

UNIVERSITE MONTPELLIER I
U.F.R. DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES

Pour l'obtention du grade de

Docteur de l'Université Montpellier I

Ecole Doctorale : Terre Eau Espace

N° de section CNU : 67

Spécialité : Biologie des Populations et Écologie

Présentée par

Xavier BODIGUEL

**Caractérisation et modélisation des processus de
bioaccumulation des PCB chez le merlu
(*Merluccius merluccius*) du golfe du Lion.**

Soutenue le 9 juillet 2008 devant le jury composé de :

Mme. Claude CASELLAS, Professeur, Université Montpellier I
Mme. Mireille HARMELIN-VIVIEN, Directeur de recherche, CNRS, Marseille
M. Michel LEBEUF, Professeur, Institut Maurice Lamontagne, Mont-Joli (Canada)
Mme. Véronique LOIZEAU, Cadre de recherche, IFREMER Brest
Mme. Nabila MAZOUNI, Chargée de mission, CEPALMAR, Montpellier
Mme. Capucine MELLON-DUVAL, Cadre de recherche, IFREMER Sète
M. Alexandre PÉRY, Ingénieur de recherche (HDR), INERIS, Verneuil-en-Halatte

Remerciements

Ce travail a été réalisé grâce à un co-financement Ifremer et Région Languedoc-Roussillon. Je souhaite tout d'abord exprimer ma reconnaissance à Jean-Claude Sauvagnargues, directeur de la station Ifremer de Sète, à Gildas Le Corre, chef du laboratoire Ressources Halieutiques de l'Ifremer de Sète, à Michel Marchand, et plus récemment Joël Knoery, directeurs du Département Biogéochimie et Ecotoxicologie de l'Ifremer, et à Jacek Tronzynski puis Catherine Munsch, responsables du laboratoire de Biogéochimie des Contaminants Organiques, pour m'avoir accueilli au sein de leur structure de recherche et avoir permis la réalisation de cette thèse.

Je tiens ensuite à remercier tout particulièrement Mme. Claude Casellas pour avoir accepté d'être directrice de cette thèse. Merci pour votre confiance, vos conseils et votre honnêteté.

Je remercie sincèrement les autres membres de mon jury. En premier lieu, Michel Lebeuf et Alexandre Péry qui m'ont fait l'honneur d'être rapporteurs de cette thèse, et qui ont contribué à l'amélioration de ce travail par la pertinence de leurs critiques. Je remercie ensuite chaleureusement Mireille Harmelin-Vivien pour avoir accepté de présider mon jury de thèse, ainsi que pour sa bienveillante attention et son aide précieuse. Nos discussions m'ont beaucoup aidé à prendre du recul sur mon travail. Merci également à Nabila Mazouni, animatrice du projet SYSCOLAG, pour m'avoir intégré dans ce projet.

Le travail exposé dans ce mémoire n'aurait pu être réalisé sans le soutien et la bienveillance de nombreuses personnes que mes séjours à l'Ifremer de Brest et de Sète m'ont amené à côtoyer. Je souhaite adresser un immense merci à Véronique Loizeau et Capucine Mellon, mes deux directrices scientifiques qui m'ont soutenu et encadré depuis mon stage de DEA. Grâce à vous, ce travail s'est déroulé dans les meilleures conditions qu'il soit, aussi bien sur le plan scientifique qu'humain. Véro, je ne sais comment t'exprimer ma gratitude pour ta confiance, ta patience et ta générosité de tout instant, mais surtout pour le soutien permanent que tu m'as apporté tout au long de la réalisation de ce travail. J'ai eu beaucoup de plaisir à travailler avec toi et te remercie profondément pour tout ce que tu m'as appris. Capucine, merci de m'avoir pleinement intégré dans un projet scientifique si pertinent et bien

mené. La cohésion et la cohérence que tu a insufflé au projet Merlumed m'ont énormément aidé à rassembler les connaissances et compétences qui étaient indispensables à mon travail.

Je remercie également mes adorables collègues de laboratoire qui m'ont supporté au quotidien, en particulier Anne-Marie Le Guellec qui m'a patiemment guidé à la paillasse depuis mon initiation à l'analyse des PCB, Xavier Philippon, Nathalie Bodin ainsi qu'Alain Abarnou. Un grand merci à vous pour votre soutien et votre bonne humeur. Merci aussi aux courageux stagiaires qui ont contribué à ce travail : Cécile, Julie Le Bruchec et François Rouspard, devenu ensuite acteur incontournable du labo. Merci François, ton travail m'a grandement aidé dans la réalisation de cette thèse.

Je remercie par ailleurs chaleureusement toute la sympathique équipe du projet Merlumed. Je garderai un excellent souvenir de nos échanges lors des différentes réunions et campagnes en mer. Merci à tous les participants pour leurs différentes contributions, notamment Mireille Harmelin-Vivien, Chantal Salen-Picard, Jean-Claude Sorbe, Luisa Métral, Davis Roos, Hervé Thébaud, Sabine Charmasson, Christian Fauvel, Daniel Cossa, Serge Mortreux, Jacques Sacchi, Jacek Tronzynski, Catherine Munschy et Hélène de Pontual. Merci particulièrement à Franck Ferraton pour son aide au laboratoire ainsi que son accueil lors de mes déplacements sétois. Un grand merci également aux différents équipages de L'Europe pour leur accueil à bord.

Je souhaite aussi remercier Alexandre Romaña et Jean-François Cadiou, responsables du programme PIM-MEDICIS, pour leur soutien au projet Merlumed.

J'ai eu beaucoup de plaisir à échanger lors des réunions de la DEB team, regroupée depuis au sein du GdR AquaDEB. Merci à Marianne Alunno-Bruscia, initiatrice du GdR, Stéphane Pouvreau, Fred Jean, Laure Péquerie, Jonhatan Flye Sainte Marie, Yves Bourles et les autres membres d'AquaDEB. Merci également à Olivier Maury, Bas Kooijman et Cédric Bacher pour leurs contributions dans l'élaboration du modèle de bioaccumulation.

Merci à l'équipe du LASAA de l'Ifemer Brest, et notamment Hélène de Pontual et Aurélie Jolivet, pour m'avoir fait bénéficier de leurs expérimentations sur merlus en milieu contrôlé.

Pour finir, merci à tous ceux qui, d'une manière ou d'une autre, m'ont soutenu, aidé ou ont contribué à ma bonne santé mentale durant ces quatre années, et notamment toute l'équipe de la station de Sète, l'ensemble du bâtiment Guilcher de l'Ifremer Brest, mes parents, ma sœur, Oliv', Cam, Jérem, Fanny, Sandy, Did, Jona, Céline, Claire, Eric, Hélène, Marie, Nat, Elorri, Nico, Maryline, Grégoire, Yo, Tonin, Ania, Fred, Phil, Cathy, Karen, Marie, Yoann, Cécilia, Yann, Mumu, Krispies, Glenn, Rem, Fred, Marina, Ju, Lolo, Rom, Momo, Aloys, la SMEL...

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION GENERALE

1	Contexte	3
2	Objectif de l'étude	7
3	Stratégie choisie pour la réalisation de la thèse	7
4	Organisation du manuscrit	8

CHAPITRE I : CONTEXTE SCIENTIFIQUE

1	Le golfe du Lion	13
1.1	Situation géographique	13
1.2	Apports particulaires et contamination associée	13
1.3	Facteurs physiques et exportation du matériel sédimentaire	15
2	Le merlu Européen	16
2.1	Intérêt économique	16
2.2	Répartition et habitat	17
2.3	Cycle de vie	18
2.4	Régime alimentaire	19
2.5	Croissance	21
2.5.1	Estimation de la croissance du merlu	21
2.5.2	Dimorphisme sexuel	21
2.6	Reproduction	22
3	Les Polluants Organiques Persistants	22
3.1	Les Polychlorobiphenyles (PCB)	23
3.1.1	Structure chimique	23
3.1.2	Propriétés physico-chimiques	24
3.1.3	Les PCB dans l'environnement	25
3.1.4	Toxicité	26
3.1.5	Réglementation	27
3.2	Le Dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT)	28
3.2.1	Structure et propriétés chimiques	28
3.2.2	Le DDT dans l'environnement	29
3.2.3	Toxicité et réglementation	29
4	La Bioaccumulation	30
4.1	La bioconcentration	30
4.2	La bioamplification	30

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

1	Echantillonnage	35
1.1	Plan d'échantillonnage	35
1.2	Moyens mis en œuvre	37
1.3	Prélèvements, mesures biométriques et caractérisation des échantillons	38
1.3.1	Merlus	38

1.3.1.1	Protocole	38
1.3.1.2	Prélèvements	38
1.3.2	Proies poisson	39
1.3.2.1	Protocole	39
1.3.2.2	Prélèvements	40
1.3.3	Suprabenthos	40
1.3.3.1	Protocole	40
1.3.3.2	Prélèvements	41
1.3.4	Zooplancton	41
1.3.4.1	Protocole	41
1.3.4.2	Prélèvements	41
1.3.5	Phytoplancton	41
1.3.5.1	Protocole	41
1.3.5.2	Prélèvements	42
1.3.5.3	Caractérisation des échantillons de phytoplancton	43
1.4	Récapitulatif des échantillons analysés	44
2	Méthodes chimiques et biochimiques	46
2.1	Détermination et quantification des PCB et du pp'DDE	46
2.1.1	Lyophilisation	47
2.1.2	Extraction des contaminants	47
2.1.3	Purification des extraits	48
2.1.4	Analyse des PCB et du pp'DDE par chromatographie en phase gazeuse	49
2.1.4.1	Gamme d'étalonnage et calcul des concentrations	49
2.1.5	Validation de la méthode analytique	51
2.1.5.1	Blancs	52
2.1.5.2	Justesse / reproductibilité	52
2.1.5.3	Répétabilité	54
2.2	Détermination du pourcentage de lipides totaux	54
2.2.1	Principe / Mode opératoire	54
2.2.2	Validation de la méthode analytique	55
2.2.2.1	Blancs d'essai	55
2.2.2.2	Justesse / reproductibilité	55
2.2.2.3	Répétabilité	55

CHAPITRE III : BIOACCUMULATION DES PCB

INTRODUCTION	59
--------------	----

Publication : Factors influencing bioaccumulation of PCBs in the Hake food web (*Merluccius merluccius*) from the Gulf of Lions (NW Mediterranean)

1	Introduction	62
2	Method	63
2.1	Field sampling	63
2.2	Nitrogen isotopic ratio	64
2.3	PCB Analysis	64
2.3.1	Sample treatment and PCB quantification	64
2.3.2	Quality control criteria	65
2.4	Data analysis and statistical treatment	66
3	Results	67

3.1	PCB concentrations	67
3.2	Influence of trophic level	71
3.3	Influence of species ecology	72
3.4	Influence of size	73
4	Discussion	74
4.1	PCB concentrations	74
4.2	Influence of trophic level	75
4.3	Influence of species ecology	76
4.4	Influence of size	77
5	Conclusion	78
DISCUSSION / CONCLUSION		80

CHAPITRE IV : NIVEAUX ET PROCESSUS DE BIOACCUMULATION DES PCB CHEZ LE MERLU EUROPEEN

INTRODUCTION	85
--------------	----

Partie I : Niveaux et profils de contamination des merlus par les composés organohalogénés **87**

Publication : Classical and novel organohalogen compounds (PCBs and PBDEs) in hake (*M. merluccius*, L.) from Mediterranean and Atlantic coasts (France).

1	Introduction	88
2	Material and methods	88
2.1	Sampling	88
2.2	Chemical Analysis	89
2.2.1	Sample treatment and analysis	89
2.2.2	Validation of analytical method	90
3	Results and discussion	91
3.1	Contamination levels	91
3.2	Contamination distribution	93
3.2.1	Contamination profiles	93
3.2.2	PCB/PBDE correlations	94

Partie II : Influence des paramètres biologiques sur les niveaux de contamination du merlu du golfe du Lion par les PCB **97**

Publication : Influence of biological and physiological parameters on organochlorine contaminant concentrations in the European hake (*Merluccius merluccius*, L.) from the Gulf of Lions (N.W. Mediterranean)

1	Introduction	98
2	Material and methods	99
2.1	Sampling	99
2.2	Sample preparation	99
2.3	Chemical analysis	100
2.4	Quality control criteria	100

2.5	Data analysis and statistical treatment	101
3	Results and discussion	102
3.1	PCB concentrations and congener-pattern	102
3.2	Interrelations between samples	104
3.3	Contamination variation with size, age and sex	105
3.4	Influence of maturity	106
3.5	Influence of lipid contents	107
3.6	Repartition and contamination levels unction of maturity	108
4	Conclusion	110
	CONCLUSION	111

CHAPITRE V : MODELISATION DE LA BIOACCUMULATION DES PCB CHEZ LE MERLU

	INTRODUCTION	115
--	--------------	-----

Partie I : Choix du modèle **116**

1	Rappel des principales approches utilisées pour la modélisation de la bioaccumulation des PCB	116
1.1	Les modèles empiriques	116
1.2	Les modèles d'équilibre de masse basés sur la physiologie	117
1.3	Les modèles bioénergétiques	120
2	Hypothèses et avantages de la théorie DEB pour cette étude	122
2.1	Hypothèses de la théorie DEB utilisées pour cette étude	122
2.2	Avantages de l'approche DEB	123

Partie II : Développement d'un modèle bioaccumulation des PCB chez le merlu basé sur la théorie DEB **125**

Publication : A dynamic and mechanistic model of PCB bioaccumulation in the European hake (*M. merluccius*)

1	Introduction	126
2	Method	128
2.1	Sampling and chemical analysis	128
2.2	Model structure	129
2.2.1	DEB growth model	129
2.2.2	Coupled bioaccumulation model	133
2.3	Parameter estimation	134
2.3.1	DEB parameter estimation	134
2.3.2	Estimation of toxicokinetic parameters	139
3	Results	140
3.1	Growth	140
3.2	PCB bioaccumulation	142
4	Discussion	148
4.1	DEB growth model	148
4.2	DEB bioaccumulation model	150

5 Conclusion _____ 151

CONCLUSION _____ 153

CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

1 Conclusion générale _____ 157

2 Perspectives de recherche _____ 160

2.1 Apports d'expérimentations en milieu contrôlé _____ 160

2.2 Evolution du modèle de bioaccumulation _____ 161

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES _____ 165

ANNEXE

Publication : Comparison of C and N stable isotope ratios between surface particulate organic matter and microphytoplankton in the Gulf of Lions (NW Mediterranean)

INTRODUCTION GENERALE

1 Contexte

Le développement des sociétés modernes a conduit à l'introduction dans l'environnement de diverses substances étrangères à celui-ci. Ces contaminants de différentes natures (matières solides, liquides ou gazeuses, micro-organismes, sons, vibrations, rayonnements, chaleurs, odeurs, radiations) sont susceptibles de créer une pollution entravant le fonctionnement des écosystèmes. Parmi les polluants potentiels, les molécules issues de la synthèse chimique sont particulièrement redoutées. Peu d'activités aussi répandues et prospères que la chimie sont en effet autant suspectes de nuisances, car la contamination chimique peut être chronique, accidentelle ou diffuse, et peut engendrer des effets très divers et souvent mal connus (AFSSET). Il est admis qu'il existe plus de 37 millions de substances chimiques à travers le monde, essentiellement des substances organiques (CAS). Sur le marché européen, le nombre de substances commercialisées recensées s'élève actuellement à 100204 (EINECS). Elles sont utilisées sous forme de produits pharmaceutiques, phytosanitaires, ou additifs à la composition de produits et matériaux. Par leurs propriétés physico-chimiques, certaines de ces molécules sont très persistantes dans l'environnement. Elles contaminent les sols et peuvent être lessivées lors d'épisodes pluvieux, ruisseler vers des rivières et des fleuves, et ainsi parcourir de longues distances à travers les réseaux hydrauliques, dont les exutoires sont principalement les lacs, mers et océans. Dans les régions industrialisées, les bassins versants collectent par ailleurs les rejets directs des zones urbanisées. Certains contaminants sont également transportés par voie atmosphérique et détectés très loin de leur lieu d'émission. La conséquence de cette large diffusion est que l'environnement est en permanence exposé à une contamination chimique qui se manifeste par des substances à l'état de traces, et dont on ne connaît pas encore suffisamment les quantités et les effets. La contamination de toute notre planète par les résidus chimiques représente donc une menace, tant pour l'équilibre des écosystèmes que pour la santé humaine.

Parmi les polluants majeurs, se trouvent les polluants organiques persistants (POP), caractérisés par une forte persistance dans l'environnement, des propriétés de bioaccumulation dans les organismes et le long des réseaux trophiques, un potentiel de transport sur de longues distances, ainsi qu'une toxicité reconnue. Ils font aujourd'hui l'objet d'une préoccupation mondiale (UNEP, 2001). Deux principaux types de POP sont distingués : les pesticides et les produits d'origine industrielle, dont les Polychlorobiphényles (PCB). Ces derniers forment une

famille de composés aromatiques de synthèse largement utilisés au XX^{ème} siècle par les industries chimiques et électriques pour leur propriété de stabilisant thermique. Ils sont très persistants dans l'environnement et leur caractère hydrophobe et liposoluble en font un bon exemple de composés bioaccumulables (Abarnou *et al.*, 2000). Ils sont décelés dans tous les compartiments de l'environnement marin (Tanabe, 1989) et sont potentiellement toxiques pour les espèces fortement exposées (Ahlborg *et al.*, 1994, Loonen *et al.*, 1996). Bien que les niveaux de ces composés soient en diminution depuis leur interdiction dans beaucoup de pays industrialisés durant les 20 dernières années (Aguilar et Borell, 2005 ; Pikkarainen et Parmanne, 2006), la diminution semble aujourd'hui s'estomper, et de fortes concentrations sont encore décelées, particulièrement dans les prédateurs aquatiques (Bignert *et al.*, 1998 ; Nyman *et al.*, 2002). Sur les 1.5 millions de tonnes de PCB produites dans le monde (excepté l'ex Union Soviétique) entre 1929 et 1989 (HELCOM, 2001), une grande quantité est encore dispersée dans la nature, et continue de poser d'importants problèmes environnementaux et sanitaires. Les concentrations en PCB récemment mesurées dans les poissons des fleuves français ont conduit à une interdiction de leur pêche, de leur commercialisation et de leur consommation dans plusieurs départements. La contamination du Rhône a fait l'objet du premier arrêté préfectoral en 2005 dans la région de Lyon (département du Rhône), puis l'interdiction s'est étendue aux départements de l'Ain et de l'Isère en 2006, et aux départements de la Drôme, de l'Ardèche, de la Loire, du Vaucluse, du Gard et des Bouches du Rhône en 2007. La Somme a connu la même interdiction en 2006 et 2007 (département de la Somme), ainsi que la partie aval de la Seine et la zone du littoral proche de son estuaire en 2008 (départements de l'Eure, du Calvados et de la Seine Maritime). La suspicion d'une contamination de l'homme par les PCB liée à la consommation de poissons d'eau douce a par ailleurs conduit au lancement d'une étude d'imprégnation des PCB en mars 2008 sur les habitants de Port Saint Louis du Rhône, ville de l'exutoire du grand Rhône dans le golfe du Lion.

Cette contamination des fleuves amène à s'intéresser à leur devenir dans le milieu marin dans lequel ils se déversent. La mer est en effet décrite comme le réservoir final de ces composés, qui y sont tous potentiellement transférés. Toutefois, compte tenu de leur très faible solubilité dans l'eau, ils n'y sont retrouvés qu'à de faibles niveaux, généralement inférieurs au ng.L^{-1} . En revanche, cette même propriété favorise l'adsorption des PCB sur les particules en suspension, qu'elles soient détritiques ou vivantes (plancton), qui peuvent ainsi entrer dans les cycles biologiques. Ce caractère très lipophile engendre leur accumulation

dans les tissus adipeux des organismes vivants où ils sont piégés. En effet, la majorité des congénères sont très peu biotransformables par les organismes et sont peu éliminés, entraînant une augmentation de leur concentration dans les organismes au cours de leur vie (Loizeau *et al.*, 2001). Leur transfert s'effectue alors par voie alimentaire dans les réseaux trophiques, où ils sont susceptibles de se bioamplifier d'un maillon trophique à un autre (Burreau *et al.*, 2004. ; Nfon et Cousins, 2006). Les prédateurs de rang trophique élevé sont donc particulièrement exposés, et peuvent renfermer des concentrations en PCB très importantes, pouvant avoir des effets sur leurs fonctions physiologiques (Ahlborg *et al.*, 1994 ; Loonen *et al.*, 1996). Tous les consommateurs finaux, y compris l'homme, sont donc exposés.

La compréhension des processus d'intégration des POP dans les réseaux trophiques, leur bioaccumulation dans les organismes, et finalement les effets toxiques directs ou indirects qu'ils peuvent engendrer sur les individus, les populations et les écosystèmes en général sont donc des questions majeures que se pose la communauté scientifique à travers le monde. Ces questions sont d'autant plus importantes que de nouveaux POP aux propriétés similaires à celles des PCB, tels que les polybromodiphényléthers (PBDE) sont désormais trouvés avec des niveaux croissants dans l'environnement aquatique (Rayne, 2003). La connaissance des mécanismes de bioaccumulation est donc essentielle dans l'évaluation et la gestion du risque engendré par l'exposition aux PCB, mais également à ces nouveaux composés. Ce phénomène est néanmoins complexe, car la bioaccumulation est influencée par de nombreux paramètres chimiques, biologiques et environnementaux, tels que la solubilité et l'encombrement stérique des différents congénères, ou la croissance, la reproduction, l'alimentation et l'habitat des différentes espèces considérées (Gobas *et al.*, 1993 ; Borga *et al.*, 2004 ; Bodin *et al.*, 2007). Le développement de modèles de bioaccumulation est apparu comme un outil de recherche intéressant, permettant de dépasser l'approche statistique. Ces modèles peuvent en effet intégrer, quantifier et hiérarchiser les différents facteurs à l'origine de cette complexité (Mackay et Fraser, 2000 ; Loizeau *et al.*, 2001). Ils sont néanmoins peu applicables à l'étude des effets des contaminants sur les organismes.

Lors de cette étude, nous nous sommes intéressés au devenir des PCB chez le merlu (*Merluccius merluccius* ; Linnaeus, 1758) dans le golfe du Lion (N.O. Méditerranée). Cette zone côtière du littoral français subit une pression anthropique forte, et récolte les apports du Rhône, fleuve particulièrement contaminé par les PCB (Babut et Miège, 2007). De part son rang trophique élevé, le merlu est potentiellement exposé à la bioaccumulation de ces

composés organiques. Représentant la plus importante des espèces de poissons démersaux exploitées du golfe du Lion (Aldebert et Carriès, 1989), il est donc important d'évaluer son niveau et ses mécanismes de contamination et décontamination.

Compte tenu de la situation géographique de cette étude, ce travail s'est intégré dans le programme régional « Systèmes Côtiers et Lagunaires » (SYSCOLAG) qui s'intéresse à la gestion des milieux côtiers du Languedoc-Roussillon et de leurs ressources, ainsi qu'au programme coordonné de recherche pluridisciplinaire "PIM-Médicis" (Projet Intégré Méditerranée), piloté par l'Ifremer. Ce dernier traite de l'état et du devenir des contaminants chimiques en Méditerranée, et rassemble près de quarante organismes de recherches du pourtour méditerranéen. Il est structuré en 12 « actions », dont MERLUMED (MERLU de MEDiterrannée), principal support de cette étude. Cette action vise particulièrement à étudier la bioaccumulation de contaminants (organiques, métaux et radionucléides) dans la chaîne trophique du merlu du golfe du Lion. Elle implique également d'autres organismes français de recherches : CNRS (Centre Océanographique de Marseille, LPTC Bordeaux, station d'Arcachon) et IRSN Toulon. Ce sujet de thèse s'inscrit dans la continuité des travaux de thèse de F. Ferraton (2007) dont les objectifs furent, entre autres, de déterminer la nature et la complexité des réseaux trophiques aboutissant aux jeunes merlus du golfe du Lion. En effet, l'alimentation est la principale voie de contamination des poissons par les contaminants organiques très hydrophobes tels que les PCB (Russel *et al.*, 1999 ; Leblanc, 2006). Il était donc fondamental d'identifier les principales proies du merlu aux différents stades de sa vie avant d'entreprendre une étude sur la compréhension des mécanismes d'accumulation des contaminants et de leur devenir. Enfin, dans le cadre du développement d'un modèle de bioaccumulation basé sur une approche bioénergétique, ce sujet s'est également inscrit dans le groupe de recherche Européen «GdRe- AquaDEB ». Ce GdR s'intéresse aux méthodes d'analyse de l'évolution de la physiologie des animaux aquatiques, en lien avec les processus écologiques et évolutifs, sur la base des flux d'énergie et d'un modèle générique de bilan d'énergie (DEB).

2 Objectif de l'étude

Le principal objectif de ce travail est de comprendre le devenir d'une famille de contaminants modèles, les PCB, chez une espèce potentiellement exposée du golfe du Lion : le merlu. Pour cela, ce travail doit permettre de :

- Comprendre le cheminement des PCB dans le réseau trophique aboutissant au merlu méditerranéen.
- Dresser un état des lieux de la contamination par les PCB du merlu du golfe du Lion, et la comparer à d'autres zones géographiques et d'autres familles de contaminants organiques.
- Identifier les processus biologiques, écologiques et environnementaux influant sur les niveaux de contamination, et notamment le rôle de l'alimentation, de la croissance, du sexe et de la reproduction des merlus.
- Construire et paramétrer un modèle de bioaccumulation qui puisse servir d'outil de recherche ainsi que de base à un modèle prédictif de l'exposition du merlu aux PCB et à ses effets.

3 Stratégie choisie pour la réalisation de la thèse

Pour répondre à l'objectif principal qui est de comprendre le devenir d'une famille de contaminants chez le merlu du golfe du Lion, nous avons choisi de mettre en place une stratégie d'étude qui combine l'acquisition de mesures et la modélisation. L'analyse des PCB dans différentes matrices biologiques permettra de dresser l'état des lieux de la contamination et d'identifier certains facteurs agissant sur leurs niveaux. Sur la base des travaux réalisés sur la dynamique du réseau trophique aboutissant au merlu, nous étudierons premièrement la répartition et la bioaccumulation des PCB dans ce réseau. Les facteurs identifiés comme influant sur les niveaux de contamination du merlu seront intégrés à un modèle de bioaccumulation, permettant de quantifier et hiérarchiser l'influence des divers processus pris en compte. Ces deux approches, mesures et modèle, nous renseigneront donc sur les mécanismes de bioaccumulation des PCB par les merlus et sur l'influence de paramètres biologiques et environnementaux. A terme, l'approche modélisation pourrait servir de base pour prédire le devenir des PCB chez le merlu. La figure 1 résume l'approche proposée.

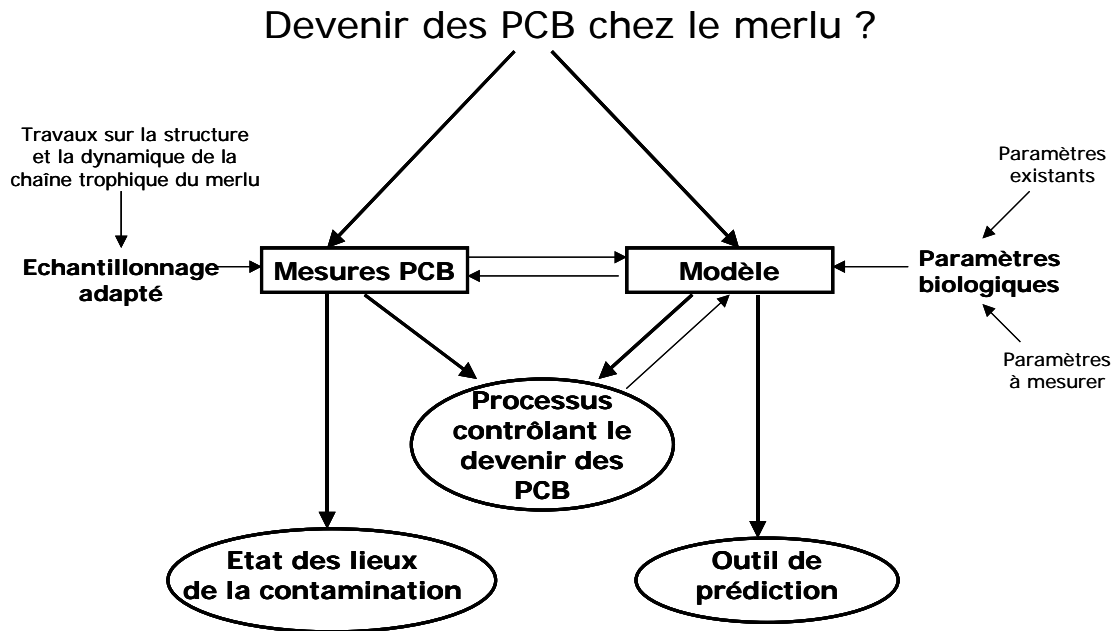


Figure 1 : Schéma décrivant la stratégie choisie pour la réalisation de cette étude

4 Organisation du manuscrit

L'exposé de cette étude s'articule en 5 chapitres. Le premier expose les connaissances fondamentales et les hypothèses biologiques qui soutiennent notre approche. Il décrit les spécificités de la zone d'étude, les caractéristiques biologiques du merlu méditerranéen, présente les propriétés physico-chimiques et le comportement des contaminants étudiés dans l'environnement marin, et introduit le phénomène de bioaccumulation. Le second chapitre décrit les méthodes utilisées pour appliquer la stratégie d'étude que nous avons définis. Il présente la stratégie et les moyens mis en œuvre pour l'échantillonnage et les méthodes chimiques et biochimiques appliquées, telles que l'analyse des PCB par chromatographie en phase gazeuse et la détermination des teneurs en lipides totaux, ainsi que leur validation.

Les trois chapitres suivant présentent les résultats obtenus par le biais de quatre publications scientifiques. Ils sont chacun replacés dans le contexte de cette étude par une courte introduction et les résultats s'y rapportant y sont brièvement synthétisés. Le troisième chapitre rend compte de l'étude de la distribution et de la bioamplification des PCB dans les principales espèces composant le réseau trophique du merlu méditerranéen. Le chapitre 4 est composé de deux publications. La première traite des niveaux et profils de contamination du merlu du golfe du Lion par les PCB. Ces niveaux sont comparés à ceux d'une autre famille de

contaminants organohalogénés, les PBDE, et à un autre secteur, le golfe de Gascogne. La seconde partie expose les résultats obtenus sur l'influence des paramètres biologiques sur les niveaux en PCB chez le merlu.

Après une première partie sur l'état de l'art des modèles de bioaccumulation et la justification de l'approche de modélisation choisie, le chapitre 5 présente dans une seconde partie le développement du modèle de bioaccumulation des PCB chez le merlu, ainsi que les résultats des simulations. Enfin, l'ensemble des résultats présentés est discuté dans une conclusion générale, dans laquelle sont exposées les perspectives qu'ouvre cette étude.

CHAPITRE I

Contexte scientifique

1 Le golfe du Lion

1.1 Situation géographique

Situé sur les côtes françaises de la Méditerranée Nord Occidentale, le golfe du Lion est l'une des plus importantes plates-formes continentales de la Méditerranée (entre 50 et 100 km de large) (Roussiez *et al.*, 2005). Avec une superficie de 12560 km², il s'étend entre les latitudes 42°15' et 43°35' Nord, et entre les longitudes 3°00' et 6°00' Est (figure 1). Le bord du plateau continental, situé à environ 200m de profondeur, est incisé par des canyons sous-marins, atteignant des profondeurs supérieures à 2000 m (Tesi *et al.*, 2007). Son pourtour est caractérisé par une forte densité de population, principalement concentrée dans les grandes métropoles telles que Marseille, Montpellier ou Perpignan, et par l'arrivée de nombreuses rivières, dont le Rhône, possédant le plus gros débit de tous les fleuves s'écoulant en Méditerranée après le Nil. Les pressions anthropiques sont fortes, notamment sur la zone côtière, en liaison avec les activités touristiques, agricoles et industrielles.

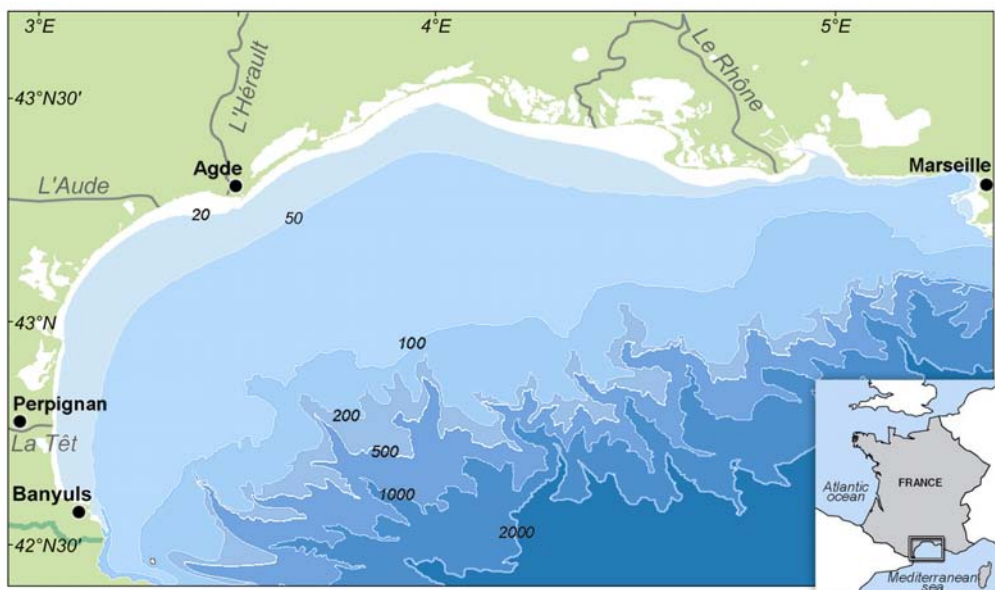


Figure 1 : Carte morpho-bathymétrique du golfe du Lion (Ifremer).

1.2 Apports particuliers et contamination associée

La présence de contaminants organiques dans le golfe du Lion, particulièrement en PCB et en DDT, est plus importante que dans d'autres régions de la Méditerranée (Tolosa *et al.*, 1995 ; Lipiatou *et al.*, 1997 ; Gomez-Gutiérrez *et al.*, 2007). Du fait de leur propriété

hydrophobe, ces contaminants s'associent préférentiellement à la matière particulaire dans l'environnement marin. Ces particules sédimentent dans la colonne d'eau et rejoignent les stocks sédimentaires, qui sont décrits comme leur principal réservoir. Leurs apports dans le golfe du Lion sont de ce fait principalement liés aux apports de matières particulaires des fleuves et rivières (Roussiez *et al.*, 2005). Plusieurs rivières (Fluvia, Muga, Tech, Têt, Agly, Aude, Orb, Hérault, Lez, et Vidourle) se déversent dans le golfe du Lion ainsi qu'un fleuve, le Rhône. Leurs apports en sédiments grossiers alimentent le littoral sableux à proximité des embouchures, alors que les apports plus fins, auxquels sont associés les PCB, sont transportés au grès des vagues et des courants sur toute la plate-forme continentale, et au-delà, vers le bassin profond (Monaco et Aloïsi, 2000) (Figure 2). Le Rhône rejette à lui seul 80% des apports d'origine terrestre du golfe du Lion (Durrieu de Madron *et al.* 2000). Avec un débit annuel moyen de $1715 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ (Naudin *et al.* 1997), la moyenne de l'ensemble des flux de matières en suspension du Rhône arrivant dans la Méditerranée a été estimée à $9,9 \pm 6,4 \text{ Mt an}^{-1}$ (Sempéré *et al.*, 2000). Drainant un bassin versant d'environ 130000 km^2 , le Rhône collecte les rejets d'une région très industrialisée comprenant un quart de la population française. En outre, 20% des activités industrielles françaises sont situées dans cette zone, ainsi que des activités de type agricoles et touristiques. L'ensemble de ces activités sont en partie responsables des arrivées de contaminants organiques dans le golfe du Lion. Le bilan annuel des dépôts de contaminants a été estimé à $0,5 \text{ t} \cdot \text{an}^{-1}$ de DDT ($\sum \text{DDT}$), et $0,3 \text{ t} \cdot \text{an}^{-1}$ de PCB ($\sum \text{PCB}$) (Tolosa *et al.*, 1995). L'origine précise de cette contamination est cependant mal connue, car les sources potentielles de PCB arrivant dans le Rhône sont multiples : ruissellement sur des sols contaminés, stations d'épuration, rejets pluviaux, rejets sauvages... Récemment, un établissement industriel de retraitement des PCB, l'entreprise TREDI S.A., située en amont de l'agglomération Lyonnaise, a été clairement identifiée comme source conséquente de la contamination du Rhône par les PCB (Babut et Miège, 2007). Une augmentation significative de la contamination en PCB a en effet été observée entre l'amont et l'aval de leur point de rejet, tant au niveau des sédiments que des poissons. Ces derniers sont particulièrement contaminés, puisque la majorité des poissons étudiés dans le Rhône présentent des concentrations dépassant la limite autorisée pour la consommation humaine, fixée à $8 \text{ pg} \cdot \text{g}^{-1}$ de poids frais (Facteur de toxicité équivalent à la dioxine de référence ou TEQ, règlement CE 199/2006). Elles atteignent des concentrations de $313 \text{ pg} \cdot \text{g}^{-1}$ poids frais TEQ pour une espèce de chevaine (Babut et Miège, 2007).

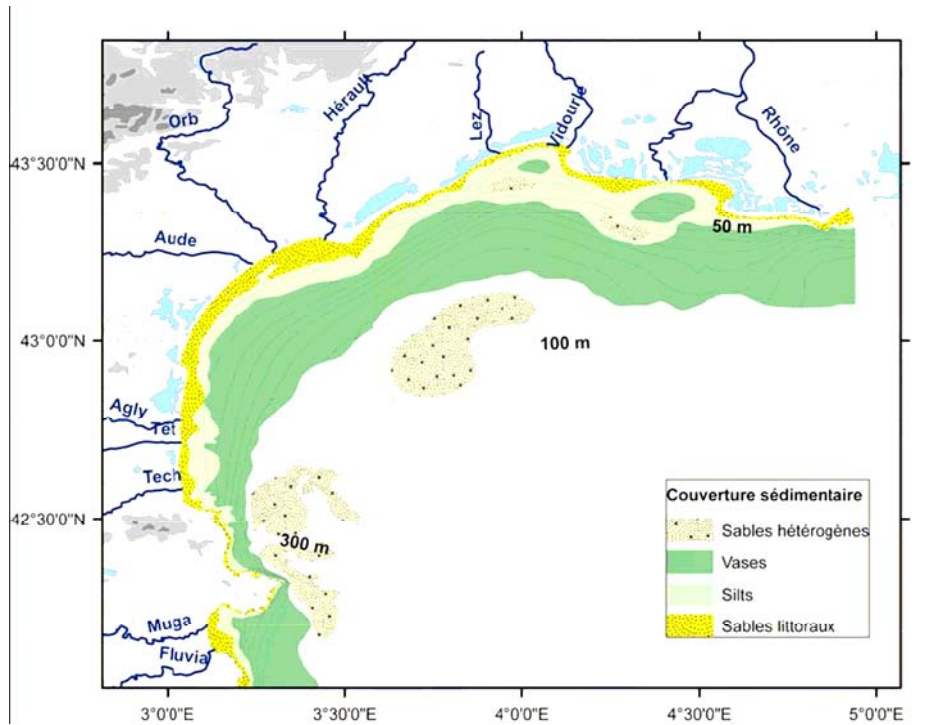


Figure 2 : Carte morpho-bathymétrique et sédimentaire du golfe du Lion montrant la répartition des dépôts de surface sur le plateau continental (Monaco et Aloïsi, 2000).

1.3 Facteurs physiques et exportation du matériel sédimentaire

Le Rhône possède un caractère saisonnier marqué, avec de forts débits durant les crues automnales et hivernales, ainsi que pendant la fonte des neiges au printemps, et des débits faibles durant l'été. L'essentiel du matériel sédimentaire est de ce fait apporté vers le golfe du Lion pendant les crues. Les sédiments superficiels du plateau continental sont également remobilisés lors des épisodes de vents forts et de tempête (Bourrin, 2007), constituant ainsi une source d'exposition permanente à la pollution par les PCB pour les poissons. Dans le golfe du Lion, les vents dominants sont continentaux : le Mistral de secteur nord et la Tramontane de secteur nord ouest. En période hivernale, lorsque la masse d'eau n'est pas stratifiée, ces vents favorisent la dispersion des panaches fluviaux (Figure 3a). Les vents marins de SE sont à l'origine des tempêtes et des crues sur le littoral. Ils induisent la formation d'un courant côtier transportant les panaches fluviaux et le matériel sédimentaire en suspension le long du littoral, depuis le NE jusqu'au SO (Figure 3b), lieu d'exportation préférentiel du matériel du plateau vers la sortie du golfe du Lion (Ulses, 2005). Enfin, le plateau est bordé par un courant de pente (courant Liguro-Provençal) dont les instabilités

(méandres) favorisent les échanges côte-large, en particulier au niveau des canyons sous-marins (Figure 3c).

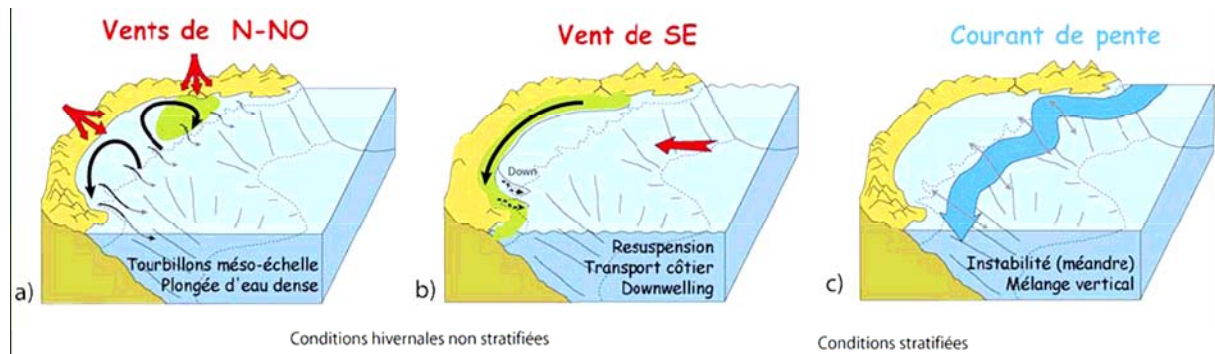


Figure 3 : Schémas montrant les principaux mécanismes d'échange côte-large dans le golfe du Lion sous l'influence des vents continentaux (a), sous l'influence des vents marins de SE (b), et du courant de pente (ou thermo-halin) (c) (Bourrin, 2007).

2 Le merlu Européen

Le groupe de poisson connu sous le nom de merlu comprend 13 espèces appartenant au genre *Merluccius*. Il est largement réparti entre les deux hémisphères, dans les océans Atlantique, Pacifique et Indien. Appelé merlan en méditerranée, le merlu Européen, *Merluccius merluccius* (Linnaeus, 1758) (Figure 4) est la seule espèce de merlu présente sur les côtes françaises.

Classe : Actinopterygiens
Ordre : Gadiformes
Famille : Merlucidés
Sous Famille : Merlucinés
Genre : *Merluccius*
Espèce : *Merluccius*



Figure 4 : Terminologie et photographie du merlu Européen (*Merluccius merluccius*).

2.1 Intérêt économique

Le genre *Merluccius* est l'un des groupes de poissons démersaux les plus exploités du monde, avec un débarquement annuel d'environ deux millions de tonnes (Alheit et Pitcher, 1995). Son intérêt commercial est donc considérable. Néanmoins, la qualité et la valeur

commerciale peuvent être très différentes selon les espèces. Sur les marchés européens, l'espèce *Merluccius merluccius* est surtout vendue entière, en tant que produit frais, alors que d'autres espèces sont surtout vendues comme produits commerciaux surgelés sous différentes présentations (Chapela *et al.*, 2007). Dans le golfe du Lion, le merlu est la principale espèce démersale exploitée (Aldebert et Carriès, 1989b ; Aldebert *et al.*, 1993) et présente donc un intérêt économique important. La pêche est répartie entre les flottilles française et espagnole, représentant respectivement 69 et 31% des débarquements (Jadaud *et al.*, 2006). Les engins de pêche mis en œuvre varient en fonction des zones exploitées. 78% des débarquements de merlus proviennent du plateau continental, exploité par les chaluts de fond. Ces débarquements sont principalement constitués des plus jeunes individus (juvéniles et jeunes adultes) dont la taille moyenne était de 19 cm entre 1998 et 2004 (French-Spanish WG, 2006). Les plus gros individus sont exploités en bordure du talus continental par des filets maillants pour les pêcheurs français (Aldebert et Recasens, 1996) et des palangres de fond pour les pêcheurs espagnols (Recasens *et al.* 1998). Ces débarquements représentent respectivement 16 et 6% de la biomasse annuelle de merlus exploités dans le golfe du Lion (Jadaud *et al.*, 2006). A titre d'exemple, les débarquements de merlu en provenance du golfe du Lion ont représenté de 500 à près de 3500 tonnes par an entre 1970 et 2001. D'après la Commission Générale des Pêches en Méditerranée, ces stocks sont surpêchés (GFCM, 2006).

2.2 Répartition et habitat

Le merlu Européen est largement distribué sur le plateau Nord-Est Atlantique, de la Norvège à la Mauritanie. La plus grande densité est trouvée entre les îles Britanniques et le sud de la péninsule ibérique (Casey et Pereiro, 1995). Il est également présent sur l'ensemble du bassin méditerranéen, où il est plus abondant à l'ouest et en Adriatique. Espèce démersale à comportement grégaire (Campillo *et al.*, 1989), il vit près du fond le jour (Figure 5) et remonte vers la surface la nuit (De Pontual *et al.*, 2007). Il possède une très large répartition dans le golfe du Lion, depuis le secteur côtier (30 mètres) jusqu'à des fonds pouvant atteindre 800 mètres. C'est entre 80 et 150 mètres de profondeur et sur les bords du plateau continental qu'il est le plus souvent trouvé (Farrugio et Marin, 1999). Cette distribution suggère l'hypothèse que le merlu suit un modèle de migration fortement liée à la profondeur, selon son âge et sa maturité (Abella *et al.*, 1997 ; Recasens *et al.*, 1998 ; Orsi-Relini *et al.*, 2002 ; Maynou *et al.*, 2003, 2006 ; Goñi *et al.*, 2004).



Figure 5 : Photographie de merlu posé sur le fond

2.3 Cycle de vie

Les œufs de merlus sont principalement retrouvés en bordure du plateau continental, majoritairement vers 100 mètres de fond (Olivar *et al.*, 2003). Selon Bjelland et Skiftesvijk (2006), les larves éclosent environ 4 jours après la fécondation, à environ 3mm de longueur totale. Entre 4 et 6 jours après l'éclosion (4mm), la mâchoire est fonctionnelle et les larves commencent à se nourrir (Figure 6). Durant la période larvaire, la croissance est réservée à la tête, et il n'y a presque pas d'augmentation de la longueur totale durant les 3-4 premières semaines après l'éclosion. Le développement des nageoires, environ 30 jours après éclosion, marque la transition entre la larve et le stade juvénile. C'est à ce stade, à une taille d'environ 2.5 cm, que les juvéniles rejoignent le fond (Morales-Nin et Moranta, 2004 ; Belcari *et al.*, 2006), majoritairement sur le plateau continental, avec des densités plus importantes sur les fonds de 100 à 200 m, et des abondances plus fortes au printemps (Recasens *et al.*, 1998)

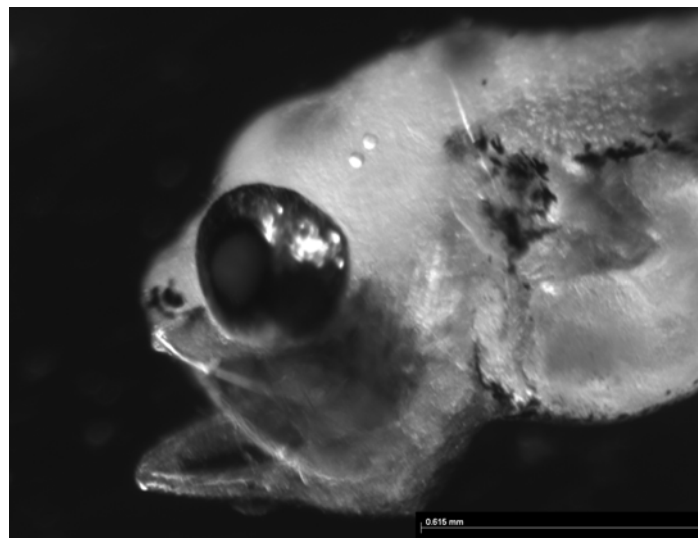


Figure 6 : Photographie d'une larve de merlu, bouche ouverte, quelques jours après éclosion (Ifremer/LASAA).

La morphologie des juvéniles est semblable à celle des adultes environ 50 jours après éclosion. Dans le golfe du Lion, la taille de première maturité sexuelle pour 50% des individus (L_{50}) est de 38 cm pour les femelles et 28.8 cm pour les mâles (Recasens *et al.*, 1998). Les jeunes adultes sont répartis sur l'ensemble du plateau continental, alors que les plus âgés vivent plus en profondeur, au niveau de la pente continentale et des têtes de canyons. Comme pour les stocks du NE Atlantique, les merlus s'agrègent sur le bord du plateau (environ 200 m) pour frayer (Recasens *et al.*, 1998 ; Fives *et al.*, 2001). Le cycle de vie du merlu est résumé sur la figure 7.

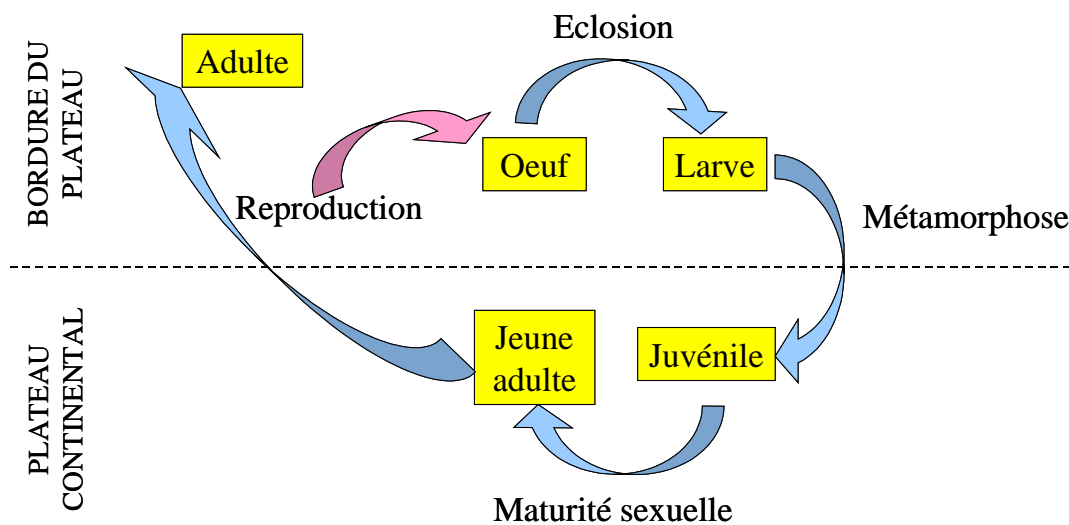


Figure 7 : Principales étapes du cycle de vie du merlu

2.4 Régime alimentaire

Le régime alimentaire du merlu a été décrit par plusieurs auteurs : Guichet, 1995 ; Velasco et Olaso, 1998 ; Mahe *et al.*, 2007, pour la façade atlantique ; Papacontantinou et Caragitsou, 1987 ; Bozzano *et al.*, 1997 ; Ferraton *et al.*, 2007, pour la mer Méditerranée. Pendant la vie larvaire, son alimentation est principalement constituée de crustacés planctoniques. A son arrivée près du fond lors du début de sa phase juvénile, il se nourrit de crustacés suprabenthiques (euphausiacés et mysidacés) ainsi que de petits poissons benthiques tels que les gobies. Son régime alimentaire évolue ensuite rapidement vers un régime pleinement piscivore (plus de 80 % des proies) à partir 15-20 cm (Ferraton *et al.*, 2007). Les espèces consommées et la taille des proies évoluent néanmoins en fonction de la taille des merlus. Une forte corrélation positive a été décrite entre la taille des merlus et la longueur de

ses proies. Le merlu consomme en moyenne des proies mesurant la moitié de sa longueur (Mahe *et al.*, 2007). De ce fait, les plus petits merlus (<35 cm) chassent de petits poissons pélagiques (3-17 cm) comme les anchois (*Engraulis encrasicolus*), sardines (*Sardina pilchardus*) et maquereaux (*Scomber scombrus*), alors que les plus grands chassent sur de plus grandes proies, principalement sur des espèces démersales (17-30 cm), comme le tacaud (*Trisopterus minutus*) ou pélagiques comme le merlan bleu (*Micromesistius poutassou*) (Bozzano *et al.*, 1997 ; Mellon-Duval *et al.*, en prep.). En atlantique, le cannibalisme peut représenter une part non négligeable de l'alimentation des plus grands merlus (> 30 cm) qui se nourrissent sur des plus jeunes (<20cm). Ce phénomène, peu observé en méditerranée, semble être essentiellement influencé par l'abondance des juvéniles (Mahe *et al.*, 2007). Les principales espèces composant le régime alimentaire du merlu du golfe du Lion sont résumées dans le tableau 1.

Tableau 1 : Principales espèces composant le régime alimentaire du merlu du golfe du Lion. D'après les études de Ferraton (2007) et Mellon *et al.* (en prep.) effectuées sur des merlus prélevés au printemps et à l'automne 2004 et 2005.

Groupes	% Masse	5-9 cm	10-14 cm	15-19 cm	20-24 cm	25-29 cm	30-39 cm	40-49 cm	50-59 cm	60-69 cm
CRUSTACÉS	Espèces Suprabenthiques	45.1	13.5	5.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	Crevettes	26.4	20.2	4.0	8.4	0.3	1.1	1.1	4.5	0.2
	Crustacés indéterminés	8.9	1.3	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
POISSONS	<i>Gobius sp</i>	7.4	12.0	4.2	1.6	0.1	0.2	0.1	0.0	0.0
	Benthiques									
	<i>Phycis blenoides</i> +sp	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.4	3.3	19.0	0.0
Démersaux	<i>Trisopterus minutus</i>	1.3	7.9	0.5	1.8	0.1	0.2	8.9	14.7	0.0
	<i>Merluccius merluccius</i>	0.0	0.0	0.0	0.0	0.4	0.0	9.0	0.0	29.3
Pélagiques	<i>Engraulis encrasicolus</i>	0.0	6.1	12.3	27.4	15.0	8.4	15.3	0.0	0.0
	<i>Micromesistius poutassou</i>	0.0	0.0	0.0	4.6	0.3	3.1	11.7	37.3	19.0
	<i>Sardina pilchardus</i>	4.3	10.6	29.3	14.0	71.9	65.8	24.1	0.0	0.0
	<i>Trachurus trachurus</i>	0.0	0.0	0.0	0.0	0.8	0.0	11.1	0.0	0.0
	Pélagiques indéterminés	0.0	10.7	18.6	15.6	4.9	9.6	5.1	1.4	0.0
	Poissons indéterminés	3.3	13.9	22.0	23.2	6.1	10.9	9.7	23.1	51.6
CEPHALOPODES	<i>Alloteuthis sp</i>	0.0	1.2	2.4	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	<i>Sepiola sp</i>	3.3	1.7	1.1	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	Céphalopodes indéterminés	0.0	1.0	0.0	1.4	0.2	0.6	0.7	0.0	0.0

2.5 Croissance

2.5.1 Estimation de la croissance du merlu

Depuis les années 30, de nombreuses études se sont penchées sur la détermination de la croissance du merlu (Hickling, 1933 ; Belloc, 1935). Ces études décrivent des estimations de croissance très différentes, tant en Atlantique Nord-Est (Bagenal, 1954 ; Guichet *et al.*, 1973 ; Robles *et al.*, 1975 ; Decamps et Labastie, 1978 ; Iglesias et Dery, 1981 ; Lucio *et al.*, 2000 ; Piñeiro et Sainza, 2003) qu'en Méditerranée (Aldebert et Recasens, 1996 ; Morales-Nin et Aldebert, 1997 ; Garcia-Rodriguez et Esteban, 2002). Dans ces études, la croissance est estimée soit à partir de la lecture des otolithes, soit à partir des fréquences de taille. L'interprétation des lectures des macrostructures des otolithes reste cependant difficile. Une première tentative de mise en place d'une méthodologie objective a été testée sur les merlus du golfe du Lion (Courbin *et al.*, 2007). Elle apporte des pistes intéressantes qui devront être développées. Les méthodes indirectes d'estimation de l'âge classiquement utilisées sont remises en cause et des méthodes directes telles que le marquage-recapture commencent à être testées (de Pontual *et al.*, 2006, Mellon-Duval *et al.*, soumis). Les résultats de ces études indiquent que le taux de croissance somatique du merlu du NE Atlantique et du golfe du Lion est de deux fois supérieur à celui prédit par les modèles actuels de croissance basés sur les méthodes indirectes.

2.5.2 Dimorphisme sexuel

Pour le merlu Européen, de nombreux auteurs ont décrits une croissance plus rapide des femelles, comparée à celle des mâles, aussi bien pour la population atlantique (Casey et Pereiro, 1995 ; Pineiro et Sainza, 2003) que méditerranéenne (Aldebert et Carries, 1989a ; Recassens *et al.*, 1998). Les tailles maximales observées pour les femelles sont également plus importantes que pour les mâles. Elles atteignent 100.7 cm pour les femelles et 72.8 cm pour les mâles en méditerranée, (Aldebert et Recassens, 1995), et respectivement 110 et 80 cm en Atlantique (Lucio *et al.*, 2000). Les raisons physiologiques de ce dimorphisme sexuel n'ont néanmoins jamais été identifiées.

2.6 Reproduction

La connaissance de la physiologie de la reproduction du merlu est limitée. A l'échelle de la population, la reproduction peut s'étaler sur toute l'année, sur des fonds de 100 à 300 mètres, avec une période plus active en fin d'automne et durant l'hiver dans le golfe du Lion (Recasens *et al.*, 1998). Le merlu est un pondreur multiple (Pérez et Pereiro, 1985 ; Sarano, 1986 ; Murua *et al.*, 2006). Durant la reproduction, une femelle peut pondre de 1 à 5 fois en quelques semaines (Sarano, 1983). La reproduction du merlu Européen se caractérise par le développement asynchrone des ovocytes (des ovocytes de toutes les étapes de maturation sont présents en même temps dans les ovaires), ce qui a été interprété comme la preuve d'une durée indéterminée de la fécondité au cours de l'année (Murua *et al.*, 1998). Les oeufs sont émis en pleine eau, généralement en bordure du plateau continental, et la fécondation est externe. Les larves de merlu sont principalement trouvées en bordure du plateau continental (Olivar *et al.*, 2003), alors que les juvéniles se répartissent dans les eaux moins profondes, entre 50 et 150 m, sur le plateau continental (Maynou *et al.*, 2003). Ce schéma de frai se traduit par une longue période de recrutement, bien qu'un pic de recrutement annuel soit généralement plus prononcé au début de l'été (juin-juillet).

3 Les Polluants Organiques Persistants

Les Polluants Organiques Persistants (POP) sont des molécules complexes qui sont définies à partir de 4 propriétés : toxicité, persistance dans l'environnement, bioaccumulation dans les tissus vivants, transport sur de longues distances. Plusieurs dizaines de familles de molécules organiques sont susceptibles de répondre à ces critères. La préoccupation des effets potentiellement néfastes de ces contaminants a conduit à l'écriture de deux textes internationaux récents : le protocole d'Aarhus signé en juin 1998, et la convention de Stockholm signée en mai 2001. Ils ont établi une première liste nominative des POP qui se répartissent en trois catégories :

- Substances produites non intentionnellement par des activités humaines (Dioxines, Furanes, Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques...);
- Substances issues de la fabrication et de l'utilisation de produits chimiques (Polychlorobiphényles, Hexachlorocyclohexane, Polybromodiphénylethers ...);
- Substances issues de l'utilisation de pesticides (Mirex, Dieldrine, Chlordécone, Lindane, Dichlorodiphényltrichloroéthane ...).

