence de contaminants dans ces milieux. Enfin, nous avons pu mettre en évidence un effet de concentrations faibles d'AMPA, métabolite principal du glyphosate, sur le développement de têtards de crapaud commun. Les amphibiens constituent donc des organismes efficaces pour étudier l'impact de la contamination de l'environnement sur les caractéristiques individuelles. Nos travaux montrent ainsi l'utilité de certaines espèces de reptiles et d'amphibiens comme espèces sentinelles de la présence de contaminants dans l'environnement et de leur impact potentiel sur les organismes. Les travaux en écotoxicologie qui portent sur ces organismes restent trop rares, et il est impératif de développer la recherche dans ce domaine, pour participer de manière efficace à l'évaluation du risque environnemental.

Mots-clés : écotoxicologie - accumulation - contaminants – environnement – espèces sentinelles – bioindicateurs – biomoniteurs - reptiles - amphibiens