3.1 Les Polychlorobiphényles (PCB)

Les Polychlorobiphényles (PCB) sont des composés organiques de synthèse. Ils ont été découverts pour la première fois dans l'environnement en 1966 par Jensen. Depuis, de nombreux auteurs ont montré leur présence un peu partout dans notre environnement, en particulier dans les organismes vivants, où ils ont tendance à s'accumuler dans les tissus adipeux (Abarnou *et al.*, 2000).

3.1.1 Structure chimique

Les PCB forment une famille de composés organochlorés dont la formule chimique est $C_{12}H_{(10-n)}Cl_n$. Le nombre d'atomes de chlore sur le noyau biphényle peut varier de 1 à 10 (Figure 8).

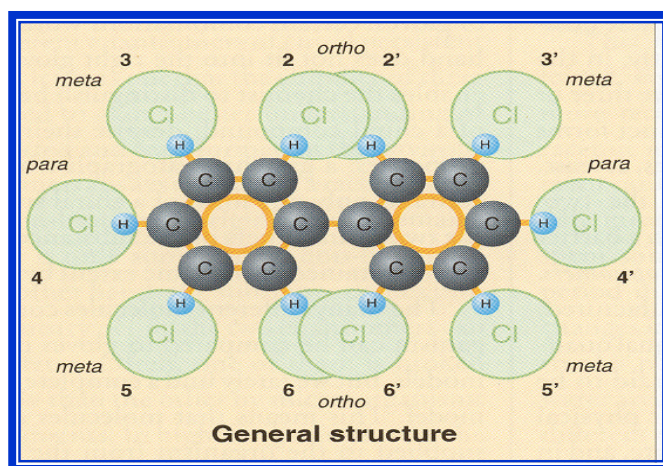


Figure 8 : Structure générale des PCB (Bernes, 1998)

Ils sont synthétisés en deux étapes. La première est l'obtention du noyau biphényle par déshydrogénation de deux molécules de benzène à $800^{\circ}C$. La seconde, est une chloration directe du biphényle en présence d'un catalyseur (chlorure ferrique ou limaille de fer) à $150^{\circ}C$ (Figure 9).

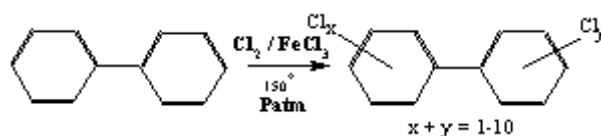


Figure 9 : Production des polychlorobiphényles par chloration catalysée du biphényle.

Les différents congénères de PCB (CB) se distinguent par le nombre et la position des atomes de chlore autour du noyau biphényle. Le nombre de congénères potentiels est de 209. Ils sont numérotés selon le nombre et la position des atomes de chlore substitués sur chacun des deux cycles (Figure 10). Néanmoins, la synthèse industrielle limite le nombre de congénères rencontrés dans les mélanges techniques à 120 (Kerckhoff *et al.*, 1983).

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

Substitution sur le deuxième cycle ()*

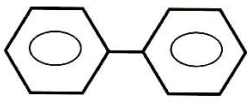


Figure 10 : Les 209 congénères de PCB désignés selon la nomenclature systématique (Ballschmitter et Zell, 1980).

3.1.2 Propriétés physico-chimiques

Les propriétés physico-chimiques de chaque congénère de PCB (solubilité, pression de vapeur, coefficient de partage octanol-eau) ainsi que leur pouvoir toxique sont déterminés par leurs caractéristiques structurales. Néanmoins, ils possèdent tous une grande stabilité thermique, une haute résistance aux acides et aux bases, une faible solubilité dans l'eau, et une haute résistance électrique. Ces propriétés, ainsi que le fait qu'ils soient peu inflammables, expliquent que les PCB aient trouvé de nombreuses applications à partir de 1920. Ils ont été utilisés sous forme de mélanges techniques (Aroclor, Phénochlore, Pyralène...) dans l'industrie, comme fluides diélectriques dans les transformateurs et les condensateurs, comme agents de transfert, diluants organiques, additifs dans des peintures, des plastiques et des teintures. Ils ont également été employés en tant qu'agents dépoussiérants, résines synthétiques...

3.1.3 Les PCB dans l'environnement

Molécules d'origine anthropique, les PCB sont caractéristiques d'une contamination chronique d'origine urbaine et industrielle. Du fait de leur grande stabilité, hydrophobie et persistance, leur présence a été signalée dans tous les compartiments de l'environnement. Leurs concentrations peuvent aller de la dizaine de picogrammes par litre dans les eaux océaniques, pour atteindre quelques milligrammes par kilogramme dans les tissus adipeux des mammifères marins (Abarnou et Loizeau, 1994). Dans les zones côtières, ce sont les estuaires qui sont les plus exposés à ces contaminants. C'est le cas de la baie de Seine, en France, où les niveaux de présence de ces composés sont les plus élevés du Littoral (Abarnou *et al.*, 2000). Les caractères hydrophobe et persistant des PCB font de ces composés un excellent exemple de substances bioaccumulables par les organismes marins. A titre d'exemple, la figure 11 illustre les facteurs de bioaccumulation des PCB dans tous les compartiments de l'écosystème du lac Ontario. On y constate une bioamplification des concentrations en PCB d'un maillon trophique à un autre, depuis les producteurs primaires jusqu'aux oiseaux. Ces derniers renferment des concentrations 25 millions de fois supérieures à celle de l'eau.

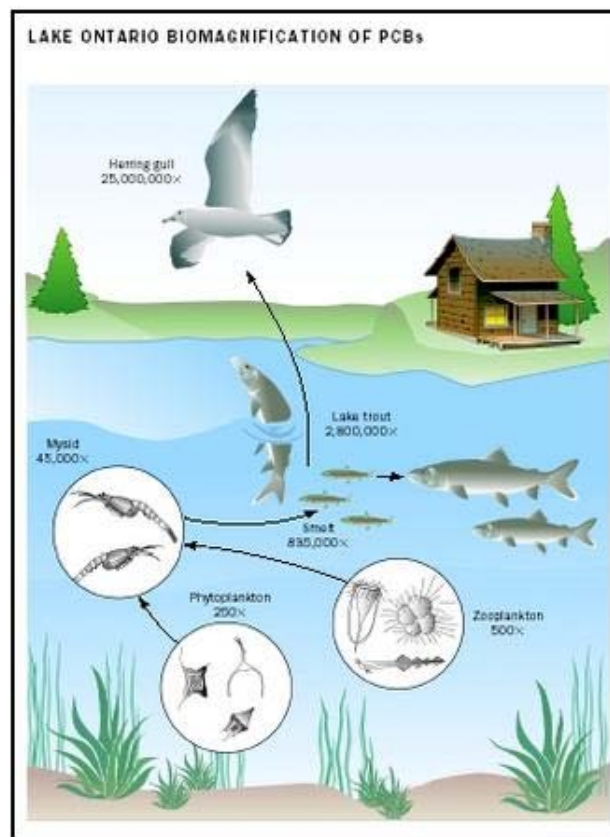


Figure 11 : Bioamplification des PCB dans l'écosystème du lac Ontario (Thomson Gale©, 2006).

3.1.4 Toxicité

La toxicité des PCB a été mise en évidence chez l'homme à la suite d'accidents tels que l'intoxication collective connue sous le nom de maladie de Yusho (Japon, 1968) où plus de 1600 personnes furent victimes d'une intoxication par les PCB due à la contamination d'huile de riz polluée à un niveau de 1000 mg.kg⁻¹(Kuratsune, 1980). Les doses létales pour 50% des individus (DL50) sont de l'ordre du gramme par kilogramme de masse corporelle (Millischer, 1987). Une exposition aiguë à forte dose est associée à des irritations de la peau (chloracné) et plus rarement à des infections hépatiques, neurologiques, des bronchites chroniques, des maux de tête, des vertiges, des dépressions, des troubles de la mémoire et du sommeil, de la nervosité et de la fatigue, et de l'impuissance (Musada *et al.*, 2005).

Les plus toxiques des 209 congénères de PCB sont les composés coplanaires. L'étude des relations structure / activité (Boon *et al.*, 1989 ; Kannan *et al.*, 1995) suggère que les composés non ortho-chlorés (par exemple : 3,3', 4,4'-tetrachlorobiphenyle, ou CB77 ; 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyle, ou CB126 ; et 3,3',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyle ou CB169) sont capables d'adopter une configuration plane et de se comporter de la même manière que la dioxine (composé hautement toxique : 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin ou TCDD). Pour cette raison, les congénères non ortho-substitués, dits « dioxine-like » (DL), présentent les plus fortes toxicités, suivis par les composés mono-orthosubstitués, modérément toxiques, alors que les congénères di-ortho-substitués présentent les plus faibles toxicités. Tous ces composés présentent un large spectre de réponses toxicologiques, incluant une immunotoxicité, des déficits de reproduction, une tératogenèse, une perturbation endocrinienne et un facteur de développement des tumeurs et carcinomes (Ahlborg *et al.*, 1994).

Dans l'environnement aquatique, les effets toxiques liés à une contamination par les PCB apparaissent comme étant plutôt sublétaux et chroniques. Les mécanismes de toxicité sont semblables à ceux des composés apparentés aux dioxines et caractérisés par l'activation de systèmes enzymatiques particuliers. La compréhension et la comparaison des mécanismes de toxicité de ces deux classes de contaminants sont à la base de la définition du concept de toxicité équivalente dioxine (TEQ) et des facteurs d'équivalent toxique (TEF). Cette approche permet le calcul de la toxicité en prenant en compte les contributions des différents congénères. Les TEF établis pour les poissons diffèrent néanmoins de ceux établis pour les

mammifères marins. Au niveau des poissons, des expériences menées par Loonen *et al.* (1996) sur cinq espèces de poissons de lacs, montrent que les doses létales pour 50% des individus après injection d'une simple dose de PCB sont relativement faibles (3 à 16 µg/kg). Les premières mortalités apparaissent au bout de 11 semaines, et les principaux effets observés sont une augmentation du taux de mortalité, une diminution du taux de croissance, une perte de poids, des nécroses aux nageoires, des hémorragies subcutanées et une hyperpigmentation.

3.1.5 Réglementation

En Europe, l'utilisation des PCB dans les applications ouvertes telles que les encres d'imprimerie et les adhésifs a été interdite en 1979. La vente et l'acquisition de PCB ou d'appareils contenant des PCB ainsi que la mise sur le marché de tels appareils neufs sont interdites en France depuis le décret du 2 février 1987. Le décret du 18 janvier 2001 transcrit en droit français la directive 96/99/CE du 16 septembre 1996 concernant l'élimination des PCB. Il prévoit la réalisation d'un plan d'élimination des PCB, à partir d'inventaires constitués sur la base des déclarations des détenteurs d'appareils contenant des PCB. L'échéance pour cette élimination est fixée au 31 décembre 2010. La voie d'exposition de l'homme aux PCB est à 90% d'origine alimentaire (Pompa *et al.*, 2003). Pour cette raison, et compte tenu du caractère toxique et bioaccumulable de ces composés, différentes mesures ont été adoptées. En 2001, le JECFA (the FAO/WHO Joint Committee on Food Additives) a fixé une dose mensuelle admissible provisoire (DMAP) pour les PCB « dioxine-like » à 70 pg TEQ /kg p.c./mois (soit une dose journalière admissible de 2.33pg TEQ/kg p.c./j). En mai 2001, le comité scientifique européen pour l'alimentation humaine a adopté un avis dans lequel il fixe une dose hebdomadaire tolérable provisoire (DHTP) de 14 pg TEQ/kg p.c. /sem pour les PCB dioxine-like. En 2002, l'OMS a proposé de fixer une DJA pour l'ensemble des PCB à 0.02µg/kg p.c./j en équivalent Aroclor 1254. Cette norme est fondée sur des études chez le singe et basé sur les effets neurocomportementaux et immunologiques. L'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA, 2003) a proposé une DJA de 0.01 µg/kg p.c./j pour la somme des 7 PCB indicateurs (CB 28, 52, 101, 118, 138, 153 et 180), considérant que ces composés représentent au moins de 50% des PCB dans les aliments. Plus récemment, l'Union Européenne a adopté le 3 février 2006 un règlement fixant à 8 pg.g⁻¹-TEQ de matière fraîche la concentration admissible en dioxine et PCB-DL dans les poissons destinés à la consommation humaine, à l'exception des anguilles pour lesquelles elle est de 12 pg.g⁻¹-TEQ. Il n'y a cependant pas de seuil pour la somme des PCB indicateurs. En France,

suite à une contamination aux PCB, une interdiction de consommation des poissons du Rhône a été adoptée en septembre 2005 à Lyon (Préfecture du Rhône, 2005). Elle a été élargie en février 2007 aux départements de l'Ain, de l'Isère, puis en juin, à l'Ardèche et à la Drôme. Depuis l'arrêté du 7 août 2007, l'interdiction de consommer et de vendre des poissons du Rhône a été étendue jusqu'au delta du fleuve.

3.2 Le Dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT)

Le Dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT) est un composé organique de synthèse. Synthétisé pour la première fois en 1874, son action comme insecticide n'a été découverte que depuis 1939. Il a été largement utilisé par les forces alliées durant la Seconde Guerre mondiale pour assurer la protection du personnel militaire de la malaria et a été commercialisé à partir de 1945. Le DDT a été l'insecticide le plus utilisé dans le monde jusqu'au milieu des années 1960. A cette époque, il avait été crédité d'un certain nombre de succès important pour la santé publique, y compris l'éradication du paludisme aux États-Unis et en Europe (Attaran et Maharaj, 2000).

3.2.1 Structure et propriétés chimiques

Le DDT ou 4,4'-(2,2,2-trichloroéthane-1,1-diyl)bis(chlorobenzène) est un composé organochloré dont la formule brute est $C_{14}H_9Cl_5$ (Figure 12). Il est synthétisé par réaction du 2,2,2-trichloroéthanol (Cl_3C-CH_2OH) avec du chlorobenzène (C_6H_5Cl). Deux isomères sont distingués : le p,p' DDT et le o,p' DDT. Le second se distingue du premier par déplacement d'un atome de chlore en position « ortho » sur le cycle benzénique.

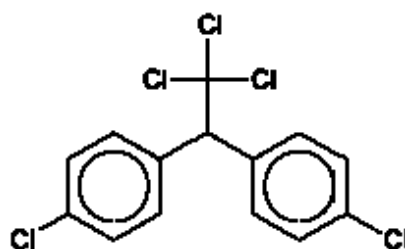


Figure 12: Structure générale du DDT

Le DDT est une substance cristalline incolore, presque insoluble dans l'eau mais très soluble dans les matières grasses et la plupart des solvants organiques ($6.22 < \log kow < 6.91$; Renner, 2002). Ses produits de décomposition dans la nature sont le DDE (dichlorodiphényldichloroéthylène ou 1,1-dichloro-2,2-bis(p-dichlorodiphényl)éthylène) et le

DDD (dichlorodiphényldichloroéthane ou 1,1-dichloro-2,2-bis(p-chlorophényl)éthane) qui sont hautement persistants et qui possèdent des propriétés physiques et chimiques similaires. La quantité totale de ces produits est connue sous le nom de DDT total (Σ DDT). Contaminant organochloré, le DDT et ses principaux métabolites possèdent des propriétés physico-chimiques similaires à celles des PCB. Pour cela, l'analyse de certains métabolites tel que le pp'DDE peut être effectuée selon le même protocole analytique que les PCB.

3.2.2 Le DDT dans l'environnement

Le DDT est un polluant organique persistant avec une demi-vie évaluée entre 2 et 15 ans. Dans les eaux, son temps de demi-vie peut être beaucoup plus faible. Néanmoins, ses produits de dégradation (DDE et DDD) sont également hautement persistants. La valeur du ratio DDT/DDE renseigne sur l'ancienneté de la contamination. Un faible ratio témoigne d'une contamination globalement ancienne. Des études menées dans les années 1960 ont montré la présence de DDT dans la plupart des communautés humaines, principalement due à l'exposition par l'alimentation (Walker *et al.*, 1954). Alors que l'exposition dans les pays industrialisés a chuté de façon spectaculaire, l'exposition demeure élevée dans certains pays en développement où le DDT continue à être utilisé dans la lutte contre le paludisme.

3.2.3 Toxicité et réglementation

Le DDT a été utilisé dans le monde entier depuis le milieu des années 1940, jusqu'à son interdiction au cours des années 1970 et 1980 dans la plupart des pays industrialisés. Il a été vendu sous divers noms commerciaux : Anofex, Cesarex, Chlorophenothane, Dedelo, p,p-DDT.... Dès le milieu des années 1950, des études animales ont montré que l'exposition au DDT pouvait avoir des effets néfastes, en particulier sur le succès de reproduction des organismes. Le DDT et le DDE ont été présentés depuis comme ayant des effets oestrogéniques et anti-androgène chez plusieurs espèces de vertébrés : mouette de Californie (*Larus californicus*) (Fry et Toone, 1981), poissons plats (*Paralichthys dentatus*) (Mills *et al.*, 2001), guppys (*Poecilia reticulata*) (Kinnberg et Toft, 2003), et même chez l'homme (Younglai *et al.*, 2002). La convention de Stockholm, ratifiée le 22 mai 2001 et effective depuis le 17 mai 2004 vise à interdire le DDT ainsi que d'autres polluants organiques persistants. Celle-ci a été signée par 158 pays et soutenue par la plupart des groupes environnementaux. Cependant, une interdiction totale de l'utilisation du DDT dans les pays où sévit le paludisme est actuellement impossible, car peu d'alternatives économiquement

abordables, ou suffisamment efficaces ont été découvertes. L'utilisation du DDT à des fins sanitaires reste donc tolérée jusqu'à ce que d'autres alternatives soient développées.

4 La Bioaccumulation

La bioaccumulation désigne la capacité des organismes à concentrer et stocker les substances chimiques à partir de l'eau dans le cas des organismes aquatiques et/ou à partir de la nourriture. Elle dépend en premier lieu de la nature chimique des composés, et tout particulièrement de leur hydrophobicité et de leur persistance. Les PCB constituent pour cela un bon exemple de substances bioaccumulables par les organismes marins. Elle se traduit par une augmentation de la concentration dans les tissus lorsqu'un individu vieillit. Les apports se font par absorption des contaminants à partir de l'eau (bioconcentration) et de la nourriture (bioamplification). Les processus tendant à réduire la bioaccumulation sont d'une part, l'excrétion de certains composés après métabolisation, et d'autre part, la croissance qui agit comme un facteur de dilution des contaminants dans la masse corporelle de l'animal. Dans le cas des femelles adultes, la reproduction est également un facteur de décontamination. Ce processus a été largement décrit pour les mammifères (Nakata *et al.*, 1995 ; Nyman *et al.*, 2002).

4.1 La bioconcentration :

L'eau peut constituer une voie de contamination pour les organismes aquatiques. Les échanges de contaminants se font au niveau des téguments, et pour les poissons, au niveau des branchies par lesquelles transitent d'importants volumes d'eau nécessaires à la respiration. Par définition, le facteur de bioconcentration chez les poissons est le rapport des constantes de vitesse d'adsorption et d'élimination des contaminants par les branchies. Plusieurs auteurs ont décrit l'existence de corrélations entre le facteur de concentration et le coefficient de partage octanol-eau (Davies *et al.*, 1984 ; Connell, 1992), et entre la vitesse d'élimination et le coefficient de partage octanol-eau (Kooijman *et al.*, 2004).

4.2 La bioamplification :

L'ingestion d'une nourriture contaminée constitue une deuxième voie de contamination des organismes et peut avoir un rôle prépondérant pour les animaux de rang trophique élevé (Marchand *et al.*, 1990). Le facteur de bioamplification est défini comme le rapport de concentration entre la chair de poisson et celle de la nourriture. Selon Bruggeman (1982), la concentration dans la chair de poisson dépend du niveau de contamination de la nourriture, de

la vitesse d'alimentation, de l'efficacité d'assimilation du composé chimique, et est liée au fait que cette concentration est inversement proportionnelle à la vitesse d'élimination. Pour les PCB, les processus de bioamplification se traduisent d'une part, par une augmentation des concentrations des composés les plus persistants comme par exemple le CB153, et d'autre part, par une réduction du nombre des composés présents. A titre d'exemple, la figure 13 empruntée à Muir *et al.* (1988) illustre ce phénomène dans la chaîne trophique de l'ours polaire. Le profil de contamination de l'ours polaire par les PCB n'est dominé que par quelques congénères, alors que celui de sa proie, le grand phoque, en contient un plus grand nombre. Celui de la morue, proie du grand phoque, est lui caractérisé par une multitude de congénères.

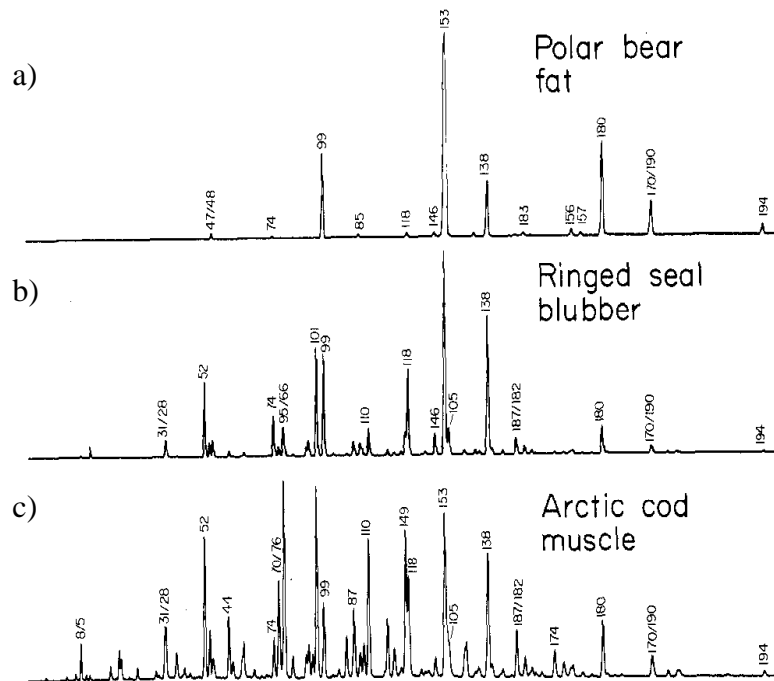


Figure 13 : Chromatogrammes de PCB dans : a) la graisse d'ours polaire, b) le melon des grands phoques, et c) le muscle de morue d'arctique (Muir, 1988).

CHAPITRE II

Matériel et méthodes

1 Echantillonnage

Les campagnes d'échantillonnage réalisées au cours de cette étude ont été mises en oeuvre dans le cadre du programme pluridisciplinaire MERLUMED. Les objectifs principaux étaient d'étudier la structure du réseau trophique aboutissant au merlu du golfe du Lion et la contamination des compartiments de ce réseau par différentes familles de contaminants (organiques, métaux, radionucléides). Secondairement, elles visaient à valider la courbe de croissance nouvellement établie pour le merlu, ainsi qu'à préciser certaines caractéristiques de sa reproduction. Le plan d'échantillonnage, les moyens mis en oeuvre et les prélèvements décrits ci-dessous sont spécifiques à l'étude des PCB, principal objectif de ce travail.

1.1 Plan d'échantillonnage

L'échantillonnage des merlus et des principales espèces de son réseau trophique a été réalisé dans 4 secteurs sur le plateau continental du golfe du Lion, et 1 secteur de la marge continentale (Figure 1). Le choix des quatre premiers secteurs (I, II, III et IV) s'est appuyé sur les résultats de l'étude préliminaire du régime alimentaire et des signatures isotopiques des juvéniles de merlu réalisée par Ferraton (2007) sur l'ensemble du plateau continental du golfe du Lion, au printemps 2002 (campagnes MEDITS). Ces résultats ont montré une structuration dans l'espace fortement liée à la profondeur et à la zone, avec une variabilité particulièrement prononcée entre les zones du Rhône (I et II) et d'Agde (III et IV). Ces 4 secteurs traduisent l'éloignement du débouché du grand Rhône, et deux tranches bathymétriques (30-50 m et 80-100 m). Le secteur situé au delà de la bordure du plateau continental (entre 200 et 600 mètres de fond) correspond au lieu de vie des merlus les plus âgés. En effet, à partir de la première maturité sexuelle, les merlus se reproduisent au niveau de la bordure continentale (Recassens *et al.*, 1998 ; Maynou *et al.*, 2003) et les plus gros individus sont retrouvés en profondeur, au niveau des canyons sous-marins. Le secteur V a donc été choisi pour échantillonner les plus gros individus. La dynamique temporelle a également été prise en compte, avec deux périodes de prélèvement : le printemps et l'automne. Ces saisons ont été choisies car elles correspondent aux pics de recrutement des juvéniles de merlus dans le golfe du Lion (Aldebert, 1974), c'est à dire le moment où ils rejoignent le fond après leur période pélagique. Le printemps correspond au principal pic d'abondance des juvéniles, pour lequel une série de données d'abondances annuelles est disponible (campagnes MEDITS), et l'automne correspond à un second pic d'apparition des juvéniles (moins important), ainsi qu'au début de la saison de reproduction des adultes (Morales-Nin et Aldebert, 1997).

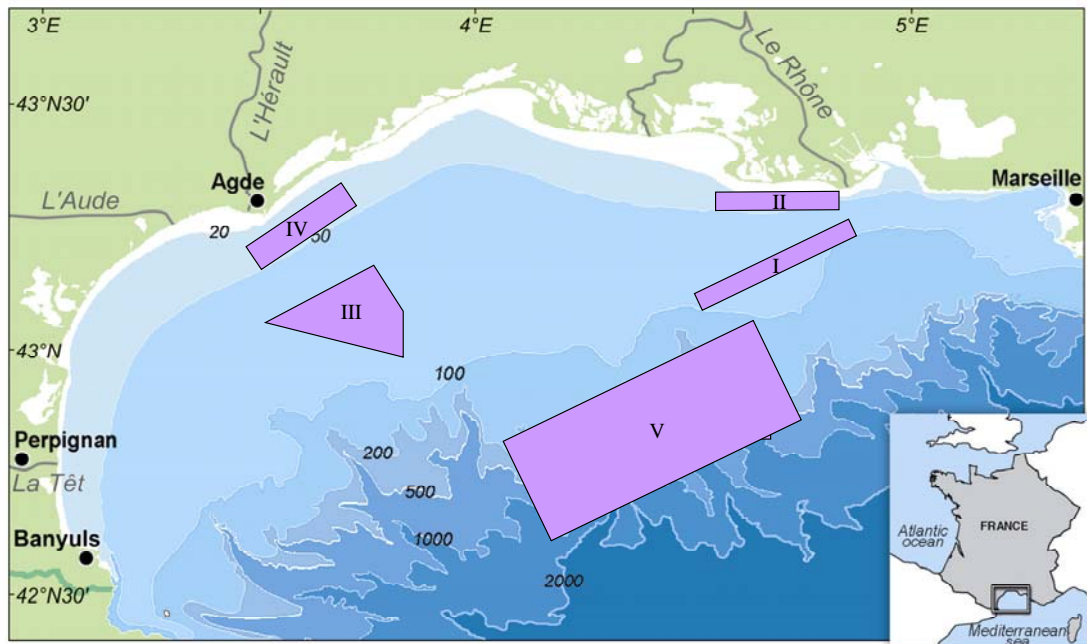


Figure 1 : Carte du golfe du Lion et secteurs d'échantillonnage.

II, IV : 30-50 m ; I, III : 80-100 m ; V : 200-600 m.

Afin de pouvoir étudier la variation de la contamination dans la population de merlu, des classes de taille centimétriques ont été fixées pour des merlus mesurant de 5 à 20 cm, et des classes de taille de 5 cm ont été fixées pour les merlus supérieurs à 20 cm. La détermination et quantification des PCB nécessitent une quantité suffisante de matière à analyser (de l'ordre de 150 mg de foie, 1 g de gonades et 2 g de muscle lyophilisés). Aussi, pour chacun des 4 secteurs du plateau, 10 individus de chaque classe centimétrique ont été échantillonnés lorsque cela était possible. Pour les classes de taille dans lesquelles le sexe des individus pouvait être identifié (>20 cm), le nombre de poissons était réparti en 5 mâles et 5 femelles par secteur et par campagne quand le nombre de poissons prélevés le permettait. Cet échantillonnage a permis d'étudier la variabilité interindividuelle de la contamination des merlus d'une même classe de taille.

Les principales espèces constituant le réseau trophique du merlu, y compris le plancton, ont été échantillonnées sur chaque secteur du plateau continental, et à chaque saison. Les proies des plus gros merlus ont également été échantillonnées sur le secteur en bordure du plateau continental. Pour chaque condition, des pools d'individus de chaque espèce ont été réalisés, de manière à obtenir une quantité suffisante de matrice biologique pour l'analyse des PCB. Deux ou trois catégories de taille ont néanmoins été distinguées pour

les proies de poissons présentant une grande diversité de taille (anchois, sardine, merlan bleu, tacaud).

1.2 Moyens mis en oeuvre

La récolte des échantillons utilisés pour cette étude a nécessité trois types de campagnes à la mer. Les campagnes MERMED (MERlu MEDiterranéen) ont consisté à échantillonner la faune ichtyologique (merlus et ses proies poissons) ainsi que la faune d'invertébrés (les plus gros crustacés et céphalopodes), par chalutage sur le plateau continental. Les campagnes TECPEC (TECHnologie des PEChes) ont permis l'échantillonnage des merlus adultes en bordure du plateau continental et têtes de canyons sous-marins par la mise en œuvre de filets maillants, ces zones profondes n'étant pas accessibles au chalut. Les campagnes RESOMER (RESeau trophique du MERlu) étaient destinées à l'échantillonnage des premiers maillons trophiques du réseau aboutissant au merlu (phytoplancton, zooplancton et suprabenthos). Un échantillonnage complémentaire de merlus femelles (de 38 à 42 cm) a également été effectué en criée de manière mensuelle. Le tableau 1 récapitule les compartiments prélevés lors de chaque campagne.

Tableau 1 : Calendrier des campagnes et principales espèces prélevées.

Secteurs : I, II, III, IV, V

Année	2004			2005		2006		
	Printemps	Automne	Printemps	Printemps	Automne	Printemps	Automne	Automne
Zone	Plateau	Plateau	Cayons	Plateau	Plateau	Plateau	Plateau	Cayons
Phytoplancton	I, II, III, IV	I, II, III		I, II, IV	I, II, IV	I, II, III, IV	IV	
Zooplancton	I, II, III, IV	I, II, III, IV		I, II, IV	I, II, III, IV	I, II, III, IV	I, II, III	
Suprabenthos		III		I, II, III, IV	I, III	I, II, III, IV	I, II, III, IV	
Gobies	I, II, IV	I, II, IV		I, II, III, IV	I, II, III			
Anchois	I, II, III, IV	I, II, III, IV		I, II, III, IV	I, II, III, IV			
Sardines	I, II, III	I, II, III, IV		I, II, III, IV	I, II, III, IV			
Tacauds	I, II, III, IV	I, II, III, IV		I, II, III, IV	I, II, III, IV			
Merlans bleus	I, III			I, III				V
Merlus <20cm	I, II, III, IV	I, II, III, IV		I, II, III, IV	I, II, III, IV			
Merlus 20-50cm	I, II, III, IV	I, II, III	V	I, II, III, IV	I, II, III, IV			V
Merlus >50cm			V					V

1.3 Prélèvements, mesures biométriques et caractérisation des échantillons

1.3.1 Merlus

1.3.1.1 Protocole

Les merlus des secteurs I, II, III et IV ont été prélevés par chalutage lors des campagnes MERMED de mai et octobre 2004 et 2005. Le chalut utilisé est un chalut de fond à quatre faces de type GOV 73, permettant de pêcher des espèces benthiques, démersales et pélagiques. Il possède un maillage de 20 mm de maille étirée au niveau du cul, une ouverture horizontale moyenne de 18 m et une ouverture verticale moyenne de 4 m. Les traits ont été réalisés entre 7 h et 19 h, à une vitesse moyenne de 3 nœuds, vitesse à laquelle la géométrie du chalut est relativement stable. Cette stabilité a été vérifiée à l'aide d'un appareillage acoustique de navigation (SCANMAR), permettant la mesure des ouvertures horizontales et verticales du chalut ainsi que son positionnement par rapport au fond.

Les merlus du secteur profond (V) ont été prélevés par filets maillants lors des campagnes TECPEC de mai 2004 et MERMED d'octobre 2006. Deux filières de filets maillants de 1200 m chacune ont été mises en œuvre simultanément sur des fonds de 150 à 450 m, durant 6 et 18 heures. Chaque filière était composée de 3 séries de 4 maillages (30, 38, 45, 50 mm) de 2 types (« standard » et « grand compas »).

Les merlus récoltés en criée ont été échantillonnés entre mars 2006 et février 2007. Durant cette période, 5 femelles de 38 à 44 cm TL (Longueur Totale) ont été prélevées chaque mois en décalant la taille de prélèvement entre les premiers et derniers 6 mois, sur un lot de merlus acheté chez un mareyeur de Sète (« Marée Sétoise »). Bien que la localisation précise du lieu de pêche de ces merlus n'ait pu être identifiée, il était certain qu'ils provenaient du plateau du golfe du Lion, puisqu'ils avaient été pêchés par chalutage par les professionnels locaux.

1.3.1.2 Prélèvements

Lors des campagnes MERMED et TECPEC, les merlus pêchés de taille ≥ 25 cm TL ont été mesurés et pesés à bord, et les plus petits classés par classe de cm et regroupés par traits. Les individus de 25 cm TL et plus ont été disséqués à bord, et les individus inférieurs à 25 cm TL au laboratoire, selon le même protocole que les grands individus. Les merlus

prélevés en criée ont été mesurés, pesés et disséqués au laboratoire. Dans tous les cas, le foie, un morceau de filet d'environ 150 g et les gonades lorsqu'elles étaient présentes, étaient prélevés (Figure 2) avec du matériel de dissection propre en acier inoxydable. Chacun de ces organes a été pesé et conditionné dans des piluliers numérotés, tarés et grillés (2 h à 500°C) pour le foie et les gonades, et emballés dans une feuille de papier aluminium pour le muscle, puis immédiatement congelé à -20°C. En plus du poids total, le poids éviscéré a été mesuré. Le rapport masse du foie/masse du poisson éviscéré correspond au rapport hépato-somatique, et le rapport masse des gonades/masse du poisson éviscéré, au rapport gonado-somatique.

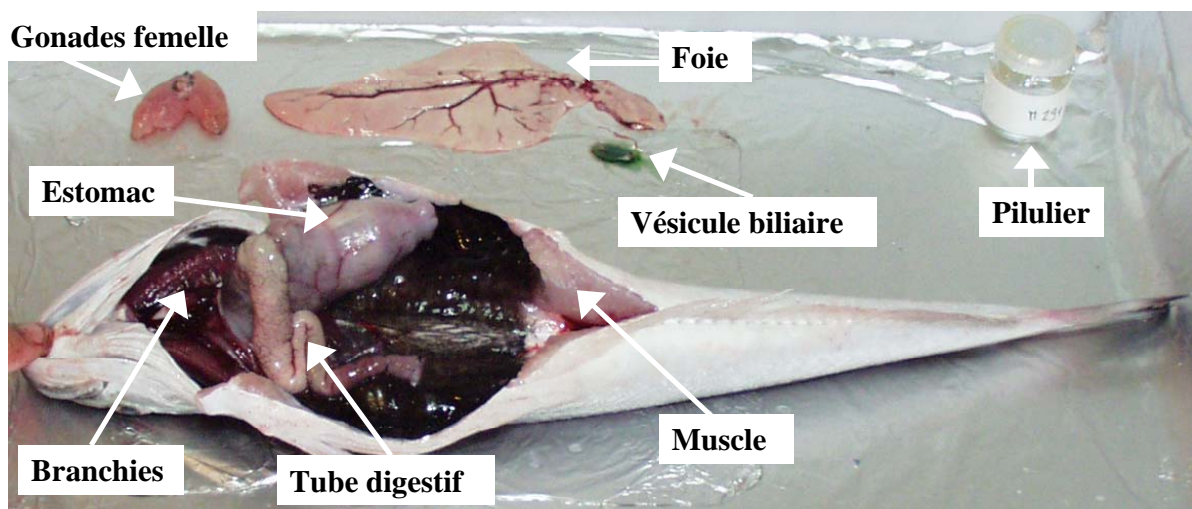


Figure 2 : Photo de merlu femelle en cours de dissection (Ifremer/MERLUMED).

1.3.2 Proies poisson

1.3.2.1 Protocole

Les poissons décrits comme proies principales du merlu ont été prélevés sur les secteurs I, II, III et IV lors des campagnes MERMED de mai 2004, octobre 2004, mai 2005, et novembre 2005 (cf. § 1.3.1.1). Il s'agissait des sardines (*Sardina pilchardus*), anchois (*Engraulis encrasicolus*), tacauds (*Trisopterus minutus*), merlans bleus (*Micromesistius poutassou*), et de deux espèces de gobies (*Gobius niger* et *Lesueurigobius friesii*) (Ferraton *et al.*, 2007 ; Mellon *et al.*, en prep.). Quelques échantillons de merlans bleus ont également été prélevés par filets maillants sur le secteur profond (V), lors des campagnes TECPEC et MERMED d'octobre 2006 (cf. § 1.3.1.1).

1.3.2.2 Prélèvements

Tous les poissons ont été mesurés et pesés (poids total) à bord. Les espèces présentant une large gamme de taille ont été triées par catégorie de taille de la manière suivante :

Sardines : 3 catégories, 8-12 cm, 13-17 cm et >17 cm.

Anchois : 2 catégories, 8-18 cm et >13 cm

Tacauds : 3 catégories, 8-12 cm, 13-17 cm et >17 cm.

Merlans bleus : 3 catégories, 8-12 cm, 13-17 cm et >17 cm.

Les espèces de gobies n'ont pas été triées par catégorie de taille. Selon la masse des espèces, des pools de 5 à 30 individus ont été constitués par campagne et par secteur de prélèvement, afin d'obtenir un échantillon suffisamment important pour l'analyse des PCB. Chaque échantillon a été conditionné dans une feuille ou une barquette d'aluminium, puis immédiatement congelé à -20°C .

1.3.3 Suprabenthos

1.3.3.1 Protocole

L'échantillonnage de ce compartiment a été réalisé lors des campagnes RESOMER de mai et novembre 2004, 2005 et 2006, au moyen d'un traîneau suprabenthique. Ce traîneau, conçu par J.C. Sorbe (chercheur CNRS/Université Bordeaux I), permet de pallier la difficulté d'échantillonnage quantitatif de la couche d'eau en contact avec le fond. Le traîneau est équipé de quatre filets en nylon de 0,5 mm de vide de maille. Ce système à quatre filets offre la possibilité d'étudier la stratification verticale des communautés suprabenthiques : deux filets échantillonnent la couche 0-50 cm au-dessus du fond et deux autres échantillonnent la couche 50-100 cm. Chaque filet est associé à un collecteur par l'intermédiaire d'un coude de liaison incliné, limitant la perte du prélèvement lors du retour du traîneau sur le pont du navire. Le traîneau est également muni d'un système d'ouverture-fermeture composé d'un rideau obturateur, masquant l'ouverture des filets durant la descente et la remontée. Lors du contact avec le fond, le mouvement des leviers vers le haut engendre l'enroulement du rideau, et par conséquent l'ouverture des filets. La pêche se poursuit pendant toute la durée du contact de l'appareil avec le substrat. Par ailleurs, un volucompteur est placé dans l'ouverture du filet supérieur droit afin d'estimer le volume d'eau filtré au cours d'un trait. Ce volucompteur ne fonctionne que lorsque le traîneau est en pêche effective, puisqu'il est masqué par le rideau obturateur pendant la descente et la remontée. Les traits ont été effectués après le levé du jour à heure fixe, afin d'être certain de capturer les espèces effectuant des migrations nocturnes

dans la colonne d'eau. Un premier trait d'environ une minute a été effectué pour estimer la qualité et la quantité de la faune. La durée des traits suivants était ajustée en fonction du premier. Leurs durées étaient de 5 à 10 minutes, à une vitesse de 1 à 2 nœuds.

1.3.3.2 Prélèvements

Pour chacune des stations, un trait a été réalisé pour l'étude faunistique quantitative, et un autre pour l'analyse des PCB. Les échantillons ont été congelés à -20°C dans des piluliers en verre préalablement grillés et tarés.

1.3.4 Zooplancton

1.3.4.1 Protocole

L'échantillonnage de ce compartiment a été réalisé lors des campagnes RESOMER de mai et novembre 2004, 2005 et 2006. Les prélèvements de zooplancton ont été réalisés de jour et à heure fixe, avec un filet triple de $200\ \mu\text{m}$ de vide de maille, équipé de collecteurs. Un profil CTD (Conductivité, Température, Densité) était préalablement réalisé à l'aide d'une sonde « Seabird », afin de déterminer la profondeur de la thermocline lorsqu'elle était présente. Quatre traits verticaux ont ensuite été réalisés à une vitesse de $1\ \text{m}\cdot\text{s}^{-1}$. Les deux premiers étaient effectués sur toute la colonne d'eau, et les deux autres au dessus de la thermocline.

1.3.4.2 Prélèvements

Pour chacune des stations, l'ensemble des trois collecteurs d'un trait était destiné à l'analyse des PCB. Les échantillons ont été conservés à -20°C dans des piluliers en verre grillés et tarés.

1.3.5 Phytoplancton

1.3.5.1 Protocole

L'échantillonnage de ce compartiment a été réalisé lors des campagnes RESOMER de mai et novembre 2004, 2005 et 2006. Les matières en suspension (MES) dans les eaux marines sont constituées de matières organiques et inorganiques. La matière organique particulaire (MOP) est constituée de cellules vivantes (phytoplancton et zooplancton) et de matières organiques détritiques (MOD). L'échantillonnage direct de phytoplancton « pur » n'étant techniquement pas réalisable, une méthode indirecte a été employée. Elle consiste à prélever les MES à la profondeur où la teneur en chlorophylle est maximale, et aux heures

d'ensoleillement maximum (autour de 12h UTC), afin de récupérer un matériel riche en cellules phytoplanctoniques, puis à caractériser l'échantillon recueilli afin d'en connaître le pourcentage de phytoplancton. La profondeur du maximum de chlorophylle était déterminée par l'analyse du profil de fluorescence, température et salinité de la colonne d'eau, au moyen d'une sonde CTD « Seabird », équipée d'un fluorimètre. Pour chaque profil, l'eau de mer était prélevée à la profondeur où la fluorescence était maximale. Afin d'obtenir des quantités de matière suffisantes pour l'analyse des PCB, de grands volumes d'eau ont été filtrés ($>10\text{m}^3$). Une pompe immergée à grand débit de pompage ($320\text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$) a permis d'acheminer l'eau jusque sur le pont du navire. L'eau était filtrée dans un échantillonneur conçu par X. Phillippon (Ifremer Brest), composé de deux cuves interconnectées, permettant la filtration successive de l'eau sur trois filets de maillage différents : 200, 63 et $6\text{ }\mu\text{m}$ de vide de maille (Figure 3).

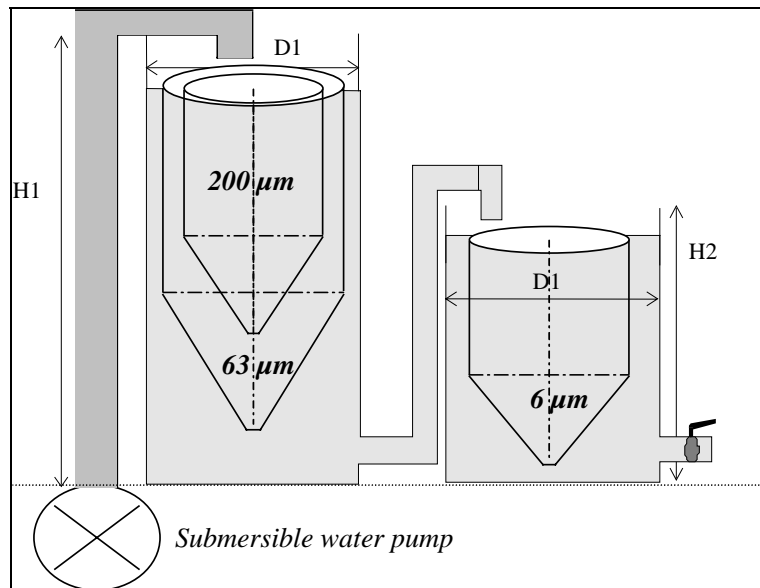


Figure 3 : Schéma conceptuel de l'échantillonneur à phytoplancton. $H1 = 145\text{ cm}$; $H2 = 175\text{ cm}$; $D1 = 63\text{ cm}$.

1.3.5.2 Prélèvements

Le matériel utilisé pour les analyses de PCB correspond à ce qui a été récolté sur les filets de $63\text{ }\mu\text{m}$ et $6\text{ }\mu\text{m}$, comprenant respectivement des particules dont la taille est comprise entre 63 et $200\text{ }\mu\text{m}$, et 6 et $63\text{ }\mu\text{m}$. Un sous-échantillon du matériel recueilli était par ailleurs fixé dans une solution de lugol pour la détermination faunistique. D'après Rau *et al.* (1990) et Rolff and Elmgren (2000), la fraction 63- $200\text{ }\mu\text{m}$ correspond à la gamme de taille la plus appropriée pour analyser les principales composantes phytoplanctoniques des communautés

planctoniques. Pour la caractérisation ultérieure des échantillons, une série de préfiltrations de 15 L d'eau brute sur des « soies » de successivement 200, 63 et 6 μm a été effectuée dans le laboratoire du bateau. L'eau pré-filtrée sur ces différents maillages a été caractérisée par ses teneurs en MES, CHN et chlorophylle. Pour cela elle était filtrée sur filtre Wathman 0.7 μm . Les étapes de préfiltrations et filtrations sont schématisées sur la figure 4.

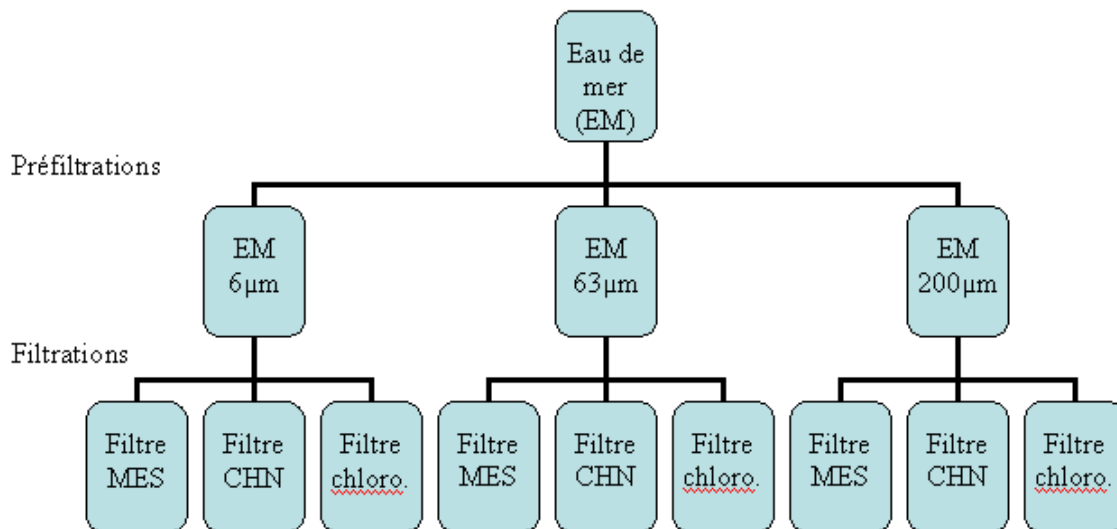


Figure 4 : Etapes de préfiltrations et filtrations pour les mesures des paramètres de la masse d'eau.

1.3.5.3 Caractérisation des échantillons de phytoplancton

Comme l'échantillonnage direct de phytoplancton « pur » n'est techniquement pas réalisable, la récolte d'échantillons a consisté à prélever les MES à la profondeur où la teneur en chlorophylle est maximale. Une caractérisation de ces derniers est donc nécessaire afin d'en connaître la composition. Elle est décrite par Harmelin-Vivien *et al.* (2008) en annexe. Brièvement, la part de MOP contenue dans les MES est déterminée par la différence entre la teneur en carbone particulaire total mesurée sur les échantillons lyophilisés, et la teneur en carbone particulaire minéral des cendres des échantillons. Cette détermination s'effectue par analyse élémentaire CHN (analyseur « Vario El III ») sur du matériel préalablement décarbonaté. Les détails et la validation de la méthode sont décrits dans Aminot et Kerouel (2004). L'analyse CHN permet ensuite d'évaluer les proportions des différentes classes de matière organique par le ratio C/N, ou rapport de Redfield (Redfield *et al.*, 1963). En effet,

lorsque la matière organique se dégrade, elle se transforme en matière organique détritique, et perd ses fonctions azotées et phosphorées plus rapidement que les éléments du squelette carboné. La proportion de carbone a donc tendance à croître dans la MOP détritique. La part du vivant dans la MOP peut ainsi être déterminée : un rapport C/N de 6 à 8 correspond à de la MOP fraîchement synthétisée, et un rapport supérieur à 10-12 à de la MOP détritique (Aminot et Kerouel, 2004). Une mesure de la teneur en chlorophylle *a* par spectrophotométrie selon la méthode d'Aminot et Rey (2002), permet de déterminer la biomasse phytoplanctonique. Elle est calculée selon la formule :

$$\text{Biomasse}_{\text{Phytoplancton}} = (\text{Chl } a * R) / \%C$$

avec Chl *a*, la concentration en chlorophylle *a* dans l'échantillon, R, le rapport des masses C/Chl *a* dans le phytoplancton, et %C, le pourcentage de carbone dans le phytoplancton vivant. Selon Aminot et Kerouel, 2004, R est de l'ordre de 60 (en moyenne) et %C de 0.28. Ces valeurs ont été utilisées dans cette étude. Le pourcentage de phytoplancton dans l'échantillon est alors calculé par le rapport biomasse phytoplanctonique / MES totale. La caractérisation de la composition faunistique des échantillons a complété la caractérisation des échantillons prélevés.

1.4 Récapitulatif des échantillons analysés

Etant donné le nombre important d'échantillons récoltés, un choix a du être effectué pour l'analyse des PCB. Compte tenu de nos objectifs, nous avons privilégié l'étude des variations des niveaux de contamination en PCB dans le merlu en fonction de paramètres biologiques tels que la répartition entre organe, la taille et le sexe, plutôt que celles engendrées par les paramètres environnementaux tels que la saison et le secteur. Ainsi, les analyses ont principalement été focalisées sur les échantillons provenant des secteurs I et II, situés face au débouché du grand Rhône. Le tableau 2 résume les échantillons analysés.

Tableau 2 : a) analyses effectuées sur les organes de merlus ; b) analyses effectuées sur les pools d'individus des principales espèces du réseau trophique du merlu.

a)

Merlus	Sexe ind.	Mâles	Femelles
Taille (cm)	6-24	25-52	25-70
Muscle	45	39	55
Foie	43	33	53
Gonades	0	21	48

b)

	Taille	Nombre pools
Anchois	8-12 cm	4
	13-17 cm	2
Sardines	8-12 cm	4
	13-17 cm	7
Merlan bleus	8-12 cm	3
	13-17 cm	4
	>17 cm	6
Tacauds	8-12 cm	6
	13-17 cm	5
L. friesii	5-8 cm	4
G. niger	8-12 cm	5
Suprabenthos	>500 µm	26
Zooplancton	>200 µm	22
Phytoplancton	6-200 µm	25

2 Méthodes chimiques et biochimiques

2.1 Détermination et quantification des PCB et du pp'DDE

Pour étudier la distribution des PCB présents à l'état de trace dans l'environnement, il est nécessaire de déterminer avec précision leurs concentrations dans différentes matrices biologiques. D'une manière générale, l'analyse des contaminants organiques dans les différentes matrices biologiques s'effectue selon un protocole incluant plusieurs étapes : la lyophilisation, l'extraction des composés recherchés dans l'échantillon, la purification de l'extrait et finalement la détermination instrumentale. L'analyse des contaminants organochlorés est réalisée selon un protocole simplifié dérivé du protocole établi et validé au laboratoire (Jaouen-Madoulet *et al.*, 2000). Toute la verrerie utilisée est au préalable grillée au four à 500°C pendant 2 heures, de façon à éliminer toutes traces de matière organique susceptible de perturber le bon déroulement du protocole ou de fausser les résultats. L'analyse est réalisée sur du matériel sec et finement broyé. Dans le cadre de cette étude, seize congénères de PCB ont été analysés, il s'agit des composés CB28, 52, 101, 105, 110, 118, 128, 132, 138, 149, 153, 156, 170, 180, 187, et 194. Parmi ces congénères de PCB qui constituent ceux systématiquement suivis au laboratoire (DCN-BE-CO, Ifremer Brest), on retrouve les 7 composés marqueurs de contamination par les PCB auxquels ont été ajoutés trois composés monoortho-substitués, de type dioxin-like (CB105, CB118 et 156). D'autres congénères ont été mesurés parce qu'ils pouvaient apporter des éléments d'information sur le comportement des PCB dans les organismes (CB110, 132 et 149 composés partiellement biotransformés par certains organismes vivants ; CB170, 187, et 194, composés persistants). La figure 5 résume par un schéma les différentes étapes du protocole pour la détermination et la quantification de ces composés. Il est à noter que le dosage des lipides totaux décrit au paragraphe 2.2 est réalisé après la phase d'extraction.

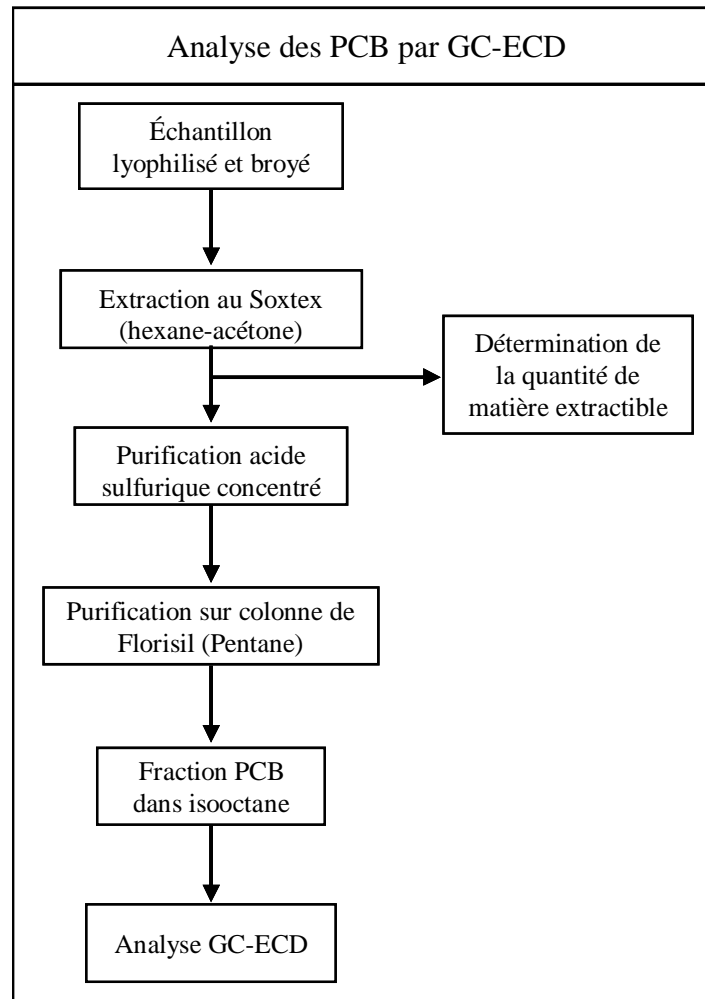


Figure 5 : Protocole d'analyse des PCB par chromatographie en phase gazeuse munit d'un détecteur à capture d'électrons (GC-ECD).

2.1.1 Lyophilisation

La présence d'eau dans le matériel étudié peut constituer une gêne pour le bon déroulement du protocole analytique car elle ne se mélange pas avec les solvants organiques utilisés, ainsi une étape de lyophilisation est indispensable. De plus, pour un même type d'échantillon, il est plus facile de comparer les concentrations en PCB lorsqu'elles sont exprimées par rapport au poids sec (moins imprécision de la mesure). La teneur en eau a cependant été déterminée pour pouvoir exprimer les concentrations en poids frais.

2.1.2 Extraction des contaminants :

La quantification des contaminants organiques présents dans les organismes nécessite une étape d'extraction préalable afin d'isoler les PCB hydrophobes du reste de la matrice. L'extraction au Soxhlet est une des méthodes les plus couramment utilisées pour l'analyse des

contaminants organiques dans des matrices de natures différentes (De Boer, 1988 ; Jaouen-Madoulet, 2000 ; Bodin, 2005). Le procédé d'extraction Soxtec (Soxtec 2050), utilisé dans cette étude est un dérivé de cette méthode. Il permet l'extraction en continu de six échantillons lyophilisés, par un mélange de solvants organiques (hexane/acétone = 80 : 20, v/v). L'extraction est réalisée sur une prise d'essais de 50 mg à 2 g de poids sec selon le matériel à analyser (muscle, foie, gonade) et comprend deux étapes :

- une étape d'extraction pendant laquelle des cartouches de cellulose contenant le lyophilisat sont plongées dans le mélange de solvant en ébullition (120°C) pendant 1h30.
- une étape de rinçage à reflux pendant laquelle les cartouches sont rincées par les vapeurs de solvant qui se condensent pendant une demi-heure. L'extrait organique ainsi obtenu est ensuite évaporé à sec, puis repris dans 500 µL d'hexane. A ce stade, il est possible de déterminer la matière extractible hexane / acétone (cf. §2.2).

2.1.3 Purification des extraits :

L'étape de purification a pour principal objectif d'éliminer tout le matériel extrait autre que les composés recherchés, tels que les lipides, les molécules polaires, les pigments, les macromolécules... Si ce matériel n'est pas éliminé, il peut interférer lors de l'analyse instrumentale finale, soit en contaminant les colonnes chromatographiques par saturation du détecteur, soit en engendrant des problèmes de co-élution avec les différents congénères de PCB. La purification est réalisée en deux temps :

1/ Hydrolyse à l'acide sulfurique : 2 mL de H₂SO₄ concentré sont ajoutés à l'extrait. Après agitation au vortex, l'émulsion obtenue est laissée à décanter pendant au minimum 12 heures à l'abri de la lumière. Le surnageant organique (S1), contenant les composés hydrophobes (PCB), est récupéré. Une seconde extraction du culot (phase aqueuse) est réalisée par 3 mL d'hexane. Après agitation au vortex, l'émulsion est centrifugée pendant 1h à 3000 tr.min⁻¹. Le surnageant récupéré (S2) est combiné avec l'extrait précédent (S1). Cet extrait est ensuite évaporé à sec, puis repris par 500µL d'hexane.

2/ Purification supplémentaire par chromatographie d'absorption sur colonne. Cette étape permet d'éliminer les composés polaires restants et les traces d'eau. La purification est réalisée sur des colonnes de Florisil (co-précipité de magnésie et de silice: 16% MgO + 84% SiO₂; taille 60/100 mesh soit 0.15/0.25 cm). Des colonnes chromatographiques en verre (hauteur 16cm ; diamètre 3mm) contenant 2,35 g de Florisil, activé à 500°C pendant 2 heures puis désactivé par 3% d'eau, sont ensuite lavées avec 25 mL de pentane. Sur chaque colonne, 500 µL d'échantillon sont déposés, puis élués avec 20 mL de pentane. Le solvant est récupéré

dans un ballon, puis évaporé à sec sous jet d'azote. L'extrait purifié est repris dans 450 μL d'isooctane et 50 μL de tétrachloronaphtalène (TCN), utilisé comme étalon interne, puis transvasé dans un flacon de 2 mL adapté au passeur automatique d'échantillons du chromatographe.

2.1.4 Analyse des PCB et du pp'DDE par chromatographie en phase gazeuse :

La dernière étape de ce protocole consiste en l'analyse instrumentale permettant à la fois la séparation des composés, leur identification et la détermination quantitative des seize congénères de PCB et du pp'DDE. Le dosage est réalisé par chromatographie en phase gazeuse selon le principe suivant : les constituants d'un mélange injecté sont entraînés par une phase mobile (gaz vecteur) le long d'une colonne imprégnée d'une phase stationnaire. Chaque composé migre à une vitesse propre, dépendant des interactions du composé avec la phase stationnaire. Le temps de rétention dans la colonne permet l'identification de chaque constituant. Les caractéristiques et conditions opératoires du chromatographe sont présentées dans le tableau 3.

Tableau 3 : Caractéristiques et conditions opératoires du chromatographe.

Chromatographe	HP 5890
Colonne	Colonne capillaire Varian CP-SIL 19 CB en silice fondue de 50 m de longueur, 0,25 mm de diamètre interne et 0,2 μm d'épaisseur de film
Gaz Vecteur	Hydrogène à 1,21 bar, vitesse linéaire 35 cm.s^{-1}
Injecteur	« on column » à 78°C
Programmation de température	2 min à 75°C 30°C.min ⁻¹ jusqu'à 180°C 2,5°C.min ⁻¹ jusqu'à 280°C 30°C.min ⁻¹ jusqu'à 300°C
Détecteur	ECD, source ⁶³ Ni à 330°C

La quantification des composés nécessite la réalisation d'une gamme d'étalonnage établissant la relation entre la réponse du détecteur et la concentration de chaque composé. Les concentrations des différents congénères de PCB et du pp'DDE dans les différents standards sont présentés dans le tableau 4. A titre d'exemple, la figure 6 représente la droite d'étalonnage du CB153, et le tableau 5 les coefficients de corrélation obtenus pour l'ensemble des congénères.

Tableau 4 : Concentration des différents congénères de PCB et du pp'DDE dans les différents standards exprimés en ng/μL.

CB	52	101	110	149	118	153	132	105
Standard 0	0	0	0	0	0	0	0	0
Standard 1	0,649	0,635	0,457	3,124	1,270	8,229	0,778	0,792
Standard 2	1,636	1,600	1,151	7,872	3,200	20,736	1,960	1,997
Standard 3	3,272	3,200	2,301	15,744	6,400	41,472	3,920	3,994
Standard 4	16,358	16,000	11,506	78,720	32,000	207,360	19,600	19,968
Standard 5	32,717	32,000	23,011	157,440	64,000	414,720	39,200	39,936
Standard 6	73,613	72,000	51,775	354,240	144,000	933,120	88,200	89,856

CB	138	187	128	156	180	170	194	pp'DDE
Standard 0	0	0	0	0	0	0	0	0
Standard 1	6,286	3,154	0,589	0,632	6,486	3,185	0,743	8,27
Standard 2	15,840	7,949	1,484	1,593	16,344	8,026	1,872	20,832
Standard 3	31,680	15,898	2,968	3,186	32,688	16,051	3,744	41,664
Standard 4	158,400	79,488	14,840	15,928	163,440	80,256	18,720	208,32
Standard 5	316,800	158,976	29,680	31,856	326,880	160,512	37,440	416,64
Standard 6	712,800	357,696	66,780	71,676	735,480	361,152	84,240	937,44

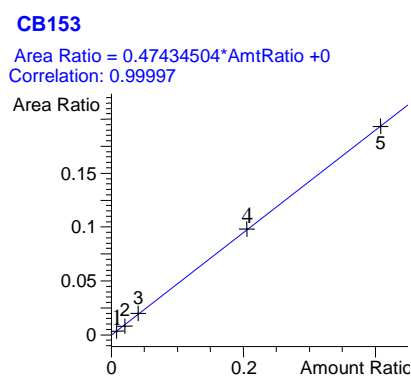


Figure 6 : Courbe d'étalonnage du CB153

Tableau 5 : Exemple de coefficients de corrélation des courbes d'étalonnage des différents congénères.

CB52	CB101	CB110	CB149	CB118	CB153	CB132	CB105
0,99970	0,99972	0,99934	0,99970	0,99950	0,99992	0,99942	0,99989
CB138	CB187	CB128	CB156	CB180	CB170	CB194	pp'DDE
0,99987	0,99959	0,99933	0,99841	0,99843	0,99810	0,99875	0,99786

A titre d'exemple, la figure 7 représente un chromatogramme obtenu à partir d'un extrait de foie de merlu. Les concentrations de chacun des congénères sont calculées selon la méthode de calcul indirecte avec étalon interne, grâce au logiciel HPChem®, selon la formule suivante :

$$[C]_i = \frac{(Ac)_i / (A_{EI})_i}{(Ac)_e / (A_{EI})_e} \times \frac{V_i \times [C]_e}{P_i}$$

avec : $[C]_i$: concentration du composé C dans l'extrait (ng.g^{-1} de poids sec).

$(Ac)_i$: aire du pic du composé C dans l'extrait.

$(A_{EI})_i$: aire du pic de l'étalon interne dans l'extrait.

$(Ac)_e$: aire du pic du composé C dans la solution étalon.

$(A_{EI})_e$: aire du pic de l'étalon interne dans la solution étalon.

V_i : volume final de l'extrait (mL).

$[C]_e$: concentration du composé C dans la solution étalon (ng.mL^{-1}).

P_i : poids de la prise d'essai (g de poids sec).

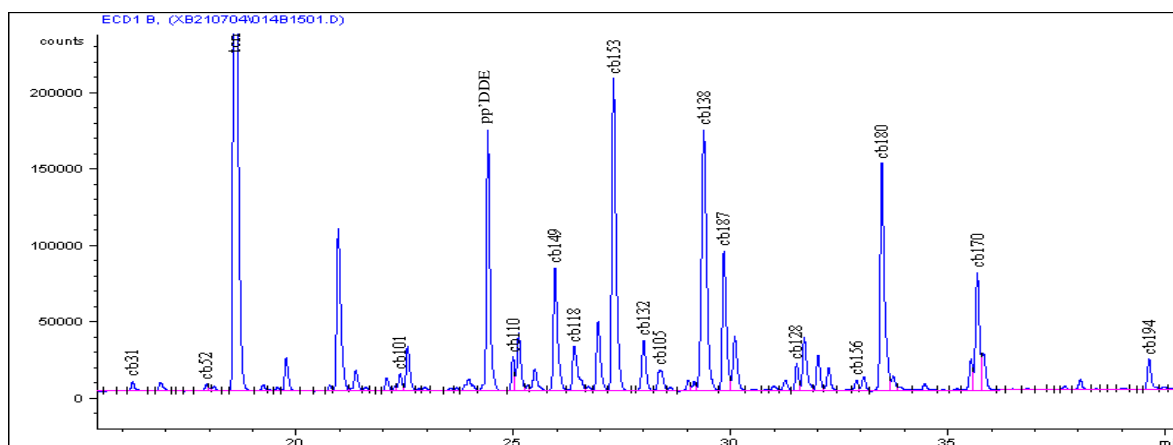


Figure 7 : Chromatogramme d'un foie de merlu mâle de 34 cm.

2.1.5 Validation de la méthode analytique

Dans ce paragraphe, sont présentés les différents contrôles qui permettent de garantir la qualité des mesures.

2.1.5.1 Blancs

La vérification de l'absence d'une éventuelle contamination des échantillons lors de l'analyse s'effectue grâce à un blanc d'essai. Ce témoin négatif est traité suivant le même protocole que les autres échantillons, tous les 10 échantillons. Il garantit que les composés détectés dans les échantillons ne proviennent pas d'une contamination lors de l'analyse. Les blancs d'analyse ont été comparés au chromatogramme du plus petit standard (Figure 8).

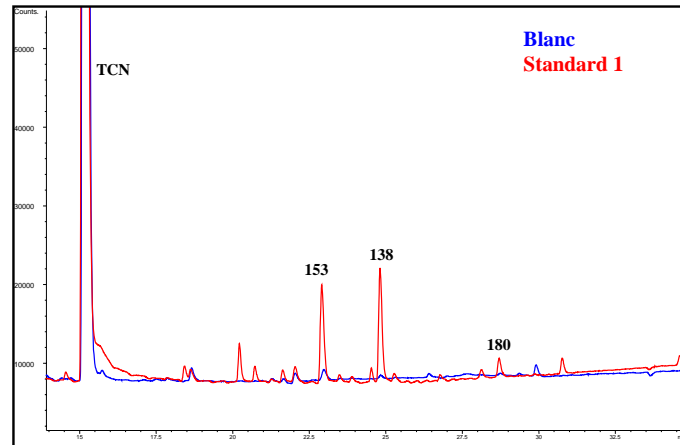


Figure 8 : Exemple de comparaison d'un chromatogramme d'un blanc d'essai et du plus petit standard.

2.1.5.2 Justesse / reproductibilité

La fiabilité du protocole décrit précédemment a été validée à l'aide d'un échantillon certifié d'huile de foie de morue (CRM349 ; Bureau Communautaire de Référence Commission Européenne). Les concentrations en PCB obtenues avec ce mode opératoire ont été comparées aux valeurs certifiées (Figure 9). Cet échantillon certifié permet de contrôler la qualité des analyses de routine par leur utilisation à intervalles de temps réguliers (tous les 10 échantillons). Les taux de récupération varient entre 74 et 125%, excepté pour le composé CB105, probablement dû à un problème de co-élution avec un autre composé lors de l'analyse. Le protocole utilisé lors de cette étude permet donc l'obtention de résultats en accord avec les valeurs de référence certifiées et les données complémentaires publiées (Schantz *et al.*, 1993). En conséquence, les résultats acquis au cours de ce travail ne sont pas corrigés pour les biais de justesse.

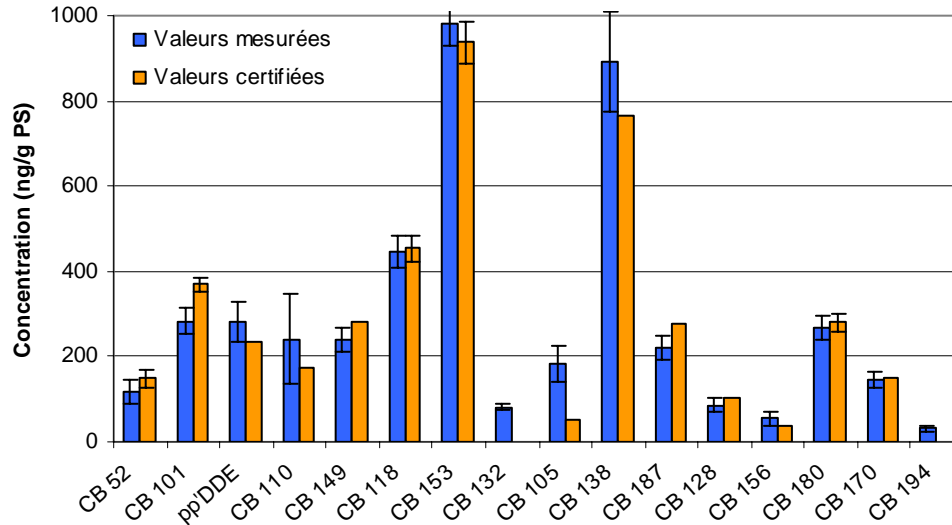


Figure 9 : Histogramme de comparaison des valeurs certifiées et mesurées des concentrations en PCB et en pp'DDE.

Enfin, les aptitudes du laboratoire pour l'analyse des PCB sont également régulièrement évaluées par le biais de participations à des exercices d'intercomparaison QUASIMEME (Quality Assurance of Information for Marine Environmental Monitoring in Europe). La performance de chaque laboratoire est estimée à partir du paramètre « Z-score » définit pour chaque composé par la relation suivante :

$$Z = (x_i - x) / s_b$$

où x_i représente la valeur mesurée, x la valeur assignée et s_b l'incertitude sur la valeur assignée.

En fonction de la valeur obtenue, différentes interprétations peuvent être faites :

- $|Z| \geq 2$ valeur mesurée satisfaisante
- $2 < |Z| < 3$ valeur mesurée à remettre en question
- $|Z| \geq 2$ valeur mesurée insatisfaisante

Pour l'exercice Quasimeme 2006, des résultats satisfaisants (Z-scores compris entre -1.9 et 0.8) ont été obtenus sur les échantillons de poissons (homogénéisés de muscles de saumons).

2.1.5.3 Répétabilité

La répétabilité de la méthode a été testée à deux reprises par la mesure des concentrations en PCB d'une huile de foie de morue et d'un muscle de merlu. Dans tous les cas et pour chacun des congénères mesurés, le coefficient de variation n'excède pas 15%, indiquant une bonne répétabilité. La mesure de la concentration en PCB d'une « carte de contrôle » (homogénéisat de muscle de merlu) à intervalles de temps réguliers assure quant à elle la répétabilité de la méthode dans le temps. La moyenne et l'écartype des résultats obtenus (n= 12) sont présentés sur la figure 10.

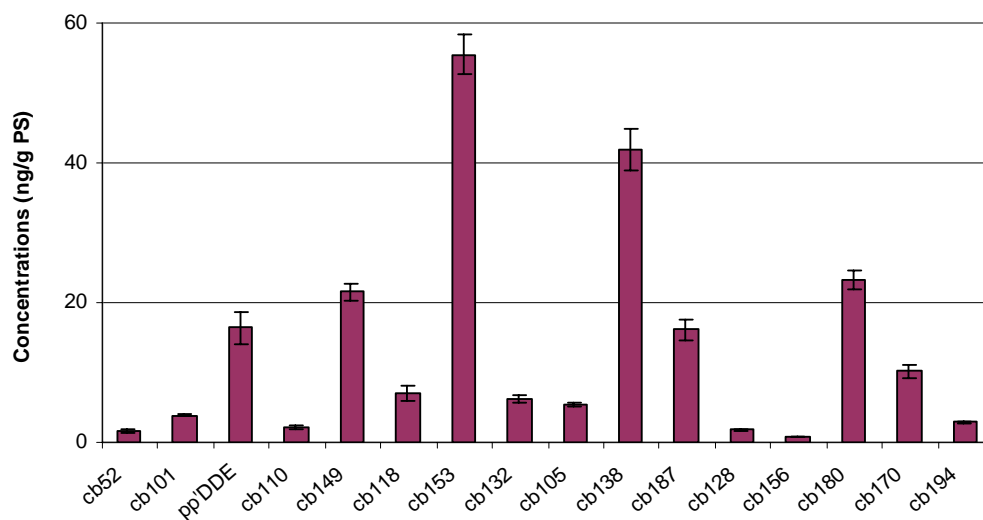


Figure 10 : Concentrations des différents congénères de PCB et du pp'DDE mesurés régulièrement sur la carte de contrôle (homogénéisat de muscle de merlu).

2.2 Détermination du pourcentage de lipides totaux

2.2.1 Principe / Mode opératoire

La méthode classiquement utilisée pour la détermination des lipides totaux est celle de Bligh and Dyer (1959). Afin de diminuer les manipulations, nous avons utilisé la méthode d'extraction Soxtec hexane/acétone 80 : 20, commune avec le dosage des PCB. Les lipides totaux sont déterminés par gravimétrie après extraction. L'extrait obtenu est transféré dans un ballon préalablement taré en rinçant abondamment le godet à l'hexane afin de récupérer tout l'échantillon. Il est ensuite évaporé à sec et placé dans un dessiccateur pendant une nuit avant

la pesée des matières extractibles hexane/acétone. Selon Monbet (1996), les matières extraites par cette méthode sont très proches des lipides totaux.

2.2.2 Validation de la méthode analytique

2.2.2.1 Blancs d'essai

Un blanc d'essai est réalisé tous les 10 échantillons. La masse de matière extractible mesurée est de l'ordre de 1mg sur tous les blancs réalisés, correspondant à l'incertitude liée à la pesée du ballon (précision de la balance Sartorius R16OP : 0,001g).

2.2.2.2 Justesse / reproductibilité

La reproductibilité de la méthode a été testée à l'aide d'une carte de contrôle (muscle de merlu) mesurée tous les 10 échantillons. Leur moyenne est de 5.29% de matière extractible hexane/acétone, avec un coefficient de variation de 9.21%. Les aptitudes du laboratoire pour l'extraction des lipides est également régulièrement évaluée lors des exercices d'intercomparaison QUASIMEME. Pour l'exercice Quasimeme 2006, un résultat satisfaisant ($Z\text{-score}=-0.1$) a été obtenu sur un homogénéisat de muscle de saumons.

2.2.2.3 Répétabilité

La répétabilité de la méthode a été régulièrement testée sur des matrices biologiques différentes (muscles de merlu, merlans bleus, chinchards, moules). Dans tous les cas, le coefficient de variation n'excède pas 10%, indiquant une bonne répétabilité pour ce type de mesure.

CHAPITRE III

Bioaccumulation des PCB dans le réseau trophique du merlu

INTRODUCTION

La voie trophique constitue la principale voie de contamination des poissons par les PCB car ces composés sont très peu solubles dans l'eau (Gobas *et al.*, 1993). Thomann (1999) a estimé qu'elle représente 99% des apports en PCB chez la truite du lac Michigan. Le régime alimentaire est par ailleurs l'un des principaux facteurs influençant leur bioaccumulation chez les cétacés (Aguilar *et al.*, 1999). En raison de leur persistance, les PCB sont bioamplifiés le long des réseaux trophiques (Fisk *et al.*, 2001 ; Nfon et Cousins, 2006), mais ce phénomène est variable en fonction de la structure et de la dynamique des réseaux (Kidd *et al.*, 1998). La dynamique des PCB dans les premiers niveaux trophiques est décrite comme conditionnant la contamination des espèces de niveaux trophiques supérieurs (Fisk *et al.*, 2001 ; Moisey *et al.*, 2001), et d'une manière générale, plus le réseau trophique est complexe, plus les niveaux en PCB sont importants chez les prédateurs supérieurs (Cabana et Rasmussen, 1994). La connaissance des positions trophiques des différents organismes d'une chaîne alimentaire est donc un élément clé pour comprendre les flux de contaminants persistants le long de ces réseaux (Muir *et al.*, 1995 ; Jarman *et al.*, 1996 ; Atwell *et al.*, 1998). Ainsi, la détermination du transfert trophique des PCB est une étape importante pour évaluer le risque pour l'environnement et l'homme.

Le ratio des isotopes stables de l'azote ($\delta^{15}\text{N}$) peut être utilisé pour estimer la position trophique des différentes espèces d'un réseau. En effet, ce rapport augmente en moyenne de 3,2 à 3,4‰ entre un prédateur et sa proie (Owens, 1987 ; Sweeting *et al.*, 2007). Pour cela, les valeurs de $\delta^{15}\text{N}$ des différents composants d'un réseau sont souvent utilisées pour estimer les effets de la position trophique sur les concentrations en POP (Minagawa et Wada, 1984 ; Cabana et Rasmussen, 1996 ; Ruus *et al.*, 2002). La signature en isotopes stables du carbone est quant à elle un bon traceur de l'origine de la matière organique ingérée par les organismes marins, puisque chaque source de matière organique, terrestre ou marine, a une gamme propre de valeurs de $\delta^{13}\text{C}$ et que la composition isotopique est fortement conservée le long des chaînes trophiques. Elles sont pour cela souvent utilisées pour identifier les contributions relatives des différentes sources de matière organique d'un réseau trophique (Thomas et Cahoon, 1993 ; Pinnegar et Polunin, 2000 ; Grall *et al.*, 2006). L'étude des signatures isotopiques de l'azote et du carbone apportent donc des informations différentes mais complémentaires pour caractériser un réseau trophique (Peterson *et al.*, 1985).

L'objectif de ce chapitre, qui constitue l'un des aspects fondamentaux de ce travail de thèse, est d'évaluer le degré d'exposition des merlus du golfe du Lion aux PCB. Cette étude s'est déroulée en deux phases. Dans un premier temps, les concentrations en PCB des différents organismes constituant le réseau trophique du merlu ont été mesurées afin de dresser un état des lieux de leur contamination. Dans un second temps, les liens potentiels entre les niveaux de contamination et les positions trophiques ont été étudiés. Pour cela, cette étude s'est appuyée sur le travail de thèse réalisé par F. Ferraton (2007) sur l'écologie trophique des juvéniles de merlu dans le golfe du Lion et les travaux en cours sur les merlus adultes. Ces études ont notamment permis d'identifier les différentes espèces constituant le réseau trophique du merlu et d'estimer leurs positions trophiques à partir des signatures isotopiques de l'azote. Les mesures du $\delta^{13}\text{C}$ ont également été utilisées pour identifier les voies d'entrées potentielles des PCB dans le réseau. Cette étude est présentée sous la forme d'un article scientifique, décrivant l'influence de facteurs tels que la position trophique et la taille des principales espèces constituant le réseau trophique du merlu du golfe du Lion sur leur niveaux et profils de contamination par les PCB. Les voies d'entrées potentielles des PCB dans ce réseau sont ensuite abordées dans une partie discussion / conclusion.

Biomagnification and differential partitioning of polychlorinated biphenyls in the European hake food web from the Gulf of Lions (NW Mediterranean)

Xavier Bodiguel ^{a,b}, Véronique Loizeau ^a, Mireille Harmelin-Vivien ^c,
Franck Ferraton ^b, Luisa Metral, François Rouspard ^a, Anne-Marie Le Guellec ^a,
Xavier Philippon ^a and Capucine Mellon-Duval ^b

^a IFREMER, Département de Biogéochimie et Ecotoxicologie, Technopôle Brest-Iroise, Pointe du Diable, BP70, 29280 Plouzané, France

^b IFREMER, Département Halieutique Méditerranéen et Tropical, bd. J. Monnet BP171, 34203 Sète Cedex, France

^c Centre d'Océanographie de Marseille, Université de la Méditerranée, UMR CNRS 6540, Station Marine d'Endoume, 13007 Marseille, France

Environmental Sciences and Technology, in prep.

Abstract

The objective of this study was to investigate the behaviour of polychlorinated biphenyl contaminants (PCBs) along the food web of the European hake (*Merluccius merluccius*) in the Gulf of Lions. The food web consisted in marine phytoplankton, herbivore zooplankton, suprabenthic fauna, and primary and secondary carnivorous fishes. A total of 14 PCB congeners were measured in the different compartments or species, and ratio nitrogen of stable isotopes was used to identify their trophic positions. Concentration values demonstrated that PCBs were biomagnified along the food web according to the trophic position of organisms. However, variation in trophic level did not explain all the variability in PCB concentration. Food web magnification factors (FWMF) indicated a higher biomagnification of high hydrophobic and non-metabolizable congeners. Contamination profiles highlighted different fingerprints between pelagic, benthic and demersal species. Pelagic species were characterized by a higher proportion of low chlorinated congeners, compared to benthic and demersal species. Although trophic level and PCB concentration recorded in the different species resulted directly from their diet, the enrichment mechanism differed between the two tracers. PCB bioaccumulation during the life of an organism was not automatically related to an increase in its trophic level, as physiological changes such as growth and reproduction did not influence the two tracers in a similar way.

Keywords - Organochlorine contaminants, PCBs, Stable isotopes, Biomagnification, food web, *Merluccius merluccius*, Mediterranean sea.

1 Introduction

During the past decades, persistent organic pollutants (POPs) such as Polychlorinated biphenyls (PCBs) have been largely used and emitted in the environment. Represented by 209 congeners, this synthetic chemical family was used in a variety of products, like cooling and isolation fluids, in the form of technical mixtures, until they were banned in France in 1987. Although levels of PCBs appear to have decreased after their prohibition in most industrial countries in the last two decades, their decrease seems to level off, and high concentrations are still measured, especially in aquatic predators (Bignert et al., 1998; Nyman et al., 2002; Bodiguel et al., 2008). Moreover, new POPs like Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) with similar chemical properties have replaced old ones. They are found now at increasing levels in aquatic environments (Rayne et al., 2003). Assessment of bioaccumulation and effects of POPs in marine ecosystems is therefore a fundamental step for the scientific evaluation of risks that chemicals may pose to the environment and human beings.

Due to high persistence, hydrophobicity and lipid propensity, PCBs are accumulated in the fat tissues of organisms and their uptake occurs mainly via diet (Gobas et al., 1993; Mackay and Fraser, 2000). Consequently, they are biomagnified along trophic webs, involving a wide range of trophic levels (Kidd et al., 1995; Fisk et al., 2001; Burreau et al., 2006), with a potential risk for high trophic level predators. As food web structure and dynamics influence POP concentrations in biota (Broman et al., 1992; Kidd et al., 1998), knowledge on trophic position of the different organisms of a food web is a key to understand the flux of persistent contaminants that may biomagnify in marine food webs (Muir et al., 1988; Jarman et al., 1996; Atwell et al., 1998). The ratio of nitrogen stable isotopes ($\delta^{15}\text{N}$) can be used to estimate trophic position, because the $\delta^{15}\text{N}$ of a consumer is typically enriched by 2.5 to 4.5‰ (mean 3.2 to 3.4‰) relative to its diet (Owens, 1987; Sweeting et al., 2007). Therefore, $\delta^{15}\text{N}$ values are often used to estimate the effects of trophic position on POP concentrations in food web components (Minagawa and Wada, 1984; Cabana and Rasmussen, 1996; Bodin et al., 2008).

Studies on biomagnification of POPs in aquatic food webs have been focused mainly on predatory fish and marine mammals in lakes and marine environments, but little information is available on coastal food webs including phytoplankton, zooplankton, and both benthic and pelagic organisms. A multi-disciplinary study conducted in the Gulf of Lions (NW Mediterranean) afforded the opportunity to collect a large range of biota (phytoplankton, herbivore zooplankton, suprabenthic taxa, and primary and secondary carnivorous fishes) within the same area, to examine the trophic transfer of contaminants along a marine coastal

food web. The Gulf of Lions is one of the most important continental shelves in the Mediterranean Sea (Roussiez et al., 2005). It receives high freshwater discharges from the Rhône River watershed, which drains heavily industrialized regions of southern France, and PCBs found in fishes can be higher than in other areas of the French coasts (Bodiguel et al., 2008). The aim of this study was to investigate PCB levels and profiles in the different organisms of the trophic web of the European hake (*Merluccius merluccius* (Linnaeus, 1758)) in the Gulf of Lions, in relation to different biological factors (trophic position, feeding mode, size). Stable nitrogen isotope analysis was used to provide estimates of the relative trophic position of the different organisms involved.

2 Method

2.1 Field sampling

Organisms constituting the hake food web were collected in the Gulf of Lions, located between 42°15' - 43°35' N and 3°00' - 6°00' E in the north-western Mediterranean in spring and autumn from 2004 to 2006. Hake and its main fish preys were collected by bottom trawling, between 30 and 150m depth, as detailed in Ferraton et al. (2007). Three size classes (11-13 cm, 28-30 cm and 47-48 cm) were considered hake to get contrasting results with size. Two size classes (8-12 cm and 13-17 cm) were considered for anchovy (*Engraulis encrasicolus* (Linnaeus, 1758)), sardine (*Sardina pilchardus* (Walbaum, 1792)), poor cod (*Trisopterus minutus* (Linnaeus, 1758)) and blue whiting (*Micromesistius poutassou* (Risso, 1827)). Due to their low size range, gobiids *Lesueurigobius friesii* (Malm, 1874) and *Gobius niger* Linnaeus, 1758, were not sorted by size class. Small crustaceans living in the benthic boundary water layer were collected with a suprabenthic sledge equipped with zooplankton nets (500 µm mesh size) between 30 and 90m depth. Euphausiids were separated from the other suprabenthic taxa to be used as base line in trophic level determination because they feed on phytoplankton. Zooplankton was collected with a WP2 net (200 µm mesh size) from vertical tows in the water column and phytoplankton was collected following the procedure described in Harmelin-Vivien et al. (2008). At each sampling site, the characteristics of the water masses were recorded using a Seabird CDT fitted with a fluorimeter to detect the fluorescence maximum. Particulate matter was collected by pumping and filtering large volumes of seawater at the fluorescence maximum with a submersible high flow water pump (320 L.minute⁻¹). Seawater was filtered through three different vertical nets of decreasing mesh size (200, 63 and 6 µm) set in a large tank. According to previous studies (Rau et al., 1990; Rolff and Elmgren, 2000), the 63-200 µm sized fraction

was considered to be the best proxy for analysing the main phytoplankton components of the community. The term “phytoplankton” used in this paper referred to the 6-63 µm and 63-200 µm fractions which were mainly composed of microphytoplankton (Harmelin-Vivien et al., 2008). All samples were immediately stored frozen at -20°C.

2.2 Nitrogen isotopic ratio

Nitrogen stable isotope ratio of hake and its prey fish species was analysed on dorsal white muscle, as this tissue gives the less variable results (Pinnegar and Polunin, 1999). Samples of fish muscles were analysed individually, whereas several individuals of small crustaceans were pooled together to obtain enough material for analysis. All samples were freeze-dried and ground to a fine and homogeneous powder using a mortar and pestle. Isotopic analyses were performed on 1 mg of powder weighed in tin cups. Sample $\delta^{15}\text{N}$ was determined by continuous-flow isotope-ratio mass spectrometry using a Europa Scientific ANCA-NT 20-20 stable isotope analyser, with ANCA-NT Solid-Liquid Preparation Module, at the Scottish Crop Research Institute (Scrimgeour and Robinson, 2003). The analytical precision (SD, n = 5) was 0.2%, estimated from standards analysed along with the samples. Internal working standards were 1 mg leucine prepared by freeze drying 50 µL of a 20 mg mL⁻¹ stock solution into tin capsules, and calibrated against ‘Europa flour’ and IAEA standards N1 and N2. Nitrogen isotope ratio was expressed as parts per thousands (‰) differences from an international standard reference material:

$$\delta^{15}\text{N}(\text{‰}) = \left[\frac{R_{\text{sample}}}{R_{\text{standard}}} - 1 \right] \times 10^3$$

with R: the ratio $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$; δ : the measure of heavy to light isotope in the sample; and standard: the atmospheric N₂.

2.3 PCB Analysis

2.3.1 Sample treatment and PCB quantification

PCB quantification was performed on pools of individuals, except for hake, where each organ (muscle, liver and gonads when present) was individually analysed. The organic contaminants in samples were determined following analytical procedures described previously (Jaouen-Madoulet, 2000; Bodin et al., 2007) and summarized below. A precisely weighed amount of the powdered material, between 100 mg and 2 g, was extracted in a hot Soxhlet extraction apparatus (Soxtec 2050 series) for 1.5 h using a hexane:acetone mixture (80:20). After

extraction, the solvent was carefully and completely evaporated. The residue was weighed to give the amount of extractible material and a rough estimation of the total lipid content. Then, 5 mL of hexane were added to extracts and the mixture was shaken. Lipids and co-extractible materials were destroyed by adding 2 mL of concentrated sulphuric acid. After one night, the emulsion had separated, and the clear remanent hexane phase was removed after decantation and centrifugation. This operation was carried out a second time by adding 2 mL of hexane. After one night of decantation, the clear remanent hexane phase was removed and added to the first one. This cleaned extract was further purified by adsorption chromatography on a Florisil column (Florisil, 60-100 mesh size, activated for 2 hours at 500°C, deactivated with 3% of demineralised water) eluted with pentane. All PCB congeners were in the same first elution fraction (volume 25 mL). After evaporation of the solvent, iso-octane was added to the final extract and the shaken mixture was transferred into a chromatographic vial with the addition of an internal standard (1, 2, 3, 4-tetrachloronaphtalene), and was then ready for the instrumental analysis. GC-ECD determination was carried out on a HP 5890 series II equipped with a CP-Sil19 column (60 m length, internal diameter 0.25 mm, and 0.15 µm phase film thickness) following optimized conditions described by Jaouen-Madoulet (2000). Six indicator PCB congeners were measured (CB 52, 101, 118, 138, 153, 180), and other congeners were also analysed to describe a larger range of chlorination, from 4 to 7 chlorine molecules (CB105, 110, 128, 132, 149, 156, 170, 187). They permit to check the appropriate resolution of the gas chromatography system, and could highlight underlying mechanisms acting on the distribution of organic contaminants in biota like bioaccumulation or biotransformation. The sum of all the 14 measured congener concentrations was referred to as $\Sigma_{14}\text{PCBs}$.

2.3.2 Quality control criteria

The calibration system was performed within a rather wide range using a six-point calibration curve to define the linearity range of our detector (ECD) for all contaminants. The relative precision of the method was checked for this type of sample by analysing five aliquots of a homogeneous tissue preparation of hake muscle. The results showed standard deviations of less than 10% for all congeners, which points to the good reproducibility of the method. During the analysis of the real samples, analytical blanks were systematically measured every ten samples. The blank concentrations were always below the concentrations of the lowest standards of all congeners. Finally, 10 replicates of a reference material, BCR-CRM349 (Cod Liver Oil) were analysed in order to determine the accuracy of the method. PCB recoveries varied between 74 and 125%, except for CB 105 which may interfere with a co-eluting compound. The

concentrations of the real samples were not corrected as regards recoveries. Moreover, the relative standard deviation values ranged from 4 to 19%, with a mean value of 10% for all PCBs. The results were in agreement with certified reference values and published data (Schantz et al., 1993). The protocol was validated by undertaking regular intercomparison exercises (QUASIMEME) in the laboratory.

2.4 Data analysis and statistical treatment

PCB concentrations were determined on hake organs (muscle, liver and gonads). To compare these measurements to those measured in preys on whole individuals, the total concentration in whole individual hake was calculated using the following equation:

$$[PCB]_{ind} = \frac{([PCB]_{liver} * (1 - wl) * Wl) + ([PCB]_{gonad} * (1 - wg) * Wg) + ([PCB]_{muscle} * (1 - wm) * Wm)}{TW}$$

with: *wl*: % of water in liver; *wg*: % of water in gonads; *wm*: % of water in muscle; *Wl*: Liver weight (g); *Wg*: Gonad weight (g); *Wm*: Muscle weight (g); *TW*: Total Weight (g); *[PCB]_{liver}*: CB153; concentration in liver (ng.g⁻¹ dw); *[PCB]_{gonad}*: PCB concentration in gonad (ng.g⁻¹ dw); *[PCB]_{muscle}*: PCB concentration in muscle (ng.g⁻¹ dw); *[PCB]_{ind}*: PCB concentration in a whole individual (ng.g⁻¹ ww).

Because of this type of calculation, concentrations were expressed in ng.g⁻¹ wet weight (ww) for all species analysed.

With our sampling method, phytoplankton and zooplankton samples contained a consequent quantity of seawater. After freeze-drying, salt distorted the dry weight of the samples. Consequently, concentrations measured in phytoplankton and zooplankton were corrected from the salt content of samples, according to the following equation:

$$[PCB] = [PCB]_{measured} / (100 - \% \text{ salt})$$

with: *[PCB]*: real PCB concentration (ng.g⁻¹ ww), *[PCB]_{measured}*: PCB concentration measured in the sample (ng.g⁻¹ ww), and *% salt*: percentage of salt in the sample measured by Cl⁻ ions determination.

Fish size was expressed in cm total length. Estimation of relative trophic levels (TL) was based on the δ¹⁵N of euphausiids which were primary consumers (TL=2). Jennings and Warr (2003) demonstrate that δ¹⁵N of primary consumers as baseline is more appropriate than those of phytoplankton to estimate the trophic position of consumers in food webs, as δ¹⁵N of primary producers varies widely in space and time. TL was calculated assuming a constant isotopic enrichment of 3.4‰ using the following equation (Post, 2002):

$$TL_{species} = \left[\frac{\delta^{15}N_{species} - \delta^{15}N_{euphausiids}}{3.4} \right] + 2$$

With: $TL_{species}$: trophic level of the considered species according to season and year, $\delta^{15}N_{species}$: nitrogen isotopic ratio of the considered species according to season and year, and $\delta^{15}N_{euphausiids}$: nitrogen isotopic ratio of euphausiids according to season and year.

Values of $\delta^{15}N_{euphausiids}$ were 3.92‰ in spring 2004 and 2006, 3.32‰ in spring 2005, 5.03‰ in autumn 2004 and 2006, and 4.43‰ in autumn 2005. PCB data followed a normal distribution after log-transformation, according to the Shapiro-Wilk test ($p < 0.05$). Correlations between TL and ln-transformed PCB concentrations were highlighted using Pearson's correlation coefficient. Using these relations, food web biomagnification factors (FWMF) were calculated using the exponential of the slopes (Fisk et al., 2001). The influence of size on PCB levels was studied using Mann-Whitney U-tests. Relative proportions of PCB congeners groups were studied after constitution of congeners groups, depending on the number of chlorine atoms in the molecule as follow: tetra-chlorinated biphenyl, CB52; penta-chlorinated biphenyls, CBs 101+110+105+118; hexa-chlorinated biphenyls, CBs 132+153+156+128+149+138; hepta-chlorinated biphenyls, CBs 180+170+187. For each group, the sum of the congener concentrations was normalized by the sum of the concentrations of all analysed congeners ($\sum_{14}PCBs$). All statistical tests were performed using Statistica Software 6.1 and considered significant at $p < 0.05$.

3 Results

3.1 PCB concentrations

Mean concentrations of PCB on a wet weight basis, lipid and water contents in the various compartments of the hake food web were presented in table 1. Congener CB153 presented the highest concentration in all the species analysed. PCB concentrations varied considerably among species. Mean concentrations of CB153 ranged for example from 0.44 ng.g⁻¹ ww in phytoplankton to 20.73 ng.g⁻¹ ww in hake. A wide range of TL was found in the Gulf of Lions biota, with mean values ranging from 1 for phytoplankton to 4.01 for *G. niger* (table 1). Hake had the highest variability of trophic level (from 3.1 to 4.1) due to the large size range of individuals analysed (from 11 to 48 cm).

A principal component analysis was carried out to identify the main trends in PCB levels in hake and the different compartments of its food web (Fig. 1). A spreadsheet of the full data set was built using the determination of 14 PCB congeners in 10 different species of various size classes. Figure 1a illustrated the projection of vectors which represented the initial variables (the 14 PCB congeners) in the first principal plane, defined by the two principal axes which represented 89% of the total variance. The first axis (81% of the total variance) revealed the predominating importance of concentration level for the different congeners. In all cases, PCB concentration increased along the first axis from positive to negative values. An increase of a specific congener concentration involved an increase of all the others. The second axis (8% of the total variance) distinguished different congeners, according to their persistence. The less persistent congeners (i.e. CBs 52, 101, 110, 132, 149) appeared in the upper part of the plot, and the most persistent ones (i.e. CBs 180, 170, 153, 138) in the lower part. Concerning supplementary variables in Fig. 1a, trophic level and size class were negatively correlated to the first axis ($r = -0.55$ and $r = -0.75$ respectively), indicating a link between these variables and PCB concentration levels. Demersal and benthic species were negatively correlated to the second axis ($r = -0.56$), whereas pelagic species were positively correlated to this axis ($r = 0.56$), indicating a link between the ecology of species and PCB fingerprints, i.e. the relative proportions of the different PCB congeners. Observations were then plotted in the first principal plane (Fig. 1b). Individuals contributing to less than 5% of the variance were excluded. Species were clearly separated depending on their biological characteristics. Planktonic species and suprabenthic taxa were separated from fishes along the first axis and appeared less contaminated than fish species. Demersal and benthic fishes (i.e. *L. friesii*, *G.niger*, poor cod and hake) were distinguished from pelagic fishes (i.e. sardine, anchovy and blue whiting) along axis 2, and were characterized by lower proportions of low persistent congeners than pelagic species.

Table 1: Mean (+/- standard deviation) of water contents (%), lipid contents (% ww), trophic level (TL) and PCB concentrations (ng.g⁻¹ ww) in the various species of the hake food web from the Gulf of Lions. Supra. taxa = suprabenthic taxa.

n	Phytoplankton	Zooplankton	Supra. taxa	Pelagic fishes			Demersal fishes		Benthic fishes	
	3	6	4	<i>E. encrasicolus</i>	<i>S. pilchardus</i>	<i>M. poutassou</i>	<i>M. merluccius</i>	<i>T. minutus</i>	<i>G. niger</i>	<i>L. friesii</i>
Water (%)	89.80	92.30	88.65± 2.25	72.99± 1.63	67.23± 5.36	75.90± 1.23		75.03± 3.48	76.85± 0.37	75.45± 0.84
Lipid (%)	1.95± 2.45	4.61± 1.47	8.91± 5.99	13.66± 4.88	29.49± 15.99	11.18± 2.80	2.60± 1.46	4.31± 0.83	4.83± 0.32	8.56± 2.57
TL	1.00± 0.00	2.34± 0.17	2.71± 0.25	3.18± 0.27	3.36± 0.25	3.09± 0.12	3.64± 0.38	3.77± 0.15	4.01± 0.38	3.82± 0.10
CB52	0.08± 0.07	0.11± 0.09	0.10± 0.12	0.39± 0.33	0.50± 0.29	0.38± 0.09	0.62± 0.26	0.10± 0.09	0.19± 0.06	0.16± 0.13
CB101	0.16± 0.12	0.20± 0.12	0.40± 0.19	1.65± 0.45	0.94± 0.59	1.27± 0.29	1.82± 1.12	0.49± 0.41	1.03± 0.63	0.35± 0.31
CB110	0.22± 0.14	0.28± 0.10	0.53± 0.28	2.03± 0.49	2.50± 1.50	1.42± 0.50	1.38± 0.78	0.24± 0.21	0.48± 0.23	1.23± 1.18
CB149	0.32± 0.24	0.48± 0.30	0.87± 0.34	3.82± 0.74	5.40± 3.68	2.44± 0.53	7.66± 4.42	0.81± 0.59	4.23± 1.85	2.60± 2.52
CB118	0.17± 0.09	0.16± 0.09	0.33± 0.13	1.38± 0.35	1.58± 0.89	0.87± 0.45	3.11± 2.34	1.14± 0.80	1.37± 0.76	1.10± 1.12
CB153	0.44± 0.33	0.87± 0.55	1.75± 0.39	9.62± 2.19	12.19± 7.76	4.93± 2.56	20.73± 14.16	13.71± 9.35	17.02± 9.20	11.58± 12.49
CB132	0.12± 0.09	0.20± 0.13	0.32± 0.13	1.42± 0.24	1.99± 1.26	0.88± 0.25	2.37± 1.36	0.24± 0.16	1.66± 0.82	1.04± 0.98
CB105	0.07± 0.08	0.10± 0.06	0.17± 0.10	0.61± 0.49	0.76± 0.79	0.55± 0.36	2.58± 1.70	0.45± 0.24	0.48± 0.21	0.32± 0.24
CB138	0.32± 0.25	0.53± 0.29	1.09± 0.46	4.82± 0.70	7.11± 5.30	2.75± 1.05	16.25± 11.09	6.44± 4.36	8.08± 3.36	5.14± 5.01
CB187	0.15± 0.09	0.31± 0.22	0.64± 0.20	3.25± 0.82	3.78± 2.63	1.28± 0.82	6.12± 4.15	1.24± 1.20	6.62± 3.73	4.44± 4.45
CB128	0.05± 0.03	0.10± 0.09	0.15± 0.07	1.23± 0.53	0.92± 0.83	0.51± 0.33	0.87± 0.59	0.66± 0.44	1.19± 1.16	0.91± 1.08
CB156	0.02± 0.01	0.04± 0.02	0.06± 0.02	0.29± 0.16	0.30± 0.16	0.12± 0.06	0.44± 0.29	0.30± 0.18	0.32± 0.12	0.22± 0.14
CB180	0.19± 0.13	0.52± 0.38	0.66± 0.19	4.01± 0.97	4.70± 3.04	1.63± 1.25	9.64± 7.52	5.86± 3.89	7.85± 4.00	5.17± 5.74
CB170	0.11± 0.07	0.24± 0.17	0.27± 0.07	1.59± 0.26	1.97± 1.05	0.62± 0.40	4.47± 3.68	3.00± 2.18	3.45± 1.39	2.04± 1.87

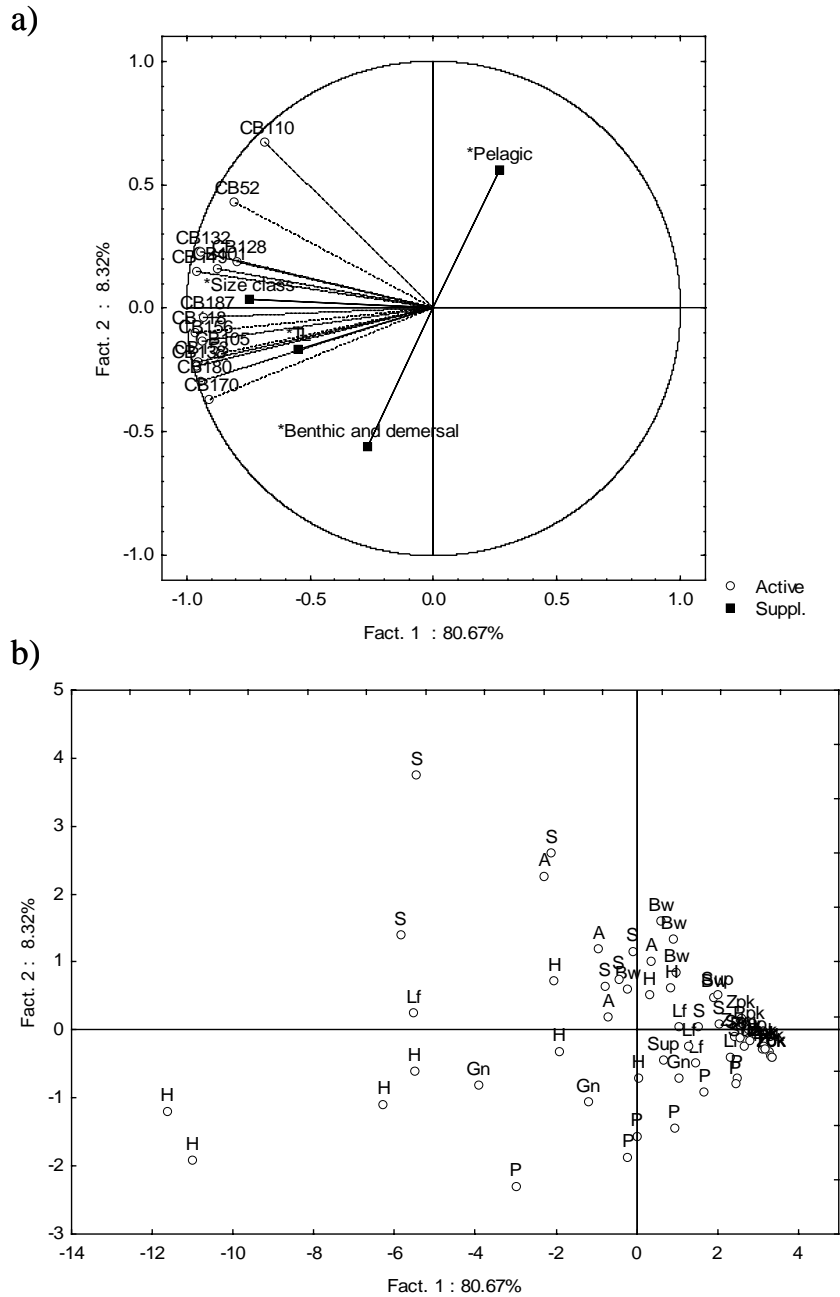


Figure 1: Principal Component Analysis of analysed PCB concentrations in organisms constituting the hake food web in the Gulf of Lions. (a) Projection in the first principal plane of the standardized variables (PCB congeners) and supplementary variables (TL, Size class, Pelagic species, Benthic and demersal species). (b) Plot of observations in the first principal plane. H, hake; Lf, *L. friesii*; Gn, *G.niger*; P, poor cod; A, anchovy; S, sardine; Bw, blue whiting; Sup, suprabenthic taxa; Zpk, zooplankton; Ppk, phytoplankton.

3.2 Influence of trophic level

Total PCB concentration on a wet weight basis was positively and significantly related to trophic level (TL) in the hake food web ($r = 0.76$, $p < 0.001$). PCB concentration in the different biota increased significantly with their increasing trophic position for all studied congeners (table 2), indicating biomagnification of all of them. The strongest correlation was observed for CB153 ($r = 0.81$), followed by CB 170 ($r = 0.80$), CB 180 ($r = 0.80$) and CB138 ($r = 0.77$).

Table 2: Statistical results of regression analysis between trophic level of sampled species as independent variable and log concentration (ng.g^{-1} ww) of the 14 PCB congeners and the $\Sigma_{14}\text{PCBs}$ as dependent variables, and food web magnification factors (FWMF). Value of log k_{ow} are from Hawker and Connell (1988).

Dependent variable	Log k_{ow}	Chlorine atoms	r	p	FWMF
CB52 (ww)	5.84	4	0.28	<0.05	0.466
CB101 (ww)	6.38	5	0.42	<0.005	0.613
CB105 (ww)	6.65	5	0.57	<0.001	0.933
CB110 (ww)	6.48	5	0.30	<0.05	0.422
CB118 (ww)	6.74	5	0.70	<0.001	1.016
CB128 (ww)	6.74	6	0.71	<0.001	1.146
CB132 (ww)	6.58	6	0.51	<0.001	0.839
CB138 (ww)	6.83	6	0.77	<0.001	1.354
CB149 (ww)	6.67	6	0.54	<0.001	0.906
CB153 (ww)	6.92	6	0.81	<0.001	1.449
CB156 (ww)	7.18	6	0.76	<0.001	1.132
CB187 (ww)	7.17	7	0.70	<0.001	1.253
CB180 (ww)	7.36	7	0.80	<0.001	1.420
CB170 (ww)	7.27	7	0.80	<0.001	1.373
$\Sigma_{14}\text{PCBs}$ (ww)			0.76	<0.001	

Food web magnification factor (FWMF) determined for PCBs was linearly related to TL (table 2). The highest FWMF values were found for CBs 153, 180 and 170, three congeners with a high log k_{ow} and a high chlorination degree. The lowest FWMFs were found for CBs 110, 52 and 101, three congeners with a low log k_{ow} and a low chlorination degree. A positive correlation was found between log k_{ow} and FWMF ($r = 0.85$; $p < 0.001$).

3.3 Influence of species ecology

To study relative proportions of PCBs in the hake food web from the Gulf of Lions, congeners were separated into four groups depending on the number of chlorine atoms in the molecule. Results were presented on figure 2. Hexachlorinated PCBs represented the highest proportions of PCBs in all species (from 50% in phytoplankton to 64% in *T. minutus*). In phytoplankton, the second highest group of PCB compounds was the penta-chlorinated biphenyls (27%), followed by hepta-chlorinated biphenyls (19%). In zooplankton, suprabenthic taxa and fishes, hepta-chlorinated biphenyls were generally the second dominant group, but with different percentages. Suprabenthic taxa presented PCB fingerprints close to those observed in zooplankton. In fishes, similar profiles were observed in species presenting similar ecology. Pelagic species (blue whiting, sardine and anchovy) contained higher proportions of tetra- and penta-chlorinated biphenyls, and lower proportions of hepta-chlorinated biphenyls, than demersal (hake and poor cod) and benthic species (*L. friesii* and *G. niger*). Moreover, demersal fishes presented higher proportions of tetra- and penta-chlorinated biphenyls and lower proportions of hepta-chlorinated biphenyls than benthic species. As a general pattern, total percentage of higher chlorinated PCB congeners (hexa- and hepta-chlorinated biphenyls) increased linearly with trophic level ($r = 0.91$, $p < 0.001$), and total percentage of lower chlorinated PCB congeners (tetra- and penta-chlorinated biphenyls) decreased linearly with TL ($r = -0.91$, $p < 0.001$).

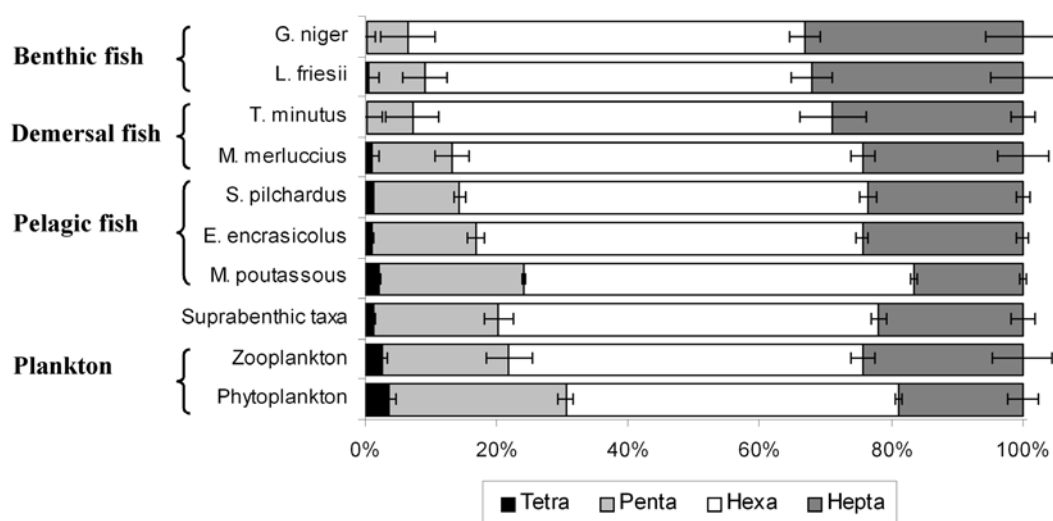


Figure 2: Relative proportions of PCB congener groups (tetra-, penta-, hexa- and hepta-chlorinated biphenyls) as percentages of $\sum_{14}\text{PCBs}$ in the hake food web from the Gulf of Lions.

3.4 Influence of size

The effect of size was investigated only in fish species presenting a large size range. In all fish species analysed, smaller individuals contained lower total PCB concentration than larger ones (Man-Whitney U-test, $p < 0.05$), as illustrated on figure 3 for the 4 PCB congener groups. Increase in PCB concentration with trophic level was observed in four of the five fish species studied. In sardine larger specimens presented a lower trophic level than the smaller ones, but this difference in TL was not statistically significant ($p > 0.05$). For both PCB concentrations and trophic level, the most important difference was observed between small and large hakes, due the high size difference between small (11-13 cm) and large (47-48 cm) specimens, compared to the other species size range (8-12 cm for small individuals to 13-17 cm for large ones).

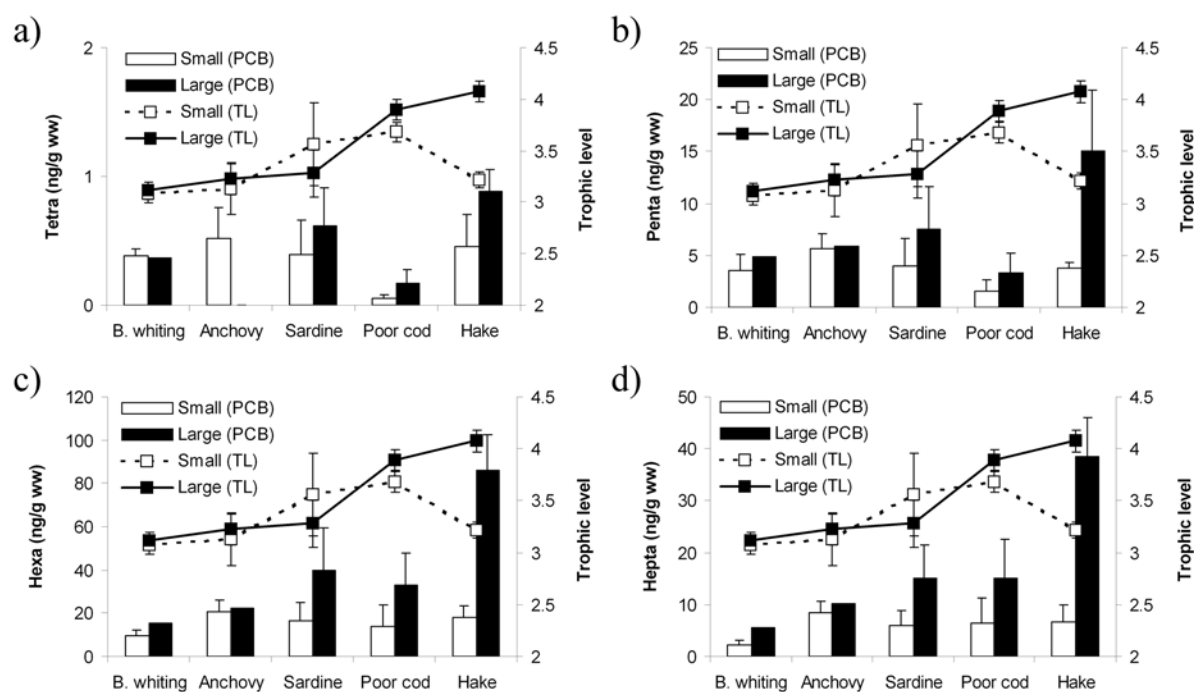


Figure 3: Concentrations of the 4 PCB congener groups (I, II, III and IV) ($\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ ww) and trophic level (TL) of small (8-12 cm) and large (13-17 cm) blue whiting, anchovy, sardine and poor cod, and of small (11-13 cm) and large (47-48 cm) hake.

Relative proportions of PCB groups in the different hake size classes were presented on figure 4. Hexachlorinated PCBs represented the highest proportions of PCBs in all hake size-classes (from 64.2 to 70.3%), followed by hepta-chlorinated biphenyls (from 19.4 to 28.6%), penta-chlorinated biphenyls (from 4.7 to 11.3%) and tetra-chlorinated biphenyls (from 0.4 to 3.0%).

However, relative proportions of PCB groups varied with hake size. Hepta-chlorinated biphenyls increased linearly with hake size ($r = 0.68$, $p < 0.05$), and tetra-chlorinated biphenyls decreased linearly with hake size ($r = -0.71$, $p < 0.05$).

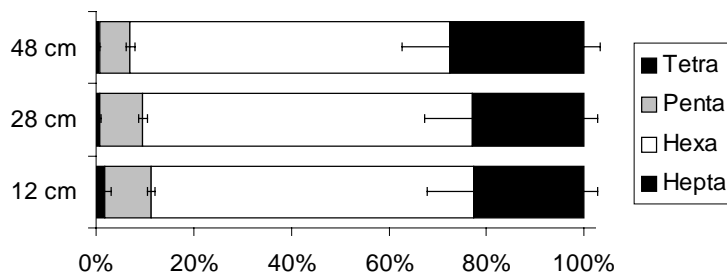


Figure 4: Relative proportions of PCB congener groups (tetra-, penta-, hexa- and hepta-chlorinated biphenyls) as percentages of Σ_{14} PCBs in the three hake size classes analysed.

4 Discussion

4.1 PCB concentrations

Although the Gulf of Lions is subject to high exposure of PCBs (Gomez-Gutiérrez et al., 2007), this study is the first to describe the bioaccumulation of these contaminants along a food web in this region. Located in the NW Mediterranean, the Gulf of Lions receives high freshwater inputs from the Rhône River, which drains heavily industrialized regions of southern France. The organisms analysed in the present study are known to be important components of the European hake food web in the Gulf of Lions (Ferraton, 2007). To our knowledge, no data was previously recorded on the PCB contamination of plankton and different fish species, considered as whole individuals, in this region. PCB levels measured in the plankton of the Gulf of Lions were similar to those measured by Berglund et al. (2001) in Swedish lakes, where wet weight concentrations range from 4.8 to 57 ng.g⁻¹ ww (Σ PCB) for phytoplankton of 10-45 μ m, and from 16 to 70 ng.g⁻¹ ww (Σ PCB) for zooplankton >150 μ m. However, these values were higher than PCB concentrations measured by Wong et al. (2004) in Lake Superior, that are 23 ± 10 ng/g lipid CB153 for phytoplankton (<102 μ m) and 21 ± 19 ng/g lipid CB153 for zooplankton (>102 μ m). Composition of phytoplankton changes between areas and seasons (Harmelin-Vivien et al., 2008), and these variations can influence the PCB concentrations measured. Due to the sampling method of this compartment (size-based selection), percentages of living phytoplankton in the material sampled can also differ among areas and season (Rolff, 2000; Harmelin-Vivien et al., 2008), influencing PCB levels.

Bodiguel et al. (2008) show that hake from the Gulf of Lions presented higher PCB concentrations than hake from the Bay of Biscay (NE Atlantic Ocean). However, PCB concentrations in hake from the Gulf of Lions are lower than those recorded in different top predators from the Mediterranean Sea, like tuna and swordfish (Stefanelli et al., 2002, 2004), shark (Storelli and Marcotrigiano, 2001) or Risso's dolphin (Storelli and Marcotrigiano, 2000). Difference in PCB concentrations among marine fishes and mammals from various Mediterranean locations are due in part to differences in biological parameters (diet, age, sex, metabolic capacity, nutritive and reproductive status), but also to the different levels of industrial and human activities of the sampling areas.

4.2 Influence of trophic level

Trophic transfer is an important PCB accumulation pathway in aquatic ecosystem, with longer food web resulting in higher PCB levels in top predator species (Thomann, 1989; Cabana and Rasmussen, 1994). Thomann (1989) estimates that the lake trout from Lake Michigan obtains 99% of PCB contamination by food consumption. A wide range of trophic level was found in the Gulf of Lions biota, with mean values ranging from 1 for the primary producers (phytoplankton) to 4 for a benthic species (*G. niger*). The relationship between trophic level and PCB concentration is widely used to understand the effects of trophic position on PCB biomagnification in marine food webs (Kidd et al., 1998; Fisk et al., 2001; Burreau et al., 2006; Bodin et al., 2008). PCB concentration in the different organisms of the hake trophic web in the Gulf of Lions increased with increasing trophic position for all PCB congeners studied, indicating biomagnification. Nevertheless, as regards of FWMF, all PCB congeners were not biomagnified in the same manner. High hydrophobic congeners (with a high chlorination degree and a high log *k_{ow}*) were the most biomagnified, and low hydrophobic congeners (with a chlorination degree and a low log *k_{ow}*) were the less biomagnified. Several authors describe the importance of congener hydrophobicity in the biomagnification ability (Fisk et al., 2001; Bodin et al., 2008). Moreover, the structure of congeners and their metabolizable potential provide a second explanation of their biomagnification degree. CBs 180 and 153 which were the most bioaccumulated in the food web are described as non-metabolizable by marine organisms (Kannan et al., 1995). Inversely, CBs 52, 101, and 110 which were the less bioaccumulated, are described by Kannan et al. (1995) as metabolizable by PB or MC-type enzymes (cytochrome P-450 1A or 2B subfamilies). Thus, in addition to trophic level, PCB biomagnification through food webs

is influenced by chemical properties of congeners like chlorination degree, hydrophobicity and metabolizable feature.

4.3 Influence of species ecology

PCB patterns showed an increased influence of higher chlorinated congeners and a decreased influence of lower chlorinated congeners, with increasing trophic level. Hexachlorinated PCBs represented the largest proportions of PCBs in all species studied. Due to their wide industrial production and their high bioaccumulation potential compared to other congeners (McFarland and Clarke, 1989), these congeners are also predominant in most of the bioaccumulation studies on zooplankton and suprabenthic taxa (Strandberg et al., 1998), crustaceans (Bodin et al., 2008), fish (Fisk et al., 2001; Ruus et al., 2002; Bureau et al., 2004), marine mammals (Muir et al., 1988; Hoekstra et al., 2003) and birds (Borga et al., 2005). According to Bodin et al. (2008), similar fingerprints are observed in organisms having the same feeding mode. In the Gulf of Lions, an increase in the proportions of high chlorinated congeners was observed from pelagic to demersal fishes, and then to benthic fishes in which high chlorinated congeners represented up to 90% of the total PCB concentration. Several mechanisms are susceptible to be at the origin of these variations. The first mechanism is the fractionation of PCB patterns along the food web due to differential assimilation processes that favor the retention of high chlorinated congeners from prey to predator. Gobas (1993) demonstrated experimentally that PCB composition patterns become enriched in more hydrophobic congeners in predators relative to their preys, as a result of a digestive fractionation in fish. This phenomenon can explain the observed fractionation between plankton and pelagic fishes because blue whiting, anchovy and sardine are planktophagous species (Palomera et al., 2007), and between pelagic fishes and hake, as hake mainly prey on pelagic fishes (Ferraton et al., 2007). A similar process occurs in the benthic food web from prey to predators up to benthic fishes, but is modified by their close relationship with the ^{15}N enriched organic matter of the sediment. Baker et al. (1991) observe that organisms that obtained PCBs from sediment are enriched in more highly chlorinated congeners, which was also observed in the present study. In contrast, organisms that are exposed mainly to dissolved PCBs or associated with settling aggregates, contain higher proportions of lower chlorinated congeners. Effectively, high proportions of low chlorinated congeners were observed in both phytoplankton and zooplankton in the Gulf of Lions. These organisms are small (high surface to volume ratio), thus uptake and elimination across the

body surface may be significant. For zooplankton, the dietary route (PCB adsorbed to phytoplankton) is also important (Borga et al., 2004), and may explain the higher proportion of high chlorinated PCBs and the lower proportion of low chlorinated PCBs in zooplankton compared to phytoplankton. In addition, another mechanism may also explain part of the variation observed in the relative proportions of PCBs, i.e. the different ability of organisms to eliminate PCBs (Boon et al., 1989). Crustaceans are described to possess strong PCB metabolic capacity, especially CBs 52, 101, 110, 132 and 149 (Kannan, 1995; Goerke and Weber, 2001; Bodin et al., 2008). This ability can affect PCB patterns in gobiids and poor cod, which feed mainly on benthic crustaceans (Joyeux et al., 1991; Morte et al., 2001).

4.4 Influence of size

In this study, size was used as a proxy of age. In all fish species, smaller individuals presented lower PCB concentrations than larger individuals. Such an increase in PCB concentration with size has been recently described in hake in the Mediterranean and the Atlantic (Bodiguel et al., 2008). Concerning the relative proportions of PCB groups in the different hake size classes, PCB patterns showed an increased influence of higher chlorinated congeners and a decreased influence of lower chlorinated congeners, with increasing hake size. In addition to the recalcitrance of high chlorinated congeners, the variation of diet hake during its life can also provide an explanation to this evolution. In the Gulf of Lions, suprabenthic fauna (mysids and euphausiids) dominated the diet of the smallest juvenile hake (<14 cm), and pelagic fishes (sardines and anchovies) of the largest juveniles (15 to 30 cm) (Ferraton et al., 2007). In addition to pelagic fishes, demersal fishes like poor cod complemented the diet of larger specimens (>30 cm) (Mellon et al., comm. pers.). The evolution of the relative proportions of PCB groups during the hake life varied according to those of its different prey types. Suprabenthic fauna presented higher proportions of low chlorinated PCBs and lower proportions of high chlorinated PCBs than pelagic fishes, and pelagic fishes presented higher proportions of low chlorinated PCBs and lower proportions of high chlorinated PCBs than demersal fishes. As diet is the main way of contamination by PCBs for fishes (Thomann, 1989), the evolution of the relative proportions of PCB groups during hake's life is a consequence of the evolution of its diet.

An increase in contamination level with size linked to trophic level increase in fish species was observed in the Gulf of Lions, as observed for perch by Olsson (2000). This relationship differed in sardine, in which larger specimens presented a lower trophic level than smaller

ones, as already described by Bode et al. (2004) for the North Iberian sardine. These authors observe a decrease in $\delta^{15}\text{N}$ in the muscle of *S. pilchardus* with size in individuals larger than 18 cm, as a consequence of a gradual increase in phytoplankton filter feeding with fish growth. Conway et al. (1994) report that larval sardines feed nearly exclusively on zooplankton, while adults ingest a significant fraction (>30%) of phytoplankton (Varela et al., 1990). Increase in trophic level is therefore not systematically linked with fish size and accumulation of PCB. Burreau et al. (2004) observe also no correlation between $\delta^{15}\text{N}$ and fish size in roach (*Rutilus rutilus*), perch (*Perca fluviatilis*) and pike (*Esox lucius*) from the Baltic Sea, and conclude that trophic position alone cannot be used to describe accurately biomagnification of PCBs in organisms.

Although both $\delta^{15}\text{N}$ signature and PCB level reflect the feeding of an organism, mechanisms differ between nitrogen fractionation and PCB accumulation. Nitrogen fractionation is linked to nitrogen metabolism and growth rate of the organism (Sweeting et al., 2007; Reich et al., 2008), and fish muscle $\delta^{15}\text{N}$ results of assimilated element integration at the scale of a few months (Maruyama et al., 2001; Suzuki et al., 2005). PCB accumulation results from difference between uptake and elimination processes, and observed PCB level is the consequence of the organism life cycle stage, especially for the most persistent congeners (Muir et al., 1988; Aguilar and Borrell, 2005). For example, growth acts as a pseudo-elimination process by mass dilution, and in the case of females, spawning leads to an elimination of organic contaminants via oocytes expulsion (Mackay and Fraser, 2000). These processes influence PCB level without interfering with nitrogen fractionation and trophic level.

5 Conclusion

We concluded that trophic level and specific feeding mode explain part of the variation observed in PCB concentration in the different compartments of the hake food web in the Gulf of Lions. Considering trophic ecology of the organisms is therefore important when discussing the variations in PCB concentrations and composition patterns between species. However, trophic interactions failed to explain all the observed variations in PCB concentrations. Chemical properties of congeners like chlorination degree, hydrophobicity and metabolizable feature, and biological factors, like growth, age, sex and reproductive status of individuals, affect also PCB bioaccumulation.

Acknowledgments - This work was partially funded by the Regional Council of Languedoc-

Roussillon with the programme SYSCOLAG. The Ifremer and ANR- ECCO-ECODYN Merlumed research programmes also supported this project. Thanks are addressed to the crews of the research vessels O/V Europe (Ifremer) and O/V Thetys II (INSU), and to J.C. Sorbe (CNRS Arcachon) and C. Salen-Picard (CNRS Marseille) for their help in collecting suprabenthic fauna.

DISCUSSION - CONCLUSION

Les mesures de PCB présentées ici sont les premières effectuées sur les espèces marines évoluant sur le plateau continental du golfe du Lion. A l'échelle de la Méditerranée nord occidentale, les niveaux observés chez les poissons sont comparables à ceux mesurés sur la côte catalane espagnole. Bien que les teneurs en PCB ne soient mesurées que dans la partie « mangeable » des poissons, les concentrations moyennes exprimées en somme de PCB (CB 28+52+101+105+118+138+153+180) dans les anchois et les sardines de cette zone (20.9 et 24.3 ng.g⁻¹ PF ; Bocio *et al.*, 2007) sont très proches de celles que nous avons mesurées chez ces espèces dans le golfe du Lion (22.5 et 27.8 ng.g⁻¹ PF). Nos mesures sont néanmoins inférieures à celles effectuées sur les poissons du golfe de Naples (mer Thyrrénienne). Les concentrations moyennes en CB153 dans les anchois et les merlus de cette zone (1216 et 1527 ng.g⁻¹ lipide ; Naso *et al.*, 2005) sont en effet 2 à 10 fois plus élevées que celles que nous avons mesuré chez ces espèces dans le golfe du Lion (117 et 797 ng.g⁻¹ lipide).

L'étude des isotopes stables du carbone peut être utilisée pour identifier les sources de matière organique dans les différentes espèces d'un réseau trophique (Pinnegar et Polunin, 2000 ; Grall *et al.*, 2006) et peut donc apporter des informations sur les voies d'entrée des contaminants organiques dans ces réseaux, puisque la voie trophique est majoritaire dans la contamination des poissons (Thomann, 1999). Le travail mené en 2007 par Ferraton sur la structure et la dynamique du réseau trophique du merlu du golfe du Lion présente les signatures isotopiques en carbone des juvéniles de merlu et de leur différentes proies (crustacés suprabenthiques, poissons benthiques, poissons démersaux et poissons pélagiques). Les résultats indiquent que toutes les espèces du réseau possèdent des signatures en $\delta^{13}\text{C}$ proches de la matière organique particulaire prélevée au maximum de chlorophylle. Cette matière étant majoritairement composée de phytoplancton marin : diatomées et dinoflagellés (Harmelin-Vivien *et al.*, sous presse, *cf.* annexe), il en déduit que le phytoplancton marin est la source principale de matière organique de tous ces organismes, ceci, quelles que soient les saisons étudiées (printemps et automne). Puisque la voie principale de contamination de ces espèces est l'alimentation, nous suggérons que le phytoplancton marin constitue la principale voie d'entrée des PCB dans le réseau. Selon Joiris *et al.* (1995), l'accumulation des PCB dans la matière particulaire en suspension (majoritairement constituée de phytoplancton dans leur étude) est principalement causée par l'adsorption des

PCB présents dans l'eau à la surface des particules, mais que l'absorption peut également être un mécanisme de contamination important pour le phytoplancton.

Par l'utilisation des signatures en $\delta^{15}\text{N}$ mesurées sur les principales espèces constituant le réseau trophique du merlu, nous avons montré que les PCB sont bioamplifiés le long de ce réseau (augmentation des concentrations en PCB avec le niveau trophique). Les résultats obtenus indiquent également que tous les congénères de PCB étudiés ne subissent pas la même amplification, car plus le niveau trophique est élevé, plus les profils sont dominés par les composés les plus chlorés. Par ailleurs, l'âge des différentes espèces (représenté par leur taille) influe également sur les niveaux en PCB chez les poissons, car une bioaccumulation de ces composés a été mise en évidence au cours de leur vie.

Enfin, l'écologie trophique apparaît comme un élément important à considérer lors de l'examen de la variation des concentrations en PCB entre les espèces d'un réseau trophique, mais n'explique pas à elle seule l'ensemble de la contamination observée. Une étude plus approfondie sur l'identification et la caractérisation des facteurs influant sur les niveaux en PCB apporterait donc une meilleure compréhension du phénomène de bioaccumulation des PCB chez les organismes marins.

CHAPITRE IV

Niveaux et processus de bioaccumulation des PCB chez le merlu Européen

INTRODUCTION

Le golfe du Lion est potentiellement exposé à la contamination par les contaminants organiques car cette région est très anthropisée et reçoit les apports du Rhône, fleuve dans lequel la présence des PCB pose des problèmes sanitaires (AFSSA, 2008). Néanmoins, bien que les PCB soient encore retrouvés en concentrations importantes dans les prédateurs supérieurs des réseaux trophiques marins (Bignert *et al.*, 1998 ; Nyman *et al.*, 2002), peu de données existent sur la contamination des poissons dans cette zone. Nous avons montré dans le chapitre 3 que les premiers maillons du réseau trophique du merlu du golfe du Lion sont faiblement contaminés par les PCB, mais que ces composés étaient bioamplifiés. Le merlu, prédateur supérieur de ce réseau trophique (Ferraton *et al.*, 2007) est ainsi exposé à d'importantes concentrations en PCB. Toutefois, les niveaux trophiques n'expliquent pas à eux seuls toutes les variations de contamination observées. Les résultats du chapitre 3 montrent que la taille des individus influe également les niveaux, et laisse supposer que d'autres paramètres peuvent aussi affecter le phénomène complexe de bioaccumulation des composés organochlorés. Le processus de bioaccumulation est en effet influencé par les propriétés physico-chimiques des composés mais aussi par les facteurs biologiques et écologiques spécifiques des espèces exposées, tels que l'habitat, le sexe, la reproduction ou encore l'état de santé des animaux (Connolly et Glaser, 2002 ; Bodin *et al.*, 2007 ; Di Bella *et al.*, 2006).

Au vu des résultats obtenus lors du précédent chapitre, il est donc apparu nécessaire d'étudier plus en détail les niveaux de contamination du merlu du golfe du Lion par les PCB, ainsi que l'influence des processus biologiques sur ces niveaux, afin de mieux appréhender leur devenir.

L'objectif de ce chapitre est donc double. Premièrement, effectuer un état des lieux de la contamination du merlu par les PCB. Ce premier travail est présenté sous la forme d'un article scientifique, présentant les niveaux et profils de PCB observés chez les merlus du golfe du Lion en comparaison à une autre population de merlus, celle du golfe de Gascogne. Ces niveaux sont également comparés à une autre famille de composés organohalogénés : les Polybromodiphényl ethers (PBDE). Ces composés sont encore utilisés dans l'industrie comme retardateurs de flamme et représentent également une préoccupation majeure (UNEP,

2001), car leurs niveaux dans les différents compartiments de l'environnement sont en augmentation (de Wit, 2002). Ces « nouveaux contaminants » présentent des propriétés physico-chimiques similaires aux PCB, et plusieurs auteurs décrivent leur présence dans l'environnement comme le « nouveau problème PCB » (de Wit, 2000 ; Siddiqi, 2003).

Le second objectif est de comprendre les relations existantes entre les facteurs biologiques et la bioaccumulation. Un second article présente les résultats obtenus en utilisant le merlu du golfe du Lion comme espèce modèle, et les PCB comme exemple type de composés organiques bioaccumulables. Les effets de la croissance, du sexe et de la maturité sur les niveaux de contamination ont été étudiés.

PARTIE I : Niveaux et profils de contamination des merlus par les composés organohalogénés

Classical and novel organohalogen compounds (PCBs and PBDEs) in hake (*M. merluccius*, L.) from Mediterranean and Atlantic coasts (France).

X. Bodiguel ^a, J. Tronczyński ^b, V. Loizeau ^a, C. Munschy ^b, N. Guiot ^b, A.M. Le Guellec ^a,
N. Olivier ^b, F. Roupsard ^a, C. Mellon ^c.

^a IFREMER, Département de Biogéochimie et Ecotoxicologie, Technopôle Brest-Iroise, Pointe du Diable, BP70, 29280 Plouzané, France

^b IFREMER, Département de Biogéochimie et Ecotoxicologie, Rue de l'Île d'Yeu BP 21105 44311 Nantes Cedex 03

^c IFREMER, Département Halieutique Méditerranéen et Tropical, bd. J. Monnet BP171, 34203 Sète Cedex, France

Environmental Toxicology 2008, Wit press, in press

Abstract

Levels of polychlorinated biphenyls (PCBs) and polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) were determined in the muscle and liver of European hakes (*Merluccius merluccius*, L.) from Mediterranean and Atlantic coasts (France). Liver was always the most contaminated organ by both groups of compounds. Hakes from the Gulf of Lions (Mediterranean) present concentrations of PCBs and PBDEs 1.6 to 13.5 times higher than hakes of a similar size from the Bay of Biscay (Atlantic). Although PCBs present higher levels compared to PBDEs, their concentrations were significantly correlated. The contaminant patterns in hakes were similar in the two studied areas, and were dominated by higher chlorinated PCBs (CB153, 138, 180 and 170), and lower brominated PBDEs congeners (BDE47, 100, 49, and 99). Concentrations globally increase with hake size, and males appear to be more contaminated than females at equivalent size. However, the compound levels depend also on the physiological status of fish.

Keywords - *Merluccius merluccius*, demersal fish, Polychlorinated biphenyls, Polybrominated diphenyl ethers, Gulf of Lions, Bay of Biscay.

1 Introduction

During the past decades, persistent halogenated compounds (PHCs) have been largely used and emitted to the environment. Two compound groups regularly found in marine biota are polychlorinated biphenyls (PCBs) and polybrominated diphenyl ethers (PBDEs). PCBs were used in a variety of products such as cooling and isolation fluids until they were banned in France in 1987. PBDEs are a class of additive flame retardants that are currently used in electronics, automobiles, textiles, and in building materials (de Wit, 2002). Besides of old deposits in sediments, PHCs continuing environmental emissions still occur, and may act as novel sources in exposure of marine organisms. Due to their high persistence, hydrophobicity and lipid propensity, they are accumulated in fat tissues of organisms and biomagnified along trophic webs (Boon et al., 2002 ; Burreau et al. 2004, 2006). Both compound groups may have adverse effects on fish (Holm et al., 1993). The European hake (*Merluccius merluccius*, L.) is widely distributed along Mediterranean and NE Atlantic coasts, and represents an important commercial interest (Alheit and Pitcher, 1995). With a high trophic level (Ferraton et al., 2007), this demersal fish is potentially exposed to the accumulation of PHCs. The main aims of this study were to determine the levels and chemical profiles of PBDEs and PCBs in different organs of hake (liver and muscle), and to compare this contamination between Mediterranean and Atlantic coasts of France.

2 Material and methods

2.1 Sampling

The study areas are the Gulf of Lions, and the northern part of the Bay of Biscay, two regions of the French coasts, fig.1. The Gulf of Lions, situated in the NW Mediterranean, is one of most important continental shelf in Mediterranean (Roussiez et al., 2005). It receives high freshwater discharges from the Rhône River watershed, which drains heavily industrialized regions of southern France. The Bay of Biscay, situated in the NE Atlantic, receives freshwater discharges from the Loire River, in western France. Hakes were caught during bottom-trawl cruises, on the continental shelves (between 50 and 120 meters depth), in spring 2001, spring 2002 and autumn 2002 in the Bay of Biscay, and in spring 2004, spring and autumn 2005 and autumn 2006 in the Gulf of Lions.

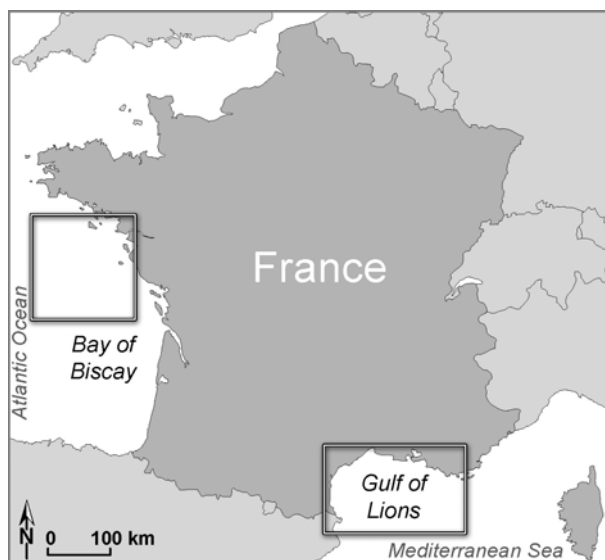


Figure 1: Map of the study areas.

A total of 94 hakes with total length (TL) from 10 to 70cm were sampled for organic contaminant analysis. 52 were analysed for both contaminant families, and 42 were only analysed for PCBs. Fish were primarily pre-treated in the laboratory for total body weight, TL, macroscopic sex determination and dissection of tissues to cut off organs (muscle and liver). Only specimens ≥ 25 cm TL were sexually differentiated. Muscles and livers were weighted and stored in pre-cleaned glass jars at -20°C . All sampled tissues were freeze dried, and grounded to obtain a fine homogeneous powder. Their water content was estimated from the weight lost after freeze drying.

2.2 Chemical Analysis

2.2.1 Sample treatment and analysis

The method used was already described for both PBDEs and PCBs analysis (Johansson et al., 2006, Bodin et al., 2007). Briefly, between 100mg and 5g dry weight (d.w.) of biological tissues were extracted with dichloromethane using a pressurised solvent extraction (ASE, Dionex Corp., CA) for the analysis of PBDEs and PCBs, or with hexane/acetone mixture (80:20) using SOXTEC, for only PCB analysis. The samples were spiked with recovery standards (BDE139, CB30, CB198 and CB209). The removal of co-extracted lipids was performed by gel permeation chromatography (GPC) on a laboratory prepared column (Bio Beads SX-3 200-400 Mesh, 460mm x 26mm column). The extracts were further purified and fractionated on a two layer silica/alumina column (H_2O 5% deactivated silica gel and

alumina) using hexane and hexane/dichloromethane (9:1) as an eluent. The extracts were finally treated with sulphuric acid to further remove remaining lipids.

Polybrominated diphenyl ethers were analysed by GC/MS in electron capture negative ionisation mode (ECNI) using methane as the reagent gas. The column was a DB-1, 15m × 248µm i.d. × 0.10µm film thickness (J&W Scientific), fitted with a 1-2m deactivated non-polar retention gap column. The ionisation voltage was about 170eV, set to the optimum by tuning. Spectra were recorded using selected ion monitoring at m/z 79, 81 and 161 for all PBDEs except BDE209 for which the 486 and 488 ions were recorded. The quantification were carried out using eight-level calibration curves in the 2-200pg range except for BDE209 which was calculated using a calibration curve in the 10-200pg range. Polychlorinated biphenyls CBs were analysed by high resolution gas chromatography fitted with two electron capture detectors (ECD), using two columns of different polarities: a DB-5 (5% phenyl-methylpolysiloxane) column of 60m x 0.25mm (film thickness 0.25µm), and a HT8 (8% phenyl-polysiloxane-carborane) column of 50m x 0.25mm (film thickness 0.25µm). Hydrogen was the carrier gas at a linear velocity of 27.6cm.s⁻¹. Concentrations were calculated by external multi level calibration regression in the linear range of the response of the detector. Whenever necessary two calibration curves were used to offset the non linear response of the ECD detector, i.e., the first in the range of 2-75pg and the second of 75-250pg of injected individual congeners. The standards added before the extraction were used as recovery surrogates, but concentrations were not corrected for recovery (Munsch et al., 2004).

2.2.2 Validation of analytical method

The overall internal QA/QC procedures included laboratory and field blanks, analyses of replicate samples for precision determination and the use of internal recovery standards added to each sample prior to extraction. Mean percent recoveries for the internal standards were 61 ± 10%, 86 ± 11%, 97 ± 10% for PCB congeners 30, 198, and 209, respectively and 94 ± 20% for BDE-139. Analyses of Reference Materials (CRM 349, SRM 2977 NIST and WMF-01 - Wellington laboratories) were routinely incorporated into the analysis of different batches of samples. The laboratory proficiency for CBs and PBDEs analysis is also evaluated through participation in the QUASIMEME (Quality Assurance of Information for Marine Environmental Monitoring in Europe) intercomparison exercises. The satisfactory z-scores are generally obtained for the CBs in biota samples (ex. 2006/2007 Quasimeme exercises z-scores ranged from -0.7 to 0.7 and from -1.7 to 0.2).

3 Results and discussion

3.1 Contamination levels

The present study focused on the levels of PBDEs and PCBs in muscle and liver of hakes caught in the Bay of Biscay (BoB) and in the Gulf of Lions (GoL). The systematic prevalence of the BDE47 and CB153 in all analysed samples allows using these compounds to illustrate the contamination levels of PBDEs and PCBs. Liver was always the most contaminated organ, with concentrations of BDE47 ranging between 3.1 and 28ng.g⁻¹d.w. in the BoB and between 2.7 and 65ng.g⁻¹d.w. in the GoL. For CB153, liver concentrations ranged between 55 and 567ng.g⁻¹d.w. in the BoB and between 59 and 2154ng.g⁻¹d.w. in the GoL. The liver concentrations were 5 to 69 times higher than muscle for BDE47, and 13 to 59 times higher than muscle for CB153. Muscle concentrations of BDE47 ranged between 0.09 and 0.57ng.g⁻¹d.w. in the BoB and between 0.42 and 6.1ng.g⁻¹d.w. in the GoL. For CB153, muscle concentrations ranged between 2.7 and 18ng.g⁻¹d.w. in the BoB and between 10 and 163ng.g⁻¹d.w. in the GoL. Compared to lipid-normalized concentrations of BDE47 reported by Boon et al. (2002) in cods from the North Sea (livers from 63 to 307ng.g⁻¹lipid and muscles from 26 to 74ng.g⁻¹lipid), the concentrations in same hake tissues from the Bay of Biscay (6.8 to 42.5ng.g⁻¹lipid in muscles and 7.4 to 25.2ng.g⁻¹lipid in livers) and the Gulf of Lions (3.7 to 91.6ng.g⁻¹lipid in muscles and 6 to 119.8ng.g⁻¹lipid in livers) are lower. Boon et al. (2002) also reported BDE47 concentrations in another fish species from the North Sea (for herring, livers from 19 to 52ng.g⁻¹lipid and muscles from 37 to 38ng.g⁻¹lipid, and for whiting, livers from 70 to 74ng.g⁻¹lipid and muscles from 26 to 28ng.g⁻¹lipid). The compound levels in muscles and livers caught in the GoL were systematically higher than levels in the BoB (between 1.6 to 11 times for BDE47 and between 1.7 to 13.5 times for CB153), fig.2. Kiviranta et al. (2003) suggested for herring from Atlantic and Baltic sea, differences in organohalogen concentrations may be caused by both, variation in exposure levels and in feeding habits of fish. However, the dietary intake is generally identified as the main pathway of fish contamination by the hydrophobic organic compounds. The higher levels of PHCs in Mediterranean hakes might be related to the Rhône River loads coming from urbanised and industrialised watershed in southern France. Furthermore, the riverine discharges are rather constrained into the Gulf of Lions, because of the low tidal dynamics, and thus resulting in possibly higher exposure levels in its marine habitats.

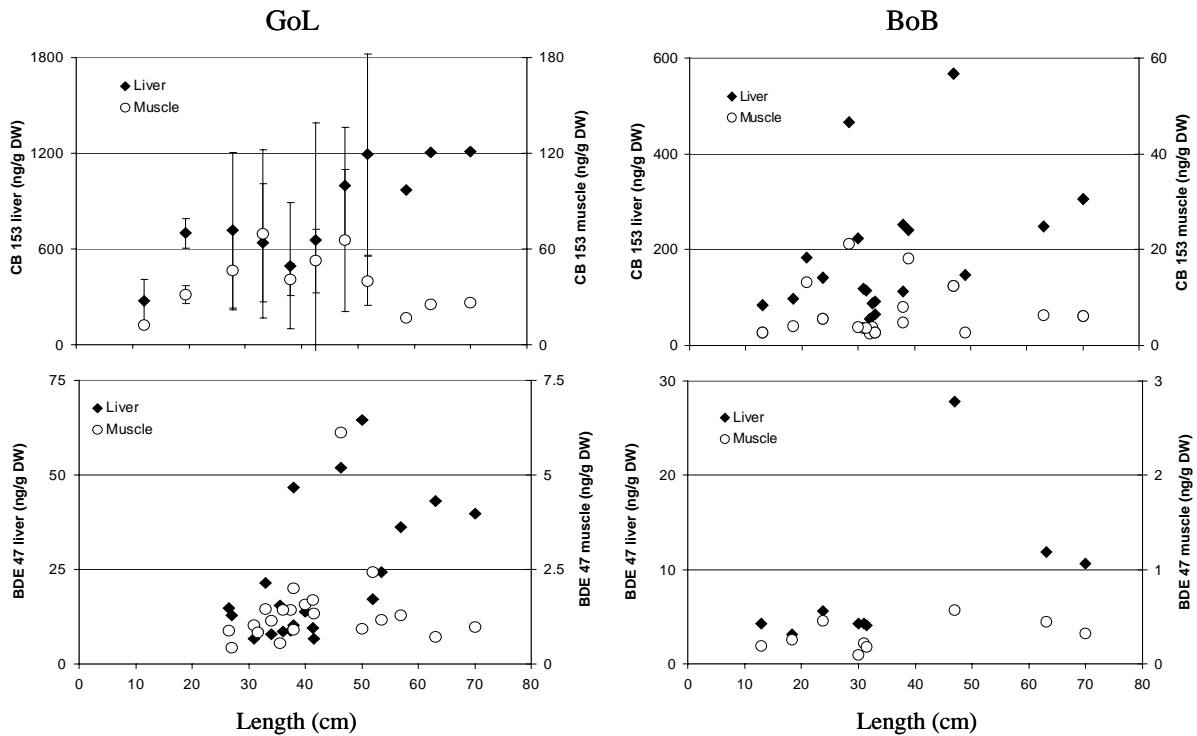


Figure 2: CB153 and BDE47 concentrations ($\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}\text{d.w.}$) in muscles and livers of hakes against hake lengths; fish samples from the Gulf of Lions (GoL) and the Bay of Biscay (BoB).

The concentrations of BDE47 and CB153 in hake muscles and livers versus the hake lengths show great variability, fig. 2. Despite this high variability, a tendency of compounds concentrations increase in liver with hake lengths may be distinguished. However, if all data are examined together, as presented in figure 2, this trend of contamination increase with fish length is not significant. Since fish length is directly related to fish age, the concentrations increase of CB153 and BDE47 with fish size is attributed to the bioaccumulation over time and storage of the compounds in lipids and their slow depuration rates by organisms. Previous studies showed also that PBDE and PCB levels increase with the age/size of fish (Parmanne et al., 2006; Loizeau et al., 2001). However, the high concentration variability in our set of fish samples suggests that length is not the only factor to act on the contamination levels. Indeed, a part of the variability may be due to a contamination difference between males and females. For instance, the levels of CB153 and BDE47 in livers of larger males (47-53cm TL) are higher than levels in female livers, fig. 3. This variation can be due to a female decontamination during spawning (Loizeau et al., 2001). Moreover, this phenomenon can be magnified by the lower growth rate of males (Recasens et al., 1998; Piñeiro and Saínza, 2003), so at equivalent size, they are older and have more bioaccumulated. This growth

dimorphism between sexes suggests that age is probably a more important factor than body size in the PBDE and PCB accumulation in hakes.

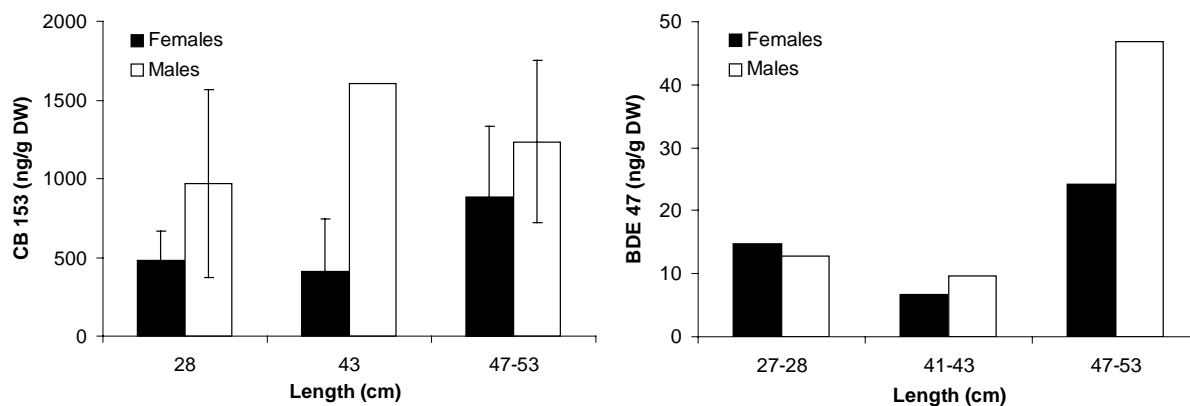


Figure 3: CB153 and BDE47 concentrations in liver of females and males from the Gulf of Lions.

The observed interindividual variability of contaminant levels may be also related to disparity in fish environmental habits, possibly leading to high dissimilarity in dietary exposure levels. Finally, other factors, such as variations in physiological conditions (reproduction, diet status, overall fitness) of the individuals have been also identified as being able to influence PHCs contamination in fish (Loizeau et al., 2001; van der Oost et al., 2003).

3.2 Contamination distribution

3.2.1 Contamination profiles

The contaminant patterns in hakes were dominated by lower brominated congeners. Among congeners, the predominant compound was always BDE47, followed by BDEs 100, 49, 99 and 154. Similar patterns have been also reported in fish previously (Law et al., 2006). Bodin et al. (2007) reported PBDE profiles in crustaceans from French coasts dominated by BDEs 100, 99 and 28. Even though PBDE profiles are efficiently transferred to fish *via* food (Isosaari et al., 2006), this pattern may be also influenced by debromination of some congeners in the intestinal tract of fish. According to dietary exposure studies on common carp (*Cyprinus carpio* L.), debromination converted BDE99 to BDE47 and BDE183 to BDE154 (Stapleton et al., 2006). However, in our study, no significant difference in PBDE patterns was observed in different organs of hakes from different regions (GoL and BoB), fig. 4.

Among PCB congeners, the higher chlorinated compounds were predominant. Patterns were dominated by hexachlorobiphenyls (CB153 and CB138), followed by heptachlorobiphenyls (CB180 and CB170). Due to their high octanol-water coefficients (K_{ow}), they are efficiently accumulated by marine organisms, and are considered persistent, due to chlorine substitution positions (Kannan et al., 1995). The CB153 and CB138 were also prevailing in another fish species (herring and salmon) from the Baltic Sea and the northern Atlantic (Burreau et al. 2006). However heptachlorobiphenyls (CB180 and CB170) can be found in lower concentrations than CB 118, a pentachlorobiphenyl. As for PBDEs, no significant difference of PCB patterns was observed in hake's muscle and liver sampled in different regions, fig. 4.

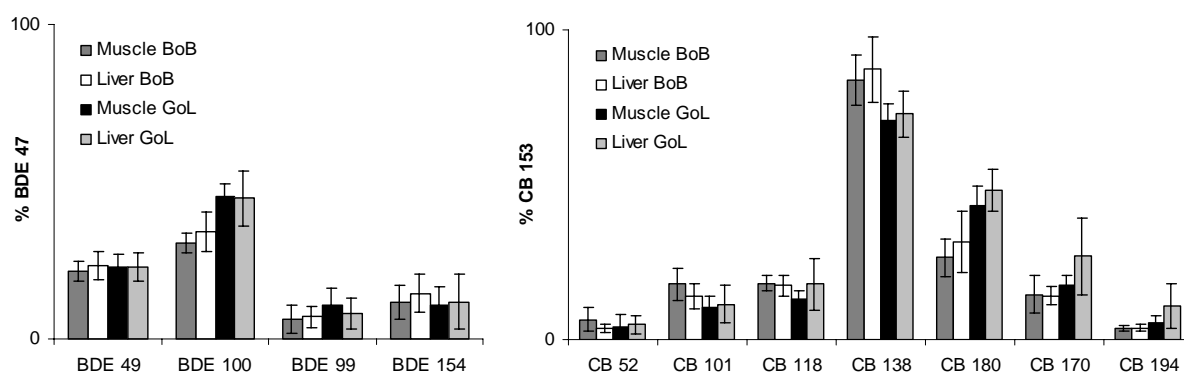


Figure 4: Concentrations of PBDE and PCB congeners normalised to the BDE47 and the CB153 in muscle and liver of hakes from the Bay of Biscay (BoB) and the Gulf of Lions (GoL).

3.2.2 PCB/PBDE correlations

Observed differences between PCB and PBDE concentration levels in hakes are in agreement with generally lower levels of PBDEs in the environment (Burreau et al., 2006; Johansson et al. 2006; Parmanne et al., 2006; Bodin et al., 2007). Even if the source emissions of PBDEs and PCBs are quite different, we attempted to correlate the CB153 and the BDE47 concentrations in our hake tissue samples. The CB153 concentrations in liver and muscle of hakes from the BoB and the GoL showed a strong correlation with the BDE47 concentrations, fig. 5. The significant BDE47/CB153 correlation tends to indicate similar bioaccumulation mechanisms in fish for both compounds.

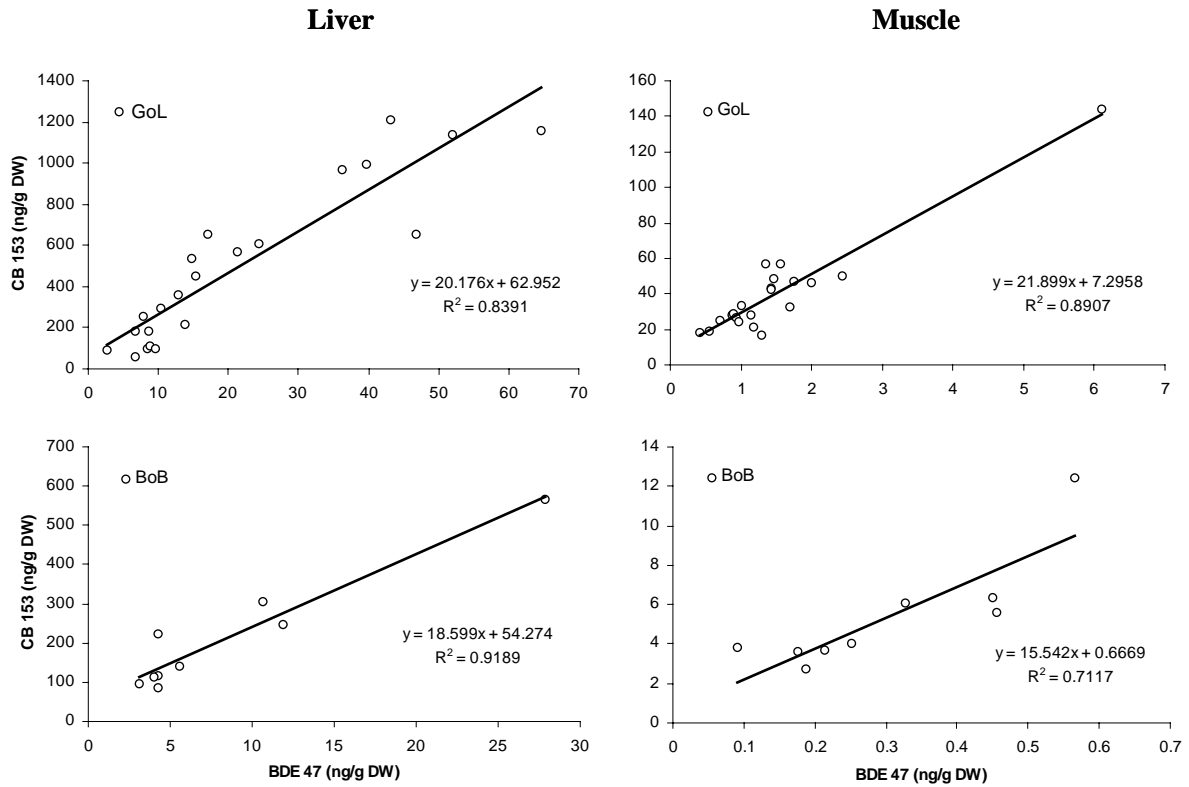


Figure 5: Comparison between CB153 and BDE47 concentrations ($\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}\text{d.w.}$) in liver and muscle of hakes from the Gulf of Lions (GoL) and the Bay of Biscay (BoB).

Acknowledgments - This work was partially funded by the Regional Council of Languedoc-Roussillon. Ifremer and Merlumed ANR- ECCO-ECODYN research programs also supported this project. We would like to thank the all crews of research vessels O/V Europe and O/V Thalassa (Ifremer), and O/V Côte de la Manche (INSU). The authors are grateful to Pierre Bodenes for drawing the map, Luisa Metral and Franck Ferraton for their laboratory assistance.

PARTIE II : Influence des paramètres biologiques sur les niveaux de contamination du merlu du golfe du Lion par les PCB

Influence of biological and physiological parameters on PCB concentrations in the European hake (*Merluccius merluccius*, L.) from the Gulf of Lions (N.W. Mediterranean)

Xavier Bodiguel ^{a,b}, Véronique Loizeau ^a, Anne-Marie Le Guellec ^a, François Rousard ^a,
Xavier Philippon ^a, and Capucine Mellon-Duval ^b

^a IFREMER, Département de Biogéochimie et Ecotoxicologie, Technopôle Brest-Iroise, Pointe du Diable, BP70, 29280 Plouzané, France

^b IFREMER, Département Halieutique Méditerranéen et Tropical, bd. J. Monnet BP171, 34203 Sète Cedex, France

Science of the Total Environment, submitted.

Abstract

The main objective of this work was to establish the influence of biological and physiological factors on the contamination of the demersal fish *Merluccius merluccius* by organochlorine compounds. Polychlorinated biphenyls (PCBs) and p,p'DDE were quantified in hake collected in the Gulf of Lions in 2004 and 2005. Contaminant fingerprints were roughly constant whatever the studied organ and the hake biological condition. The major factors acting on hake PCB concentrations were age, sex and maturity degree. Liver was always the more lipidic and contaminated organ. Results highlighted the importance of lipid content on the level of PCB contamination in the gonads, increasing with the maturation degree. Although the main storage organ was the liver, a PCB transfer from muscle to gonads during oogenesis was observed. Spawning seems to represent an important mechanism for the elimination of contaminants. Consequently, PCB bioaccumulation during the whole hake life was only observed in males.

Keywords - Bioaccumulation, PCBs, pp'DDE, *Merluccius merluccius*, Demersal fish, Mediterranean Sea.

1 Introduction

Polychlorinated biphenyls (PCBs) are a group of synthetic organochlorinated compounds which have been produced as commercial technical mixtures since the 1920s. They have been used in a wide scale of applications, such as coatings, inks, flame retardants and paints, but their major applications were in electric appliances, heat transfer systems and hydraulic fluids. PCB open applications were banned in many countries in the 1970s (Stockholm Convention, 2003) and their use in close systems (such as capacitors and transformers) was limited since the 1990s. However, their high lipophilicity and environmental stability make them to persist in the environment for long periods, involving a wide geographical distribution. These compounds are considered among the most dangerous pollutants because of their toxicity (Ahlborg and Hanberg, 1994; Loonen et al., 1996), stability, long biological half-life, and high liposolubility. They may also be bioaccumulated and biomagnified along food chains involving a wide range of trophic levels, with a potential risk for high trophic level predators (Borga et al., 2001; Fisk et al., 2001; Nfon and Cousins, 2006). The dietary intake, especially the consumption of marine organisms, is considered as one of the most important exposure source of PCBs for human population (Johansen et al., 1996; Pompa et al., 2003).

The European hake (*Merluccius Merluccius*) is an important ecological and commercial species in the ecosystem of the Gulf of Lions (N.W. Mediterranean). With a large spatial distribution from the coast to the continental slope, this species plays a fundamental ecological role in this area. This is a major focus for stock assessment on account that hake is the main commercial demersal species (Oliver and Massuti, 1995; Aldebert and Recasens, 1996) with catches principally taken on juveniles. Its bathymetric distribution, between 30 and 600 meters depth, depending on its length (Campillo et al., 1991). Hake goes up to the water column to eat, and its food is mainly made up of crustaceans and pelagic fishes depending on hake size (Bozzano et al., 1997; Cartes et al., 2004, Ferraton et al., 2007). In the Gulf of Lions, the spawning season runs throughout the year, peaking in autumn-early winter (Recasens et al., 1998). Although growth has been studied over a number of decades, age determination from recently tagged otolith readings in Atlantic (De Pontual et al., 2003; 2006) and from otolith microstructure readings in the Mediterranean Sea (Arneri and Morales-Nin, 2000; Morales-Nin and Moranta, 2004; Belcari et al., 2006) have called into question the previous results.

Due to a high trophic level, hake is potentially exposed to the bioaccumulation of organic compounds, especially in Mediterranean. In fact, this completely land-locked water is

polluted by extensive anthropogenic activities and is particularly exposed to this type of contamination. The bioaccumulation of organochlorine compounds is however a complex phenomenon ruled by both physico-chemical properties of compounds and ecological and biological factors such as feeding behaviors, habitat, age, sex or state of health of the animals (Paterson, 2003; Bodin et al., 2007a; Di Bella et al., 2006). The aim of this study was to understand the relationships between biological factors and bioaccumulation in hake (the target species) from the Gulf of Lions, using PCBs as organic contaminant model. We specifically studied the effects of growth, sex and maturity degree on PCB contamination levels.

2 Material and methods

2.1 Sampling

The study area is the Gulf of Lions, situated in the North Western Mediterranean Sea. This large continental shelf is exposed to important contaminant discharges from the Rhone River. The Rhone watershed represents about 130 000 km² and a quarter of France's population. Moreover, 20% of French industrial activities are located in this catchment area, as well as some other agricultural and tourist activities (Anon., 2000). As hake cannot be considered as a sedentary fish since it reaches increasingly deeper waters as it gets older, fish samples were caught on the continental shelf (between 30 and 120 meters depth) during three bottom-trawl cruises (May 2004-2005; October 2004) and at the edge of canyons (>150 meters depth) during gillnets cruise in October 2006. Moreover, a complementary sampling was carried out in 2006 by IFREMER at the Sète Auction market. A total of 104 hakes or hake pools, from 6 to 70 cm total length (TL), were collected for organic contaminant analysis.

2.2 Sample preparation

Preliminary sample pre-treatment steps were performed as soon as possible on receipt of the fish. Specimens larger than 25 cm TL were primarily pre-treated on board whereas the smallest individuals were processed in the laboratory. Pre-treatment included total body weight, fish gutted weight, total length, macroscopic sex determination and dissection of tissues to cut off organs (muscle, liver and gonads). Only specimens \geq 25 cm TL were sexually identifiable. Muscle, liver, as well as gonads were weighed and stored in pre-cleaned glass jars at -20°C . In the laboratory, all sampled tissues were freeze dried, and grounded to obtain a fine homogeneous powder. Their water content was estimated from the weight lost

during freeze drying. Finally, to obtain sufficient quantity of tissue powder to carry out contaminant analysis, each tissue, livers and muscles, of the smallest individuals (<25 cm TL) were pooled at each season per centimetric class.

2.3 Chemical analysis

PCB and pp'DDE analysis were carried according to the protocol described by Bodin et al. (2007b). Concisely, sample was extracted in a hot Soxhlet extraction apparatus (Soxtec) during 1.5 h with a hexane:acetone mixture (80:20). The amount of extracted fat was determined by gravimetric method. Then, two successive clean-up were performed on the extractable material. First, lipids and co-extractible material were destroyed by addition of concentrated sulphuric acid. Secondly, the cleaned extract was purified by adsorption chromatography on a Florisil column (Florisil, 60-100 mesh size, activated for 1.5 h at 500°C, deactivated with 3% of demineralised water) eluted with pentane. Finally, PCB congeners and pp'DDE were analysed by gas chromatography with electron capture detector, on a HP 5890 series II equipped with a CP-Sil19 capillary column (60 m length, internal diameter 0.25 mm, and 0.15 μm phase film thickness) following optimized conditions described by Jaouen-Madoulet (2000). Seven indicator PCB congeners were measured (CB28, 52, 101, 118, 138, 153, 180). However, the CB28 was always below the detection limit of $0.3 \text{ pg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ and was consequently not taken into account in the data analysis. A few other congeners were also analysed to describe a larger range of chlorination, from 5 to 8 chlorine molecules (CB105, 110, 128, 132, 149, 156, 170, 187, 194). They permit to check the appropriate resolution of the gas chromatography system, and could highlight underlying mechanisms acting on the distribution of organic contaminants in biota like bioaccumulation or biotransformation.

2.4 Quality control criteria

The calibration system was performed within a rather wide range using a six-point calibration curve to define the linearity range of our detector (ECD) for all contaminants. The relative precision of the method was checked for this type of sample by analysing five aliquots of a homogeneous tissue preparation of hake muscle. The results showed standard deviations of less than 10% for all congeners, which points to the good reproducibility of the method. During the analysis of the real samples, analytical blanks were systematically measured every ten samples. The blank concentrations were always below those the concentrations of the lowest standards of all congeners. Finally, 10 replicates of a reference material, BCR-CRM349 (Cod Liver Oil) were analysed in order to determine the accuracy of the method.

PCB recoveries varied between 74 and 125%, except for CB 105 which may interfere with a co-eluting compound. For p,p' DDE, recovery was 120 %. The concentrations of the real samples were not corrected as regards recoveries. Moreover, the RSD values ranged from 4 to 19 %, with a mean value of 10% for all PCBs. In the case of p,p'DDE, the RSD was 9 %. The results were in agreement with certified reference values and published data (Schantz, 1993). The protocol was validated by undertaking regular intercomparison exercises (QUASIMEME) in the laboratory.

2.5 Data analysis and statistical treatment

Hake growth in different areas is currently reconsidered (Garcia-Rodriguez and Esteban, 2002; De Pontual et al., 2006; Mellon-Duval et al., accepted). Consequently, hake age was calculate using recent data obtain in 2006 and 2007 by tagging experiments in the Gulf of Lions by Mellon-Duval et al. (accepted). From these two years recaptured data (n= 200), they calculate a first estimate of a new Von Bertalanffy parameter k, considering L_{∞} unchanged from previous estimate (Aldebert and Recasens, 1996) as follow:

Female: $L_{\infty} = 100.7$, $k = -0.236$; male: $L_{\infty} = 72.8$, $k = -0.239$.

The gonado-somatic index (GSI) commonly used to characterize the maturity phase of gonads of the hake was determined by the ratio between gonad weight and fish gutted weight.

A Principal Component Analysis was performed to facilitate the interpretation of the large set of data obtained throughout this study. Morphometric data were normally distributed, and PCB data followed a normal distribution after log-transformation, according to the Shapiro-Wilk test ($p < 0.05$). Then data on body weight, length, and PCB concentrations expressed in dry weight (dw) were subjected to correlation analysis using Pearson's coefficient. Additionally, the influence of size, sex, on PCB levels and fingerprints in hake were studying using Student tests. Statistical analyses were performed using Statistica Software 6.0. To estimate the relative part of PCB contamination in various organs, measured concentrations were expressed in quantity by organ. Total wet weight concentrations in whole individuals were defined using the following equation:

$$[153]_{ind} = \frac{([153]_{liver} * (1 - wl) * Wl) + ([153]_{gonad} * (1 - wg) * Wg) + ([153]_{muscle} * (1 - wm) * Wm)}{TW}$$

with: wl : % of water in liver ; wg : % of water in gonads; wm : % of water in muscle; Wl :

Liver; weight (g); Wg :: Gonad weight (g); Wm : Muscle weight (g); TW : Total Weight (g);

$[153]_{liver}$: CB153 concentration in liver ($ng \cdot g^{-1}$ DW); $[153]_{gonad}$: CB153 concentration in

gonad ($ng \cdot g^{-1}$ DW); $[153]_{muscle}$: CB153 concentration in muscle ($ng \cdot g^{-1}$ DW); $[153]_{ind}$:

CB153 concentration in whole individual (ng.g^{-1} ww). Total lipid concentrations in whole individuals were calculated with the same method.

3 Results and discussion

3.1 PCB concentrations and congener-pattern

All 15 PCB congeners and pp'DDE were quantified in more than 95% of the analysed samples. Concentrations and lipid contents (mean and range) of all determined congeners in muscle, liver and gonads of the European hake from the Gulf of Lions are reported in table 1. The dry weight concentrations of 2,2',4,4',5,5'PCB congener (CB153) ranged within the following intervals: muscle, 10 – 200 ng.g^{-1} dw; liver, 100 – 2500 ng.g^{-1} dw; gonads, 5 – 450 ng.g^{-1} dw. For all congeners, the highest levels were recorded in livers, followed by muscle, then gonads, except for some females, where gonads were more contaminated than muscle. In particular, livers were about 5.4 to 37 times more contaminated than muscles and about 4.6 to 71 times more contaminated than gonads. To our knowledge, no data is available on the contamination of hake from the Gulf of Lions through PCBs. At the scale of NW Mediterranean, our values were lower than those reported by Naso et al. (2005) for hake from the Gulf of Naples (Tyrrhenian Sea). Mean CB153 concentration in hake muscle from this area (1527 ng.g^{-1} lipid) was approximately two times higher than our measurement in the Gulf of Lions (797 ng.g^{-1} lipid). The values were however 2 to 5 times higher than those reported for hake from Bay and Biscay (Bodiguel et al., 2008). When comparing to other fish species, the levels were comparable to concentrations observed in the deep sea fish *Mora moro* from the Gulf of Lions (Solé et al., 2001), but lower than those recorded in different top predators from the Mediterranean Sea, like tuna and swordfish (Stefanelli et al., 2002, 2004), shark (Storelli and Marcotrigiano, 2001) or Risso's dolphin (Storelli and Marcotrigiano, 2000). Furthermore, in the Mediterranean hake, the PCB fingerprints were characterized by the importance of the hexachlorobiphenyls, notably CB138 and CB153 which represent by far the major compounds of all samples, followed by heptachloro-biphenyls (CB180 and CB170). These recalcitrant congeners are also predominant in most biota (Boon et al., 1989), including marine organisms from the Mediterranean Sea, such as monkfish (Storelli et al., 2004) tuna (Stefanelli et al., 2002) or swordfish (Stefanelli et al., 2004). Due to their high octanol-water coefficients ($\log K_{ow} > 6.5$; Hawker and Connell, 1988), they are accumulated by marine organisms and are not metabolised, because of chlorine substitution positions (Bright et al., 1995; Kannan et al., 1995).

Table 1 : PCB and pp'DDE concentrations (ng.g⁻¹ dw), lipid and water content (%) in hake tissues.

n	Undetermined sex						Males									Females											
	Muscle			Liver			Muscle			Liver			Gonads			Muscle			Liver			Gonads					
	29	29	29	26	26	26	26	17	49	49	45	49	49	45	49	49	45	49	49	45	49	49	45				
mean	min	max	mean	min	max	mean	min	max	mean	min	max	mean	min	max	mean	min	max	mean	min	max	mean	min	max	mean	min	max	
Water (%)	78,2	73,1	79,9	60,4	28,1	75,9	79,1	77,3	80,4	44,9	30,3	78,8	87,0	83,9	89,6	78,3	71,2	81,5	43,5	26,2	72,4	78,7	59,9	88,7			
Lipid (%)	3,6	2,1	4,7	43,8	17,1	67,5	5,7	1,1	10,8	69,3	37,1	88,7	9,9	8,2	11,2	6,2	1,0	13,9	71,9	23,6	95,1	16,8	2,8	27,5			
CB52	1,3	0,3	3,4	16,0	2,2	40,8	1,5	0,0	4,5	19,3	2,1	39,8	2,8	0,7	7,8	1,3	0,3	3,4	16,0	2,2	40,8	6,3	0,0	22,0			
CB101	3,6	1,3	15,9	61,3	6,9	248,6	5,3	1,1	12,2	90,0	13,2	222,8	3,8	1,4	6,7	3,6	1,3	15,9	61,3	6,9	248,6	11,6	0,8	62,3			
DDE	17,3	1,3	65,8	370,1	10,9	3052,1	32,1	3,4	110,1	654,8	52,3	2249,5	12,5	2,2	55,6	17,3	1,3	65,8	370,1	10,9	3052,1	104,0	0,0	1148,7			
CB110	3,8	0,3	12,6	65,7	3,6	222,0	4,2	0,7	11,0	79,4	9,9	215,7	3,3	1,1	6,2	3,8	0,3	12,6	65,7	3,6	222,0	14,7	0,0	81,8			
CB149	16,4	2,6	47,8	237,0	24,0	674,0	26,1	4,4	81,4	372,5	95,7	851,8	12,4	5,4	34,5	16,4	2,6	47,8	237,0	24,0	674,0	45,7	2,8	161,9			
CB118	5,9	0,8	18,1	104,0	19,8	380,9	9,3	2,3	28,1	161,9	40,4	414,0	3,3	0,3	6,5	5,9	0,8	18,1	104,0	19,8	380,9	18,7	0,0	91,2			
CB153	41,7	11,6	85,0	725,7	151,0	2628,2	71,9	10,8	200,9	1074,0	315,4	2276,8	26,0	9,8	53,8	41,7	11,6	85,0	725,7	151,0	2628,2	127,1	5,8	456,7			
CB132	5,1	0,0	13,7	78,9	16,8	187,6	8,0	0,2	27,7	121,2	25,9	296,2	3,2	0,0	7,3	5,1	0,0	13,7	78,9	16,8	187,6	15,6	0,8	56,2			
CB105	4,0	0,5	17,8	67,6	6,0	370,4	7,2	0,7	24,4	113,7	29,9	342,3	3,4	0,0	11,8	4,0	0,5	17,8	67,6	6,0	370,4	13,7	0,4	81,7			
CB138	31,1	6,4	116,4	527,0	105,5	2266,2	55,9	8,3	173,4	833,7	253,9	1890,6	16,3	0,1	41,4	31,1	6,4	116,4	527,0	105,5	2266,2	92,8	4,0	394,7			
CB187	14,6	4,1	50,4	226,2	28,6	797,9	22,8	3,6	68,3	328,0	66,4	696,5	7,4	0,0	18,3	14,6	4,1	50,4	226,2	28,6	797,9	38,6	1,9	164,4			
CB128	2,0	0,5	6,9	34,1	6,2	130,1	3,0	0,8	10,6	52,2	6,8	119,7	2,0	0,1	4,4	2,0	0,5	6,9	34,1	6,2	130,1	7,5	0,2	32,4			
CB156	1,0	0,3	3,0	20,1	5,1	81,9	1,4	0,4	4,1	26,1	5,0	67,5	1,1	0,0	5,3	1,0	0,3	3,0	20,1	5,1	81,9	3,5	0,2	16,9			
CB180	19,9	0,0	66,5	358,7	59,2	1337,0	32,4	5,2	87,8	522,5	44,8	1238,2	9,8	0,1	24,9	19,9	0,0	66,5	358,7	59,2	1337,0	56,4	2,2	292,3			
CB170	8,7	0,0	35,2	158,7	30,0	589,9	15,4	2,4	52,4	252,0	51,0	637,0	4,8	2,2	9,3	8,7	0,0	35,2	158,7	30,0	589,9	24,5	0,8	116,2			
CB194	2,6	0,0	10,4	47,5	0,0	172,3	4,0	0,0	14,2	77,3	17,5	200,8	1,2	0,0	3,0	2,6	0,0	10,4	47,5	0,0	172,3	6,9	0,0	31,1			

3.2 Interrelations between samples

Concentrations of 15 PCB congeners and p,p'DDE were measured in different organs (muscle, liver and gonads when possible) of 104 hakes. Those 48 parameters were determined in hake samples varying with biological characteristics, corresponding to various size, gender, sexual maturity or lipid fraction, leading to a very large data base. PCA (Principal Component Analysis) was performed on these data (104 x 48) in order to look for interrelations between samples and to compare their contaminant fingerprints, to give a more integrated picture of the contamination in hake from the Gulf of Lions. Chemical analyses contributing to less than 5% of the variance were excluded. The results of PCA are presented in a first plan, named loading-plot, which is defined by the first and the third principal component axis that together retain 55.6% of the variability (fig. 1).

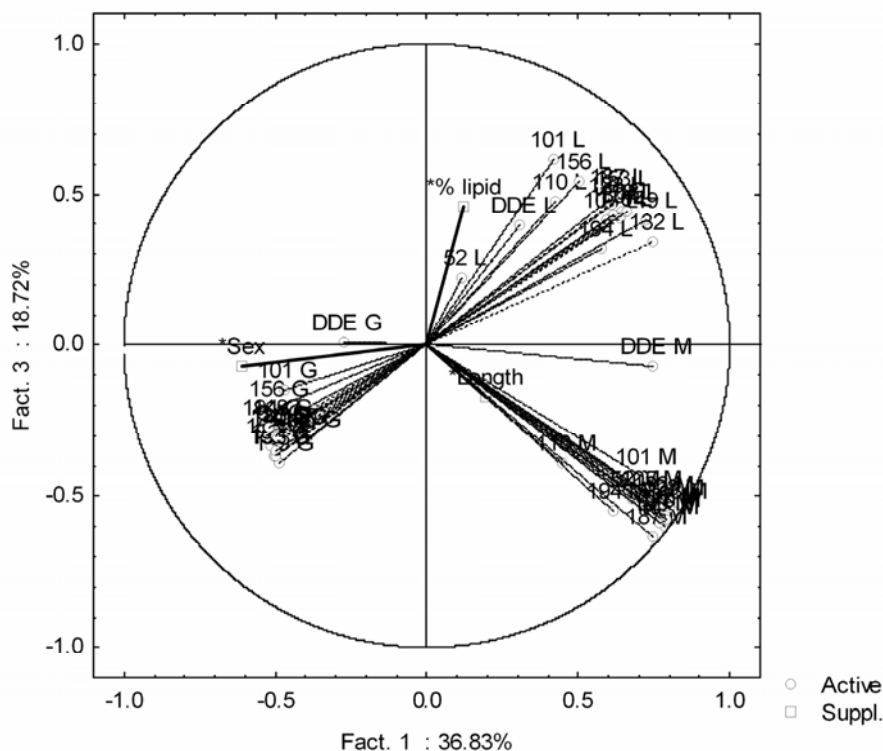


Figure 1: Principal Component Analysis of analysed PCB concentrations in muscle (M), liver (L) and gonads (G) of the hake from the Gulf of Lions. Projection of the standardized variables (PCB congeners) and explicative variables (Sex, Length and % Lipid) in the principal plane.

Three large groups of variables appeared almost orthogonally. PCB congeners in liver and muscle were represented on the right side, and PCB congeners in gonads on the left side. In each group, all vectors which represent PCB congeners pointed towards the same direction, indicating that all congeners varied approximately all together in each organ. PCB levels in muscle seems correlated with hake size, whereas liver contamination is correlated with total lipid content, and gonads contamination with sex. These results highlight that the influence of the biological parameters like age (represented here by the size), sex and also lipid content on PCB levels, is not necessary the same function of the considered organ.

3.3 Contamination variation with size, age and sex.

One of the main result of the PCA was the influence of size on PCB levels in hake muscle. As all congeners are correlated, only one congener was used to illustrate the influence of biological parameters on PCB contamination. The CB153 was chosen for its systematic prevalence in all analysed samples. Significant positive relationship between body size and CB153 concentrations in the hake muscle was observed ($r = 0.30$, $p < 0.01$), both sexes included. This relationship was also significant for liver and gonads ($r = 0.43$, $p < 0.01$ and $r = 0.48$, $p < 0.01$ respectively). As described by several authors for other fish species (Mackay and Fraser, 2000), this concentration increase with size is due to the bioaccumulation property of PCBs, to their relatively resistance to biotransformation and to their slow depuration rates by organisms.

As regards of CB153 concentrations in muscle and liver, a significant difference was found between of males and females. When comparing total concentrations of CB153 related to hake size (fig. 2a) and to hake age (fig. 2b), the significant contamination variation observed at equivalent size between males and females is not observable at equivalent age until hakes reach 2.5 years. This result can partially be attributed to a difference in growth rate between the two sexes. Females are described as having a faster growth rate than males (Aldebert and Recasens, 1996; Morales-Nin, 1998). At the same length, males are therefore older than females and have bioaccumulated more PCBs than females. This observation suggest that age is a more important factor than body size in the PCB accumulation process (Muir et al., 2003; Vives et al., 2005).

When considering age, a significant relationship was only observed with total concentrations of CB153 in males. For females an increase of CB153 concentrations was comparable to males until 2-2.5 years (38-42 cm TL), and a decrease then occurred (fig. 2). As described by Loizeau et al. (2001) in sea bass, a depuration of PCBs can occur during spawning of female

hakes, and can give a complementary explanation of the contamination variation according to sex.

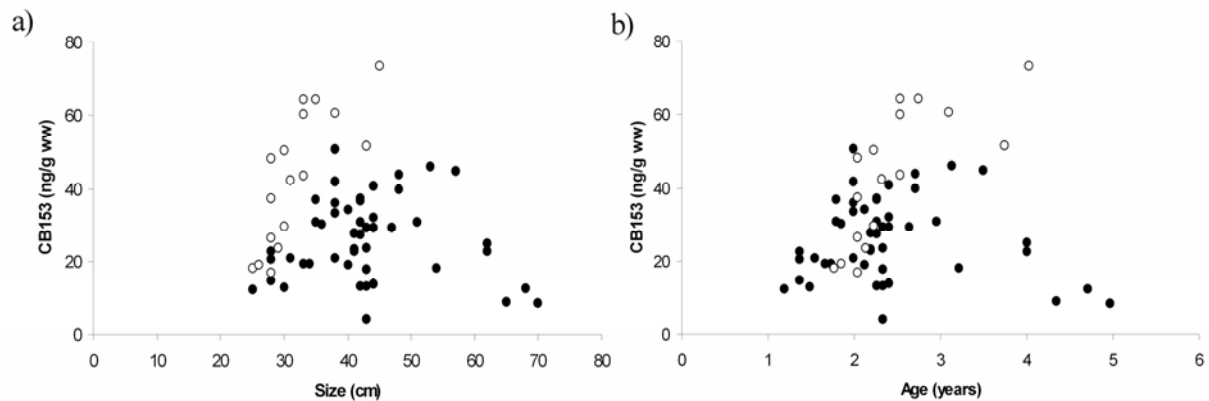


Figure 2: Relationship between CB153 concentrations in whole fish (ng.g⁻¹ ww) and a) hake size (cm), and b) age (years). Females and males are represented with black and white circles respectively.

3.4 Influence of maturity

As regards of the gonado-somatic index (GSI) commonly used to characterize the maturity phase of gonads of fish, the transition between the immature and mature stages occurred from 38 cm TL, with an increase gonadic index from less than 0.5% to more than 9% (fig. 3a). This result is in accordance with the study of Recasens et al. (1998), who describe the first maturity of 50% of females at 38 cm TL in the gulf of Lions. This transition was not observed in males. The increase of female GSI was coupled with an increase of PCB concentrations in gonads. Figure 3b shows that CB153 concentrations in female gonads jumped from less than 50 ng.g⁻¹ d.w. to more than 450 ng.g⁻¹ d.w., while CB153 concentrations in male gonads did not exceed 60 ng.g⁻¹ d.w. The evolution of PCB concentrations in gonads was then similar and positively correlated to GSI in females ($r = 0.65$, $p < 0.01$).

It appears that the mobilisation of PCBs toward gonads takes place during female maturation but not during that of the males. As a consequence, contaminants accumulated in the female gonads will be expelled during spawning, thus resulting in a relative depuration in females. Therefore, contamination differences between sexes were amplified due to contaminant depuration among females. The reproductive process has been also reported to decrease the body burden of persistent contaminants in various animals. The elimination of pollutants through spawning also occurs in other fish species (Swackhamer et al., 1988; Loizeau et al.,

2001), mollusks (Hummel et al., 1989), and crustaceans (Mcmanus et al., 1983 ; Bodin et al., 2007a). Previous observations on fish related to size also show higher PCB accumulations in males than in females (Olsson et al., 2000; Vives et al., 2005). Finally, the phenomenon of PCB bioaccumulation in males but not in females because of contaminant elimination during the reproductive process is also observed in aquatic mammals (Nakata et al., 1995).

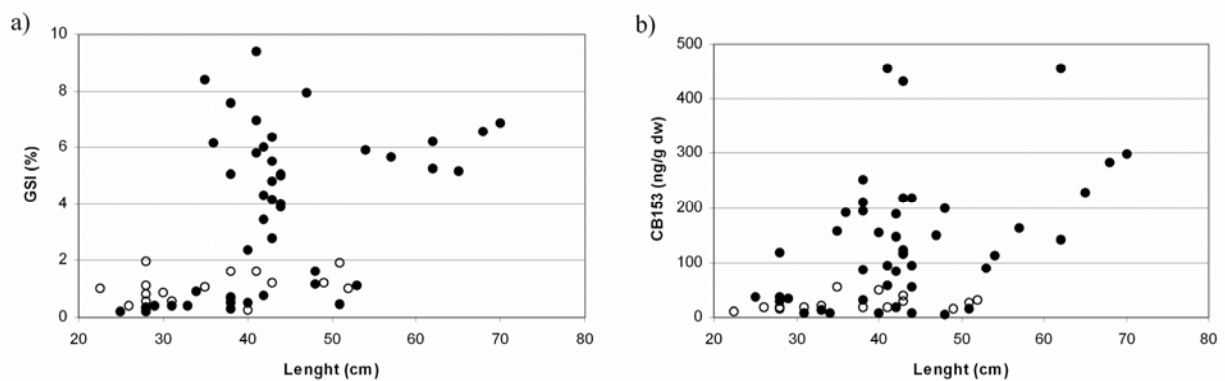


Figure 3: Relationship between body size (cm) and a) Gonadosomatic Index (GSI; %), and b) CB153 concentrations in gonads (ng.g-1 dw) for sexed hakes. Females and males are represented with black and white circles respectively.

3.5 Influence of lipid contents

It is generally accepted that PCBs enter in marine organisms with lipids of ingested food (Hites et al., 2004) and their distribution in organs and tissues are strongly influenced by their lipid contents (Henshel and Sparks, 2006 ; Antunes et al., 2007). In this study, lipid contents were determined in muscle, liver and gonads of females and males. They varied within broader intervals in gonads (7-30 %) and liver (20-88 %) than in muscle (1-13 %) (table 1).

In order to examine the influence of lipids on PCB concentrations, CB153 concentrations in each analysed tissue were plotted against its lipid content (fig. 4). In gonads (fig. 4a), lipid contents were correlated with CB153 concentrations in females ($r = 0.54$, $p < 0.01$), and a significant positive relationship between GSI and lipid content was also observed ($r = 0.86$, $p < 0.01$). Lipid contents and CB153 concentrations in male gonads were however always low. This result suggest that PCBs are mobilized into gonads linked to lipids during egg synthesis. In muscle (fig. 4b), the CB153 concentration in females varied linearly with lipids ($r = 0.37$, $p < 0.01$). This relation was however no significant in the case of male ($r = 0.32$, $p > 0.05$). In liver (fig 4c), CB153 concentrations were not correlated with lipids, either in males and females, and both lipid contents and CB153 concentrations were highly variables. This result

is in accordance to previous study on PCB in sardine from the Portuguese (Antunes et al., 2007). With a high lipid content, liver appears as the main storage organ in hake, as lipids constitute the main energy reserves in fish (Médale et al., 2003). Liver can then be considered as an energy buffer with a lipid content varying function of intake and expenditure energy. This feature can be at the origin of the poor correlation observed between lipid contents and PCB levels in hake because potential elimination of PCBs may not occur at the same time that lipids consumed.

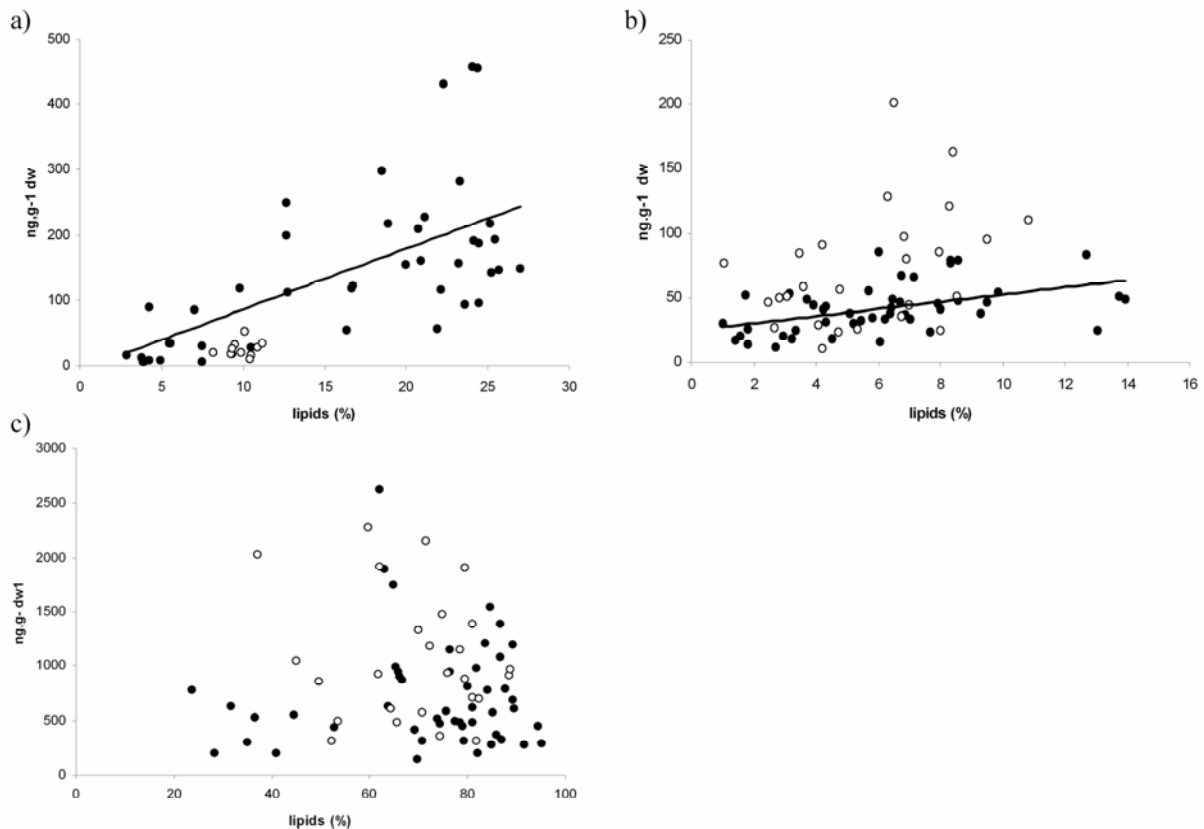


Figure 4: Concentration of CB153 versus lipid content (%) in gonads (a), muscle (b) and liver (c) of sexed hakes. Females and males are represented with black and white circles respectively.

3.6 Repartition and contamination levels function of maturity

Various stages of developments were defined to apprehend the relative distribution of PCBs in the different hake organs. Recasens et al., (1998) describe the first maturity length of 50% of individuals at 28.8 cm TL for males and 38.0 cm TL for females. This size can attain 50 cm TL for females. According to these results, six stages were considered: 1- The immature and

undetermined sex hakes (TL < 25 cm; n = 5) for which gonads are not taken into account; 2- The immature females (25 < TL < 35 cm; n = 5); 3- The mature males (TL > 28 cm; n = 6); 4- The females in their 1st maturity (n = 5); 5- The mature females > 50 cm TL with GSI > 5% (n = 3); 6- The mature females > 50 cm TL with GSI < 1% (n = 3).

Organ contribution to the total PCB body burden and total PCB concentration are presented in figure 5 in each stage, with the example of CB153. Results presented below for the CB153 are applicable to the other PCB congeners studied. CB153 concentration in whole fish illustrates the bioaccumulation phenomena for hake males and confirms the partial decontamination of females after the first spawning.

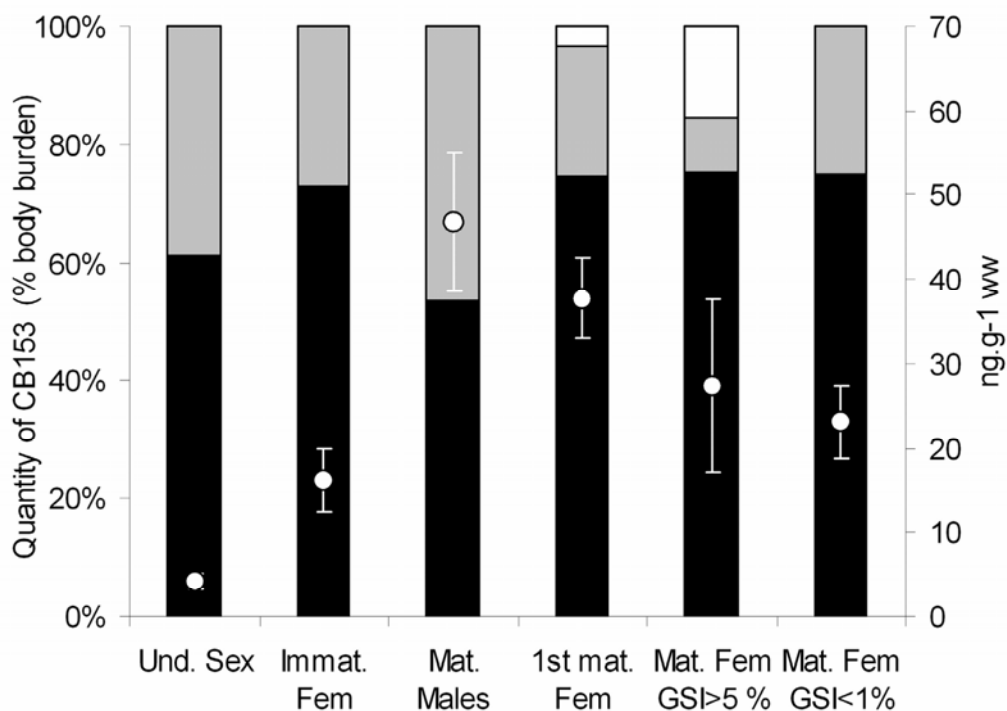


Figure 5: Organ contribution to the total CB153 body burden (%) in the six stage (liver is represented in black, muscle in grey and gonads in white) and CB153 concentration (ng.g⁻¹ ww) in whole fish (white circle).

For all maturity stages, liver was the major contributor to the total PCB body burden (50.6 – 80.5 %). However PCB distribution in tissues was different according to the considered maturity stages. Undetermined sex hakes and mature males presented the lowest PCB proportions in liver (61 ± 12 and 53% ± 7.7 respectively) and the highest in muscle (39 ± 6.1 and 46% ± 8.5) respectively). In females, PCB proportions in liver appeared relatively stable,

around 75% (± 3.03) of the total body burden, whatever the maturity stage. As expected, the PCB proportion in female gonads was higher in mature specimens than in immature ones. The PCB proportion in muscle appeared variable and complemented to gonads. This relation suggests that although the main storage organ is the liver, a PCB transfer from muscle to gonads occurs during gonad maturation of female, i.e. oogenesis. As suggested by Antunes et al. (2007) for sardines, this observation do not exclude a potential PCB transfer from liver to gonads, because an eventual PCB depuration of the liver could be compensate by compounds arriving via food. Finally, additional studies would be desirable to explain more in depth the transfer mechanism of PCB stored in the different organs to gonads.

4 Conclusion

This study presents variations of hake contamination by PCBs in the gulf of Lions. Observed levels appeared higher than the population of the Bay of Biscay and lower than the population of the Tyrrhenian Sea. Contaminant fingerprints were roughly constant whatever the studied organ and the hake biological condition. Results highlight that the influence of biological parameters like age, sex and also lipid content on PCB levels, is not necessary the same function of the considered organ. Liver was always the more lipidic and contaminated organ, but without correlation between PCB concentrations and lipid content. However, presented results highlights the importance of lipid content on the level of PCB contamination in the gonads, increasing with the maturation degree. Spawning seems to represent an important mechanism for the elimination of contaminants. Consequently, PCB bioaccumulation during the whole hake life was only observed in males. Although the main storage organ was the liver, a PCB transfer from muscle to gonads during oogenesis was observed. The results show the necessity of delineating the biological parameters and reporting them in chemical contamination study of marine fish and when conducting an ecotoxicological assessment of these toxic compounds. The processes such as growth, sex, maturity and reproduction cycle should be taken into account when modeling the bioaccumulation and biomagnification of persistent hydrophobic contaminants in fish.

Acknowledgments - This work was partially funded by the Regional Council of Languedoc-Rousillon. Moreover, we would like to thank the crew of the IFREMER boat "L'Europe" for making the sampling possible. The authors are also grateful to Pierre Bodenes for drawing the map, Mireille Harmelin-Vivien and Luisa Metral for their assistance.

CONCLUSION

L'étude menée sur la contamination des merlus par les composés organochlorés a révélé que la population du golfe du Lion présente des niveaux de contamination en PCB et PBDE 1,6 à 13,5 fois plus élevés que ceux mesurés chez les individus du golfe de Gascogne. Nous suggérons que l'importance des niveaux observés dans le golfe du Lion peut être liée aux apports de contaminants par le Rhône et la faible dynamique des marées dans cette zone, entraînant une exposition potentiellement élevée des organismes marins aux composés organohalogénés. Pour les deux familles de contaminants, le foie est systématiquement apparu comme l'organe le plus contaminé, et constitue donc l'organe cible de ces contaminants chez le merlu. Les empreintes globales de contamination des PCB et PBDE ne varient néanmoins que très peu quels que soient la zone et l'organe étudié. Les profils sont dominés par les congénères de PCB les plus chlorés et les congénères de PBDE les moins bromés. Bien que les PCB présentent des niveaux plus élevés que ceux des PBDE, les concentrations en BDE47 et en CB153 sont significativement corrélées. Ce résultat semble indiquer des mécanismes de bioaccumulation similaires de ces deux composés dans les poissons.

L'analyse plus détaillée menée sur les processus de bioaccumulation des PCB chez les merlus du golfe du Lion a révélé l'influence de plusieurs paramètres biologiques et physiologiques sur les niveaux observés. Ainsi, l'augmentation des niveaux de contamination avec la taille montre une bioaccumulation des PCB au cours de la vie des merlus. Le sexe est également un des facteurs biologiques prédominant, en raison d'une part de la différence de croissance entre les mâles et les femelles, et d'autre part, des pertes de contaminants engendrées par la reproduction. Cette décontamination des femelles via la ponte semble liée, au moins en partie, à la mobilisation des PCB présents dans le muscle vers les gonades au moment de leur maturation. Ce transfert s'effectuerait de manière similaire à celui des lipides. Toutefois, afin de valider et préciser cette hypothèse, il serait nécessaire d'étudier la mobilisation des PCB dans les femelles matures au cours d'un échantillonnage saisonnier qui permettrait de suivre de manière temporelle le cycle de la reproduction et les changements biochimiques que celui-ci est susceptible d'engendrer dans l'organisme. Les niveaux de contamination en PCB sont donc fortement influencés par les facteurs biologiques (âge, sexe) et physiologiques (degré de maturité) qui ont une action variable en fonction du stade de vie de l'animal.

Ces résultats suggèrent la nécessité de prendre en compte les facteurs biologiques et physiologiques lors de la conduite d'une évaluation de la contamination de poissons par des contaminants organiques persistants. L'influence des différents facteurs biologiques est cependant complexe, car nous avons vu qu'elle peut évoluer en fonction du sexe et du stade de vie de l'animal. Une telle complexité est difficile à appréhender par une approche statistique classique. Afin de réaliser une description quantitative et une hiérarchisation des processus influant sur la bioaccumulation des PCB aux différents stades de vie du poisson, l'approche modélisation semble pertinente.

CHAPITRE V

Modélisation de la bioaccumulation des PCB chez le merlu

INTRODUCTION

Les études menées sur les mécanismes de bioaccumulation des POP décrivent une influence importante des processus physiologiques sur les niveaux de contamination des organismes marins (Gobas *et al.*, 1993 ; Mackay et fraser, 2000 ; Bodin *et al.*, 2007). Au cours des précédents chapitres, plusieurs de ces processus ont été identifiés comme sources de variation des niveaux en PCB observés chez le merlu du golfe du Lion. Lors du chapitre 3, nous avons montré que le niveau trophique et le mode alimentaire sont des facteurs explicatifs aux niveaux de PCB rencontrés dans le réseau trophique du merlu. L'influence d'autres facteurs biologiques tels que la croissance, le sexe et la reproduction sur les niveaux de contamination en PCB des merlus a été mise en évidence dans le chapitre 4. Les facteurs influant sur la bioaccumulation des PCB chez le merlu sont donc nombreux, et il est difficile de hiérarchiser leur importance relative par une approche statistique classique, d'autant que leur influence peut varier en fonction des stades de vie du poisson. L'élaboration d'un cadre méthodologique intégrant cette complexité est néanmoins essentiel dans une démarche de compréhension plus globale. L'outil de modélisation est décrit comme dépassant l'approche statistique, en permettant de tester des hypothèses, identifier et hiérarchiser les variables pertinentes, et finalement prédire l'évolution d'un système sous différents scénarios.

Lorsqu'on tente de modéliser un phénomène naturel, l'objectif n'est pas de le reproduire dans ses moindres détails car c'est tout simplement impossible, mais d'en obtenir une image suffisamment représentative sur laquelle il est possible de s'appuyer pour pouvoir répondre à une ou plusieurs questions précises. Dans cette étude, l'objectif est de construire et paramétrer un modèle de bioaccumulation qui puisse servir d'outil de recherche ainsi que de base à un modèle prédictif de l'exposition du merlu aux PCB et à ses effets. Il est ici question de tenter de quantifier les apports et l'élimination des PCB durant toute la vie d'un merlu, afin de mieux caractériser le devenir de cette famille de contaminants chez cette espèce. Pour cela, et compte tenu des résultats obtenus précédemment, la biologie et la physiologie du poisson doivent être pris en compte. Par ailleurs, ce modèle devra être suffisamment générique pour permettre son application à d'autres contaminants ou d'autres espèces.

PARTIE I : Choix du modèle

1 Rappel des principales approches utilisées pour la modélisation de la bioaccumulation des PCB

Plusieurs approches de modélisation ont été développées pour comprendre, quantifier et hiérarchiser les phénomènes de bioaccumulation. Selon Mackay et Fraser (2000) et Arnot et Gobas (2006), deux grands types d'approches peuvent être distingués. Le premier type de modèle est empirique et consiste à obtenir une régression entre le facteur de bioconcentration (BCF ; rapport entre la concentration du composé dans l'organisme et celle dans l'eau) et le log du coefficient de partage octanol-eau (K_{ow}), cette relation pouvant être utilisée pour prédire les niveaux de contamination. La seconde approche est mécanistique et décrit la cinétique des contaminants dans un organisme ou un réseau trophique. Landrum *et al.* (1992) suggèrent que ces modèles mécanistiques peuvent être divisés en deux classes : les modèles cinétiques à base physiologique et les modèles énergétiques.

1.1 Les modèles empiriques

La première avancée majeure dans la quantification de la bioaccumulation a été réalisée en 1971 par Hamelink *et al.*. Ils suggérèrent que la répartition des composés est en équilibre entre l'environnement et l'organisme. En 1974, Neely *et al.* utilisèrent pour la première fois des corrélations empiriques pour décrire les phénomènes de bioconcentration dans les organismes marins en se basant sur les propriétés physico-chimiques des contaminants. Par des expériences menées sur la contamination de truites arc en ciel par plusieurs familles de contaminants, ils obtinrent une corrélation linéaire entre le facteur de bioconcentration (BCF) et le log du coefficient de partage octanol-eau (K_{ow}) des composés étudiés, selon l'équation :

$$\text{Log BCF} = C_{\text{org}} / C_{\text{eau}} = 0.542 \log K_{ow} + 0.124$$

Cette approche fut ensuite reprise et affinée par de nombreux auteurs (Veith *et al.*, 1979 ; Mackay, 1982 ; Bintein *et al.*, 1993), et étendue à de multiples composés chimiques. Meyland *et al.* (1999) proposèrent une méthode détaillée pour prédire les BCF à partir des K_{ow} de 694 composés. Ils définirent plusieurs corrélations pour des composés ioniques et non-ioniques, dépendantes de la valeur du K_{ow} des composés. Les valeurs de BCF sont néanmoins apparues variables en fonction des durées d'expérimentation et des concentrations d'exposition. La

figure 1 présente une comparaison de différentes corrélations empiriques entre le log du K_{ow} et le log du BCF.

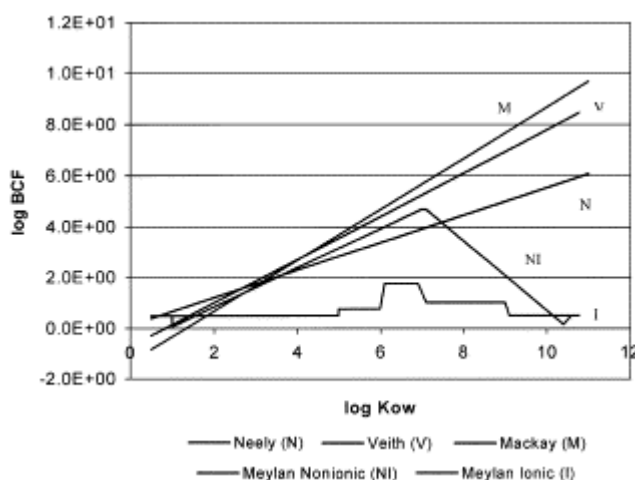


Figure 1 : Comparaison des corrélations empiriques entre le coefficient de partage octanol/eau (K_{ow}) et le facteur de bioconcentration (BCF), d'après Mackay et Fraser (2000).

Selon Mackay et Fraser (2000), ce type d'approche simpliste est nécessairement sujet à erreurs en raison de l'influence couplée de facteurs environnementaux et biologiques sur la bioaccumulation. Aucun taux de transfert entre l'environnement et l'organisme n'est en effet inclus dans les équations.

1.2 Les modèles d'équilibre de masse basés sur la physiologie

Avec les études croissantes sur la problématique du phénomène de bioaccumulation, un second type de modèle a été développé. Ces modèles sont basés sur des calculs d'équilibre de masse, et peuvent simuler l'accumulation d'un composé chimique dans un organisme marin en réponse à une exposition chimique. La forme générale des équations de bioaccumulation est bien définie. Ces dernières calculent le taux de changement de la concentration d'un composé dans un poisson (ou d'un autre organisme aquatique) par la somme des flux chimiques entrant et sortant de l'animal. Ces flux incluent l'assimilation directe à partir de l'eau, le flux de contaminant entrant par l'alimentation, la perte par les fécès et la métabolisation., Certains de ces modèles incluent également une dilution due à la croissance et des pertes par la ponte. Les différents flux sont schématisés dans la figure 2.

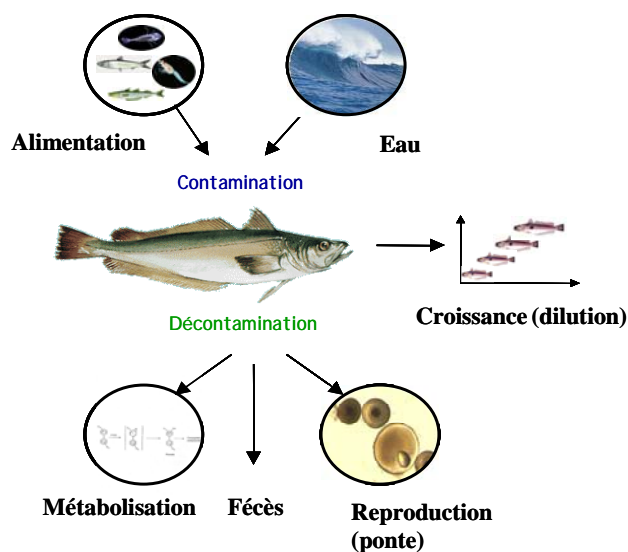


Figure 2: Schéma des processus pouvant affecter la bioaccumulation des contaminants chez les poissons.

Les modèles développés diffèrent par la spécificité des équations décrivant les flux de contaminants entrant et sortant de l'organisme. Barber *et al.* (1991) ont développé un modèle basé sur les échanges de PCB via l'alimentation et la respiration branchiales afin de quantifier les processus d'entrée de composés organiques non métabolisables par la nourriture et l'eau. Les paramètres du modèle incluent les propriétés physico-chimiques des composés ainsi qu'un certain nombre de traits physiologiques du poisson dont la structure et la taille des branchies. Le modèle a été appliqué à différentes espèces de poisson du lac Ontario pour étudier les voies de contamination par les PCB. En 1992, Thomann développa un modèle de réseau trophique considérant l'interaction des espèces avec le sédiment dans l'accumulation des composés. Ce modèle à l'équilibre comporte cinq compartiments biotiques, composés d'invertébrés benthiques et de poissons, avec quatre voies d'exposition possibles, caractérisant l'absorption de contaminants. Elles incluent l'ingestion de contaminants présents sur les particules associées au sédiment et au phytoplancton, et l'entrée de contaminant dissous dans la colonne d'eau et dans les eaux interstitielle par la respiration. La contamination par l'eau est proportionnelle au taux de respiration de l'organisme et au k_{ow} du composé considéré. Plusieurs auteurs ont repris les formulations de Thomann pour décrire la bioaccumulation des PCB dans différents réseaux trophiques, comme par exemple Loizeau *et al.* (2001) pour le réseau trophique du bar de l'estuaire de la Seine (Manche).

Un modèle basé sur la fugacité, c'est à dire la pression partielle des composés comme critère d'équilibre, décrivant les mécanismes d'entrée et de sortie des contaminants, a été développé par Clarke *et al.* (1990). Ils considèrent l'entrée des contaminants par l'eau et la nourriture, et les pertes par les fécès, la métabolisation de certains composés, et leur dilution par la croissance. Le transfert des contaminants dans l'organisme est décrit en utilisant le concept des résistances, elles même décrites comme proportionnelles au k_{ow} . Dans ce modèle, la résistance des branchies et de la membrane intestinale à l'eau et aux contaminants organiques sont considérées. Les équations décrivent donc le transfert des composés à travers les branchies et la membrane intestinale, ainsi que l'excrétion, la métabolisation et la dilution par la croissance. Le modèle considère également la biodisponibilité des contaminants dans l'environnement ainsi que la taille des poissons. Il a été appliqué à un réseau trophique du lac Ontario pour tester sa capacité à décrire le processus de bioamplification. Le concept de fugacité a également été repris par Gobas (1993), Campens et Mackay (1997) et Fraser *et al.* (2002) pour des applications dans plusieurs réseaux trophique du lac Ontario et de la mer de Barents.

Malgré une bonne description des phénomènes de bioaccumulation dans des conditions très diverses, les modèles d'équilibre de masse ont révélé une grande sensibilité aux valeurs des taux métaboliques, ainsi qu'aux densités de nourritures disponibles. De plus, les simulations du phénomène de métabolisation de certains congénères ainsi que celui de la ponte présentent certaines incertitudes. Ce type de modèle représente en effet tous les flux de matière et de PCB aux travers d'un organisme, la plupart du temps décrit par une seule équation différentielle pour la matière, et une seule pour les contaminants. Ceci a pour première conséquence qu'il n'est possible de simuler la métabolisation qu'un pas de temps après leur assimilation, lorsqu'une partie a déjà été excrétée. La deuxième conséquence est que la ponte ne peut être simulée que par une perte ponctuelle de matière à laquelle est associée une quantité arbitraire de PCB. En outre, l'absence de formulation physiologique explicite rend impossible toute compréhension mécanistique des effets toxiques des contaminants sur la physiologie de l'organisme. Pour affiner la représentation de ces phénomènes, il est donc apparu souhaitable d'affiner la représentation des différentes fonctions physiologiques des organismes, et d'appréhender la distribution et l'utilisation de la matière dans différents compartiments d'un organisme. Puisqu'il est difficile de quantifier les flux de masse entre les différents compartiments, une solution a été de représenter ces flux en unité d'énergie.

1.3 Les modèles bioénergétiques

L'énergie a été décrite comme la variable explicative privilégiée pour décrire l'évolution des traits physiologiques des organismes. En effet, tout organisme a besoin d'énergie pour assurer sa survie, son activité, sa croissance et sa reproduction. La bioénergétique est donc apparue comme le moyen d'interprétation des cycles de l'histoire de vie des organismes, par la description des principales fonctions physiologiques et de leurs interactions. Une telle conceptualisation a permis une description plus réaliste des phénomènes de bioaccumulation, ainsi que l'intégration d'effets toxiques des contaminants sur les organismes. Plusieurs types de modèles ont été développés sur cette base (Norstrom *et al.*, 1976 ; Luk et Brockway, 1997 ; Connolly et Gaser, 2002). Ils se distinguent par des formulations différentes de la gestion de l'énergie, c'est à dire par différents procédés d'allocation de l'énergie acquise.

Le plus répandu est le modèle de type « Scope for Growth » (SFG) (Bayne , 1998). Il part du principe que l'énergie acquise par l'alimentation est égale à l'énergie dépensée pour la maintenance, la croissance et la reproduction des organismes. Il prend en compte les variations de l'environnement (température, disponibilité en nourriture), et a pour cela été largement utilisé pour décrire la croissance de divers organismes marin dans leur milieu, en particulier les mollusques bivalves (Pouvreau, 2000 ; Flye Sainte Marie *et al.*, 2007). Il a également été utilisé pour décrire les effets toxiques de contaminants sur la croissance et la reproduction d'invertébrés benthiques (Malby and Naylor, 1990). Il est néanmoins peu générique, car spécifique à une espèce, souvent à une zone géographique, et est par ailleurs relativement surparamétré.

Une approche plus générique de type « Dynamic Energy Budget » (DEB) a été développée par Kooijman (1988, 1993, 2000). Cette théorie présente des lois mécaniques simples, décrivant les apports et l'utilisation de l'énergie issue de l'alimentation, et les conséquences pour l'organisation physiologique d'un bout à l'autre du cycle de vie d'un organisme, incluant la relation de l'énergie avec l'âge. Ce type de modèle utilise des équations différentielles pour décrire les taux auxquels les organismes assimilent et utilisent l'énergie de leur nourriture pour leur maintenance, croissance, reproduction et développement. Ces taux dépendent de l'état de l'organisme (age, sexe, taille statut nutritionnel etc ...) et des conditions de leur environnement (densité de nourriture, température...). Les solutions des

équations du modèle représentent "l'histoire de la vie" d'un organisme dans un environnement potentiellement variable (Nisbet *et al.*, 2000).

Le principe de l'utilisation de l'énergie est simple (figure 3). L'énergie extraite de la nourriture est stockée dans les réserves (lipides, protéines, carbohydrates), et est utilisée pour quatre destinations :

- La croissance, correspondant à l'augmentation de la biomasse structurale, principalement sous forme protéiques.
- La maintenance somatique, spécifiant l'énergie dépensée pour l'activité et le renouvellement des molécules.
- La complexification de l'organisme pour les juvéniles, et la reproduction pour les adultes
- La maintenance de la complexité de l'organisme.

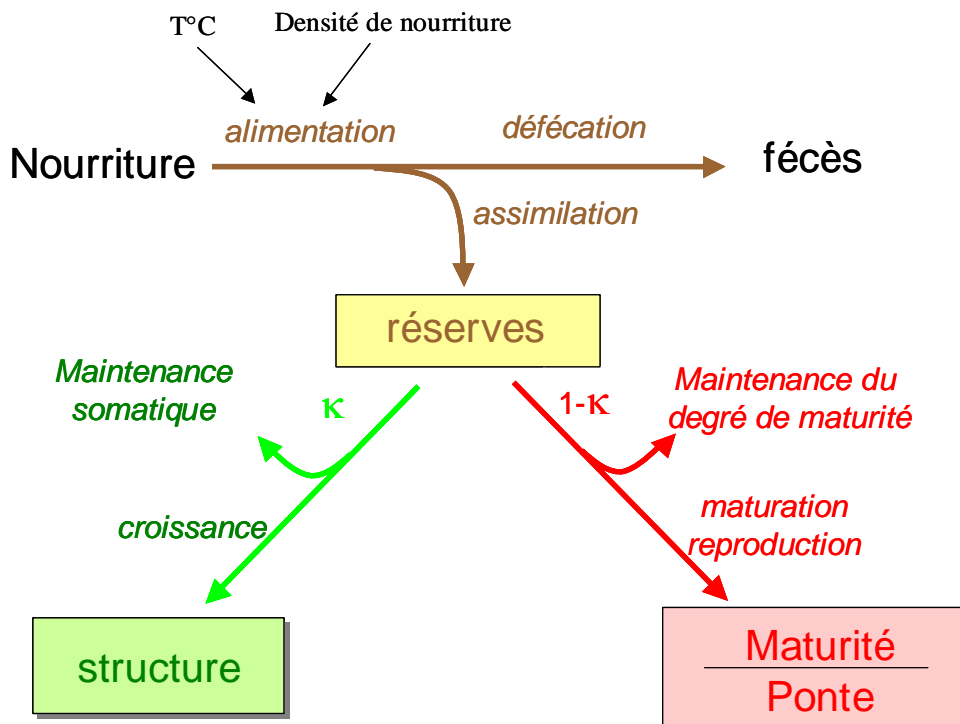


Figure 3 : Principe d'utilisation de l'énergie selon la théorie DEB (Kooijman, 2000).

Ce type de modèle a été utilisé pour décrire la croissance de nombreux organismes marins dont les poissons (van der Veer, 2001 ; Pecquerie, 2007), ainsi que pour étudier la cinétique de contaminants organiques tels que les HAP (hydrocarbures aromatiques polycycliques) et les PCB (Kooijman et Van Haren, 1990), et de contaminants métalliques (Casas et Bacher, 2006) chez la moule. Il a également été utilisé pour étudier les effets toxiques des métaux sur la croissance et la reproduction d'invertébrés (Péry *et al.*, 2002 ; Ducrot *et al.*, 2004).

2 Hypothèses et avantages de la théorie DEB pour cette étude

2.1 Hypothèses de la théorie DEB utilisées pour cette étude

De grandes règles régissent la quantification du flux d'énergie selon la théorie DEB. Elles ont été testées contre des valeurs expérimentales pour de nombreuses espèces et sont décrites par Kooijman (2000) comme s'appliquant à la plupart des espèces vivantes. Ces règles simples possèdent d'importantes implications dans le fonctionnement des organismes et définissent la gestion des flux d'énergie.

- Le modèle DEB spécifie les apports et l'utilisation de la nourriture par un animal comme un système dynamique à trois variables d'état :
 - la quantité de réserve,
 - le volume de la biomasse structurale,
 - le compartiment de réserve dédié à la complexité de l'organisme et à sa reproduction.

- Trois stades de vie sont distingués :
 - l'embryon, qui ne se nourrit pas et ne se reproduit pas ;
 - le juvénile, qui se nourrit mais ne se reproduit pas ;
 - l'adulte, qui se nourrit et se reproduit.

- A partir du stade juvénile, l'ingestion de nourriture est proportionnelle au carré de sa taille (surface d'échange avec son environnement), et dépend hyperboliquement de la densité de nourriture présente dans le milieu.

- Une partie de la nourriture est convertie en fécès, et une autre est assimilée sous forme d'énergie dans les réserves.
- La dynamique des réserves est de premier ordre, avec un taux d'utilisation inversement proportionnel à la longueur.
- L'énergie allouée pour la maintenance et la croissance somatique (augmentation de la biomasse de structure) est une fraction fixe de l'énergie écoulee par les réserves. Cette fraction est appelée Kappa (κ). La fraction $1-\kappa$ est allouée à l'augmentation de la complexité de l'organisme durant sa phase juvénile, à sa reproduction durant sa phase adulte, ainsi qu'à la maintenance de la complexité durant toute sa vie.
- La maintenance est prioritaire sur la croissance.
- L'homéostasie de la biomasse structurale et des réserves (par exemple leur composition chimique) ne doit pas changer, en dépit d'un changement de la composition chimique de l'environnement.

2.2 Avantages de l'approche DEB

Le premier avantage de ce type de modèle est de pouvoir simuler la croissance de manière mécanistique, c'est à dire sans utiliser de relations empiriques. Cette approche est particulièrement intéressante dans le cas du merlu, car les paramètres de croissance des courbes de Von Bertalanffy sont actuellement remises en question pour cette espèce (De Pontual, 2003). D'autre part, ce type de modèle permet de suivre et de quantifier l'utilisation de l'énergie dans un organisme tout au long de sa vie, et de distinguer la partie réserve de la partie somatique.

Comme les réserves énergétiques des poissons sont principalement constituées de lipides (Tocher, 2003) et que les PCB sont presque exclusivement liés aux lipides de réserve dans les tissus vivants (Van der Molen et Kooijman, 1996), la dynamique des PCB dans l'organisme pourra être liée à celle des réserves. Un des grands avantages est alors de pouvoir aborder de manière mécanistique les pertes de contaminants inclus dans les œufs lors de la ponte, car l'énergie allouée au développement des gonades provient des réserves. Enfin, l'une des principales motivations dans le choix du modèle DEB est son aspect potentiellement

évolutif. Il peut en effet être couplé à des modèles de dynamique des populations et de transfert des contaminants le long des réseaux trophiques. Il pourra également s'appliquer à d'autres contaminants, et offrir la possibilité d'intégrer les effets potentiels des contaminants. Les modèles dits « DEBtox » prennent en effet en compte les effets qu'exercent les contaminants sur la survie, la croissance ou la reproduction des organismes. Les effets sur la croissance sont traduits par une diminution de la quantité de nourriture assimilée, une augmentation des coûts de maintenance de l'organisme et une augmentation du coût énergétique de la croissance. Les effets sur la croissance engendrent aussi, indirectement, des effets sur la reproduction. La diminution de la fécondité des organismes est traduite par une mortalité des femelles durant l'oogenèse, une diminution de l'énergie disponible pour la reproduction et une augmentation du coût énergétique de la fabrication des œufs. A partir d'une certaine concentration, ces modèles calculent également un risque de mortalité (Kooijman et Bedaux, 1996).

PARTIE II : Développement d'un modèle bioaccumulation des PCB chez le merlu basé sur la théorie DEB

A dynamic and mechanistic model of PCB bioaccumulation in the European hake (*M. merluccius*)

Xavier Bodiguel^{a,c}, Olivier Maury^b, Capucine Mellon-Duval^c, François Roupsard^a, Anne-Marie Le Guellec^a and Véronique Loizeau^a

^a IFREMER, Département de Biogéochimie et Ecotoxicologie, Technopôle Brest-Iroise, Pointe du Diable, BP70, 29280 Plouzané, France

^b IRD, Research Unit Thetis (UR109) CRH (Centre de Recherches Halieutiques Méditerranéennes et Tropicales), bd. J. Monnet BP171, 34203 Sète Cedex, France

^c IFREMER, Département Halieutique Méditerranéen et Tropical, bd. J. Monnet BP171, 34203 Sète Cedex, France

Journal of Sea Research, 2009

Abstract

Bioaccumulation is difficult to document because responses differ among chemical compounds, with environmental conditions, and physiological processes characteristic of each species. We use a mechanistic model, based on the Dynamic Energy Budget (DEB) theory, to take into account this complexity and study factors impacting accumulation of organic pollutants in fish through ontogeny. The bioaccumulation model proposed is a comprehensive approach that relates evolution of hake PCB contamination to physiological information about the fish, such as diet, metabolism, reserve and reproduction status. The species studied is the European hake (*Merluccius merluccius*, L. 1758). The model is applied to study the total concentration and the lipid normalised concentration of 4 PCB congeners in male and female hakes from the Gulf of Lions (NW Mediterranean sea) and the Bay of Biscay (NE Atlantic ocean). Outputs of the model compare consistently to measurements over the life span of fish. Simulation results clearly demonstrate the relative effects of food contamination, growth and reproduction on the PCB bioaccumulation in hake. The same species living in different habitats and exposed to different PCB prey concentrations exhibit marked difference in the body accumulation of PCBs. At the adult stage, female hakes have a lower PCB concentration compared to males for a given length. We successfully simulated these sex-specific PCB concentrations by considering two mechanisms: a higher energy allocation to growth for females and a transfer of PCBs from the female to its eggs when allocating lipids from reserve

to eggs. Finally, by its mechanistic description of physiological processes, the model is relevant for other species and sets the stage for a mechanistic understanding of toxicity and ecological effects of organic contaminants in marine organisms.

Keywords: *Merluccius merluccius*, demersal fish, Polychlorinated biphenyls (PCB), Bioaccumulation model, Bioenergetic, Dynamic Energy Budget (DEB).

1 Introduction

Assessment of bioaccumulation and effects of pollutants in marine species is a fundamental step for environmental management. The development of a methodological framework for assessing bioaccumulation is therefore essential for the scientific evaluation of risks that chemicals may pose to the environment and by enlargement to humans. However, in the case of organic contaminants (OCs), bioaccumulation is difficult to document because responses differ among chemical compounds, with environmental conditions, and physiological processes characteristic of each species (Gobas, 1993; Connolly and Glaser, 2002). In early empirical approaches, the quantification of the bioaccumulation phenomena was deduced from concentrations in the organism (e.g. fish) and concentration of their prey and in water, to calculate bioaccumulation and bioconcentration factors (BAF and BCF). However, interpreting bioaccumulation data reveals difficulties related to the contaminant dynamics, possible changes in the environment (temperature, trophic conditions, prey contamination levels) and interactions with the physiology of animals (Mackay and Fraser, 2000). To improve those tools, it is important to better characterize the dominant underlying processes driving the bioaccumulation phenomenon. Physiological-based models, (Norstrom et al., 1976; Gobas, 1993; Loizeau et al., 2001) take into account some of these processes. Gobas (1993) consider for example that contaminants may be taken up from food and from seawater by transfer through the gills, and lost by fecal egestion, metabolic degradation, and again, by transfer through the gills. Contaminant dilution resulting from growth was also considered as a pseudo-elimination process. These studies assume implicitly steady-state conditions for the physiological processes in the organism. But the kinetics and concentrations of the xenobiotic are affected by the changing physiological condition of fish. Consequently, these models do not always fit well the data, especially in conditions where the physiological state (*ie.* size, energy reserve and reproductive cycle) of the organism is changing (van Haren et al., 1994). Moreover, their lack of explicit physiological formulation make impossible a mechanistic

understanding of the toxic effects of contaminants on organism physiology. Unifying concepts are needed to better tie together such complexities (Connolly and Glaser, 2002).

The uptake/elimination model proposed by Kooijman and Van Haren (1990) for organic contaminants such as PAHs (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons) and PCBs (PolyChlorinated Biphenyls) has been designed to account for changes in the physiological conditions of the organism. It is based on the Dynamic Energy Budget (DEB) theory (Kooijman, 2000) which describes mechanistically growth, reserve dynamics and reproduction as a function of body size. Such a model is presented below for fish. The purpose of this paper is to test the applicability to fish of the DEB-based model to assess uptake-excretion kinetics for OCs by taking example of PCBs bioaccumulation in the European hake (*Merluccius merluccius* L. 1758). These contaminants are considered among the most dangerous pollutants because of their toxicity (Ahlborg and Hanberg, 1994; Loonen et al., 1996), stability, long biological half-life, and high liposolubility. They may also be bioaccumulated and biomagnified along food chains involving a wide range of trophic levels, with a potential risk for high trophic level predators (Borga et al., 2001; Hoekstra et al., 2003; Nfon and Cousins, 2006). Having a high trophic level (Ferraton et al., 2007), the European hake is exposed to the bioaccumulation of these organic compounds (Bodiguel et al., 2008). The model was built by coupling a PCB kinetic model through an organism to the standard DEB model. It was calibrated and tested on field data from the Gulf of Lions (Mediterranean sea) and the Bay of Biscay (Atlantic ocean). DEB parameters were estimated with field and experimental data or found in literature. In the model, we took into account contaminant uptake from food, contaminant losses due to spawning and we assessed the influence of physiological variables, such as body size and lipid content on PCB kinetics. Moreover, biotransformation of organic xenobiotics can affect elimination kinetics. But biotransformation increases the complexity of the analysis of the already complicated toxico-kinetic studies. Therefore, to simplify the analysis, we studied toxico-kinetics without biotransformation. Concerning PCBs, this phenomenon is negligible because of the high stability of these compounds. We also assumed that the physiological condition is not affected by the compounds although, one of the major interest of the DEB-based model is to offer a useful basis to describe such effects.

2 Method

2.1 Sampling and chemical analysis

The study areas are the Gulf of Lions, and the northern part of the Bay of Biscay, two regions off the French coasts (Fig. 1). The Gulf of Lions, situated in the NW Mediterranean, is one of most important continental shelf in the Mediterranean sea (Roussiez et al., 2005). It receives high freshwater discharges from the Rhône River watershed, which drains heavily industrialized regions of southern France. The Bay of Biscay, situated in the NE Atlantic, receives freshwater discharges from the Loire River, in western France. Hakes and its various preys were caught during bottom-trawl cruises, on the continental shelves (between 50 and 120 meters depth), in spring 2001, spring 2002 and autumn 2002 in the Bay of Biscay, and in spring 2004 and autumn 2004 in the Gulf of Lions. Largest specimens were caught on the edge of the continental shelf by gillnets, in autumn 2006 in the Gulf of Lions. A total of 202 hakes with total length (L) from 7 to 70cm and 59 prey pools (sardines, anchovies, pouts, blue whittings, horse mackerels, gobiids, shrimps and zooplankton) were sampled for organic contaminant analysis. Fish were primarily pre-treated in the laboratory for total body weight, total length and macroscopic sex determination for hakes.

Chemical analysis have been described previously (Bodiguel et al., 2008) and are summarized below. The various biological species were solvent extracted using Soxtec apparatus. For samples from the gulf of Lions, extracts were weighed to give the amount of extractible material and thus a rough estimation of the total fat content. Appropriate clean-up of the extracts was then performed before the final instrumental analysis by gas chromatography with electron capture detector, on a HP 5890 series II equipped with a CP-Sil19 capillary column following optimized conditions described by Jaouen-Madoulet (2000). PCBs were quantified individually using a standard solution. Finally, concentrations of the different PCB congeners are available for each prey pool and at the individual level for hakes, for both sexes in the Gulf of Lions but without sex distinction in the Bay of Biscay. 4 PCB congeners described as few metabolisable were chosen because of different chlorination levels, two penta-chlorinated biphenyls: CBs 101 and 118, one hexa-chlorinated biphenyl: CB153, and one hepta-chlorinated biphenyl: CB180.

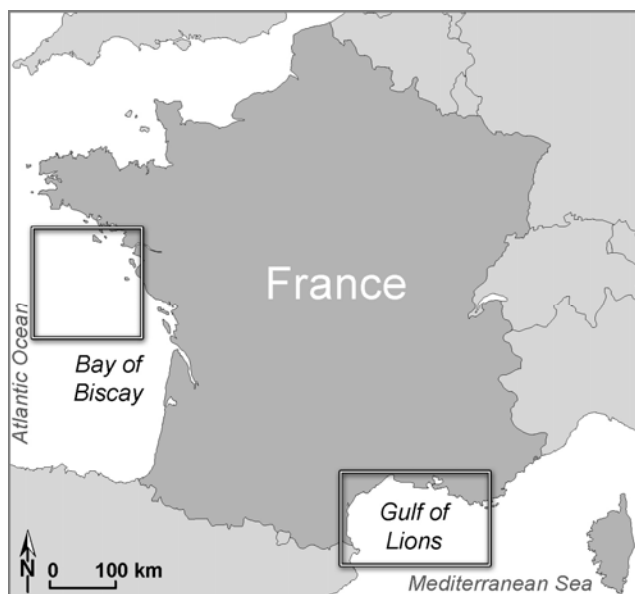


Figure 1: Map of the study area showing the two sampled sites: the Bay of Biscay and the Gulf of Lions

2.2 Model structure

Our bioenergetic approach is based on a mechanistic model, the DEB theory (Kooijman, 2000). It describes the acquisition and expenditures of energy in an organism, and the consequences for physiological organisation throughout its life cycle, in a potentially variable environment. A kinetic model of PCBs was then built, coupled to the bioenergetic one. It integrates the effects of growth and incorporates the chemical affinity of PCBs to reserve lipids. It is applied by taking the example of bioaccumulation of 4 PCB congeners (CBs) in the European hake (*Merluccius merluccius*, L.) from the Gulf of Lions (Mediterranean sea) and the northern part of the Bay of Biscay (Atlantic ocean). The 4 CBs were chosen among the seven indicators currently measured in pollution monitoring programs: CB101 (2,2',4,5,5'-pentachlorinated biphenyl), CB118 (2,3',4,4',5-pentachlorinated biphenyl), CB153 (2,2',4,4',5,5'-hexachlorinated biphenyl) and CB180 (2,2',3,4,4',5,5'-heptachlorinated biphenyl). They describe a large range of chlorination (from 5 to 8 chlorine molecules on the biphenyl core).

2.2.1 DEB growth model

DEB models are based on simple assumptions to describe the rates at which individual organisms assimilate and utilize energy from food, for maintenance, growth, reproduction and development (Fig.2). These rates depend on the state of the organism (size, sex, maturity

status) and of its environment (food density, and temperature). A conceptual introduction to the DEB theory can be found in Kooijman (2001) and in van der Meer (2006), and a full description is given in Kooijman (2000).

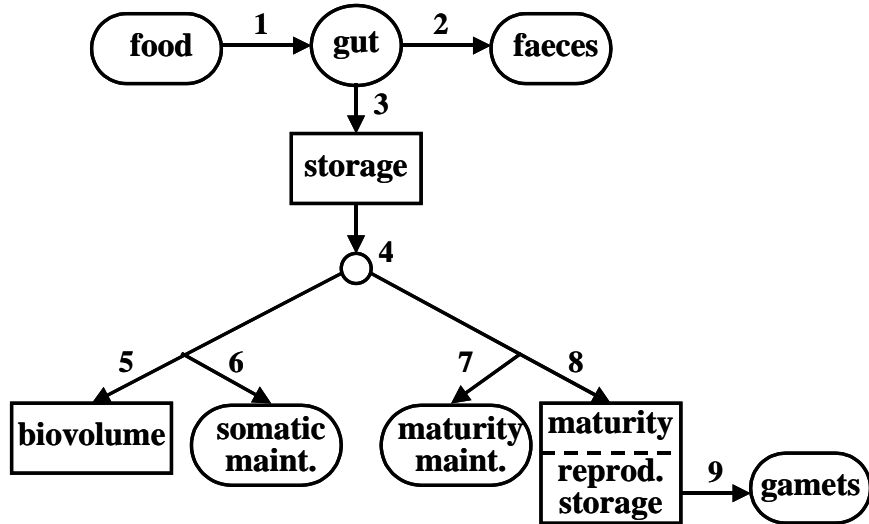


Figure 2. Energy flows through an organism in the DEB model, after Kooijman (2000). Rates: 1 ingestion (uptake), 2 defecation, 3 assimilation, 4 utilisation, 5 growth, 6 somatic maintenance, 7 maturation maintenance, 8 maturation, 9 reproduction. The rounded boxes indicate sources or sinks, the squares indicate state variables.

The dynamics of growth and reproduction are considered using a system of coupled differential equations for the three state variables: structural body volume V (cm^3), energy reserve E (J), and energy allocated to development and reproduction E_R (J). Quantities are expressed per unit of volume with square brackets $[\]$ and per unit of biosurface area with braces $\{ \}$. Rates have dots, indicating the dimension per time. According to the DEB theory, food uptake is proportional to the surface area of the structural body volume (V , cm^3) and follows a type-II Holling functional response (Kooijman, 2000). The ingestion rate \dot{p}_x ($\text{J} \cdot \text{d}^{-1}$) is equal to:

$$\dot{p}_x = \{ \dot{p}_{x_m} \} \cdot f \cdot V^{2/3} \quad (1)$$

where $\{ \dot{p}_{x_m} \}$ is the maximum surface area-specific ingestion rate ($\text{J} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{d}^{-1}$), calculated with maximum surface area-specific ingestion rate expressed in mass $\{ \dot{I}_{x_m} \}$ ($\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{d}^{-1}$) and the energy content of food (β_x). f is the scaled functional response, corresponding to a function of food density (dimensionless).

An assimilation efficiency (ae), assumed constant, is applied to calculate the energy assimilation rate:

$$\dot{p}_A = ae.\dot{p}_X = ae.\{\dot{p}_{Xm}\}fV^{2/3} = \{\dot{p}_{Am}\}fV^{2/3} \quad (2)$$

Assimilated energy is integrated in a reserve pool E , whose dynamics is given by the equation:

$$\frac{dE}{dt} = \dot{p}_A - \dot{p}_C \quad (3)$$

where \dot{p}_C ($J.d^{-1}$) denotes the energy utilization rate.

Stored energy is mobilized from the reserve and is allocated to growth, maintenance and development or reproduction. A fixed fraction (κ) of energy used is allocated to somatic maintenance and growth while the remainder ($1-\kappa$) is used for maturation/reproduction and maturity maintenance. Maintenance has priority over growth, so growth ceases when maintenance costs cannot be covered by reserve. From this energy allocation rule, it follows that growth investment is given by:

$$\frac{dV}{dt} = \frac{\kappa\dot{p}_C - [\dot{p}_M]}{[E_G]} \quad (4)$$

where $[\dot{p}_M]$ is the maintenance cost ($J.cm^{-3}.d^{-1}$), $[E_G]$ is the volume-specific cost for structure ($J.cm^{-3}$), and κ (-) is the fraction of energy utilization rate spent on maintenance plus growth.

Kooijman (2000) derived the following equation of energy utilization from theoretical considerations:

$$\dot{p}_C = \frac{[E]}{[E_G] + \kappa[E]} \left(\frac{[E_G]\{\dot{p}_{Am}\}V^{2/3}}{[E_m]} + [\dot{p}_M]V \right) \quad (5)$$

where $[E]$ represents energy density ($[E] = E/V$, $J cm^{-3}$) and $[E_m]$ ($J cm^{-3}$) is the maximum energy density in the reserve compartment.

Juvenile development (increase of complexity) and adult state (energy investment for reproduction) correspond to two different stages in the individual life history. The transition between juveniles and adults occurs at a threshold value of the structural volume V_P (volume at puberty). The length at V_P is noted L_P . The evolution of the reproduction buffer at the adult stage is given by:

$$\frac{dE_R}{dt} = \left((1-\kappa)\dot{p}_C - \frac{(1-\kappa)}{\kappa}V_P[\dot{p}_M] \right) \quad (6)$$

where E_R represents the energy storage compartment allocated for reproduction.

During gamete emission, E_R is emptied, with an efficiency κ_R . $(1-\kappa_R)*E_R$ represents the gametogenesis cost. Total length L (cm) was obtained from body volume using:

$$L = \frac{V^{1/3}}{\delta_m} \quad (7)$$

where δ_m is the shape coefficient.

Fresh tissue mass W (g) was obtained by summing the 3 state variables E (J), V (cm³) and E_R (J), after conversion into fresh mass. A specific density d of 1 g.cm⁻³ was used to convert somatic volume into mass (van der Veer, 2001):

$$W_{Total} = dV + \left(\frac{(E + E_R)}{\beta_E} \right) \quad (8)$$

where β_E is the energy/mass converter of E and E_R .

These two compartments are assumed to have the same energetic value (Kooijman, 2000).

$\frac{(E + E_R)}{\beta_E}$ is the reserve weight ($W_{Reserve}$).

DEB theory considers that reserve includes each molecule that is immediately available to somatic synthesis, maintenance, development and reproduction, and that reserve can be classified into polysaccharides, lipids and proteins as ribosomal RNA (Kooijman 2000), with different proportions between the different species. In the case of fish, energetic reserve is described to be mainly constituted of lipids, especially neutral lipids (Tocher, 2003). To simplify the study, reserve weight has been considered to be equal to the weight of lipidic reserve ($W_{Reserve} = W_{Lipid}$), and β_E , the lipid energetic value.

Temperature has an effect on all physiological rates, here $\{p'_{Am}\}$ and $\{p'_M\}$. In the DEB theory, the Arrhenius description is used to describe the effect of temperature on metabolic rates:

$$\dot{k}(T) = \dot{k}_1(T) \exp \left\{ \frac{T_A}{T_1} - \frac{T_A}{T} \right\} \quad (9)$$

where \dot{k} is a physiological rate, T is ambient temperature (K), T_1 is a chosen reference temperature (K) and T_A is a species-specific coefficient, the so-called Arrhenius temperature (K). This Arrhenius temperature can be compared with the Q_{10} values, according to:

$$Q_{10} = \exp \left\{ \frac{10.T_A}{T.T_1} \right\} \quad (10)$$

2.2.2 Coupled bioaccumulation model

In addition to DEB equations, a model of PCB kinetics has been established, coupled to the growth one, and apply with the same manner to the 4 studied congeners. In this model, we assume that fish contamination by PCBs is exclusively due to food consumption, which is a validated assumption in the case of highly hydrophobic compounds such as PCBs (Kooijman and van Haren, 1990). It has been shown that absorption through the gill membrane affects the total body content to a much lesser extent (Russel et al., 1999; Leblanc, 2006). Uptake from the water is thus considered to be negligible in the model.

The rate at which contaminant is taken from food \dot{r}_{pa} ($\text{ng}\cdot\text{d}^{-1}$) integrates the length-dependent hake diet and the PCB contamination of its different preys. It depends on the surface area specific ingestion rate $\{\dot{I}_{Xm}\}$ ($\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$), the functional response $f(-)$, the hake surface area $V^{2/3}$ (cm^2), the bolus contaminant concentration C_p ($\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$) which is a forcing variable and a contaminant assimilation efficiency ae_{PCB} (-):

$$\dot{r}_{pa} = \{\dot{I}_{Xm}\} \cdot f \cdot V^{2/3} \cdot C_p \cdot ae_{PCB} \quad (11)$$

Assimilated PCBs are stored in W_{PCB} (ng).

PCBs are described as almost exclusively bound to reserve lipids in organisms, due to their lipophilic character (van Haren et al., 1994). As fish energetic reserve is mainly constituted of reserve lipids (Tocher, 2003), PCBs contained in W_{PCB} are considered bound to storage lipids after assimilation. PCB concentration in reserve lipids CL_{PCB} ($\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$) is given by:

$$CL_{PCB} = \frac{W_{PCB}}{W_{\text{Reserve}}} \quad (12)$$

Considering that PCBs cannot be metabolised by fish, the only PCB exit way is the reproduction, via gamete emission. It is considered that PCB affinity for gametes is different between male and female hakes because of their gamete composition difference. For females, reserve lipids contained in E_R are directly transferred into eggs with PCB associated. PCB loss during spawning R_{PCB} (ng) is given by:

$$R_{PCB} = \frac{W_{PCB}}{(E + E_R)} \cdot E_R \quad (13)$$

For males, extracted energy from reserve lipid catabolism is used for spermatozoon synthesis (mostly proteic). Unbind PCBs during β -oxydation (production of ATP from lipids) bound again to the closest lipid reserve. For this reason, it is considered that PCBs associated to

lipids stay in W_{PCB} during spermatozoon synthesis. Consequently, $R_{PCB}=0$ for males. Finally, the PCB concentration in the whole individual (C_{PCB} , $\text{ng.g}^{-1} \text{W}$) is deduced by:

$$C_{PCB} = \frac{W_{PCB}}{W_{Total}} \quad (14)$$

2.3 Parameter estimation

2.3.1 DEB parameter estimation

Most of the DEB parameters were derived from environmental observations and experimental data conducted on the European hake. However the paucity of experimental data and the non directly measurable character of some specific DEB parameters led us to use a calibration procedure using data available in the literature for other fish of the Gadiform order like the cod (*Gadus morhua*).

Shape coefficient

Hake is considered to have an isomorphic growth and the same shape coefficient in the two study areas. It is assumed that reserve little contributes to total length, so that physical length quantifies structural length. The value of the shape coefficient is obtained by fitting a weight-length relationship of the type $W_{Total} = d(\delta_m \cdot L)^3$, with d the density in g.cm^{-3} , to individuals smaller than the length at puberty L_P (juveniles, without reproduction buffer). Here, the contribution of the reserve to the total weight is neglected. The shape coefficient was estimated to be 0.18 ($n = 2606$ juveniles from the Gulf of Lions, $p < 0.001$).

Temperature

Bottom temperatures only are considered because hake spends most of its time near the bottom (Bozzano et al., 2005). The temperature is considered to be constant over the year under the mixed layer and equal to 12.8°C in the Gulf of Lions (Schroder et al., 2006), and to 12.5°C in the Bay of Biscay (Puillat and Lazure, 2004). We used the relation of Arrhenius to simulate effects of temperature on all the physiological rates. Since no Q10 estimates are available for hake, we took the value of Q10 estimated from juvenile cods ($Q10=2.35$) by Peck et al. (2003) using respiration rate as a proxy for metabolism. This value corresponds to an Arrhenius temperature of 6923°K (cf. eq. 10). The reference temperature was set to 12.5°C .

Feeding

As hake is an opportunistic feeder (Mahe et al. 2007), it is difficult to estimate food ability in the environment. Nevertheless it is possible to evaluate an approximate functional response over the life of an animal by dividing the asymptotic length observed in a given environment (L_{inf}) by the theoretical maximal length that an animal can attain if the food is not limited (L_{max}): the largest fish ever observed (Kooijman, 2000). L_{max} is given at 140cm for a female hake by Cohen et al. (1990). In our study areas, observed female L_{inf} are 110cm in the Bay of Biscay (de Pontual et al. 2006) and 100.7cm in the Gulf of Lions (Recassens et al., 1998). Used functional responses for the present application are :

$$f(\text{Bay of Biscay}) = 110/140 = 0.786, \text{ and } f(\text{Gulf of Lions}) = 100.7/140 = 0.719$$

Values determined in experimental study are used to compute the rate of mass and energy intake. The ingestion rate value of hakes can be estimated from the study of Jolivet et al. (unpublished data). The ingested biomass of prey (sea bass *Dicentrarchus labrax*, given in excess) $\{\dot{I}_{Xm}\}$ is $0.1312 \text{ g.cm}^{-2}.\text{d}^{-1}$ at 12.5°C , corresponding to a specific surface area ingestion rate $\{\dot{p}_{Xm}\}$ of $735 \text{ J.cm}^{-2}.\text{d}^{-1}$ with a sea bass energy content (β_X) of $5,6 \text{ kJ.g}^{-1}$ (Peres and Oliva-Teles, 2007). The specific surface area assimilation rate refers to the totality of ingested energy less the losses due to digestion and the faeces. Brett and Groves (1979) estimate that 20% of ingested energy is lost into faeces. $\{\dot{p}_{Am}\}$ is thus estimated assuming a fixed assimilation efficiency (ae) equal to 0.8: $\{\dot{p}_{Am}\} = 735 * 0.8 = 588 \text{ J.cm}^{-2}.\text{d}^{-1}$.

Reproduction

The length at puberty L_P corresponds to the minimum fish size caught with gonads in development in each study area. It should be noticed that length at first allocation of energy to reproduction (i.e., length at puberty) is smaller than the length at first reproduction (i.e. length at maturity). The individual first fills the reproduction buffer and later converts it into gametes. This value does not affect growth but the amount of reserve allocated to reproduction before the first reproduction and therefore the first spawning season. In the Gulf of Lions, minimum hake sizes with gonads in development are given by Recasens et al. (1998): 30cm for females and 22cm for males. In the Bay of Biscay, Lucio et al. (2000) observed 40cm for females and 30cm for males.

Without the data on hake reproductive investment, data on *Gadus morua* were used to estimate the κ value. This species is indeed close to *Merluccius* in terms of taxonomic

classification (both belong to the same Gadiform order), it has a metabolism relatively close to hake, and its biology has been very well studied. Jobling (1982) estimated the annual energy investment for reproduction of female cods from Faroe Islands and North Sea to 22%. For this study, κ of female hake was then set to 0.78.

Kooijman (2000) assumes that the overhead costs of female reproduction ($1 - \kappa_R$) are small: the reserve of the female are transformed into reserve of the offspring with a closely related chemical composition (high lipid content), so little chemical work is involved and κ_R is set to 0.9. For males, this chemical composition is different, and mainly composed of proteins. In this case, κ_R is set to 0.7. But this value has no influence on bioaccumulation because we consider that PCB losses during spermatogenesis are negligible. In the model, female spawning is triggered each year at a given date. For males, gamete emission time is described to cover the whole reproduction period of females for many fish. As the reproduction period of female hakes can cover all the year, the model considers a continuous emission of male gametes, all over the year.

Calibration procedure

Most of the specific DEB parameters cannot be measured directly (Van der Meer, 2006). This is the case for the maximum storage density $[E_m]$ (J.cm^{-3}), the volume-specific cost for growth of structure $[E_G]$ (J.cm^{-3}) and the volume-specific maintenance cost for structure $[\dot{p}_M]$ (J.cm^{-3}). Kooijman et al., 2008 present a method to derive the value of those parameters using estimates of κ , $\{\dot{p}_{Am}\}$, f , and quantities that are more easy to observe such as the volumetric length at first feeding L_b (cm), the age at first feeding ab (d), the volumetric ultimate length L_{inf} (cm) and the von Bertalanffy growth rate \dot{r}_B (d^{-1}) or length at age data. The method permits to calculate compound parameters: g the investment ratio, \dot{k}_M the maintenance coefficient, and \dot{v} the energy conductance. We used von Bertalanffy parameters of females in the Bay of Biscay to calibrate parameter values. In a second step, DEB parameters ($[E_m]$, $[E_G]$ and $[\dot{p}_M]$) have been calculated using equations proper to the DEB theory:

$$[E_m] = \{\dot{p}_{Am}\} / \dot{v} . \quad (15)$$

$$[E_G] = [E_m] \cdot \kappa \cdot g \quad (16)$$

$$[\dot{p}_M] = \dot{k}_M \cdot [E_G] \quad (17)$$

“Easy to observe quantities” were taken in the literature describing larvae and female hakes from the Bay of Biscay. Volumetric lengths L_b and L_{inf} are obtained by dividing the total length by the shape coefficient. Due to the specific shape of the hake larvae a specific larvae shape coefficient was estimated for the calculation of L_b . In fact, larvae are more spherical than a juvenile or an adult hake (Bjelland and Skiftesvik, 2006). Without data on weight-at-length larvae, its shape was assimilated as a sphere, corresponding to a shape coefficient of 0.8. Parameter values are given in Table 1.

Sexual dimorphism

Male and female hakes exhibit growth dimorphism, with a faster growth rate and a higher ultimate size for females (Aldebert and Recasens, 1996; Morales-Nin et al., 1998). Without evidence for metabolism difference between sexes, it was considered that the metabolism of a single species is the same for both sexes. It was therefore chosen to simulate growth differences between sexes with only a difference of reproduction investment ($1-\kappa$). This choice permits to simplify the parameter estimation, and to give genericity to the model. For females, (κ) was estimated at 0.78 with data on cod reproduction investment. For males, κ was calibrated to best fit the lengths at age data from de Pontual et al. (2006) and Mellon-Duval (unpublished data, comm. pers.). It was estimated to be 0.58.

Energy/mass conversion

An energy mass converter β_E was used to estimate the weight of reserve. The energy/mass conversion was assumed to be a constant. The model considers that reserves are exclusively composed of lipids. The lipid energetic value used in this study was set to 37 kJ.g⁻¹ (Anon., 2003).

Table 1: List of DEB parameters. Rates at the reference temperature $T_1 = 285.5 \text{ K}$ (12.5°C).

Parameters	Symbol	Units	Value	Source
Water temperature	T	$^\circ \text{K}$	283.5	Puillat and Lazure, 2004
Arrhenius température	T_A	$^\circ \text{K}$	6923	after Peck et al., 2003
Shape coefficient	δ_m	-	0.18	Ifremer Surveys
Functional response	f	-	0.719 (BoB)	after Recasens et al., 1998
		-	0.786 (GoL)	after de Pontual et al., 2006
Max. surf. area-specific ingestion rate	$\{p'_{Xm}\}$	$\text{J cm}^{-2} \text{J}^{-1}$	735	Jolivet et al. (unpub. data)
Assimilation efficiency	ae	-	0.8	Brett and Groves , 1979
Fraction of p_c spent on maint. plus growth	κ	-	0.78 (females)	Jobling , 1982
		-	0.58 (males)	calib.
Length at puberty	L_p	cm	30 (females GoL)	Recasens et al., 1998
		cm	22 (males GoL)	Recasens et al., 1998
		cm	40 (females BoB)	Lucio et al., 2000
		cm	30 (males BoB)	Lucio et al., 2000
Fraction of repro. energy fixed in gametes	κ_R	-	40 (females)	Kooijman, 2000
		-	0.7 (males)	estimated.
Maximum storage density	$[E_m]$	J cm^{-3}	1505	calib.
Volume specific maintenance cost	$[p'_M]$	$\text{J cm}^{-3} \text{d}^{-1}$	18.15	calib.
Volume-specific cost for structure	$[E_G]$	J cm^{-3}	7563	calib.
Energy content of lipids	β_E	J g^{-1}	37000	Anon., 2003
<i>Parameters used for calibration</i>				
Ultimate length	L_{inf}	cm	110	de Pontual et al., 2006
Length at first feeding	L_b	cm	0.4	Bjelland et al., 2006
Shape coefficient (larvae)	δ_l	-	0.8	after Bjelland et al., 2006
Age at first feeding	ab	D	4	Bjelland et al., 2006
Von Bertalanffy growth rate	r_B	-	0.261	de Pontual et al., 2006

2.3.2 Estimation of toxicokinetic parameters

PCB concentrations in the diet

A special attention was devoted to describe PCB concentrations in the hake diet. Detailed description of hake diet from Ferraton et al. (2007) on hakes <25cm, and Mellon-Duval et al. (unpublished data, comm. pers.) on hakes ≥25cm, was used in the Gulf of Lions. Data from Guichet (1995) on evolution of hake diet during its life were used in the Bay of Biscay. In these studies, variations of diet were described per size class of 5cm for hakes <30cm, and 10cm for hakes ≥30cm. Measurements of PCB concentrations were carried out on these preys, and for different prey sizes when possible. According to Mahe et al. (2007), it was considered that hakes prey on sizes smaller than half of its length. The PCB bolus concentration C_p was calculated in each length class of hake using the formula:

$$C_p = \sum_{i=1}^n (C_{pi} * F_i) \quad (18)$$

Where C_{pi} is the PCB concentration in a given prey, and F_i , the mass percentage of this prey in the bolus content.

Gut transfer

Studies indicate that the assimilation efficiency of hydrophobic contaminants is closely linked to the digestion of the associated food (Gobas et al., 1993; Penry, 1998; Drouillard and Norstrom, 2000). These studies are relevant for hake because the mechanisms of uptake can be applied generally across species (Standaert, 1988). For the growth model, we considered a food assimilation efficiency of 0.8. We consider that the PCB assimilation efficiency is the same ($ae_{PCB} = 0.8$), which is in accordance with Madenjian et al. (2000) who estimated PCB assimilation rate by trouts from the Great Lakes to be 81%.

Sensitivity analysis

A simple sensitivity analysis was carried out to assess the influence of the main parameters on the model predictions. For both the growth model and the coupled bioaccumulation model, a +10% and -10% of each parameter value was applied to assess their individual influence on the total wet weight and the total CB153 concentration respectively. In both case, a sensitivity index (SI) was calculated using the following formula:

$$SI = \frac{1}{n} \sum_{t=1}^n \frac{|W_t^1 - W_t^0|}{W_t^0} * 100 \quad (\%) \quad (19)$$

where n is the number of simulated days, W_t^0 is the total wet weight predicted with the standard simulation at time t , and W_t^1 is the total wet weight predicted with the new parameter value at time t . The SI value was calculated for both Mediterranean and Bay of Biscay models and both sexes.

3 Results

The model was applied to 4 PCB congeners, which are described as few metabolisable, the CBs 101, 118, 153, and 180, in two study areas of the French coast, the Gulf of Lions (N.W. Mediterranean) and the Bay of Biscay (Atlantic Ocean), represented on the Figure 1. These two sites differ by their environmental conditions (temperature, food density, PCB prey concentrations).

3.1 Growth

DEB model predictions applied in both study sites are presented in Figure 3, and compared to the Von Bertalanffy growth curves. Growth is presented for both sexes for a period of 10 years corresponding to the life expectation of hakes. In the Bay of Biscay, the growth of females is accurately predicted by the DEB model, with a similar growth rate and a similar ultimate size of 110cm. A deviation between the DEB model and the Von Bertalanffy curve is observable for males, especially the first years. Although the model underestimates male growth rate, the male ultimate size is well reproduced, with 80cm. In the Gulf of Lions, predictions of both male and female growth are accurately predicted by the model. Modeled ultimate sizes are 72.8cm for males and 100.7cm for females. These smaller ultimate sizes in the Gulf of Lions are due to the lower functional response (less food) than in Bay of Biscay. No difference between predicted and measured male growth is observed in the Gulf of Lions.

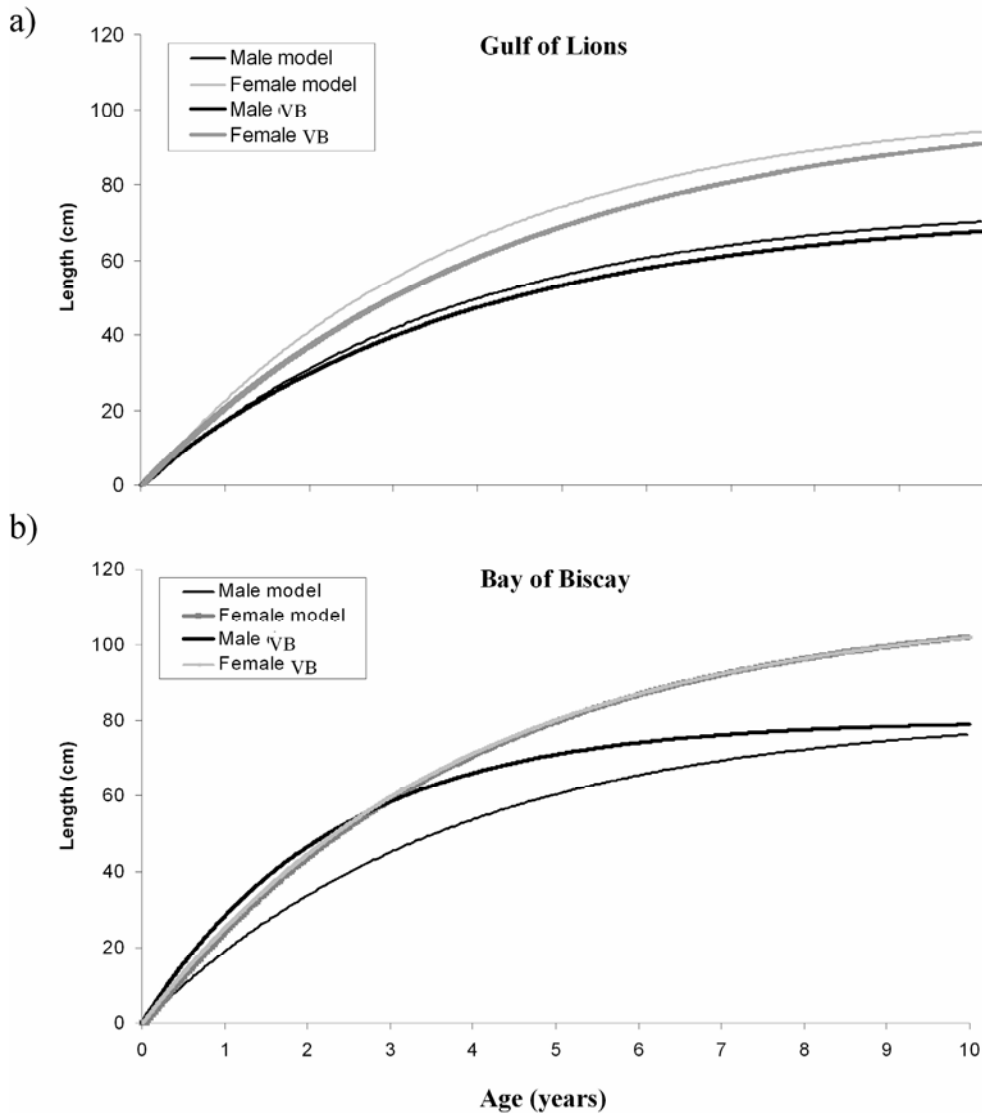


Figure 3: Simulated growth of female and male hake in a) the Gulf of Lions, and b) the Bay of Biscay, for a period of 10 years. Comparison with Von Bertalanffy (VB) growth curves proposed by Mellon-Duval (unpublished data, comm. pers.) in the Gulf of Lions, and de Pontual et al. (2006) in the Bay of Biscay.

The DEB model describes reserve dynamic in organisms over time. As fish reserve is mainly constituted of neutral lipids, their quantity can be estimated along the hake life. In the case of the Gulf of Lions, predicted lipid content can be compared to measurements (Fig. 4). Results are in the same order of magnitude than measurements, except for young hakes of undetermined sex and females larger than 50cm, where simulations overestimate lipid contents.

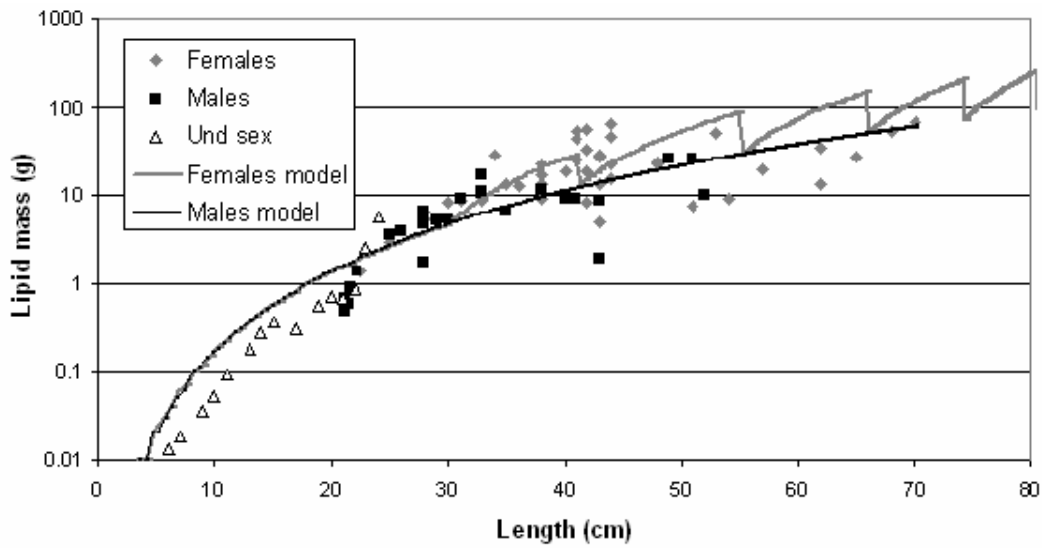


Figure 4 : Simulations of the evolution of the reserve lipid mass with a logarithmic scale as function of length for female (gray line) and male (black line) in the Gulf of Lions, for a period of 10 years. Data for undetermined sex (Und sex, black triangles), females (grey squares) and males (black squares) sampled in 2004 in the Gulf of Lions are represented.

Sensitivity analysis shows that the parameters governing food consumption, (i.e. f and $\{\dot{p}_{Am}\}$) and κ have the most important effect on growth. An increase or a decrease of 10% of f , $\{\dot{p}_{Am}\}$ and κ yielded a mean variation of 25 to 33% of the mean wet weight (Fig. 5). To a lesser extent, an increase or a decrease of 10% of $[E_G]$ and $[\dot{p}_M]$ values caused a mean variation of 12 to 16% of the mean wet weight. Finally, our analysis shows that parameters $[E_m]$ and β_E have a weak effect on the predicted total wet weight. An increase or a decrease of 10% of their values caused a mean variation of 0 to 1% of the mean wet weight.

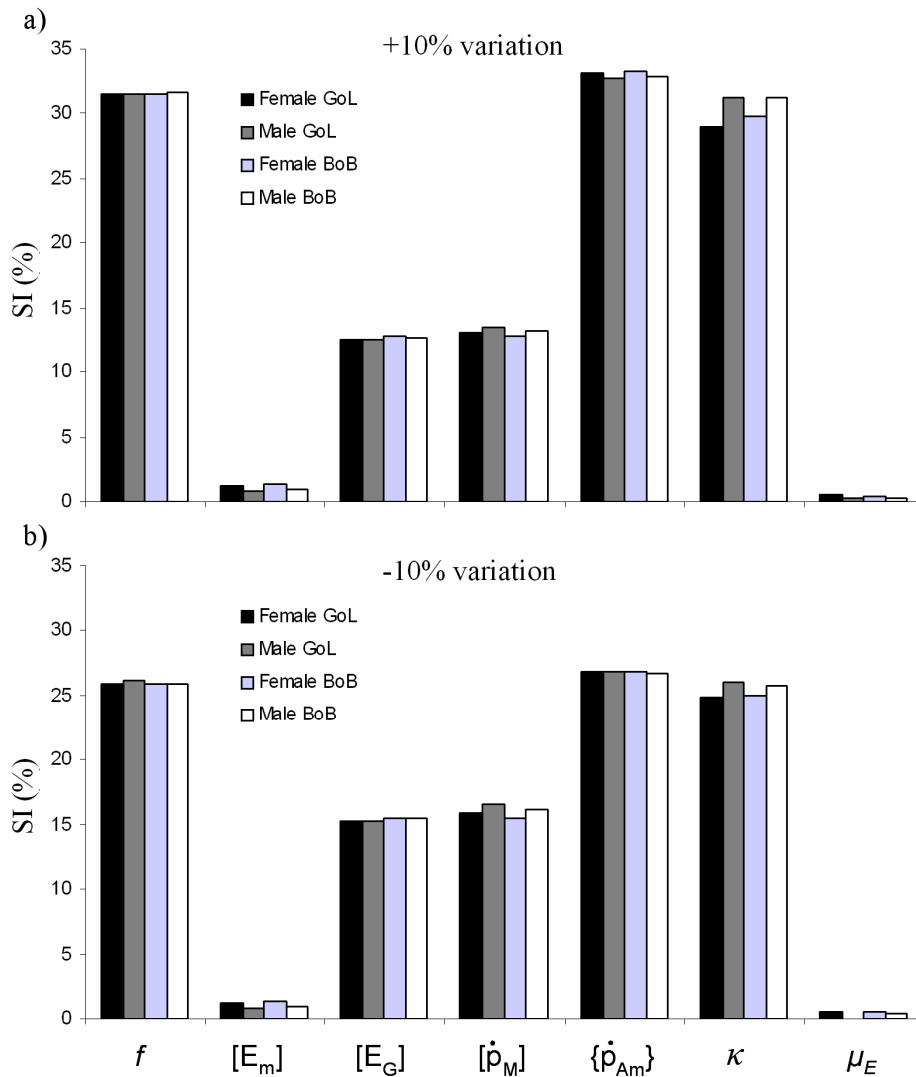


Figure 5: Sensitivity index (SI) on hake growth, computed for DEB parameters for both sexes in the Gulf of Lions (GoL) and the Bay of Biscay (BoB). a) effect of +10% variation of parameter values, and b) effect of -10% variation of parameter values.

3.2 PCB bioaccumulation

Reconstitution of mean prey concentrations for the 4 studied PCB congeners is presented in Figure 6. These results are used as forcing variables of the model. In both study areas, highest concentrations were found for the CB153, and to a lesser extend for the CB180. Lowest concentrations were measured for CB118 and CB101. For the 4 congeners, concentrations increase until hake length reaches 35cm in the Bay of Biscay and 40cm in the Gulf of Lions. For hakes >35 cm in the Gulf of Lions, and >40 cm in the Bay of Biscay, the bolus concentration decreases.

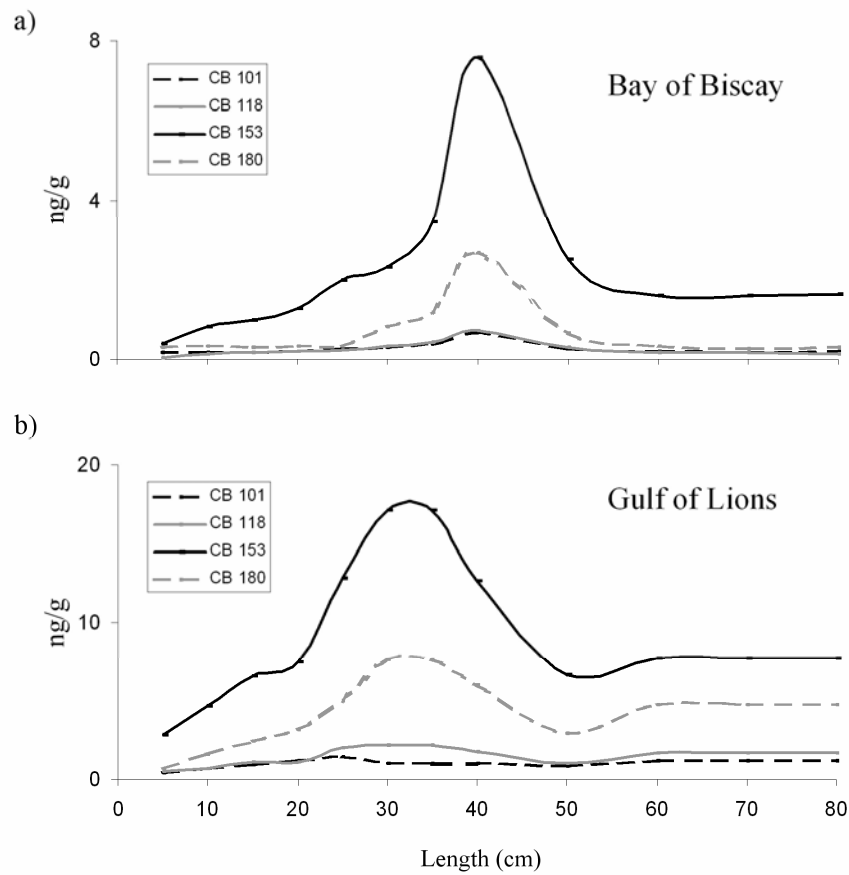


Figure 6: Evolution of the reconstituted bolus concentrations (ng.g^{-1}), as function of hake length (males and females confused) for the 4 studied PCB congeners in a) the Bay of Biscay and b) the Gulf of Lions.

Predicted and measured concentrations of the 4 studied PCB congeners are plotted in Figure 7. There is a significant variation of concentrations between the two studied sectors. Mediterranean hakes present higher concentrations for the 4 congeners, from 2 to 5 times higher than in the Atlantic. In all cases, predicted concentrations are in good agreement with measurements during the whole life of hakes. The main difference between modelled and measuring values occur for the CB101 in both sites: simulations overestimate concentrations for hakes $<25\text{cm}$. From hake sizes of 25cm in the Gulf of Lions, and 30cm in the Bay of Biscay, total PCB concentration increases quickly. At the same length, simulated males exhibit higher concentrations than females. Female concentrations decrease suddenly during spawning (-60% of the total concentration during the first spawning).

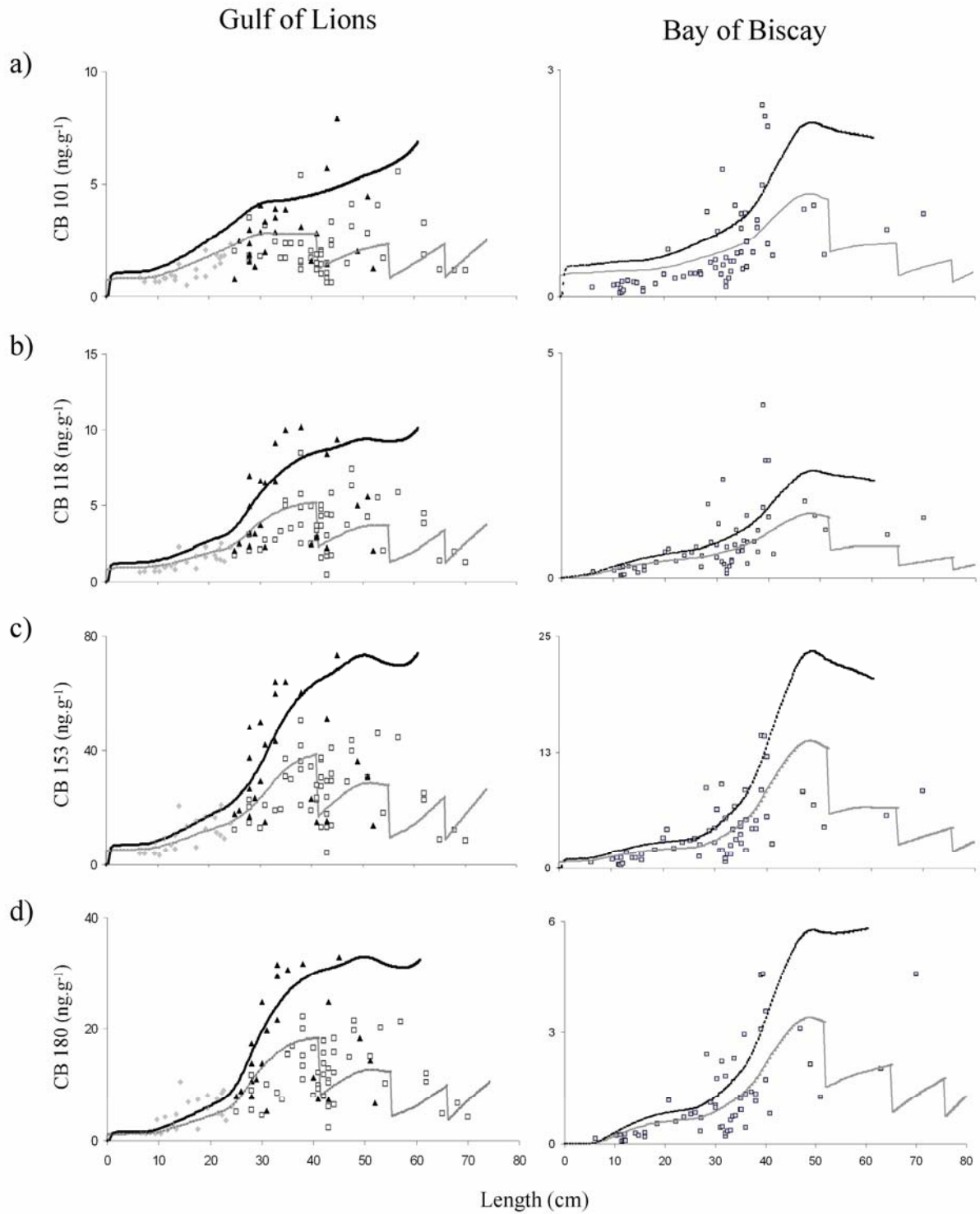


Figure 7: Simulated concentrations of PCBs ($\text{ng g}^{-1} \text{W}$) as function of length for female (grey line) and male (black line) hake in the Gulf of Lions and the Bay of Biscay, for a period of 10 years. In the Gulf of Lions measured concentrations (symbols) distinguish undetermined sex hakes (light grey squares), females (white squares) and males (black triangles).

In the model, the spawning period was imposed at a fixed date. However, Recasens et al. (1998) described a high variability of length at first maturity for hake females in the Gulf of Lions: between 30 and 50cm. Although length at first maturity (i.e. ability to reproduction) is smaller than length at first reproduction (i.e. gamete emission), length at first spawning is also variable in the environment. Scenarios of different size at first spawning were tested for females from the Gulf of Lions. Figure 8 presents simulations of the evolution of CB153 concentrations, with length at first spawning ranging from 38 to 53cm.

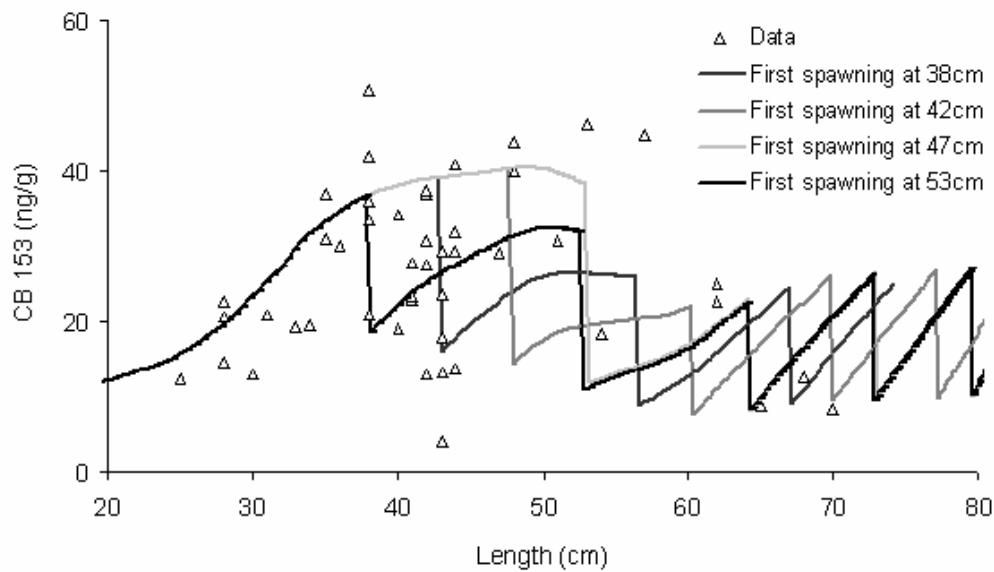


Figure 8: Simulations of the evolution of CB153 concentrations ($\text{ng g}^{-1} \text{W}$) in females from the Gulf of Lions according to different size at first spawning (38, 42, 47, and 53cm), for a period of 10 years. Data for female hakes in the Gulf of Lions are provided (black triangles).

Results indicate that when the size at first spawning is increased, the PCB losses during the first spawning are more important (from -50% of the CB153 total concentration for a female with a first spawning at 38 cm, to -70% for a female with a first spawning at 53cm). In the Gulf of Lions, predicted PCB concentrations normalized to lipids were compared to measurements (figure 9). Despite that PCB levels normalized to lipids present a high variability, predicted concentrations are in the same order of magnitude than measurements. However, it has to be noted that simulated concentrations are underestimated for undetermined sex hakes and females larger than 50cm, due to the overestimation of their lipid content. It is noteworthy that spawning has no effect on lipid normalised concentration, because the PCB concentration in eggs is simulated as the same as that in lipid reserve.

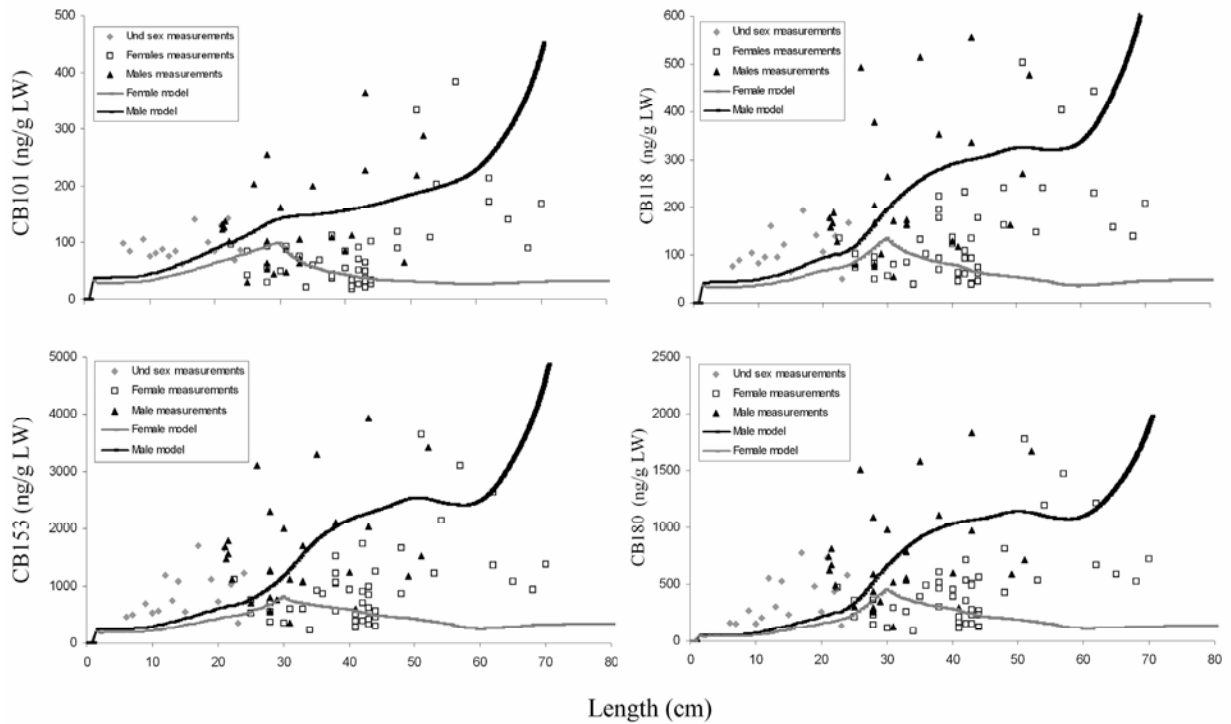


Figure 9: Simulated concentrations of lipid normalized PCBs ($\text{ng g}^{-1} \text{LW}$) as function of length for female (grey line) and male (black line) hake in the Gulf of Lions and the Bay of Biscay, for a period of 10 years. In the Gulf of Lions measured concentrations (symbols) distinguish undetermined sex hakes (grey squares), females (white squares) and males (black triangles).

Concerning bioaccumulation, the results of the sensitivity analysis conducted indicate that an increase or a decrease of 10% of PCB prey concentrations and PCB assimilation efficiency lead to a mean variation of 10% of the total CB153 concentration (Fig. 10). The influence of these parameters on the bioaccumulation model is moderate. A 10% increase or decrease of the DEB-specific parameters governing growth has different impact on the total PCB concentration. The sensitivity of the model to these parameters varies with the sex and geographic location considered. The parameters governing food consumption, (i.e. f and $\{p_{Am}\}$) and κ have the most important effect on total PCB concentrations. These variations are explained by the influence of those parameters on growth rate, and then on the PCB prey concentration consumed, because prey concentration is directly linked to hake length. Finally, it should be noted that the κ value has a greater impact on lipid normalized concentrations due to its influence on the amount of lipids allocated to reproduction.

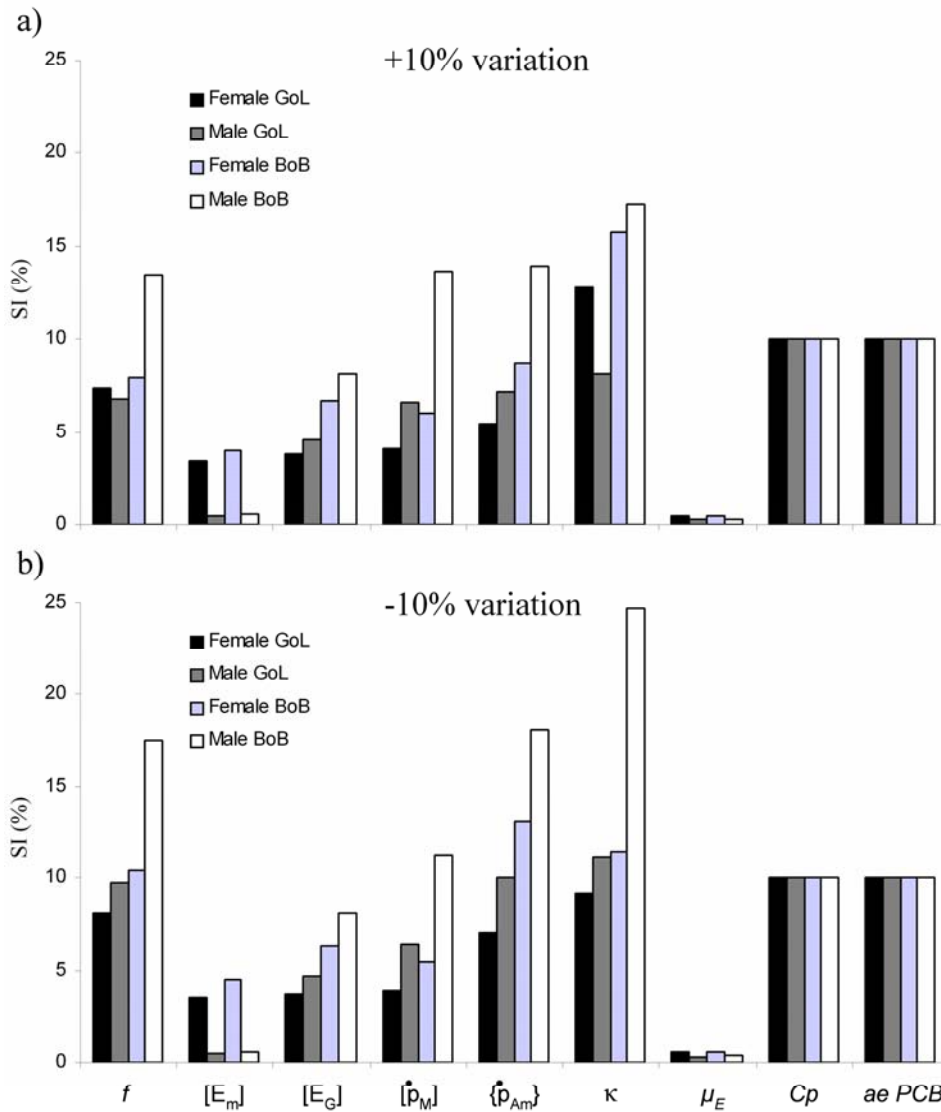


Figure 10: Sensitivity index (SI) on total CB153 concentrations in hake, computed for both sexes in the Gulf of Lions (GoL) and the Bay of Biscay (BoB). a) effect of +10% of parameter values, and b) effect of -10% of parameter values.

4 Discussion

4.1 DEB growth model

We applied the DEB theory (Kooijman, 2000) to describe biological functions influencing persistent organic pollutants bioaccumulation at the scale of the hake life cycle. It was applied in two coastal French sites, and for both sexes. It has been considered that physiological parameters were the same for the two populations. Predictions of the growth model are especially influenced by parameters governing food consumption, i.e. the functional response

f , which is a function of food density, and $\{\dot{p}_{Am}\}$, the maximum surface area assimilation rate estimated using growth experiments from Jolivet et al. (unpublished data) on Atlantic hakes. We used a mean value for $\{\dot{p}_{Am}\}$ since it was not possible to estimate inter-individual variations with the data available. More experiments would be needed to confirm this value and estimate inter-individual variations. The functional response was approximated in each study area using the ratio between estimated ultimate and maximum size. The advantage of this method is to evaluate a mean food density during the life of the hake, without consideration of seasonal variations for which little information is available. However, it is likely that the functional response differs between juveniles and adults due to the probable higher mobility of adults and their capacity to eat bigger preys. Finally, this method appears to be useful to describe the functional response of fish when the main objective is to simulate food intake at the scale of the entire life cycle.

The growth model also provides the evolution of the lipid content in the organism by converting energy reserve into lipid mass. When compared to the data, estimated lipid content of hakes <25 cm and >50 cm is overestimated. This overestimation can be due to the fact that a part of analysed lipids, as membrane phospholipids, cannot be regarded as reserve but as structure. Consequently, the total lipid content measured on fish can be higher than the modelled reserve lipid content. Analysis of the different lipid classes would provide a better estimation of the reserve lipid content. Moreover, the ontogenic variation in the hake feeding may affect the hake lipid content (Lloret et al., 2008). This potential phenomenon is not taken into account by the model.

With parameters governing food consumption, κ is the most influential parameter on growth. Due to the difficulty of maintaining hakes in captivity, no experimental data on hake reproduction are available. The value of female κ has been simply derived from experiments on cod, and simplistic reproduction rules were used. A better understanding of hake reproduction is therefore essential to a better description of this function in our model. It is for example known that hake is a batch spawner (Murua et al., 2006) but in the absence of data on the number and frequency of batches, the model simulates a single spawning date per year. Nevertheless, this simplification does not modify the global PCB budgets at the scale of the life cycle. The parameter κ as been designed to simulate growth rate differences observed between males and females. Without biological information about the cause of the sexual dimorphism described between males and females (Aldebert and Recasens, 1996; Morales-Nin et al., 1998), it was arbitrarily chosen to simulate this difference using two different

values of κ , considering that all other parameters do not change with sex. Again, experiments in controlled conditions would help to refine the parameterization of the model. Finally, the DEB growth model might appear to be over-parameterised. This is the cost to pay for a mechanistic description of the biological processes influencing bioaccumulation.

4.2 DEB bioaccumulation model

The model describes the evolution of food uptake, growth and reproduction that are the main biological factors influencing the bioaccumulation processes. For the bioaccumulation model, a special attention has been devoted to the description of the evolution of hake diet. Reconstitution of mean prey concentrations from our measurements as a function of hake length shows that mean prey concentrations increase until hake length reaches 40cm in the Bay of Biscay and 35cm in the Gulf of Lion. In both cases, this corresponds first to an evolution of the hake diet mostly based on crustaceans, to a diet mainly composed of fish which are more contaminated (Guichet, 1995; Ferraton et al., 2007). Secondly, the increase of prey length with hake length is also responsible of the increase of the PCB bolus concentration. For a given species, a bigger specimen is older, and has more bioaccumulated PCBs. The quick increase of the PCB bolus concentration from hakes of 20cm length in the Gulf of Lions and 30cm in the Bay of Biscay, is due to a diet mainly based on small pelagic adults (i.e. sardines and anchovies) that are more contaminated. The decrease of mean prey concentrations for hakes >35cm in the Gulf of Lions, and >40cm in the Bay of Biscay, is due to a change of hake preferential prey, shifting from small pelagic fish to bigger pelagic or demersal fish (less contaminated) like blue whiting or horse mackerel.

Despite that the estimated physiological parameters are sometimes poorly determined, the PCB bioaccumulation model was successfully applied in our study areas. It reproduces both the absolute levels and the variations of total fish concentrations and gives a roughly approximation of lipid normalized concentrations of 4 PCB congeners for both sexes. From hake sizes of 20cm in the Gulf of Lions, and 30cm in the Bay of Biscay, total PCB concentration increases quickly. This observation is the direct consequence of the fast increase of the PCB bolus concentration at these sizes. It shows the important influence of the diet on concentrations observed in hake and highlights that a diet rich in small pelagic fish like sardines and anchovies induces high contamination in hake in both Atlantic and Mediterranean. Growth rate variation between males and females allow a good representation of observed PCB concentration variations between sexes. This difference is first due to a different dilution by growth, and secondly, to the fact that at same length, males are older, and

have bioaccumulated during a longer period. Moreover, female concentrations decrease suddenly during spawning, due to the loss of PCBs contained in eggs. This phenomenon is not observable for males, because gamete emission doesn't lead to loss of PCBs. Reproduction has therefore a great influence on PCB contamination levels in females, and contributes to the concentration difference observed between the 2 sexes from the first spawning. The model proposes a realistic simulation of PCB losses during spawning by the mobilisation and transfer of lipid reserve and PCB associated to reserve to eggs. As a high variability of length at first maturity is observed for females from the Gulf of Lions (Recasens et al., 1998), different sizes at first spawning have been tested. Outputs of the model indicate that the larger the size at first spawning, the higher the PCB losses during the first spawning. We suggest that the variation of size at first spawning can explain a part of the concentration variability of PCBs observed in the female hake population from the Gulf of Lions.

The successful reconstruction of PCB concentration evolution in hake during the life cycle confirms the robustness of the model based on the DEB theory as well as the assumptions concerning PCB bioaccumulation (exclusive lipid composition of fish reserve and link between PCBs and reserve lipids). The underestimation of PCB concentrations normalized to lipids results from an overestimation of lipid content. A better estimation of lipid content (see above) should allow a better representation of these concentrations. Organic contaminants studied here are highly hydrophobic. For studying water-soluble compounds, the uptake of contaminants through the gills would have to be considered explicitly. In this case, the uptake-elimination rates could be considered to be proportional to the respiration rate, and the model should then incorporate this function. In the DEB theory, respiration corresponds to oxygen consumption. As respiration includes routine metabolic costs as well as costs of growth, DEB theory considers that respiration is proportional to assimilation, growth and dissipation processes. In addition in the case of more water-soluble compounds, the contaminant repartition between the aqueous fraction (here, the somatic compartment) and the non aqueous fraction (the lipid reserve compartment) would also have to be considered (Kooijman and van Haren, 1990). The contaminant repartition between phases could then be taken as proportional to the octanol/water partition coefficient (k_{ow}).

5 Conclusion

The model presented effectively describes growth and accumulation of PCBs during the life cycle of both male and female hakes. It accounts for the effects of growth, physiological condition (*i.e.* proportion of reserve), and reproduction on observed concentrations in two

hake populations. Levels and evolution of 4 PCB congeners concentrations are well reproduced in two study areas: the Gulf of Lions (Mediterranean sea) and the Bay of Biscay (Atlantic ocean). This suggests that the basic assumptions of the model are valid and that the approach is adapted to study the fate of contaminants in fish. Study of less lipophilic compounds can be envisioned with this approach, including the uptake of contaminants through the gills and the biotransformation processes. Finally, the internal consistency of the proposed model of organic contaminant bioaccumulation sets the stage for a mechanistic understanding of toxicity and ecological effects of organic contaminants in marine organisms. Some contaminants are considered to alter energy use by causing energy loss or poor energy management. Including those toxicity phenomena into our bioaccumulation model would allow to model the effects of contaminants on physiological functions.

Acknowledgments - This work was partially funded by the Regional Council of Languedoc-Rousillon. Moreover, we would like to thank the crew of the IFREMER boats “L’Europe” and “Gwen-drez” for making the sampling possible. The authors are also grateful to Pierre Bodenes for drawing the map, Aurélie Jolivet for communicating her data, Bas Kooijman and the AquaDEB team (www.ifremer.fr/aquadeb/) for their assistance.

CONCLUSION

Nous avons choisis de concevoir un modèle de bioaccumulation des PCB chez le merlu sur la base d'un modèle bioénergétique. Son développement s'est déroulé en deux temps. Le premier a été de paramétrer un modèle de croissance basé sur la théorie DEB, choisi pour sa généralité d'application à différentes espèces et différents milieux. Il a été appliqué à la croissance du merlu dans deux zones côtières aux caractéristiques environnementales différentes : le golfe du Lion (mer Méditerranée) et le golfe de Gascogne (océan Atlantique). La température et la densité de nourriture ont été utilisées comme variables forçantes spécifiques aux milieux étudiés. Elles conditionnent les différences de performance de croissance entre les populations des zones considérées. Par sa description de la physiologie des organismes, le modèle a permis de reproduire les différences de croissance observées entre les mâles et les femelles, et d'appréhender les variations de teneurs lipidiques en fonction du stade de vie, de l'état des réserves et du statut reproducteur des poissons. En raison de la remise en cause récente des méthodes classiques d'estimation de l'âge du merlu, les prédictions de croissance du modèle ont été comparées à de nouvelles estimations, basées sur des campagnes de marquage recapture. Ces expérimentations étant toujours en cours, la validation de ces nouvelles estimations n'est pas encore définitive. Les prédictions de croissance du modèle sont néanmoins en bon accord avec ces nouvelles estimations, sauf pour les mâles du golfe de Gascogne pour lesquels le modèle semble sous évaluer la croissance durant les premières années de leur vie.

Dans un deuxième temps, un modèle de bioaccumulation des PCB a été couplé au modèle de croissance afin de tenir compte des effets de l'âge, de la croissance, de l'état des réserves, du sexe, et de la reproduction sur les cinétiques d'accumulation et de décontamination de ces composés. Les hypothèses de départ du modèle étaient de plusieurs ordres : 1) un apport de PCB exclusivement par la voie alimentaire. 2) une accumulation des PCB dans les compartiments de réserve dans lesquels ils se répartissent de manière homogène. 3) une perte de contaminant uniquement engendrée par la ponte, dont la quantité est proportionnelle à la concentration des PCB dans les réserves au moment de la formation des gamètes et à la quantité de réserve mobilisée pour leur synthèse. La perte de PCB par émission des gamètes mâles a été considérée négligeable. Le modèle intègre l'évolution de la contamination du bol alimentaire du merlu au cours de sa vie et décrit efficacement l'accumulation de 4 congénères de PCB peu métabolisables durant toute la vie des merlus

mâles et femelles des deux populations étudiées. Les bons accords observés entre les concentrations en PCB mesurées et simulées suggèrent que les hypothèses de base du modèle de bioaccumulation sont valides et que cette approche est adaptée à la problématique du devenir des contaminants organiques chez les poissons. Grâce à la représentation des pertes de PCB par la ponte, nous avons pu observer que ce processus peut être un facteur important de décontamination pour les femelles, et que la variabilité inter-individuelle de la taille à première ponte pourrait être à l'origine de la grande variation des concentrations en PCB mesurées chez les femelles du golfe du Lion.

Le modèle de bioaccumulation présenté ici offre donc une explication unifiée de l'influence des divers processus biologiques influant sur le devenir des PCB chez le merlu. Cette première étape prometteuse ouvre la voie à l'application du modèle pour l'étude de la bioaccumulation des PCB chez d'autres poissons et avec d'autres composés. Il pourrait également servir de base au développement d'une application consistant à intégrer les effets toxiques des contaminants organiques sur les grandes fonctions physiologiques des organismes marins, en réponse à leur accumulation.

CONCLUSION GENERALE
ET PERSPECTIVES

1 Conclusion générale

La compréhension des processus d'intégration des POP dans les réseaux trophiques, leur bioaccumulation dans les organismes, et les effets toxiques directs ou indirects qu'ils peuvent engendrer sur les individus, les populations et les écosystèmes en général apparaît fondamental dans l'évaluation et la gestion des risques posés par les contaminants organiques sur l'environnement et l'homme. Parmi ces polluants, les PCB sont particulièrement redoutés car ils sont très persistants dans l'environnement, se bioaccumulent dans les tissus riches en lipides et sont bioamplifiés le long des réseaux trophiques. Bien que le golfe du Lion reçoive les apports du Rhône, fleuve particulièrement contaminé par les PCB dans lequel la consommation de poisson est interdite, très peu de données sont disponibles sur la contamination des poissons dans cette région côtière. De part son niveau trophique élevé et son intérêt économique important, le merlu Européen a été choisi comme espèce modèle pour cette étude.

Le sujet de cette thèse était d'étudier le devenir des PCB chez le merlu du golfe du Lion. Les principaux objectifs étaient d'une part de comprendre le cheminement des PCB dans le réseau trophique aboutissant à cette espèce et de dresser un état des lieux de sa contamination par cette famille de composés. D'autre part, d'identifier les processus biologiques et physiologiques influant sur ces niveaux de contamination, et enfin, de construire et paramétrer un modèle de bioaccumulation intégrant ces processus, qui puisse servir d'outil de recherche ainsi que de base à un modèle prédictif de l'exposition du merlu aux PCB et à ses effets.

Sur la base des travaux menés sur la structure et la dynamique trophique du merlu dans le golfe du Lion, une première approche a consisté à étudier le comportement des PCB dans les principales espèces constituant ce réseau. Les différents maillons choisis ont été le phytoplancton marin, voie d'entrée majoritaire des PCB dans le réseau puisque constituant la source de matière organique de l'ensemble du système, le zooplancton, la faune suprabenthique et les consommateurs primaires et secondaires que sont les poissons pélagiques, démersaux et benthiques. L'augmentation des niveaux de contamination en PCB avec le niveau trophique indique une bioamplification de ces composés le long du réseau. Tous les congénères n'ont néanmoins pas un comportement identique, car une évolution des

profils est observable depuis les premiers maillons jusqu'aux prédateurs supérieurs. Les congénères les moins chlorés subissent en effet une moindre bioamplification en comparaison des plus chlorés, en partie en raison d'une moindre efficacité d'assimilation engendrée par une plus faible hydrophobicité, et d'une éventuelle métabolisation des composés les moins stables. Par ailleurs, le niveau trophique n'explique pas à lui seul les niveaux de PCB observés. Ainsi, l'âge des différentes espèces a été identifié comme un des facteurs responsables des niveaux de contamination.

L'exposition du merlu aux PCB par la voie trophique nous a conduit à étudier plus en détail ses niveaux de contamination. En premier lieu, il apparaît que le foie, organe le plus riche en lipides, constitue la cible préférentielle de ces contaminants. D'un point de vue quantitatif, les merlus du golfe du Lion présentent des niveaux de contamination en PCB élevés en comparaison à la population du golfe de Gascogne (Atlantique Nord-Est), mais inférieurs à ceux rencontrés dans la population de la baie de Naples (mer Tyrrénienne). D'un point de vue qualitatif, les empreintes sont dominées par les congénères les plus stables et sont très peu variables quel que soit l'organe étudié.

La contamination par les PCB est nettement plus élevée que celle en PBDE, mais les niveaux de chacun des congénères prédominants (CB153 et BDE 47) sont significativement corrélés, ce qui pourrait indiquer des mécanismes de bioaccumulation similaires de ces deux familles de composés organohalogénés dans les poissons.

La variation importante des niveaux de contamination en PCB mesurés chez les merlus du golfe du Lion nous a ensuite amené à étudier l'influence de paramètres biologiques et physiologiques sur ces niveaux. L'augmentation de la contamination avec la taille, déjà observée lors de l'étude du réseau trophique, montre une bioaccumulation des PCB au cours de la vie des merlus. Le sexe est également un des facteurs biologiques prédominant, en raison d'une part de la différence de croissance entre les mâles et les femelles, et d'autre part, des pertes de contaminants engendrées par la reproduction. La ponte est en effet un facteur de décontamination important chez les femelles, puisqu'à partir de leur première reproduction, une nette diminution des concentrations en PCB est observée. Nous avons montré que l'origine de cette décontamination provenait au moins en partie de la mobilisation des PCB présents dans le muscle vers les gonades au moment de leur maturation, et que ce transfert s'effectue par la voie des lipides. Les niveaux de contamination en PCB sont donc influencés

par l'âge, le sexe, et le degré de maturité. Ces facteurs biologiques ont une action variable en fonction du stade de vie de l'animal.

Le développement d'un modèle de bioaccumulation s'est avéré être un outil essentiel pour appréhender cette complexité difficile à intégrer par une approche statistique classique. Il s'est déroulé en deux étapes.

La première a été la paramétrisation d'un modèle de croissance basé sur la théorie DEB. Elle a permis de décrire de manière mécanistique les différents processus biologiques identifiés comme influençant les niveaux de contamination en PCB, à savoir l'alimentation, la croissance, les mécanismes de mobilisation de l'énergie des réserves pour la reproduction et la ponte. Ce modèle a été appliqué à deux zones côtières aux caractéristiques environnementales différentes, le golfe du Lion (mer Méditerranée) et le golfe de Gascogne (océan Atlantique). Il reproduit avec réalisme l'évolution temporelle de la croissance des merlus mâles et femelles par une différence d'investissement de leur énergie pour la reproduction. Bien que les dernières estimations de la croissance du merlu par marquage recapture ne soient pas encore publiées, elles ont été choisies pour tester la validité des simulations obtenues, car les anciennes estimations basées sur l'interprétation des lectures otolithaires ont été récemment remises en question. Les prédictions de croissance du modèle sont en bon accord avec les nouvelles estimations, sauf pour les mâles du golfe de Gascogne pour lesquels le modèle semble sous évaluer la croissance durant les premières années de leur vie.

La seconde étape a été la construction et la validation d'un modèle de cinétique des PCB, couplé au modèle de croissance. Il prend en compte les effets de la croissance, de l'état des réserves, du sexe, et de la reproduction sur les cinétiques d'accumulation et de décontamination des PCB. Les principales hypothèses de départ ont été un apport de PCB exclusivement par la voie alimentaire, une accumulation des PCB dans l'organisme dans les compartiments de réserve et une perte de contaminant uniquement lors de la ponte des femelles. La perte de PCB par l'émission de gamètes mâles a été considérée négligeable. Le modèle intègre l'évolution de la contamination du bol alimentaire du merlu au cours de sa vie et décrit efficacement l'accumulation de 4 congénères de PCB peu métabolisables durant toute la vie des merlus mâles et femelles des deux populations étudiées. La bonne correspondance entre les concentrations en PCB mesurées et simulées a permis de valider les hypothèses de

base du modèle de bioaccumulation et indique que cette approche est adaptée à la problématique du devenir des contaminants organiques chez les poissons. Grâce à la représentation des pertes de PCB par la ponte, nous avons pu observer que ce processus peut être un facteur important de décontamination pour les femelles, et que la variabilité inter-individuelle de la taille à première ponte peut être à l'origine de la grande variation des concentrations en PCB mesurées chez les femelles du golfe du Lion.

Le modèle de bioaccumulation développé lors de cette étude permet donc une explication du devenir des PCB chez le merlu, en apportant une solution adaptée pour la description quantitative des principaux processus influant sur la bioaccumulation des PCB chez les poissons à tous les stades de sa vie.

2 Perspectives de recherche

Ces résultats ouvrent de nombreuses perspectives et demandent la réalisation d'études supplémentaires pour mieux comprendre et approfondir certains phénomènes observés.

2.1 Apports d'expérimentations en milieu contrôlé

La poursuite des travaux sur le devenir des PCB chez le merlu devrait préalablement passer par la mise en place d'un volet expérimental. Cet aspect ne pourra cependant être abordé qu'après une bonne maîtrise de l'élevage des merlus en captivité, ce qui n'est pas encore tout à fait le cas.

Ce type d'approche permettrait en premier lieu d'accroître la connaissance de la biologie du merlu. Lors de cette étude, nous avons montré que les facteurs biologiques tels que l'alimentation, la croissance et la reproduction ont un rôle important sur le devenir des PCB chez le merlu. Jusqu'à présent, la quasi-totalité des études menées sur la biologie de cette espèce a été réalisée en milieu naturel. Elles apportent des connaissances liées au cycle de vie des merlus, à leur régime alimentaire ou à leur croissance dans le milieu naturel dans le cas des études de marquage-recapture. Des expériences en milieu contrôlé apporteraient une connaissance complémentaire et pourraient permettre de mieux définir les grandes fonctions physiologiques et de valider certains paramètres de notre modèle. Ainsi, le taux d'ingestion maximum, paramètre qui est apparu particulièrement sensible dans le modèle de

bioaccumulation, pourrait être évalué avec précision sur des individus nourris *ad libitum*. L'impact des variations de température sur les paramètres physiologiques tels que les taux d'alimentation et de croissance pourrait également être appréhendé pour permettre une meilleure représentation des différences observées sur des populations d'une même espèce évoluant dans des milieux différents.

Par la suite, cet outil permettrait d'étudier en détail la bioaccumulation des PCB chez le merlu, et notamment leur assimilation efficace à partir de la nourriture, les cinétiques d'accumulation et de décontamination, ainsi que la répartition et le transfert de ces contaminants entre organes. Une étude plus approfondie pourrait pour cela être menée sur les interactions existant entre le transfert des PCB et le métabolisme des différents types de lipides dans l'organisme. Enfin, les PCB peuvent avoir des effets toxiques de plusieurs ordres sur les organismes. La mise en place d'un volet expérimental permettrait d'appréhender différents types d'effets sur certaines fonctions physiologiques, en réponse à une exposition ponctuelle ou chronique aux PCB. Il serait notamment intéressant d'étudier leur impact à différentes doses sur le taux d'ingestion et le taux de croissance, ainsi que d'évaluer leur éventuel effet en terme de repro- et génotoxicité. Une estimation des concentrations seuils à partir desquelles des effets sont détectables pourrait également être envisagée. Etant donné que le merlu n'atteint sa première maturité sexuelle qu'à partir de deux ans pour les femelles, il semble difficile d'appréhender les éventuels effets des PCB sur la reproduction de cette espèce avec une telle approche.

2.2 Evolution du modèle de bioaccumulation

Le modèle de bioaccumulation développé lors de cette étude a été paramétré et appliqué pour décrire l'accumulation des PCB chez le merlu du golfe du Lion et du golfe de Gascogne. Cette application n'est néanmoins qu'une première étape, validant le couplage qui a été mis en place entre un modèle de croissance (approche DEB) et un modèle de cinétique des contaminants organiques. Le choix de départ d'utiliser une structure de type DEB a été motivé en raison de sa description réaliste des grandes fonctions physiologiques des organismes et pour ses multiples perspectives de développement. Cet outil offre donc de nombreuses pistes de recherche pour l'étude des phénomènes de bioaccumulation.

La première est une application du modèle à d'autres congénères de PCB et d'autres contaminants organiques présentant un comportement similaire. Certains congénères de PCB sont décrits comme potentiellement métabolisables par les organismes marins. Par une description détaillée du métabolisme, le modèle pourrait être utilisé pour simuler ce phénomène. Une des pistes potentielles de modélisation pourrait être de décrire un taux de métabolisation de manière proportionnelle au taux de maintenance de l'organisme. Dans le cas de la formation de métabolites non éliminés par l'organisme, le modèle deviendrait néanmoins plus complexe et une gestion de leur dynamique devra être envisagée. Mais la représentation de la biotransformation des composés ouvrirait alors la voie à l'application du modèle à d'autres familles de contaminants organiques métabolisables, comme par exemple les PBDE ou les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP). Une autre caractéristique des composés moins persistants est qu'ils sont un peu plus solubles dans l'eau et qu'ils peuvent de ce fait entrer dans l'organisme par le biais des branchies lorsque le poisson respire. Cet aspect pourrait être pris en compte dans le modèle, avec une entrée de ces contaminants de manière proportionnelle au taux de respiration. Ce taux n'est néanmoins pas explicite dans le modèle DEB, mais peut être défini par la consommation d'oxygène. Kooiman (2000) décrit cette consommation comme proportionnelle à la somme des produits de dégradation du métabolisme. Elle est directement liée aux coûts énergétiques d'assimilation, de maintenance et de croissance des organismes. Dans le cas des contaminants un peu moins hydrophiles, l'hypothèse d'un stockage exclusif dans les réserves lipidiques devra être revue. Leur répartition dans l'organisme pourrait être envisagée de manière proportionnelle à leur affinité pour les lipides en utilisant leur coefficient de partage octanol-eau (k_{ow}), entre les compartiments de réserve, considérés comme exclusivement composés de lipides neutres, et le compartiment somatique, composé majoritairement de protéines.

La seconde piste de d'évolution du modèle de bioaccumulation est une intégration des effets potentiels que les contaminants peuvent produire sur les merlus. A partir d'une certaine concentration, le contaminant peut en effet être considéré comme perturbateur de l'utilisation de l'énergie, en entraînant une déperdition ou une mauvaise gestion de celle-ci. De part sa description réaliste de la biologie des organismes, le modèle DEB est particulièrement adapté pour simuler de manière mécanistique ces phénomènes sur la croissance, la reproduction et la survie des individus modélisés. Les effets sur la croissance peuvent être traduits par une diminution de la quantité de nourriture assimilée, une augmentation des coûts de maintenance de l'organisme et une augmentation du coût énergétique de la croissance. La diminution de la

fécondité des organismes peut être traduite par une diminution de l'énergie disponible pour la reproduction et une augmentation du coût énergétique de la synthèse des ovocytes. A partir d'une certaine concentration, il est également envisageable de calculer un risque de mortalité (Kooijman et Bedaux, 1996). Enfin, si un tel modèle peut être validé et que la structure de la population est bien définie, il serait alors possible d'envisager de modéliser les conséquences de la contamination des individus sur le devenir des populations de merlus. Les modèles populationnels structurés en classes d'âge de type « matrice de Leslie » peuvent en effet être utilisés pour prédire des scénarios de pollution (Lopes *et al.*, 2005).

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abarnou A. et Loizeau V., 1994. La bioaccumulation : l'exemple des PCB. *Oceanis*, 20 : 29-45.
- Abarnou A., Burgeot T., Chevreuil M., Leboulenger F., Loizeau V., Madoulet-Jaouen A. et Teil M. J., 2000. Les contaminants organiques : quels risques pour le monde vivant? *Programme Scientifique Seine-Aval*, fasc. 13, 35 p.
- Abella A., Caddy J. F., Serena F., 1997. Declining natural mortality with age and fisheries on juveniles: a Mediterranean demersal fishery yield paradigm illustrated for *Merluccius merluccius*. *Aquatic Living Resources*, 10 : 257-269.
- AFSSA, 2003. Avis de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments sur l'existence éventuelle d'une corrélation significative entre les teneurs dans les différents congénères de PCB. *Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France section Aliments et Nutrition*. Saisine n°2002-SA-0149, France.
- AFSSA, Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments, 2008. Avis de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments relatif à l'interprétation des résultats d'analyses du plan d'échantillonnage mis en place dans le cadre de la pollution en PCB des poissons du Rhône. Saisine n° 2007-SA-0239, France.
- AFSSET. Agence Française de Sécurité Sanitaire de l'Environnement et du Travail. Disponible en ligne à partir de <http://www.afsse.fr/>.
- Aguilar A. and Borrell A., 2005. DDT and PCB reduction in the western Mediterranean from 1987 to 2002, as shown by levels in striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*). *Marine Environmental Research*, 59 : 391-404.
- Ahlborg U.G., Hanberg A., 1994. Toxic equivalency Factors for dioxin-like PCBs. *Environmental Science and Pollution Research International*, 1 : 67-68.
- Aldebert Y., 1974. Oeufs et larves de quelques poissons téléostéens récoltés par l'Ichthys de 1970 à 1972. *Rapport de la Commission Internationale sur la Mer méditerranée*, 22 : 41.
- Aldebert Y. et Carriès J.C., 1989a. La croissance du merlu dans le Golfe du Lion. Méthodologie. Problèmes posés. Report of the age-reading workshop on Mediterranean Hake and Sardine. *Palma de Mallorca, Espana, 10-15 April 1989* : 66-70.
- Aldebert Y. et Carriès C., 1989b. L'exploitation du merlu dans le golfe du Lion. *Bulletin de la Société Zoologique de France*, 114 : 15-20.
- Aldebert Y., Recasens L., Leonart J., 1993. Analysis of gear interactions in a hake fishery : the case of the Gulf of Lions (NW Mediterranean). *Scientia Marina*, 57 : 207-217.

- Aldebert Y. et Recasens L., 1995. Estimation de la croissance du merlu dans le golfe du Lion par l'analyse des fréquences de taille. *Rapport de la Commission Internationale sur la Mer méditerranée*, 34 : 236.
- Aldebert Y., and Recasens L., 1996. Comparison of methods for stock assessment of European hake *Merluccius merluccius* in the Gulf of Lions (Northwestern Mediterranean). *Aquatic Living Resources*, 9 : 13-22.
- Alheit J., and Pitcher T. J., 1995. Hake: Fisheries, Ecology and markets. *Chapaman & Hall, London* : 478 p.
- American Chemical Society. Disponible en ligne à partir de <http://www.cas.org/>
- Aminot A., Rey F., 2002. Chlorophyll a: Determination by spectroscopic methods. *ICES Techniques of Marine Environmental Sciences*, 30 : 18p.
- Aminot A and Kerouel R., 2004. Hydrologie des ecosystems marins. Paramètres et analyses. *Edition Ifremer*, 336 p.
- Anonyme (2003). Food energy-methods of analysis and conversion factors, Rome 2003. *FAO, Food and Nutrition Paper 77*.
- Antunes P., Amado J., Vale C., Odete G., 2007. Influence of the chemical structure on mobility of PCB congeners in female and male sardine (*Sardina pilchardus*) from Portuguese coast. *Chemosphere*, 69 : 395-402.
- Arnot J.A. and Gobas F.A.P.C., 2006. A review of bioconcentration factor (BCF) and bioaccumulation factor (BAF) assessments for organic chemicals in aquatic organisms. *Environmental Review*, 14 : 257-297.
- Attaran A., and Maharaj R., 2000. Doctoring malaria, badly: the global campaign to ban DDT. *Br. Med. J.*, 321 : 1403-1405.
- Atwell L., Hobson K.A. and Welch H.E., 1998. Biomagnification and bioaccumulation of mercury in an arctic marine food web: Insights from stable nitrogen isotope analysis. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 55 : 1114-1121.
- Babut M. et Miège C., 2007. Contamination des poissons et des sédiments du Rhône par les polychlorobiphényles. *Rapport Cemagref*, 37 p.
- Bagenal T.B., 1954. Growth rate of the hake (*Merluccius merluccius* L.) in the Clyde and other Scottish areas. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 33 : 69-95.
- Baker J.E., Eisenreich S.J., 1989. PCBs and PAHs as tracers of particulate dynamics in large lakes. *Journal of Great Lakes Research*, 15 : 84-103.

- Baker J.E., Eisenreich S.J., Steven J., Eadie B.J., 1991. Sediment trap fluxes and benthic recycling of organic carbon, polycyclic aromatic hydrocarbons, and polychlorobiphenyl congeners in Lake Superior. *Environmental Science and Technology*, 5 : 500-509.
- Ballschmiter K., Zell M., 1980. Analysis of PCB by glass capillary gas chromatography : composition of technical Aroclor and clophen PCB mixtures. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 302 : 20-31.
- Barber M.C., Suárez L.A. and Lassiter R.R., 1991. Modelling bioaccumulation of organic pollutants in fish with an application to PCBs in Lake Ontario salmonids. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 48 : 318-337.
- Bayne B.L., 1988. The physiology of suspension feeding by bivalve molluscs: an introduction to the Plymouth 'TROPHEE' workshop. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 219 : 1-19.
- Belcari P., Ligas A., 2006. Age determination and growth of juveniles of the European hake, *Merluccius merluccius* (L., 1758), in the northern Tyrrhenian Sea (NW Mediterranean). *Fisheries Research*, 78 : 211-217.
- Belloc G., 1935. Belloc, Etude monographique du merlu *Merluccius merluccius* L. 3ème partie, *Revue des travaux de l'Office des pêches maritimes*, 8 : 145-202.
- Berglund O., Larsson P., Ewald G. and Okla L., 2001. Bioaccumulation and differential partitioning of polychlorinated biphenyls in freshwater, planktonic food web. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 57 : 1160-1168.
- Bernes C., 1998. Persistent organic pollutants. Monitor 16. *Swedish Environmental Protection Agency*. ISBN 91-620-1189-8.
- Bertignac M. and de Pontual H., 2007. Consequences of bias in age estimation on assessment of the northern stock of European hake (*Merluccius merluccius*) and on management advice. *ICES Journal of Marine Science*, 64 : 981-988.
- Bignert A., Olsson M., Persson W., Jensen S., Zakrisson S., Litzen K., Eriksson U., Haeggberg L., Alsberg T., 1998. Temporal trends of organochlorines in Northern Europe, 1967-1995. Relation to global fractionation, leakage from sediments and international measures. *Environmental Pollution*, 99 : 177-198.
- Bintein S., Devillers J. and Karcher W., 1993. Nonlinear dependence of fish bioconcentration on *n*-octanol/water partition coefficient. *SAR QSAR Environmental Research*, 1 : 29-39.
- Bjelland R.M., Skiftesvik A.B., 2006. Larval development in European hake (*Merluccius merluccius* L.) reared in a semi-intensive culture system. *Aquaculture Research*, 37 : 1117-1129.

- Bligh E.G. and Dyer W.J., 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37 : 911-917.
- Bocio A., Domingo J.L., Falco G., Llobet J.M., 2007. Concentrations of PCDD/PDFs and PCBs in fish and sea food from the Catalan (Spain) market: Estimated human intake. *Environment International*, 33 : 170-175.
- Bode A., Carrera P. and Lens S., 2003. The pelagic foodweb in the upwelling ecosystem of Galicia (NW Spain) during spring: natural abundance of stable carbon and nitrogen isotopes. *ICES Journal of Marine Science*, 60 : 11-22.
- Bode A., Alvarez-Ossorio M.T., Carrera P. and Lorenzo J., 2004. Reconstruction of trophic pathways between plankton and the North Iberian sardine (*Sardina pilchardus*) using stable isotopes. *Scientia Marina*, 68 : 165-178.
- Bodiguel X., Tronczyński J., Loizeau V., Munsch C., Guiot N., Le Guellec A.M., Olivier N., Roupsard F., Mellon C., 2008. Classical and novel organohalogen compounds (PCBs and PBDEs) in hake (*M. merluccius*, L.) from Mediterranean and Atlantic coasts (France). *Environmental Toxicology 2008, Witt Press*. 157-167.
- Bodin N., 2005. Contamination des crustacés décapodes par les composés organohalogénés. Etude détaillée de la bioaccumulation des PCB chez l'araignée de mer *Maja brachidactyla*. *Thèse de doctorat, Université de Bretagne Occidentale* : 309p.
- Bodin N., Caisey X., Abarnou A., Loizeau V., Latrouite, D. Le Guellec A.-M. and Guillou M., 2007. PCB contamination of the spider crab *Maja brachydactyla*: influence of physiological and ecological processes. *Environmental and Toxicological Chemistry*, 26 : 454-461.
- Bodin N., Abarnou A., Fraisse D., Defour S., Loizeau V., Le Guellec A.M., Philippon, X., 2007. PCB, PCDD/F and PBDE levels and profiles in crustaceans from the coastal waters of Brittany and Normandy (France). *Marine Pollution Bulletin*, 54 : 657-6687.
- Bodin N., Abarnou A., Le Guellec A.M., Loizeau V. and Philippon X., 2007. Organochlorine contaminants in decapod crustaceans from the coasts of Brittany and Normandy (France). *Chemosphere*, 67 : S36-S47.
- Bodin N., Le Loc'h F., Caisey X., Le Guellec A.M., Abarnou A., Loizeau V., and Latrouite D., 2008. Congener-specific accumulation and trophic transfer of polychlorinated biphenyls in spider crab food webs revealed by stable isotope analysis. *Environmental Pollution*, 151 : 252-261.

- Boon J. P., Eijgenraam F., Everaats J.M., Duinker J.C., 1989. A Structure-Activity Relationship (SAR) approach towards metabolism of PCBs in marine animals from different trophic levels. *Marine Environmental Research*, 27 : 159-176.
- Boon J.P., Lewis W.E., Tjoen-A-Choy M.R., Allchin C.R., Law R.J., De Boer J., Ten Hallers-Tjabbes C.C. and Zegers B.N., 2002. Levels of polybrominated diphenyl ether (PBDE) flame retardants in animals representing different trophic levels of the North Sea food web. *Environmental Science and Technology*, 36 : 4025-4032.
- Borga K., Gabrielsen G.W., Skaare J.U., 2001. Biomagnification of organochlorines along a Barents Sea food chain. *Environmental Pollution*, 113 : 187-198.
- Borga K., Fisk A.T., Hoekstra P.F. and Muir D.C.G., 2004. Biological and chemical factors of importance in the bioaccumulation and trophic transfer of persistent organochlorine contaminants in Arctic marine food webs. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23 : 2367-2385.
- Borga K., Wolkers H., Skaare, J. U., Hop H., Muir D.C.G., Gabrielsen G.W., 2005. Bioaccumulation of PCBs in Arctic seabirds: influence of dietary exposure and congener biotransformation. *Environmental Pollution*, 134 : 397-409.
- Bourrin F., 2007. Variabilité et devenir des apports sédimentaires par les fleuves côtiers : cas du système Têt - littoral Roussillon dans le golfe du Lion. *Thèse de l'université Via Domitia de Perpignan* : 305 p.
- Bozzano A., Recasens L. et Sartor P., 1997. Diet of the European hake (*Merluccius merluccius*) in the Western Mediterranean (Gulf of Lion). *Sci. Mar.*, 61 : 1-8.
- Bozzano A., Sardà F., Rios J., 2005. Vertical distribution and feeding patterns of the juvenile European hake, *Merluccius merluccius* in the NW Mediterranean. *Fisheries Research*, 73 : 29-36.
- Brett J.R. and Groves T.D.D., 1979. Physiological energetics. In: Hoar, W.S., Randall, D.J. and Brett, J.R., Editors, 1979. *Fish Physiology* 8, Academic Press, New York : 279-352.
- Broman D., Näf C., Rolff C., Zebuhr Y., Fry B. and Hobbie J., 1992. Using ratios of stable nitrogen isotopes to estimate bioaccumulation and flux of polychlorinated dibenzo-p-dioxins (PCDDs) and dibenzofurans (PCDFs) in two food chains from the northern Baltic. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 11 : 331-345.
- Bruggeman W.A., 1982. Hydrophobic interactions in the aquatic environment. Handbook of the environmental chemistry. 2. (B). O. Hutzinger Ed. Springer Verlag Pub. : 205p.
- Bureau S., Zebühr Y., Broman D. and Ishaq R., 2004. Biomagnification of polychlorinated biphenyls (PCBs) and polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) studied in pike (*Esox*

- lucius*), perch (*Perca fluviatilis*) and roach (*Rutilus rutilus*) from the Baltic Sea. *Chemosphere*, 55 : 1043-1052.
- Burreau S., Zebühr Y., Broman D., and Ishaq R., 2006. Biomagnification of PBDEs and PCBs in food webs from the Baltic Sea and the northern Atlantic Ocean. *Science of the Total Environment*, 366 : 659-672.
- Cabana G. and Rasmussen J.B., 1994. Modelling food chain structure and contaminant bioaccumulation using stable nitrogen isotopes. *Nature*, 372 : 255 - 257.
- Cabana, G., Rasmussen, J.B., 1996. Comparison of aquatic food chains using nitrogen isotopes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93 : 10844-10847.
- Campfens J. and Mackay D., 1997. Fugacity-based model of PCB bioaccumulation in complex aquatic food webs. *Environmental Science and Technology*, 31 : 577-583.
- Campillo A., Aldebert Y., Bigot J.L., Liorzou B. 1989. Données sur la distribution des principales espèces commerciales du golfe du Lion. *IFREMER DRV-89.041-RH-Sète* : 137p.
- Casas S. and Bacher C., 2006. Modelling of trace metal (Hg and Pb) bioaccumulation in the Mediterranean mussel, *Mytilus galloprovincialis*, applied to environmental monitoring, *Journal of Sea Research*, 56 : 168-181
- Casey J. and J. Periero, 1995. European hake (*M. merluccius*) in the north-east Atlantic. p. 125-147. In J. Alheit and T. J. Pitcher (eds.) Hake: Biology, fisheries and markets. *Chapaman & Hall, London.* : 478 p.
- Chapela M.J., Sanchez A., Suarez M.I., Pérez-Martín R.I., and G. Sotelo C.G., 2007. A Rapid Methodology for Screening Hake Species (*Merluccius* Spp.) by Single-Stranded Conformation Polymorphism Analysis. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 55 : 6903-6909.
- Clark K.E., Gobas F.A.P.C. and Mackay D., 1990. Model of organic chemical uptake and clearance by fish from food and water. *Environmental Science and Technology*, 24 : 1203-1213.
- Clark E.J., Norris D.O., Jones R.E., 1998. Interactions of gonadal steroids and pesticides (DDT, DDE) on gonaduct growth in larval tiger salamanders, *Ambystoma tigrinum*. *General and Comparative Endocrinology*, 109 : 94-105.
- Cohen D.M., Inada T., Iwamoto T. et Scialabba N., 1990. FAO species catalogue. Vol. 10. Gadiform fishes of the world (Order Gadiformes). An annotated and illustrated catalogue of cods, hakes, grenadiers and other gadiform fishes known to date. *FAO Fish Synopsis*, 10 (125) : 442 p.

- Conan P., Pujot-Pay M., Raimbault P., Leveau M., 1998. Variabilité hydrologique et biologique du golfe du Lion : II. Productivité sur le bord interne du courant. *Oceanoogica Acta*, 21 : 767-782.
- Connell D.W., 1992. Quantitative structure activity relationship (QSARs) for modelling bioconcentration of lipophilic compounds. Proc. Of a Bioaccumulation workshop. *Water Bd and Australian Marine Science Association Inc. Pub.*, 334p.
- Connolly J.P. and Glaser D., 2002. p,p'-DDE bioaccumulation in female sea lions of the California Channel Islands. *Continental Shelf Research*, 22 : 1059-1078.
- Connolly J.P. and Glaser D., 2002. A model of p,p'-DDE and total PCB bioaccumulation in birds from the Southern California Bight, *Continental Shelf Research*, 22 : 1079-1100.
- Conway D.V.P., Coombs S.H., Fernandez de Puellas M.L. and Tranter P.R.G, 1994. Feeding of larval sardine , *Sardina pilchardus* (Walbaum), off the north coast of Spain. *Boletín del Instituto Español de Oceanografía* 10 : 165-175.
- Courbin N., Fablet R., Mellon C; de Pontual H., 2007. Ere hake otolith macrostructures randomly deposited? Insights from an unsupervised statistical and quantitative approach applied to Mediterranean hake otoliths. *ICES Journal of Marine Science*, 64 : 1191-1201
- Davies R.P., Dobbs A.J., 1984. The prediction of biocentration in fish. *Water Research*, 18 : 1253-1262.
- De Boer J., 1988. Chlorobiphenyls in bound and non-bound lipids in fishes; comparaison of different extraction methods. *Chemosphere*, 17 : 1803-1810.
- Decamps P., and Labastie J., 1978. Note sur la lecture et l'interprétation des otolithes du merlu. *ICES Document*, CM 1978/G: 41.
- de Pontual H., Bertignac M., Battaglia A., Bavouzet G., Moguedet P. et Groison A.L., 2003. A pilot tagging experiment on European hake (*Merluccius merluccius*): methodology and preliminary results. *ICES Journal of Marine Science*, 60 : 1318-1327.
- de Pontual H., Groison A.L., Piñeiro C. and Bertignac M., 2006. Evidence of underestimation of European hake growth in the Bay of Biscay, and its relationship with bias in the agreed method of age estimation, *ICES Journal of Marine Science*, 63 : 1674-1681.
- de Pontual H., Jolivet A., Fablet R., and Bertignac M., 2007. Diel rhythm in diving behaviour of European hake and associated thermal changes revealed by archival tagging. *2nd International Symposium on tagging and tracking marine fish with electronic devices, Donastia-San Sebastian, Spain, October 8-11.*

- de Wit C.A., 2002. An overview of brominated flame retardants in the environment. *Chemosphere*, 46 : 583-624.
- Drouillard K.G., Norstrom R.J., 2000. Dietary absorption efficiencies and toxicokinetics of polychlorinated biphenyls in ring doves following exposure to Aroclor (R) mixtures. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19 : 2707-2714.
- Ducrot V., Péry A.R.R., Mons R., Garric J., 2004. Energy based modelling as a basis for the analysis of reproduction data with the midge *Chironomus riparius*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23 : 225-231.
- Durrieu de Madron X., Abassi A., Heussner S., Monaco A., Aloisi J. C., Radakovitch O., Giresse P., Buscail R., Kerhervé P., 2000. Particulate matter and organic carbon budgets for the Gulf of Lions (NW Mediterranean). *Oceanologica Acta*, 23 : 717-730.
- EINECS. Inventaire Européen des Substances chimiques Commerciales Existantes. Disponible en ligne à partir de <http://ecb.jrc.it/esis/>.
- Farrugio H. et Marin, 1999. Etat des pêcheries et des stocks de poissons démersaux et de petits pélagiques du golfe du Lion (Unités de gestion CGPM 37 1.2) : travaux du laboratoire RH de l'IFREMER pour la période 1983-1999. *Document de travail CSC/CGPM*, Rome, 7-10 juin 1999 : 51p.
- Farrugio H., Massutí E., Guijarro B., Ordinas F., Quetglas A., 2005. Stock assessment of the French-Spanish shared stock of hake (*Merluccius merluccius*) in the Gulf of Lions. *GFCM-SAC WG on demersal stock assessment*, Rome 26-30 september 2005 : 25 pp.
- Ferraton, 2007. Écologie trophique des juvéniles de merlu (*Merluccius merluccius*) dans le golfe du Lion : Implications biologiques de la variabilité spatio-temporelle des ressources alimentaires exploitées dans les zones de nourricerie. *Thèse de doctorat, Université Montpellier2* : 209 p.
- Ferraton F., Harmelin-Vivien M., Mellon-Duval C., Souplet A., 2007. Spatio-temporal variation in diet may affect condition and abundance of juvenile European hake in the Gulf of Lions (NW Mediterranean). *Marine Ecology Progress Series*, 337 : 197-208.
- Fisk A.T., Hobson K.A., Norstrom R.J., 2001. Influence of chemical and biological factors on trophic transfer of persistent organic pollutants in the Northwater Polynya marine food web. *Environmental Science and Technology*, 35 : 732-738.
- Flye Sainte Marie J., Jean F., Paillard C., Ford S., Powell E., Hofmann E., Klinck J., 2007. Ecophysiological dynamic model of individual growth of *Ruditapes philippinarum*. *Aquaculture*, 266 : 130-143.

- Fry D.M., Toone K.T., 1981. DDT-induced feminization of gull embryos. *Science* 213 : 922-924.
- Garcia-Rodriguez M. et Esteban A., 2002. How fast does hake grow? A study on the Mediterranean hake (*Merluccius merluccius* L.) comparing whole otoliths readings and length frequency distributions data. *Scientia Marina*, 66: 145-156.
- Gobas F.A.P.C., 1993. A model for predicting the bioaccumulation of hydrophobic organic chemicals in aquatic food-webs: application to Lake Ontario. *Ecological Modelling*, 69 : 1-17.
- Gobas F.A.P.C., Zhang X., Wells R., 1993. Gastrointestinal magnification: the mechanism of biomagnification and food chain accumulation of organic chemicals. *Environmental Science and Technology*, 27 : 2855-2863.
- Gobas F.A.P.C. et Morrison H.A., 2000. Bioconcentration and biomagnification in the aquatic environment. In: Boethling, R.S. and Mackay, D., Editors, 2000. *Handbook of Property Estimation Methods for Chemicals*, CRC Press, Boca Raton, FL :189-231.
- Goerke H. and Weber K., 2001. Species-specific elimination of polychlorinated biphenyls in estuarine animals and its impact on residue patterns. *Marine Environmental Research*, 51 : 131-149.
- Gomez-Gutierrez A, Garnacho E, Bayona JM, 2007. Screening ecological risk assessment of persistent organic pollutants in Mediterranean sea sediments. *Environment International* 33 : 867-876.
- General Fisheries commission for the Mediterranean (GFCM), 2006. *SAC Sub-Committee on Stock Assessment (SCSA)*. Rome, Italy, 11-14 September. Document n°8.
- Goñi R., Adlerstein S., Alvarez F., Garcia M., Sánchez P., Sbrana M., Maynou F., Viva C., 2004. Recruitment indices of European hake, *Merluccius merluccius* (Linnaeus 1758), in the Northwest Mediterranean based on landings from bottom-trawl multispecies fisheries. *ICES Journal of Marine Science*, 61 : 760-773.
- Guichet R., Quero J. C., Labastie J., 1973. Estimation de la composition du stock du merlu au nord et à l'ouest de l'Irlande. *ICES Document*, CM 1973/G: 5.
- Guichet, R., 1995 The diet of European hake (*Merluccius merluccius*) in the northern part of the bay of Biscay. *ICES Journal of Marine Science*, 52:21-31.
- Hamelink J.L., Waybrandt R.C., Ball R.C., 1971. Proposal: exchange equilibriums control the degree chlorinated hydrocarbons are biologically magnified in benthic environments. *Transactions of the American Fisheries Society*, 100 : 207-214.

- Harmelin-Vivien M., Loizeau V., Mellon-Duval C., Beker B., Arlhac D., Bodiguel X., Ferraton F., Philippon X., Salen-Picard C., in press. Comparison of C and N stable isotope ratios between surface particulate organic matter and phytoplankton in the Gulf of Lions (NW Mediterranean). *Continental Shelf Research*.
- Hawker D. W., et Connell D. W., 1988. Octanol-water partition coefficients of polychlorinated biphenyl congeners. *Environmental Science and Technology*, 22 : 382-387.
- Henshel D.S et Sparks D.W., 2006. Site-specific PCB-linked Interspecies Differences in Organ Somatic Indices. *Ecotoxicology*, 15 : 9-18.
- HELCOM, 2001. The pesticides selected for immediate priority action, a compilation and evaluation of the information given by the contracting parties with the focus on use and legislation. *Helsinki Commission, Baltic Marine Environment Protection Commission*.
- Hickling C. F., 1933. The natural history of hake. 4. Age determination and growth rate. *UK Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, Investigation Series 2 13* : 120 pp.
- Hites R.A., Foran J.A., Carpenter D.O., Hamilton M.C., Knuth B.A., Schwager S.J., 2004. Global assessment of organic contaminants in framed salmon. *Science*, 303 : 226-229.
- Hoekstra P.F., O'Hara T.M., Fisk A.T., Borgå K., Solomon K.R., Muir D.C.G., 2003. Trophic transfer of persistent organochlorine contaminants (OCs) within an Arctic marine food web from the southern Beaufort-Chukchi Seas. *Environmental Pollution*, 124 : 509-522.
- Holling C. S., 1959. Some characteristics of simple types of predation and parasitism. *Canadian Entomology*, 91, pp.385-398.
- Holm G., Norrgren, L., Andersson T., Thuren A., 1993. Effects of Exposure to Food Contaminated with PBDE, PCN or PCB on Reproduction, Liver Morphology and Cytochrome-P450 Activity in the 3-Spined Stickleback, *Gasterosteus aculeatus*. *Aquatic Toxicology*, 27 : 33-50.
- Hummel H., UitOudeGroeneveld J.P., Nieuwenhuise J., van Liere J.M., Bogaards R.H., de Wolf L., 1989. A relation between PCB concentrations and reproduction in mussels *Mytilus edulis*. *Marine Environmental Research*, 28 : 489-493.
- Iglesias S., and Dery L., 1981. Age and growth of hake (*Merluccius merluccius* L.) from ICES Divisions VIIIc and IXa. *ICES Document*, CM 1981/G: 38.
- Isosaari P., Hallikainen A., Kiviranta H., Vuorinen P.J., Parmanne R., Koistinen J., Vartiainen T., 2006. Polychlorinated dibenzo-p-dioxins, dibenzofurans, biphenyls, naphthalenes and polybrominated diphenyl ethers in the edible fish caught from the Baltic Sea and lakes in Finland. *Environmental Pollution*, 141 : 213-225.

- Jadaud A., Mellon-Duval C., Farrugio H., Guijarro B., Valls M., Massutí E., Ordinas F., Quetglas A., 2006. Stock assessment of the French-Spanish shared stock of hake (*Merluccius merluccius*) in the Gulf of Lions. *GFCM-SAC WG on demersal stock assessment*, Sète 4-5 july 2006 : 28 p.
- Jaouen-Madoulet A., 2000. Distribution et effet biologiques des PCB et HAP dans les organismes de l'estuaire de Seine. *Thèse de doctorat, Université du Havre* : 244 p.
- Jarman W.M., Hobson, K.A., Sydeman, W.J., Bacon, C.E., McLaren, E.B., 1996. Influence of trophic position and feeding location on contaminant levels in the Gulf of the Farallones food web revealed by stable isotope analysis. *Environmental Science and Technology*, 30 : 654-660.
- Jennings S., Warr K.J., 2003. Environmental correlates of large-scale spatial variation in the $\delta^{15}\text{N}$ of marine animals. *Marine Biology*, 142 : 1131-1140.
- Jensen S., 1966. Report of a new chemical hazard. *New Sci.*, 32 : 62.
- Jensen S, Johnels A, Olsson M, Otterlind G., 1969. DDT and PCB in marine animals from Swedish waters. *Nature*, 223 :753- 4.
- Jobling M.,1982. Food and growth relationship of the cod, *Gadus Morhua* L., with special reference to Balsfjorden, north Norway. *Journal of Fish Biology*, 21 : 357-372.
- Johansson I., Héas-Moisan K., Guiot N., Munsch C., Tronczynski J., 2006. Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in mussels from selected French coastal sites: 1981-2003. *Chemosphere*, 64 : 296-305.
- Joyeux J.C., Tomasini J.A., Bouchereau J.L., 1991. Diet of *Gobius niger* Linne, 1758 (Teleostei, gobiidae) in the brackish lagoon of Mauguio-France. *Annales des sciences naturelles-zoologie et biologie animale*, 12 : 57-69.
- Kannan N., Reusch T.B.H., Schultz-Bull D.E., Petrick G, Duinker J.C., 1995. Chlorobiphenyls : model compound for metabolism in food chain organisms and their potential use as ecotoxicological stress indicators by application of the metabolic slope concept. *Environmental Science and Technology*, 29 : 1851-1859.
- Kerkhoff M.A.T., de Vries A., Otte P., de Boer J., 1983. PCB onderzoek in roob aal wit Nederlandse wateren (1981-1982). *RIVO, Rap. CA 83-07*.
- Kidd K., Schindler D., Hesslein R., Muir D., 1995. Correlation between stable nitrogen isotope ratios and concentrations of organochlorines in biota from a freshwater food web. *Science of the Total Environment*, 161 : 381-390.

- Kidd K.A., Hesslein R.H., Ross B.J., Koczanski K., Stephens G.R., Muir D.C.G., 1998. Bioaccumulation of organochlorines through a remote freshwater food web in the Canadian Arctic. *Environmental Pollution*, 102 : 91-103.
- Kinnberg K., Toft G., 2003. Effects of estrogenic and antiandrogenic compounds on the testis structure of adult guppy (*Poecilia reticulata*). *Ecotoxicol. Environ. Safety*, 54 : 16-24.
- Kiviranta H., Vartiainen T., Parmanne R., Hallikainen A., Ruokojarvi P., Koistinen J., 2003. PCDD/s and PCBs in Baltic herring during the 1990's. *Organohalogen Compounds*, 57 : 153-156.
- Kooijman S. A. L. M., 1988. The von Bertalanffy growth rate as a function of physiological parameters: a comparative analysis. In "Mathematical Ecology". eds, T. G. Hallam, L. J. Gross and S. A. Levin. *World Scientific, Singapore*.
- Kooijman S.A.L.M. and van Haren R.J.F., 1990. Animal energy budgets affect kinetics of xenobiotics. *Chemosphere*, 21 : 681-693.
- Kooijman S. A. L. M., 1993. Dynamic Energy and Mass Budgets in Biological Systems. *Cambridge University Press*.
- Kooijman S.A.L.M., Bedaux J.J.M., 1996. The Analysis of Aquatic Toxicity Data. *Vu University Press, Amsterdam*.
- Kooijman S.A.L.M., 2000. Dynamic Energy and Mass Budgets in Biological Systems. *Cambridge University Press, Cambridge*.
- Kooijman S.A.L.M., 2001. Quantitative aspects of metabolic organizations; a discussion of concepts. *Philosophical Transaction of the Royal Society*, B 356 : 331-349.
- Kooijman S.A.L.M., 2004. The relationship between elimination rates and partition coefficients. *Dynamic Energy and Mass Budgets in Biological Systems*, *Cambridge University Press*.
- Kooijman S.A.L.M., 2007. Software package DEBtool. Téléchargeable depuis : <http://www.bio.vu.nl/thb/deb/deblab/debtool/>
- Kooijman S.A.L.M., Sousa. T., Pecquerie L., van der Meer J., Jager T., 2008. The estimation of DEB parameters, a practical guide. *Biol. Rev.* 83, pp. 533-552.
- Kucklick J.R., and Baker J.E., 1998. Organochlorines in Lake Superior's food web. *Environmental Science and Technology*, 32 : 1192-1198.
- Kuratsune M., 1980. Yusho (chap. 9B1). Halogenated biphenyls, terphenyls, naphtalenes, dibenzodioxins and related products. *R.D. Kimbrough, Ed. P* : 287-302.

- Landrum P.F., Lee H., Lydy M.J., 1992. Toxicokinetics in aquatic systems: model comparison and use in hazard assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 11 : 1709-1725.
- Law R.J., Allchin C.R., de Boer J., Covaci A., Hertzke D., Lepom P., Morris S., Tronczynski, J., de Wit A.C., 2006. Levels and trends of brominated flame retardants in the European environment. *Chemosphere*, 64 : 187-208.
- Leblanc L.A., Buckel J.A., Conover D.O., Brownawell B.J., 2006. Tests of bioaccumulation models for polychlorinated biphenyl compounds: A study of young-of-the-year bluefish in the Hudson River estuary, USA. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25 : 2067-2076.
- Linnaeus C., 1758. *Systema Naturae per Regna Tria Naturae secundum Classes, Ordines, Genera, Species cum Characteribus, Differentiis Synonymis, Locis. 10th ed., Vol. 1. Holmiae Salvii.* : 824 p.
- Lipiatou E., Tolosa I., Simo H.R., Bouloubassi I., Dachs J., Marti S., Sicre M.A., Bayona J.M., Grimalt J., Salot A., Albaiges J., 1997. Mass budget and dynamics of polycyclic aromatic hydrocarbons in the Mediterranean sea. *Deep Sea Research II*, 44 : 881-905.
- Lochet F. et Leveau M., 1990. Transfers between a eutrophic ecosystem, the river Rhône, and an oligotrophic ecosystem, the north-western Mediterranean Sea. *Hydrobiologia*, 207 : 95-103.
- Loizeau V. et Menesguen A. 1993. A steady state model of PCB accumulation in dab food web. *Oceanologica Acta*, 16 : 5-6.
- Loizeau V., Cugier P., Abarnou A., Le-Gall A.C, Le Guellec A.M., Philippon X., 2003. A model of PCB bioaccumulation in simplified food web from the Seine Estuary (Eastern English Channel). In Proceedings of the State of the Art Workshop: Bioaccumulation of Organic Compounds and mercury in Aquatic Food Webs. JRC Ispra (Italy). S.J. Eisenreich and J.m. Zaldivar (Eds).
- Loizeau V., Abarnou A., Menesguen A., 2001. Loizeau, V., Abarnou, A., Menesguen, A., 2001. A Model of PCB Bioaccumulation in the Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*) Food Web from the Seine Estuary (Eastern English Channel). *Marine Pollution Bulletin*, 43 : 242-255.
- Loonen H., van de Guchte C., Parsons J.R., de Voogt P., Govers H.A.J., 1996. Ecological Hazard assessment of Dioxins : Hazards to organisms at different levels of aquatic food webs (fish-eating birds and mammals, fish and invertebrates). *The Science of the Total Environment*, 182 : 93-103.

- Lopes C., Péry A.R.R., Chaumot A., Charles S., 2005. Ecotoxicology and population dynamics: Using DEBtox models in a Leslie modeling approach. *Ecological Modelling*, 188 : 30-40.
- Lucio P., Santurtun M., Quincoces I., 2000. Tagging experiments on hake, anglerfish and other species in the Bay of Biscay. *ICES, C.M. 2000/Z* : 09.
- Luk G.K., Brockway F., 1997. Application of a polychlorinated biphenyls bioaccumulation model to Lake Ontario lake trout. *Ecological Modelling*, 101 : 97-111.
- Mackay D., 1982. Correlation of bioconcentration factors. *Environmental Science and Technology*, 16 : 274-278.
- Mackay D. et Fraser A., 2000. Bioaccumulation of persistent organic chemicals: mechanisms and models. *Environmental Pollution*, 110 : 375-391.
- Madenjian C. P., O'Connor D.V., Nortrup D.A., 2000. A new approach toward evaluation of fish bioenergetics models. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 57 : 1025-1032.
- Mahe K., Amara R., Bryckaert T., Kacher M., Brylinski J. M., 2007. Ontogenetic and spatial variation in the diet of hake (*Merluccius merluccius*) in the bay of Biscay and the Celtic Sea. *ICES Journal of Marine Science*, 64 : 1210-1219.
- Malby L. and Naylor C., 1990. Field deployment of a scope for growth assay involving *Gammarus pule*, a fresh water benthic invertebrate. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 19 : 292-300.
- Marchand M., Abarnou A., Marcaillou-Lebaut C., 1990. Les Polychlorobiphényles (PCB) en milieu marin. Biogéochimie et écotoxicologie. *Rapports scientifiques et techniques de l'Ifremer*, 18.
- Maruyama A., Yamada Y., Rusuwa B., Yuma M., 2001. Change in stable nitrogen isotope ratio in the muscle tissue of a migratory goby, *Rhinogobius* sp., in a natural setting. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 58 : 2125-2128.
- Masuda Y. on behalf of the Study Group for Yusho, 2005. Behavior and toxic effects of PCBs and PCDFs in Yusho patients for 35 years. *Journal of Dermatological Science Supplement*, 1 : S11-S20.
- Maynou F., Leonart J., Cartes J. E., 2003. Seasonal and spatial variability of hake (*Merluccius merluccius* L.) recruitment in the NW Mediterranean. *Fisheries Research*, 60 : 65-78.

- Maynou F., Olivar M. P., Emelianov M., 2006. Patchiness of eggs, larvae and juveniles of European hake *Merluccius merluccius* from the NW Mediterranean. *Fisheries Oceanography*, 15 : 390-401.
- McFarland V. A., Clarke J. U., 1989. Environmental occurrence, abundance, and potential toxicity of polychlorinated biphenyl congeners: Considerations for a congener-specific analysis. *Environmental Health Perspectives*, 81 : 225-239.
- McManus G.B., Wyman K.T., Peterson W.T., Wurster C.F., 1983. Factors affecting the elimination of PCBs in the marine copepod *Acartia tonsa*. *Estuarine Coastal Shelf Science*, 17 : 421-430.
- Mendes E. and Gonzales R.M., 1997. Seasonal changes in the chemical and lipid composition of the Southwest Atlantic hake (*Merluccius hubbsi*). *Food chemistry*, 59 : 213-217.
- Meylan W.M., Howard P.H., Boethling R.S., Aronson D., Printup H., Gouchie S., 1999. Improved method for estimating bioconcentration/bioaccumulation factor from octanol/water partition coefficient. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 18 : 664-672.
- Millischer R.J., 1987. Les PCB et leurs produits de décomposition : peut-on évaluer un seuil de toxicité ? *Revue générale de l'Electricité*, 8 : 23-37.
- Mills L.J., Gutjahr-Gobell R., Haebler R.A., Horowitz D.J.B., Yayaraman S., Pruell R.J., McKinney R.A., Gardner G.R., Zarogian G.E., 2001. Effects of estrogenic (o,p_-DDT; octophenol) and anti-androgenic (p,p_-DDE) chemicals on indicators of endocrine status in juvenile male summer flounder (*Paralichthys dentatus*). Part. B. *Aquatic Toxicology*, 52 : 157-176.
- Minagawa M., Wada E., 1984. Stepwise enrichment of ^{15}N along food chains: Further evidence and the relation between $\delta^{15}\text{N}$ and animal age. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 48 : 1135-1140.
- Minier C., Abarnou A., Jaouen-Madoulet A, Le Guellec A.M., 2006. A pollution-monitoring pilot study involving contaminant and biomarker measurements in the Seine Estuary, France, using zebra mussels (*Dreissena polymorpha*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25 : 112-119.
- Monaco A., Aloïsi J.-C., 2000. Carte de la nature des fonds du Golfe du Lion. CNRS - CEFREM, site ORME : <http://medias.obs-mip.fr/orme/>, Perpignan.
- Monbet P., 1996. Détermination des lipides et des PCB dans les organismes suprabenthiques. *Rapport de stage IFREMER-Université de Bretagne Occidentale*.

- Morales-Nin B., and Aldebert Y., 1997. Growth of juvenile *Merluccius merluccius* in the Gulf of Lions (NW Mediterranean) based on otolith microstructure and length-frequency analysis. *Fisheries Research*, 30 : 77-85.
- Morales-Nin B., Tores G.J., Lombarte A., Recasens L., 1998. Otolith growth and age estimation in the European hake. *Journal of Fish Biology*, 53 : 1155-1168.
- Morte M.S., Redon M.J., Sanz-Brau A., 2001. Feeding habits of *Trisopterus minutus capelanus* (Gadidae) off the Eastern Coast of Spain (Western Mediterranean), P.S.Z.N. *Marine Ecology*, 22 : 215-229.
- Muir D.C.G., Norstrom R.J., Simon M., 1988. Organochlorine Contaminants in Arctic Marine Food Chains: Accumulation of Specific Polychlorinated Biphenyls and Chlordane-Related Compounds. *Environmental Toxicology and Technology*, 22 : 1071-1079.
- Muir D., Savinova T., Savinov V., Alexeeva L., Potelov V., Svetochev V., 2003. Bioaccumulation of PCBs and chlorinated pesticides in seals, fishes and invertebrates from the White Sea, Russia. *The Science of The Total Environment*, 306 :111-131.
- Munsch C., Moisan K., Tronczynski J., 2004. Levels and patterns of PCBs and PCDD/Fs in different tissues of the marine flatfish dab (*Limanda limanda*) from the English Channel, France. *Organohalogen Compounds*, 66 : 1695-1703.
- Murua H. and Motos L. (2006). Reproductive strategy and spawning activity of the European hake *Merluccius merluccius* (L.) in the Bay of Biscay. *Journal of Fish Biology*, 69 : 1288-1303.
- Murua H., Lucio P., Santurtun M., Motos L., 2006. Seasonal variation in egg production and batch fecundity of European hake *Merluccius merluccius* (L.) in the Bay of Biscay. *Journal of Fish Biology*, 69 : 1309-1316.
- Naso B., Perrone D., Calmera Ferrante M., Bilancione M., Lucisano A., 2005. Persistent organic pollutants in edible marine species from the Gulf of Naples, Southern Italy. *Science of the Total Environment*, 343 : 83-95.
- Nakata H, Tanabe S, Tatsukawa R, Amano M, Miyazaki N, Petrov EA, 1995. Persistent organochlorine residues and their accumulation kinetics in Baikal seal (*Phoca sibirica*) from Lake Baikal, Russia. *Environmental Science and Technology* 29 : 2877-2885.
- Naudin J. J., Cauwet G., Chretiennot-Dinet M. J., Deniaux B., Devenon J. L., Pauc H., 1997. River discharge and wind influence upon particulate transfer at the land-ocean interaction. Case study of the Rhone River plume. *Estuarine Coastal and Shelf Science*, 45 : 303-316.

- Neely B.W., Branson D.R., Blau G.E., 1974. Partition coefficient to measure bioconcentration potential of organic chemicals in fish. *Environmental Science and Technology*, 8 : 1113-1115.
- Nfon E., Cousins I.T., 2006. Interpreting time trends and biomagnification of PCBs in the Baltic region using the equilibrium lipid partitioning approach. *Environmental Pollution*, 144 : 994-1000.
- Nisbet R. M., Muller E. B., Lika K., & Kooijman S. A. L. M., 2000. From molecules to ecosystems through dynamic energy budget models. *Journal of Animal Ecology*, 69 : 913-926.
- Norstrom R.J., McKinnon A.E., De Freitas A.S.W., 1976. A bioenergetics-based model for pollutant accumulation by fish: simulation of PCB and methylmercury residue levels in Ottawa River yellow perch (*Perca flavescens*). *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 33 : 248-267.
- Nyman M., Koistinen J., Fant M.L., Vartiainen T., Helle E., 2002. Current levels of DDT, PCB and trace elements in the Baltic ringed seals (*Phoca hispida baltica*) and grey seals (*Halichoerus grypus*). *Environmental Pollution*, 119 : 399-412.
- Olivar M. P., Quílez G., Emelianov M., 2003. Spatial and temporal distribution and abundance of European hake, *Merluccius merluccius*, eggs and larvae in the Catalan coast (NW Mediterranean). *Fisheries Research*, 60 : 321-331.
- Olsson A., Valters K., Burreau S., 2000. Concentrations of organochlorine substances in relation to fish size and trophic position: a study on perch (*Perca fluviatilis* L.). *Environmental Science and Technology*, 34 : 4878-4886.
- Orsi-Relini L., Papaconstantinou C., Jukic-Peladic S., Souplet A., Gil de Sola L., Piccinetti C., Kavadas S., Rossi M., 2002. Distribution of the Mediterranean hake populations (*Merluccius merluccius smiridus* Rafinesque, 1810) (Osteichthyes : Gadiformes) based on six years monitoring by trawl surveys : some implications for management. *Scientia Marina*, 66 (Suppl.2) : 21-38.
- Owens, N.J.P., 1987. Natural variations in ^{15}N in marine environment. *Advances in Marine Biology*, 24 : 389-451.
- Palomera, Olivar M.P., Salat J., Sabatés A., Coll M., García A., Morales-Nin B., 2007. Small pelagic fish in the NW Mediterranean Sea: An ecological review. *Progress in Oceanography*, 74 : 377-396.
- Papaconstantinou C. et Caragitsou E., 1987. The food of hake *Merluccius merluccius* in Greek sea. *Vie et milieu*, 37 : 77-83.

- Parmanne R., Hallikainen A., Isosaari P., Kiviranta H., Koistinen J., Laine O., Rantakokko P., Vuorinen P.J., Vartiainen T., 2006. The dependence of organohalogen compound concentrations on herring age and size in the Bothnian Sea, northern Baltic. *Marine Pollution Bulletin*, 52 : 149-161.
- Peck M. A., Buckley J., Bengtson, D.A., 2003. Energy losses due to routine and feeding metabolism in young-of-the-year juvenile Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 60 : 929-937.
- Pecquerie L., 2007. Bioenergetic modelling of growth, development and reproduction of a small pelagic fish : the Bay of Biscay anchovy. *Thèse de doctorat, Agrocampus Rennes* : 258 p.
- Penry D.L., 1998. Applications of efficiency measurements in bioaccumulation studies: Definitions, clarifications, and a critique of methods. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 17 : 1633-1639.
- Peres H., Oliva-Teles A. 2007. Effect of the dietary essential amino acid pattern on growth, feed utilization and nitrogen metabolism of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture*, 267 : 119-128.
- Pérez N. et Pereiro F. J., 1985. Aspectos de la reproducción de merluza (*Merluccius merluccius* L.) de la plataforma gallela y cantábrica. *Boletín del Instituto Oceanográfico*, 2 : 39-47.
- Péry A.R.R., Flammarion P., Vollat B., Bedaux J.J.M., Kooijman S.A.L.M., Garric J., 2002. Using a biology-based model (DEBtox) to analyse bioassays in ecotoxicology: opportunities and recommendations. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 21 : 459-465.
- Pikkarainen A.L. et Parmanne R., 2006. Polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides in Baltic herring 1985-2002. *Marine Pollution Bulletin*, 52 : 1304-1309
- Piñeiro and Saínza M., 2003. Age estimation, growth and maturity of the European hake (*Merluccius merluccius* Linnaeus, 1758) from Iberian Atlantic waters. *ICES Journal of Marine Science*, 60 : 1086-1102.
- Pinnegar J.K., Polunin N.V.C., 1999. Differential fractionation of $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ among fish: implications for the study of trophic interactions. *Functional Ecology*, 13 : 225-231.
- Pompa G., Caloni F., Fracchiolla M.L., 2003. Dioxin and PCB contamination of fish and shellfish: assessment of human exposure. Review of the international situation. *Veterinary Research Communication*, 27 : 159-167.

- Post D. M., 2002. Using stable isotopes to estimate trophic position: models, methods, and assumptions. *Ecology*, 83 : 703-718.
- Pouvreau S., Bacher C., Héral M., 1990. Ecophysiological model of growth and reproduction of the black pearl oyster, *Pinctada margaritifera*: potential applications for pearl farming in French Polynesia. *Aquaculture*, 186 : 117-144.
- Préfecture du département du Rhône, 2005. Arrêté Préfectoral N° 2005-4359 du 14 septembre, portant sur l'interdiction de consommation des poissons pêchés dans le canal de Jonage et le Grand Large.
- Puillat I., Lazure P., 2004. Hydrographical variability on the French continental shelf in the Bay of Biscay, during the 1990s. *Continental Shelf Research*, 10 : 1143-1163.
- Rau G.H., Teyssie J.L., Rassoulzadegan F., Fowler S.W., 1990. $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ and $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ variations among size-fractionated marine particles: implications for their origin and trophic relationships. *Marine Ecology Progress Series*, 59 : 33-38.
- Rayne S., Ikonomou M.G., Antcliffe B., 2003. Rapidly Increasing Polybrominated Diphenyl Ether Concentrations in the Columbia River System from 1992 to 2000. *Environmental Science and Technology*, 37 : 2847-2854.
- Recasens L., Lombarte A., Morales-Nin B., Torres G.J., 1998. Spatiotemporal variation in the population structure of the European hake in the NW Mediterranean. *Journal of Fish Biology*, 53 : 387-401.
- Redfield AC, Ketchum BH, Richards FA, 1963. The influence of organisms on the composition of sea water. In *The Sea* (vol2). Hill M.N. (ed.) *Wiley Interscience, New York*, 26-77.
- Reich K.J., Bjoerndal K.A., Martinez del Rio C., 2008. Effects of growth and tissue type on the kinetics of ^{13}C and ^{15}N incorporation in a rapidly growing ectotherm. *Oecologia*, 155 : 651-663.
- Rebecca R., 2002. The K_{ow} Controversy. *Environmental Science and Technology*, 21 : 411A-413A.
- Rolff C., Elmgren R., 2000. Use of riverine organic matter in plankton food webs of the Baltic Sea. *Marine Ecology Progress Series*, 197 : 81-101.
- Rolff C., 2000. Seasonal variation in $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ of size-fractionated plankton at a coastal station in the northern Baltic proper. *Marine Ecology Progress Series*, 203 : 47-65.
- Roussiez V., Aloisi J. C., Monaco A., Ludwig W., 2005. Early muddy deposits along the Gulf of Lions shoreline : A key for a better understanding of land-to-sea transfert of sediments and associated pollutant fluxes. *Marine Geology*, 222-223 : 345-358.

- Russell R.W., Gobas F.A.P.C., Haffner G.D., 1999. Role of chemical and ecological factors in trophic transfer of organic chemicals in aquatic food webs. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 18 : 1250-1257.
- Ruus A., Uglund K.I., Skaare J.U., 2002. Influence of trophic position on organochlorine concentrations and composition patterns in a marine food web, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 21 : 2356-2364.
- Safe S., 1984. PCB and PBB : biochemistry toxicology and mechanism of action. *CRC Critical Reviews in Toxicology*, 13 : 319-393.
- Sarano F. 1983. La reproduction du merlu *Merluccius merluccius* (L), Cycle ovarien et fécondité. Cycle sexuel de la population du golfe de Gascogne. *Thèse de doctorat, Université de Poitiers* : 305 p.
- Sarano F. 1986. Cycle ovarien du Merlu. *M. merluccius*, poisson à ponte fractionnée. *Revue des Travaux de L'Institut des Pêches Maritimes*, 48 : 65-76.
- Scrimgeour C.M., Robinson D., 2003. Stable isotope analysis and applications. In *Soil and Environmental Analysis: Modern Instrumental Techniques*, (K.A. Smith and M. S. Cresser eds.). *Marcel Dekker Inc.* : 381-431.
- Schantz M.M., Parris R.M., Kurz J., Ballschmiter K., Wise S.A., 1993. Comparison of methods for the gas-chromatographic determination of PCB congeners and chlorinated pesticides in marine reference materials. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 346 : 766-778.
- Schmidt K., McClelland J.W., Mente E., Montoya J.P., Atkinson A., Voss M., 2004. Trophic-level interpretation based on $\delta^{15}\text{N}$ values: implications of tissue-specific fractionation and amino-acid composition. *Marine Ecology Progress Series*, 266 : 43-58.
- Schroder K, Gasparini GP, Tangherlini M, Astraldi M., 2006. Deep and intermediate water in the western Mediterranean under the influence of the Eastern Mediterranean Transient. *Geophysical Research Letters*, 33.
- Sempéré R., Charrière B., Van Vambeke F., Cauwet G., 2000. Carbon inputs of the Rhône River to the Mediterranean Sea : Biogeochemical implications. *Global Biogeochemical Cycles*, 14 : 669-681.
- Stapleton H.M., Letcher R.J., Baker J.E., 2004. Debromination of Polybrominated Diphenyl Ether Congeners BDE 99 and BDE 183 in the Intestinal Tract of the Common Carp (*Cyprinus carpio*). *Environmental Science and Technology*, 38 : 1054-1061.
- Standaert F.G., 1988. Absorption and distribution of xenobiotics. *Environmental Health Perspectives*, 77 : 63-71.

- Stefanelli P., Ausili A., Ciuffa G., Colasanti A., Di Muccio S., Morlino R., 2002. Investigation of Polychlorobiphenyls and Organochlorine Pesticides in Tissues of Tuna (*Thunnus thynnus*) from the Mediterranean Sea in 1999. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 69 : 800-807.
- Stefanelli P., Ausili A., Muccio A.D., Fossi C., Muccio S.D., Rossi S., Colasanti A., 2004. Organochlorine compounds in tissues of swordfish (*Xiphias gladius*) from Mediterranean Sea and Azores islands. *Marine Pollution Bulletin*, 49 : 938-950.
- Storelli M.M., Marcotrigiano G.O., 2000. Persistent Organochlorine Residues in Risso's Dolphins (*Grampus griseus*) from the Mediterranean Sea (Italy). *Marine Pollution Bulletin*, 40 : 555-558.
- Storelli M.M., Marcotrigiano G.O., 2001. Persistent organochlorine residues and toxic evaluation of polychlorinated biphenyls in sharks from the Mediterranean Sea (Italy). *Marine Pollution Bulletin*, 42 : 1323-1329.
- Strandberg, Bandh C., Van Bavel B., Bergqvist P.A., Broman D., Näf C., Pettersen H., Rappe C., 1998. Concentrations, biomagnification and spatial variation of organochlorine compounds in a pelagic food web in the northern part of the Baltic Sea, *Science of the Total Environment*, 217 : 143-154.
- Suzuki K.W., Kasai A., Nakayama K., Tanaka M., 2005. Differential isotopic enrichment and half-life among tissues in Japanese temperate bass (*Lateolabrax japonicus*) juveniles: implications for analysing migration. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 62 : 671-678.
- Swackhamer D.L., Hites R.A., 1988. Occurrence and bioaccumulation of organochlorine compounds in fishes from Siskiwit Lake, Isle Royale, Lake Superior. *Environmental Science and Technology*, 22 : 543-548.
- Sweeting C.J., Barry J., Barnes C., Polunin N.V.C., Jennings S., 2007. Effects of body size and environment on diet-tissue $\delta^{15}\text{N}$ fractionation in fishes. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 340 : 1-10.
- Tanabe S., 1989. Distribution, behavior and fate of PCB in the marine environment. *Journal of Oceanographic Society of Japan*, 41 : 358-370.
- Tesi T., Misericocchi S., Goñi M.A., Langone L., 2007. Source, transport and fate of terrestrial organic carbon on the western Mediterranean Sea, Gulf of Lions, France. *Marine Chemistry*, 105 : 101-117.
- Thomann R.V., 1989. Bioaccumulation model of organic chemical distribution in aquatic food chains. *Environmental Science and Technology*, 23 : 699-707.

- Thomann R.V., Connolly J.P., Parkerton T.F., 1992. An equilibrium model of organic chemical accumulation in aquatic food webs with sediment interaction. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 11 : 615-629.
- Tocher D. R., 2003. Metabolism and Functions of Lipids and Fatty Acids in Teleost Fish. *Reviews in Fisheries Science*, 11 : 107-184.
- Tolosa I., Bayona J.M., Albaiges J., 1995. Spatial and temporal distribution, fluxes, and budgets of organochlorinated compounds in NW Mediterranean sediments. *Environmental Science and Technology*, 29 : 2519-2527.
- Tolosa, I., Bayona, J.M., Albaiges J., 1996. Aliphatic and polycyclic aromatic hydrocarbons and sulfur/oxygen derivatives in NW Mediterranean sediments: Spatial and temporal variability, fluxes and budgets. *Environmental Science and Technology*, 30 : 2495-2503.
- Thomson Gale©, 2006. Téléchargé à partir de : <http://www.pollutionissues.com>
- Ulses C., 2005. Dynamique océanique et transport de la matière particulaire dans le Golfe du Lion : Crue, tempête et période hivernale. *Thèse de doctorat, Université Paul Sabatier, Toulouse* : 247 p.
- UNEP, 2001. Convention de Stockholm sur les Polluants Organiques Persistants. Disponible en ligne à partir de : http://www.pops.int/documents/convtext/convtext_fr.pdf.
- van der Meer J., 2006. An introduction to Dynamic Energy Budget (DEB) models with special emphasis on parameter estimation. *Journal of Sea Research*, 56 : 85-102.
- van der Oost R., Beyer K., Vermeulen N.P.E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 13 : 57-149.
- van der Veer H. W., 2001. Intra and interspecies comparison of energy flow in North Atlantic flatfish species by means of dynamic energy budgets. *Journal of Sea Research*, 45 : 303-320.
- van der Veer H.W., Kooijman S.A.L.M., Van der Meer J., 2003. Body size scaling relationships in flatfish as predicted by Dynamic Energy Budgets (DEB theory): implications for recruitment, *Journal of Sea Research*, 50 : 255-270.
- van der Veer H.W., Cardoso J.F.M.F., van der Meer J., 2006. The estimation of DEB parameters for various Northeast Atlantic bivalve species. *Journal of Sea Research*, 56 : 107-124.
- van Haren, R.J.F., Schepers, H.E., Kooijman, S.A.L.M., 1994. Dynamic Energy Budgets affect kinetics of xenobiotics in the marine mussel *Mytilus edulis*. *Chemosphere* 29 : 163-189.

- Varela M., Alvarez-Ossorio M.T., Valdes L., 1990. Método para el estudio cuantativo del contenido estomacal de la sardina. Resultados preliminares. *Boletín del Instituto Español de Oceanografía* 6 : 117-126.
- Veith G.D., Defoe, D.L., Bergstedt, B.V., 1979. Measuring and estimating the bioconcentration factor of chemicals in fish. *Journal Fisheries Research Board of Canada*, 36 : 1040-1048.
- Velasco, F. and Olaso, I. 1998. European hake (*Merluccius merluccius* L.1758) feeding in the Cantabrian Sea : seasonal, bathymetric and length variations. *Fisheries Research*, 38 : 33-44.
- Vives I., Grimalt J.O., Ventura M., Catalan J., Rosseland B.O., 2005. Age dependence of the accumulation of organochlorine pollutants in brown trout (*Salmo trutta*) from a remote high mountain lake (Redo', Pyrenees). *Environmental Pollution*, 2 : 343–350.
- Walker K., Goette M., Batchelor G., 1954. Pesticide residues in foods: dichlorodiphenyltrichloroethane and dichlorodiphenyldichloroethylene content of prepared meals. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 2 : 1034- 7.
- WHO, 1979. DDT and its derivatives. *Geneva World Health Organisation*, 9.
- Younglai E.V., Holloway A.C., Lim G.E., Foster W.G., 2004. Synergistic effects between FSH and 1,1-dichloro-2,2-bis(pchlorophenyl) ethylene (p,p_-DDE) on human granulosa cell aromatase activity. *Human Reproduction*, 19 : 1089-1093.
- Zuo Z., Eisma D., Berger G.W., 1991. Determination of sediment accumulation and mixing rates in the Gulf of Lions, the Mediterranean Sea. *Oceanologica Acta*, 14 : 253-262.
- Wong C. S., Mabury S. A., Whittle D. M., Backus S. M., Teixeira C., DeVault D. S., Bronte C.R., Muir D.C.G., 2004. Organochlorine compounds in Lake Superior: Chiral polychlorinated biphenyls and biotransformation in the aquatic food web. *Environmental Science and Technology*, 38 : 84-92.

ANNEXE



Contents lists available at ScienceDirect

Continental Shelf Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/csr

Comparison of C and N stable isotope ratios between surface particulate organic matter and microphytoplankton in the Gulf of Lions (NW Mediterranean)

Mireille Harmelin-Vivien^{a,*}, Véronique Loizeau^b, Capucine Mellon^c, Beatriz Beker^d, Denise Arlhac^a, Xavier Bodiguel^b, Franck Ferraton^{a,c}, Rachel Hermand^a, Xavier Philippon^b, Chantal Salen-Picard^a

^a Centre d'Océanologie de Marseille, Université de la Méditerranée, UMR CNRS 6540, Station Marine d'Endoume, 13007 Marseille, France

^b IFREMER Centre de Brest, Département Biogéochimie et Ecotoxicologie, BP 70, 29280 Plouzané, France

^c Centre de Recherches Halieutiques Méditerranéenne et Tropicale, IFREMER, Laboratoire Ressources Halieutiques, Avenue Jean Monnet, BP 171, 34203 Sète Cedex, France

^d Centre d'Océanologie de Marseille, Université de la Méditerranée, UMS CNRS 2196, Station Marine d'Endoume, 13007 Marseille, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 16 May 2007
Received in revised form
19 February 2008
Accepted 4 March 2008
Available online 8 March 2008

Keywords:

Particulate organic matter
Phytoplankton composition
Fluorescence maximum
Stable isotopes
C/N ratio
PON/Chl *a*
Seasonal variation

ABSTRACT

Carbon and nitrogen stable isotope ratios of particulate organic matter (POM) in surface water and 63–200 μm -sized microphytoplankton collected at the fluorescence maximum were studied in four sites in the Gulf of Lions (NW Mediterranean), a marine area influenced by the Rhone River inputs, in May and November 2004. Some environmental (temperature, salinity) and biological (POM, Chlorophyll *a* and phaeopigments contents, phytoplankton biomass and composition) parameters were also analysed. Significantly different C and N isotopic signatures between surface water POM and microphytoplankton were recorded in all sites and seasons. Surface water POM presented systematically lower $\delta^{13}\text{C}$ ($\sim 4.2\%$) and higher $\delta^{15}\text{N}$ ($\sim 2.8\%$) values than those of microphytoplankton, due to a higher content of continental and detrital material. Seasonal variations were observed for all environmental and biological parameters, except salinity. Water temperature was lower in May than in November, the fluorescence maximum was located deeper and the Chlorophyll *a* content and the phytoplankton biomass were higher, along with low PON/Chl *a* ratio, corresponding to spring bloom conditions. At all sites and seasons, diatoms dominated the phytoplankton community in abundance, whereas dinoflagellate importance increased in autumn particularly in coastal sites. C and N isotopic signatures of phytoplankton did not vary with season. However, the $\delta^{15}\text{N}$ of surface water POM was significantly higher in November than in May in all sites likely in relation to an increase in $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ratio of the Rhone River POM which influenced surface water in the Gulf of Lions. As it is important to determine true baseline values of primary producers for analysing marine food webs, this study demonstrated that C and N isotopic values of surface water POM cannot be used as phytoplankton proxy in coastal areas submitted to high river inputs.

© 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Stable isotopes of carbon and nitrogen are widely used to analyse food webs in freshwater (Vander Zanden and Rasmussen, 2001; Perga and Gerdeaux 2004), estuarine (Kikuchi and Wada, 1996; Riera et al., 2000) and marine (Thomas and Cahoon, 1993; Pinnegar and Polunin, 2000; Grall et al., 2006) ecosystems. Due to difference in fractionation with trophic levels, these two elements give complementary informations (Peterson et al., 1985). As the $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratio increases generally from 1‰ to 2‰ from prey to

predator, $\delta^{13}\text{C}$ traces the origin of carbon sources into food webs (De Niro and Epstein, 1978; McCutchan and Lewis, 2002). The large increase in $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ratio in the food web (mean 3.2–3.4‰) (Owens, 1987; Sweeting et al., 2007) explains the use of $\delta^{15}\text{N}$ to determine the trophic level of organisms (Minagawa and Wada, 1984; Cabana and Rasmussen, 1996; Schmidt et al., 2004). The comprehension of the transfer of organic matter into food webs as well as the determination of trophic level of organisms, imply a precise determination of the isotopic signatures of organic matter sources (Fry and Scherr, 1984; Vander Zanden and Rasmussen, 2001; Philipps and Gregg, 2003). Isotopic signatures of phytoplankton are generally difficult to obtain and imply specific sampling procedures (Descolas-Gros and Fontugne, 1985; Fry and Wainwright, 1991). Therefore, most of food web studies rely on

* Corresponding author. Tel.: +33 491 041628; fax: +33 491 041635.
E-mail address: mireille.harmelin@univmed.fr (M. Harmelin-Vivien).

the isotopic values of particulate organic matter (POM) in surface water as a proxy of phytoplankton isotopic values (Riera et al., 1999; Michener and Kaufman, 2007). However, POM is a complex heterogeneous material composed of a variety of elements, as bacteria, phytoplankton, microzooplankton, fecal pellets and detritus which influence its isotopic values, particularly in coastal areas submitted to river inputs. To determine the accurate values of organic matter end-members in a multisource environment as coastal zones is thus of prime importance in food webs studies.

The Gulf of Lions provided a suitable area to address the fundamental question of the use of surface water POM isotopic ratios as a marine end-member in a coastal area influenced by river runoff, as it is subjected to the high Rhone River inputs. The Gulf of Lions is located in the northwestern Mediterranean Sea and presents complex hydrological dynamics. The circulation is driven by a combination of factors including winds, freshwater dynamics associated with the large Rhone River discharge, coastal upwellings and the Northern Current that flows cyclonically along the continental slope (Millot, 1990). The Rhone River, with a mean annual discharge of $1700 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$ is the most important river in the Mediterranean and is responsible for 50% of the primary production of the Gulf of Lions (Lochet and Leveau, 1990). The river plume, diverted mostly towards the southwest, is a site of high but variable primary production (Naudin et al., 2001). The influence of the Rhone River particles on surface water and sediment is observed westward all over the gulf area (Durrieu de Madron et al., 1990, 2000; Tesi et al., 2007).

The present work is part of a broad, multidisciplinary programme aimed at studying contaminant transfer and food web functioning of coastal demersal fishes in this region (Ferraton et al., 2007). Analyses of size-fractionated plankton in a pelagic Mediterranean area (Rau et al., 1990), the Atlantic Ocean (Sholto-Douglas et al., 1991) and the Baltic Sea (Rolff, 2000) demonstrated significant differences in $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ of suspended particles related to their size and composition. However, no study has been done previously in a river-dominated Mediterranean coastal zone. Thus, to obtain more realistic isotopic values of the phytoplanktonic source in the Gulf of Lions where surface water POM is a mixing of marine and terrestrial organic matter, we analysed differences in $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ and $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ratios between surface water POM and 63–200 μm -sized microphytoplankton pumped at the fluorescence maximum. Our objectives were (1) to look for differences in $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ in POM sampled at sea surface and in the microphytoplankton, (2) to evidence or not seasonal variations in these parameters, and (3) to link C and N isotopic values to the specific composition of the phytoplankton collected.

2. Material and methods

2.1. Study area and sampling

Sampling was performed in four sites located on the continental shelf of the Gulf of Lions (NW Mediterranean) (Fig. 1A). Two sites were located in front of the Rhone River delta (sites 1 and 2) in the Rhone River water dilution zone, and two in front of Agde in the middle of the Gulf (sites 3 and 4) generally outside of the dilution zone to look for difference related to river input level. Sites 1 and 3 were located far from the coast in deep water (90–100 m) and sites 2 and 4 in more coastal shallow water (30–50 m). Sampling was performed in May 2004 during the spring phytoplankton bloom and in November 2004 at the end of the warm low productive season (Fig. 1B). At each site, the characteristics of the water masses were recorded using a Seabird

CTD fitted with a fluorimeter to detect the fluorescence maximum. Surface water was prefiltered on 250 μm -mesh sieves to remove zooplankton and large detritus, and filtered on pre-weighed Whatman GF/F filters precombusted for 4 h at 500 °C. Plankton samples were collected by pumping and filtering large volumes of seawater at the fluorescence maximum with a submersible high flow water pump (320 L min^{-1}). Seawater was filtered through three different vertical nets of decreasing mesh size (200, 63 and 6 μm) set in a large tank. According to previous studies (Rau et al., 1990; Rolff and Elmgren 2000), the 63–200 μm -sized fraction was considered to be the best proxy for analysing the main phytoplankton components of the community. The term “phytoplankton” used in this paper referred to the 63–200 μm fractions which mainly represented microphytoplankton. The present study was not designed to analyse the various fractions of phytoplankton, but to obtain a realistic value of the marine end-member for reconstructing demersal fish food webs (Ferraton et al., 2007). As the herbivorous pathway dominated in coastal zones (Legendre and Rassoulzadegan, 1995) and diatoms are grazed by numerous small pelagic crustaceans as well as benthic filter feeders (Riera et al., 1999), we did not take into consideration the small nano- and picoplankton.

In each site, a sub-sample of the 63–200 μm -sized fraction was fixed in a lugol solution for species determination. Samples for Chlorophyll *a* and phaeopigment content determination were obtained by filtration performed on Whatman GF/F filters, rinsed with filtered seawater and stored frozen in the dark. The remaining material retained on net sieve was immediately frozen for further contaminant and isotopic analyses. Quantification of suspended particulate matter (SPM) concentration in surface water (0.7–250 μm -sized particules) and at the fluorescence maximum (63–200 μm -sized particules) was determined by filtration on precombusted and preweighed Whatman GF/F filters. Filters were rinsed with demineralised water to remove salt and dried at 60 °C for 48 h before being weighed again (Aminot and Kerouel, 2004) and then stored at –20 °C till isotopic analyses. Particulate organic carbon (POC) and particulate organic nitrogen (PON) contents were determined with an elemental analyser (Vario El III) after decarbonation of filters with HCl vapours in a vacuum-enclosed system, and used to calculate molar C/N ratios. Chlorophyll *a* and phaeopigments were analysed spectrophotometrically according to Lorenzen (1967) and Aminot and Rey (2002). Biomass of the 63–200 μm microphytoplankton was determined from Chlorophyll *a* concentration according to the following equation:

$$\text{Biomass}_{\text{Phytoplankton}} = \frac{\text{Chl } a \times R}{\%C},$$

with Chl *a* = Chlorophyll *a* concentration in the 63–200 μm fraction, $R = C/\text{Chl } a$ mass ratio of phytoplankton, and %C = percentage of carbon in living phytoplankton. In the present study, mean values of $R = 60$ and %C = 0.28 were used following Aminot and Kerouel (2004).

2.2. Stable isotope analysis

C and N stable isotope analyses were conducted on two sub-samples of surface POM and 63–200 μm -sized fraction. One sub-sample was analysed without any prior treatment for $\delta^{15}\text{N}$ determination. The other, used for carbon isotope analysis, was acidified with 10% HCl solution to remove carbonates, rinsed with distilled water and oven-dried at 40 °C for 24 h, as carbonates present a higher $\delta^{13}\text{C}$ than organic carbon (De Niro and Epstein, 1978). The $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ and $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ratios in the samples were determined using continuous-flow isotope-ratio mass

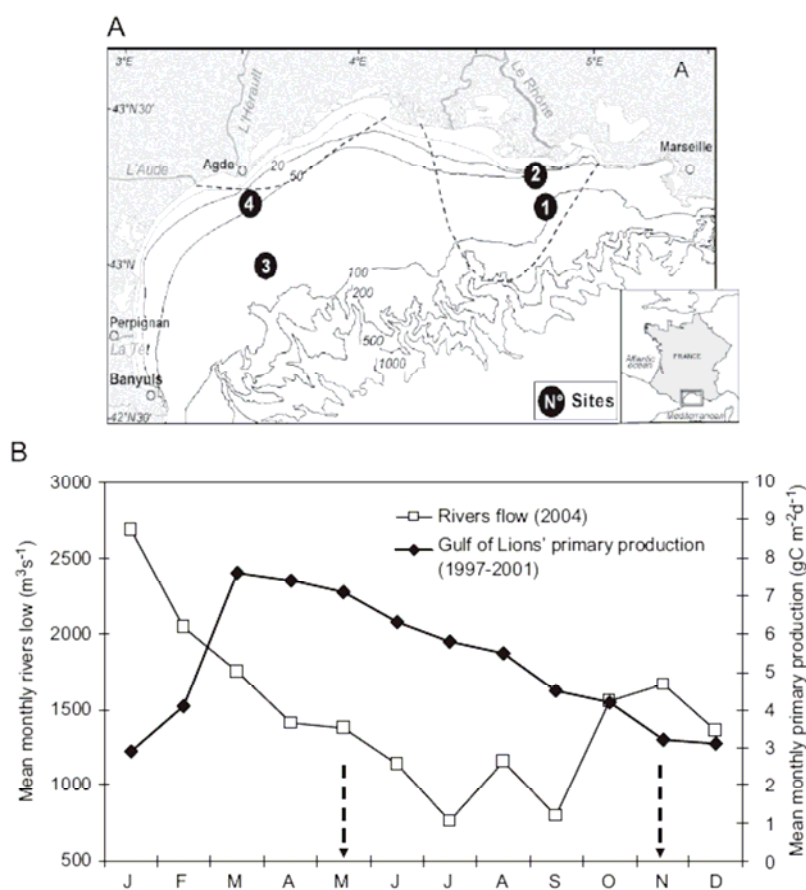


Fig. 1. (A) Location of the four sites studied in the Gulf of Lions in May and November 2004. The average extension of the Rhone River water dilution zone (37.5 surface isohaline), indicated by the dashed line, was derived from a compilation of about 1500 CTD profiles performed between 1993 and 2006 (courtesy X. Durrieu de Madron). (B) Seasonal variations of the primary production ($\text{gC m}^{-2} \text{d}^{-1}$) in the Gulf of Lions averaged for the period 1997–2001 (from Bosc et al., 2004) and monthly discharge ($\text{m}^3 \text{s}^{-1}$) of the sum of the Rhone, Hérault and Aude Rivers' flows in 2004 (Compagnie Nationale du Rhône, and Banque HYDRO). The Rhone River flow represented 92% of the monthly discharge indicated. Spring (May) and autumn (November) sampling periods are indicated by the vertical dashed lines.

spectrometry. The spectrometer (Europa Scientific ANCA-NT 20-20 Stable Isotope Analyser with ANCA Solid/Liquid preparation module)

was operated in dual mode allowing $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ and $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ to be measured simultaneously. The analytical precision was 0.2‰ for both N and C, estimated from internal standards analysed along with the samples (1 mg leucine prepared by freeze drying 50 μL of a 20 mg mL^{-1} stock solution and calibrated against 'Europa flour' and IAEA standards N1 and N2). Isotope ratios were expressed as parts per thousands (‰) differences from a standard reference material:

$$\delta X = \left[\frac{R_{\text{sample}}}{R_{\text{reference}}} - 1 \right] \times 10^3,$$

where X is ^{13}C or ^{15}N , and R the corresponding ratio $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ or $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$. The standard reference materials were Vienna Pee Dee Belemnite for carbon and atmospheric N_2 for nitrogen.

Relative proportions of terrestrial (Ft) and marine (Fm) organic matter in the surface water POM at both seasons were calculated using the equation:

$$\delta^{13}\text{C}_{\text{Surface POM}} = \text{Ft} \delta^{13}\text{C}_{\text{MOP Rhone}} + \text{Fm} \delta^{13}\text{C}_{\text{Phytoplankton}}$$

with $\text{Ft} + \text{Fm} = 1$. The $\delta^{13}\text{C}_{\text{MOP Rhone}}$ was -27.76‰ in May and -24.95‰ in November 2004 (MHV personal data).

2.3. Phytoplankton composition

Phytoplankton samples were concentrated using Utermöhl settling chambers (Hasle, 1988) and counted with an inverted microscope (Wild M40) equipped with phase contrast. Sedimented volumes were adapted to the particle concentration of each sample. Organisms were identified to the lowest possible taxonomic level with optic microscopy analysis. Numerations were carried out on diametrical tapes with enlargements of 200 and 400 times, or on the totality of the chamber surface, depending on the size and the abundance of the species (Lund et al., 1958). When possible, 400 cells were counted to assure that the error in estimation of cellular abundance remains within the limits of $\pm 10\%$ (Uehlinger, 1964). Estimates of cell volume for each species are obtained by routine measurements of 30–50 cells of an individual species and application of the geometric formula best fitted to the shape of the cell (Hillebrand et al., 1999). Unfortunately, heterotrophic and autotrophic dinoflagellates could not be distinguished due to lugol fixation of samples.

2.4. Data analysis

Difference in temperature, salinity and quantity of suspended matter in surface water and at the fluorescence maximum according to season (May vs November) were analysed by two-way analyses of variance (ANOVA) after the assumption of normality and homogeneity of data were met using Levene test. Appropriate means were compared using Student–Newman–Keuls test. Difference in mean $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$ and C/N ratios according to the type of material analysed (surface POM vs 63–200 μm -sized plankton) and season (May vs November) were tested by two-way ANOVAs. Relationships between the isotopic signature of the 63–200 μm -sized plankton and the abundance percentage of diatoms and dinoflagellates were tested by Pearson linear regressions combining data from all sites and seasons.

3. Results

3.1. Physical and biological parameters

The mean water temperature at the sampling stations was lower in May (13.9 ± 0.7 °C) than in November (17.7 ± 0.8 °C), and did not differ between the surface and the fluorescence maximum depths (Tables 1 and 2). Salinity did not change with season or depth and averaged 37.2 ± 0.9 for the period studied. A two-way ANOVA showed that SPM concentration varied significantly with season with higher values in May than in November, and depth with higher values in surface water than at the fluorescence maximum. However, interaction between the two factors indicated that SPM concentration in surface water in May was significantly higher than the others. Seasonal difference in SPM quantity occurred thus only in surface water and difference between surface and fluorescence maximum was only observed in May. The fluorescence maximum (F. max) was located significantly deeper in spring than in autumn (17.1 ± 7.7 m vs 5.5 ± 3.0 m, $P = 0.005$), except in site 1 (Table 1). Chlorophyll *a* concentration and biomass of phytoplankton at the fluorescence maximum were both significantly higher in May than in November (1.96 ± 0.14 $\mu\text{g l}^{-1}$ vs 0.06 ± 0.03 $\mu\text{g l}^{-1}$, $P < 0.001$ and 421.07 ± 30.93 mg l^{-1} vs 13.39 ± 7.50 mg l^{-1} , $P < 0.001$, respectively). Chlorophyll *a* concentration (1.96 ± 0.14 $\mu\text{g l}^{-1}$) was signif-

icantly higher than phaeopigments concentration (0.48 ± 0.31 $\mu\text{g l}^{-1}$) in May ($P < 0.001$), whereas the reverse was observed in November with a higher concentration of phaeopigments (0.18 ± 0.07 $\mu\text{g l}^{-1}$) than Chlorophyll *a* (0.06 ± 0.03 $\mu\text{g l}^{-1}$) ($P = 0.019$). All the other phytoplankton parameters tested did not differ with season.

3.2. Stable isotope signatures

C and N isotopic values of surface POM significantly differed from those of 63–200 μm microphytoplankton collected at the fluorescence maximum (Tables 3 and 4). Significantly lower $\delta^{13}\text{C}$ and higher $\delta^{15}\text{N}$ values were recorded for surface POM than for the 63–200 μm microphytoplankton in both seasons (Fig. 2). However, if no seasonal difference in C and N isotopic ratios was observed for the 63–200 μm -sized plankton, $\delta^{15}\text{N}$ of surface POM was significantly higher in November than in May (Table 4). No difference in surface POM values was observed with site and season, except for a significantly higher $\delta^{13}\text{C}$ value at site 4 in November ($P = 0.005$) and higher $\delta^{15}\text{N}$ values in sites 1 and 3 in November also ($P < 0.001$). In contrast, significant difference in isotopic signatures between sites at both seasons was observed for the 63–200 μm microphytoplankton due to the low variance of data ($P < 0.001$ for carbon and $P < 0.001$ for nitrogen). The lowest $\delta^{13}\text{C}$ values were generally observed in site 1 and the lowest $\delta^{15}\text{N}$ values in sites 3 and 4 (Table 3). Mean differences in $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values between surface POM and the 63–200 μm microphytoplankton (Δ) did not differ with season ($P = 0.867$ and 0.320 , respectively) (Fig. 3), averaging $4.17 \pm 1.17\%$ for $\Delta^{13}\text{C}$ and $2.81 \pm 1.9\%$ for $\Delta^{15}\text{N}$ in the Gulf of Lions in 2004. Determination of the organic matter origin indicated that the mean proportion of

Table 2
Summary of two-way ANOVA results performed on temperature (°C), salinity and suspended matter concentration (mg l^{-1})

Source of variation	Temperature		Salinity		Suspended matter	
	F	P	F	P	F	P
Season	92.02	< 0.001	0.69	0.421	22.80	< 0.001
Depth	0.16	0.694	0.40	0.539	11.59	0.005
Season \times depth	0.16	0.694	0.40	0.539	7.80	0.016

Table 1

Characteristics of the main physical and biological parameters recorded in surface water (surface) and at the fluorescence maximum (F.max) in the Gulf of Lions in 2004

Season	May				November			
	1	2	3	4	1	2	3	4
Sites								
Depth	90–100 m	30–50 m	90–100 m	30–50 m	90–100 m	30–50 m	90–100 m	30–50 m
Date	15/05/04	14/05/04	12/05/04	13/05/04	11/11/04	09/11/04	04/11/04	08/11/04
Depth—F.max (m)	6.9	17.8	25.7	17.8	9.1	4.6	6.3	0.3
Temperature—surface (°C)	15.4	13.5	13.8	13.4	16.9	17.2	18.7	18.1
Temperature—F.max (°C)	14.6	13.4	13.4	13.4	16.9	17.2	18.7	18.1
Salinity—surface	34.5	37.7	37.1	37.3	37.3	38.0	38.0	36.2
Salinity—F.max	36.4	37.7	37.4	37.6	37.3	38.0	38.0	36.2
SPM—surface (mg l^{-1})	10.0	6.8	4.6	6.1	1.8	3.0	0.6	1.1
SPM—F.max (mg l^{-1})	1.8	3.4	2.3	2.8	1.4	2.5	0.6	1.9
Chlorophyll <i>a</i> —F.max ($\mu\text{g l}^{-1}$)	1.99	2.14	1.94	1.79	0.05	0.02	0.10	0.08
Phaeopigments—F.max ($\mu\text{g l}^{-1}$)	0.93	0.27	0.29	0.44	0.13	0.24	0.12	0.25
Biomass Phyto—F.max ($\mu\text{g l}^{-1}$)	426.43	458.57	415.71	383.57	10.71	4.28	21.43	17.14
PON/Chl <i>a</i> —F.max	1.08	1.11	0.81	0.96	15.20	25.00	6.30	8.13
Number of species—F.max	36	32	16	31	66	34	41	39
% Diatoms—F.max	97.54	85.61	50.05	98.94	99.58	76.56	97.34	53.07
% Dinoflagellates—F.max	2.45	14.39	9.88	1.06	0.41	23.29	2.64	46.61
% Others—F.max	0.01	0.00	40.07	0.00	0.01	0.15	0.02	0.32

SPM, suspended particulate matter; Biomass Phyto, biomass of phytoplankton (63–200 μm size-class); PON, particulate organic nitrogen ($\mu\text{mol l}^{-1}$).

Table 3

Mean (\pm sd) $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$ and C/N values of particulate organic matter in surface water (surface POM) and 63–200 μm -sized phytoplankton at the fluorescence maximum (F.max Phyto.) and mean proportions of organic matter of terrestrial (Ft) and marine (Fm) origin in the Surface POM in the Gulf of Lions in 2004

Sites	May				November			
	1	2	3	4	1	2	3	4
Depth	90–100m	30–50m	90–100m	30–50m	90–100m	30–50m	90–100m	30–50m
$\delta^{13}\text{C}$ (‰)								
Surface POM	-23.94 ± 0.25	-24.23 ± 0.07	-24.84 ± 0.97	-24.97 ± 0.75	-24.73 ± 0.32	-24.76 ± 0.41	-23.97 ± 0.28	-22.57 ± 0.26
F.max Phyto.	-20.36 ± 0.22	-21.05 ± 0.07	-19.25 ± 0.04	-20.30 ± 0.11	-20.85 ± 0.16	-18.66 ± 0.42	-20.34 ± 0.12	-19.78 ± 0.06
$\delta^{15}\text{N}$ (‰)								
Surface POM	5.26 ± 0.22	6.84 ± 0.58	6.74 ± 0.68	7.71 ± 1.23	8.63 ± 1.93	6.67 ± 0.15	9.01 ± 1.02	7.29 ± 0.55
F.max Phyto.	5.45 ± 0.05	4.24 ± 0.06	4.63 ± 0.14	3.79 ± 0.02	3.82 ± 0.13	5.77 ± 0.13	3.73 ± 0.04	4.18 ± 0.18
C/N								
Surface POM	7.55 ± 0.40	10.01 ± 1.55	13.64 ± 3.13	10.13 ± 0.24	9.61 ± 0.45	8.12 ± 1.53	8.37 ± 0.06	8.86 ± 0.06
F.max Phyto.	6.68 ± 0.05	8.94 ± 0.06	9.44 ± 0.01	9.02 ± 0.05	7.29 ± 0.01	5.66 ± 0.03	6.73 ± 0.02	6.72 ± 0.91
Origin POM (%)								
Ft	48.4	47.4	65.7	62.6	94.6	97.0	78.7	54.0
Fm	51.6	52.6	34.3	37.4	5.4	3.0	21.3	46.0

For each sample $n = 3$.

Table 4

Summary of two-way ANOVA results on $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$ and C/N of surface POM and 63–200 μm -sized POM at the fluorescence maximum (POM type) in May and November (season)

Source of variation	$\delta^{13}\text{C}$		$\delta^{15}\text{N}$		C/N	
	F	P	F	P	F	P
POM type	337.43	<0.001	83.36	<0.001	19	<0.001
Season	2.41	0.128	3.05	0.087	15	<0.001
POM type \times season	0.01	0.912	5.10	0.029	0	0.7448

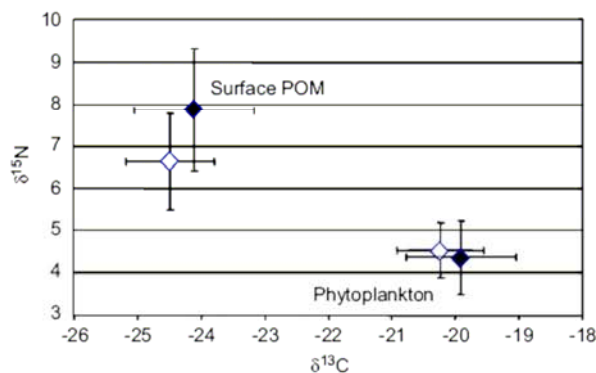


Fig. 2. Mean C and N stable isotope signatures of the surface water POM (surface POM) and the 63–200 μm microphytoplankton (phytoplankton) in the Gulf of Lions in May (open symbols) and in November 2004 (dark symbols). Vertical and horizontal bars indicate standard deviations.

terrestrial matter in the surface water POM was significantly lower in May ($56.0 \pm 9.5\%$) than in November ($81.1 \pm 19.8\%$) (Table 3). This was likely due to the higher phytoplankton biomass recorded in spring (Table 1). Terrestrial matter represented a lower percentage of surface POM near the Rhone mouth than in the middle of the gulf in May, whereas it formed the bulk (>90%) of the surface POM near the river mouth in November.

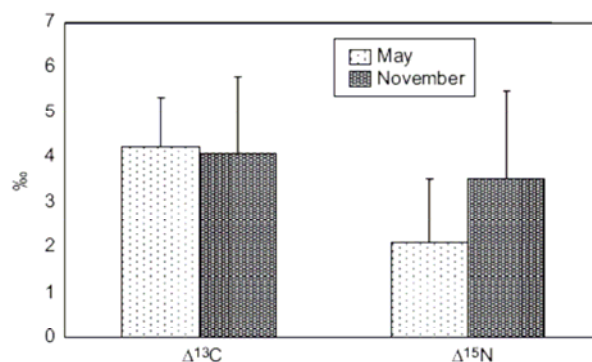


Fig. 3. Mean difference (Δ) between surface water POM and 63–200 μm microphytoplankton isotopic ratios in the Gulf of Lions in May and November 2004. Vertical bars indicate standard deviations.

3.3. Level of heterotrophy

C/N ratio of surface POM was significantly higher (9.52 ± 2.11) than C/N of the 63–200 μm microphytoplankton (7.56 ± 1.35), and the values recorded in May were generally higher than those recorded in November (Table 4). Lower C/N ratios were systematically observed for the 63–200 μm microphytoplankton collected at the fluorescence maximum at each site and season (Table 3). C/N ratios did not differ with site for surface POM ($F = 1.45$, $P = 0.255$) or 63–200 μm microphytoplankton ($F = 0.83$, $P = 0.495$) at each season. The 63–200 μm microphytoplankton presented higher values of the PON/Chl a ratio in November ($13.66 \pm 8.48\%$) than in May ($0.99 \pm 0.14\%$) indicating a higher level of heterotrophy in autumn (Table 1). This ratio was higher near the Rhone River than off Agde, particularly in November.

3.4. Composition of phytoplankton community

Despite a much higher phytoplankton biomass in spring than in autumn 2004, the number of phytoplanktonic species recorded in the 63–200 μm -sized fraction was lower in May than in November in each site (Table 1). The spring phytoplanktonic

Table 5

Name and abundance percentage (%) of the dominant phytoplankton species collected in the Gulf of Lions in May and November 2004

Group	Species	Bv (μm^3)	May 2004				November 2004				
			Site 1	Site 2	Site 3	Site 4	Site 1	Site 2	Site 3	Site 4	
			90–100 m	30–50 m	90–100 m	30–50 m	90–100 m	30–50 m	90–100 m	30–50 m	
Chlorophytes	<i>Chlorophyte</i> sp.	463	–	–	40.1	–	–	–	–	–	–
Diatoms	<i>Asterionella formosa</i>	420	25.4	–	–	–	–	–	–	–	–
Diatoms	<i>Asterionellopsis glacialis</i>	384	–	4.4	–	3.6	–	–	–	–	–
Diatoms	<i>Chaetoceros costatus</i>	10,073	–	–	–	–	–	–	–	34.8	–
Diatoms	<i>Chaetoceros curvisetus</i>	6597	–	–	–	–	21.1	–	–	6.2	–
Diatoms	<i>Chaetoceros decipiens</i>	3770	4.1	–	–	3.3	13.4	–	–	46.3	–
Diatoms	<i>Chaetoceros densus</i>	15,607	54.3	–	–	–	–	–	–	–	–
Diatoms	<i>Chaetoceros laciniosus</i>	3393	–	–	–	–	5.1	–	–	–	–
Diatoms	<i>Chaetoceros rostratus</i>	2827	–	–	–	–	4.0	–	–	7.1	–
Diatoms	<i>Chaetoceros</i> spp. (broken cells)	5089	–	–	–	23.5	–	–	–	–	–
Diatoms	<i>Cyclotella</i> sp.	170	2.4	–	–	–	–	–	–	–	–
Diatoms	<i>Cylindrotheca closterium</i>	80	5.6	23.5	–	62.3	–	–	–	–	–
Diatoms	<i>Paralia sulcata</i>	5888	–	7.5	22.2	–	–	8.3	–	–	22.4
Diatoms	<i>Pinnularia</i> sp.	40,560	–	–	–	–	–	4.3	–	–	–
Diatoms	<i>Pleurosigma</i> sp. 1	3864	–	–	27.3	3.2	–	–	–	–	–
Diatoms	<i>Pleurosigma</i> sp. 2	58,904	–	–	–	–	–	38.9	–	–	9.2
Diatoms	<i>Thalassionema nitzschioides</i>	2040	–	48.5	–	–	–	–	–	1.8	–
Diatoms	<i>Thalassiosira</i> cf. <i>excentrica</i>	15,080	–	–	–	–	–	10.1	–	–	11.0
Dinoflagellates	<i>"Diplopsalis" sp. 1</i>	120,335	–	4.3	–	–	–	23.0	–	–	–
Dinoflagellates	<i>Ceratium fusus</i>	115,925	–	–	–	–	–	–	–	–	10.9
Dinoflagellates	<i>Preperidinium meunieri</i>	60,670	–	–	3.4	–	–	–	–	–	–
Dinoflagellates	<i>Protoperidinium oblongum</i>	63,334	–	–	–	–	–	–	–	–	6.7
Dinoflagellates	<i>Pyrophacus</i> sp.	139,801	–	–	2.7	–	–	–	–	–	–
% of total phytoplankton abundance per site			91.7	88.1	95.6	95.8	96.4	84.7	96.3	60.2	

Bv: cell biovolume (μm^3) calculated from simple geometric shapes.

bloom was thus generated by large populations of a few species, whereas the high diversity of phytoplankton observed in autumn was related to low specific population level. Diatoms dominated largely the community during both seasons averaging 83% of the phytoplankton abundance in May and 82% in November. An unidentified chlorophyte was important in site 3 in May, and dinoflagellates were an important component of the community in coastal sites (2 and 4) in November. However, as dinoflagellates presented larger cellular volumes than diatoms (Table 5), their volumetric percentage in the phytoplankton ranged between 9% and 63% in May (mean $37 \pm 26\%$), and between 4% and 90% in November (mean $48 \pm 41\%$). Few species constituted the bulk of the phytoplankton abundance (Table 5) and most of them differed between seasons. In May, some freshwater diatoms, like *Asterionella formosa*, were found in abundance within the river plume (site 1), likely due to the river phytoplankton bloom which also occurred in spring.

No correlation was found between the isotopic signatures of the 63–200 μm microphytoplankton and the abundance percentage of diatoms ($r = 0.62$, $P = 0.096$ for $\delta^{13}\text{C}$, $r = -0.20$, $P = 0.629$ for $\delta^{15}\text{N}$) or dinoflagellates ($r = -0.42$, $P = 0.302$ for $\delta^{13}\text{C}$, $r = 0.20$, $P = 0.643$ for $\delta^{15}\text{N}$). Correlations were also not significant between the isotopic ratios and the volumetric percentage of diatoms ($r = 0.57$, $P = 0.138$ for $\delta^{13}\text{C}$, $r = -0.40$, $P = 0.324$ for $\delta^{15}\text{N}$) or dinoflagellates ($r = -0.57$, $P = 0.141$ for $\delta^{13}\text{C}$, $r = 0.40$, $P = 0.323$ for $\delta^{15}\text{N}$).

4. Discussion

Marine POM is composed of a mixture of living and detrital material including bacteria, phytoplankton, zooplankton, fecal pellets and continental detritus of terrestrial and freshwater origin, particularly in coastal zones submitted to river outflow. The characteristics of the surface water POM, including their

isotopic signatures, could be modified by the quality and quantity of the continental material brought to the sea by rivers. In the Gulf of Lions, both surface and bottom water layers are largely influenced by the Rhone River inputs and continental material was transported all over the area due to the westward water circulation (Durrieu de Madron, et al., 1990, 2000; Sempéré et al., 2000; Tesi et al., 2007). The influence of the Rhone river inputs on surface water can be observed very far from the coast and exhibits high seasonal variations in relation to the river flow (Cauwet et al., 1997).

4.1. Difference between surface POM and microphytoplankton

The quantity of SPM was higher in surface water than at the fluorescence maximum depths. SPM corresponded to 0.7–250 μm -sized particles in surface water and to 63–200 μm -sized particles at the fluorescence maximum, this implied that both large (200–250 μm) and small (0.7–63 μm) particles constituted an important component of the surface POM, particularly in May. The 63–200 μm -sized fraction collected at the fluorescence maximum was mainly composed of microphytoplankton (mostly diatoms and dinoflagellates). Following the results of Rau et al. (1990) and Rolf and Elmgren (2000), this fraction was considered to be the most representative of large autotrophic phytoplankton organisms. It was used in this study as the best proxy for analysing phytoplankton isotopic signatures in the Gulf of Lions and the term 'phytoplankton' will be used hereafter for '63–200 μm -sized fraction of plankton'. Small-sized phytoplankton organisms (nano- and picoplankton) were not taken into account in our study, whereas picoplankton is the main contributor to Chlorophyll *a* content not only in oligotrophic regions, but also in coastal areas (Arin et al., 2005), including the Gulf of Lions (Lantone and Neveux, 1993). Our study was not designed to analyse the various size-classes of phytoplankton, but to provide

the best approximation of the isotopic signatures of the marine organic matter source for the study of coastal food webs in the Gulf of Lions. The microphytoplankton was chosen as the most appropriate fraction because the herbivore pathway is dominant in the transfer of carbon into upper trophic levels in high nutrient areas (Legendre and Rassoulzadegan, 1995).

The C/N ratio of the surface POM was higher than that of phytoplankton. As C/N is considered to be an indicator of the mixing of different material and/or their degradation when increasing (Savoie et al., 2003), these results indicated that surface water POM contained a higher proportion of mixed and degraded material than the microphytoplankton fraction collected at the fluorescence maximum. This could be related to the quantity of phytoplanktonic material of decaying state along with a high quantity of detritus linked to both river inputs and planktonic food webs, including fecal pellets, in the surface water. The importance of land-derived detritus was corroborated by the carbon isotopic signature, as continental detritus of terrestrial and freshwater origin exhibit much lower $\delta^{13}\text{C}$ (-30‰ to -26‰) than that of marine phytoplankton (-23‰ to -19‰) (Fry and Scherr, 1984; Riera et al., 1999; Darnaude et al., 2004a, b). Thus, systematically lower $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratios in surface POM in our study indicated a higher proportion of continental POM in this fraction than in phytoplankton, likely due to difference in particle size. Terrestrial organic matter adsorbed onto fine particles is selectively transported away from the Rhone River prodelta (Tesi et al., 2007) and surface POM samples included small-sized particles (0.7–63 μm) contrary to phytoplankton samples which was composed of 63–200 μm -sized particles. The importance of the smallest-sized particles in bearing terrestrial and detrital isotope signatures was confirmed by the analysis of the 6–63 μm fraction at site 4 in May. This fraction exhibited isotopic ratios ($\delta^{13}\text{C} = -20.10 \pm 0.05\text{‰}$, $\delta^{15}\text{N} = 3.58 \pm 0.20\text{‰}$) similar to those of the 63–200 μm fraction ($\delta^{13}\text{C} = -20.30 \pm 0.11\text{‰}$, $\delta^{15}\text{N} = 3.79 \pm 0.02\text{‰}$), but highly different from the 0.7–250 μm surface POM ($\delta^{13}\text{C} = -24.97 \pm 0.75\text{‰}$, $\delta^{15}\text{N} = 7.71 \pm 1.23\text{‰}$) recorded at that site. Thus, we might infer reasonably that difference in isotopic signatures between surface POM and microphytoplankton was likely due to the 0.7–6 μm fraction, constituted by nano- and picoplankton along with detrital material. If we assumed that these small particles represented at least 50% of the phytoplankton biomass (Lantoine and Neveux, 1993; Arin et al., 2005), their calculated isotopic ratios were -29.74‰ for $\delta^{13}\text{C}$ and 11.74‰ for $\delta^{15}\text{N}$. In an area not influenced by river, Rau et al. (1990) recorded $\delta^{13}\text{C}$ values of -25.4‰ to -22.5‰ and $\delta^{15}\text{N}$ values of -0.5‰ to 3‰ for $<0.8\text{ }\mu\text{m}$ particles. The lower $\delta^{13}\text{C}$ values and the higher $\delta^{15}\text{N}$ values obtained for the 0.7–6 μm particles in our study testified thus from the high importance of terrestrial material in this small-sized fraction in the Gulf of Lions. These results corroborated the estimation of the percentage of organic matter of terrestrial origin in the surface POM ($68.6 \pm 19.6\%$ as a mean). Significantly higher $\delta^{15}\text{N}$ values were observed for POM collected in surface water than at the fluorescence maximum. As $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ratios are higher in bacteria, zooplankton and fecal pellets than in phytoplankton (Minagawa and Wada, 1984; Rolf, 2000; Vander Zanden and Rasmussen, 2001), the higher $\delta^{15}\text{N}$ values found in surface POM were related to the higher content of degraded material included in this fraction and revealed by a higher C/N ratio. Thus, particles from continental origin and detrital material of vegetal and animal origin modified the isotopic signatures of surface POM compared to those observed for phytoplankton. In the Gulf of Lions, the difference in isotopic ratios between surface POM and phytoplankton was around 4.2‰ for carbon and 2.8‰ for nitrogen. Similar differences were observed by Rolf (2000) in the Baltic Sea with higher $\delta^{13}\text{C}$ values and lower $\delta^{15}\text{N}$ values in phytoplankton (50–100 μm) than in the smallest-sized POM fraction ($<5\text{ }\mu\text{m}$). Fry

and Wainwright (1991) indicated that phytoplankton can be enriched in ^{13}C by 3–7‰ relative to POM, and Loick et al. (2007) by 2.4‰.

4.2. Seasonal variations

The situation observed in May in the Gulf of Lions for physical and biological parameters was characteristic of the end of the spring phytoplankton bloom as described for the northwestern Mediterranean by several authors (Lefevre et al., 1997; Conan et al., 1998; Bosc et al., 2004). The water temperature was low, and the Chlorophyll *a* concentration and the biomass of phytoplankton were high. The depth of the fluorescence maximum was around 20–30 m, except in front of the Rhone River (site 1) where the maximum of phytoplankton production was located in more shallow water at the dilution plume/marine water interface (Naudin et al., 2001). In November, the water temperature was high testifying of the fall water stratification. Chlorophyll *a* concentration and phytoplankton biomass were low and the fluorescence maximum, hardly noticeable, was rather shallow as already observed in this region in autumn (Lefevre et al., 1997; Conan et al., 1998). High POC content in surface water is mainly correlated with primary production and exhibits high seasonal variability in the Gulf of Lions (Cauwet et al., 1997). Maximum of primary production occurs during spring bloom (March–May) whereas low production occurs in autumn (Lefevre et al., 1997). In our study, the phytoplankton communities were numerically dominated at all seasons by diatoms, whereas dinoflagellates might be predominant by volume due to their larger size. Similar observations are related for this region (Lefevre et al., 1997; Naudin et al., 1997) and other temperate waters (Videau et al., 1998; Arin et al., 2005). The increased importance of dinoflagellates in autumn when the abundance of diatoms decreased was also observed in the Bay of Marseille (Travers and Travers, 1962) and the Bay of Seine (L'Helguen et al., 2003).

The lower C/N ratio observed in November in both surface POM and phytoplankton might be the result of a higher bacterial activity as bacterial C/N is lower than that of phytoplankton (Savoie et al., 2003) and a higher importance of heterotrophic organisms in the plankton (Waite et al., 2007). The dominance of phaeopigments along with higher PON/Chl *a* ratios at that season corroborated this hypothesis, as PON/Chl *a* ratio is used as an index of heterotrophy (Waser et al., 2000; Waite et al., 2007). Low PON/Chl *a* ratio is an indication of the importance of phytoplankton as a component of organic matter (Maguer et al., 2000). In the Gulf of Lions, low PON/Chl *a* ratios along with high Chlorophyll *a* content in May suggested a high contribution of phytoplankton to the total biomass, whereas high PON/Chl *a* ratios in November indicated highly degraded material.

Carbon isotopic signature of suspended POM and microphytoplankton did not vary with season. However, the $\delta^{15}\text{N}$ of surface POM was significantly higher in November than in May, whereas no difference occurred for phytoplankton. Surface water organic matter is largely influenced by the Rhone River inputs (Cauwet et al., 1997), and the $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ratio of the Rhone water varied with season, with higher values in November 2004 (8.9‰) than in May (6.7‰) (MHV personal data). Higher $\delta^{15}\text{N}$ of the Rhone River POM in autumn than in spring has been already recorded in 2001 (Darnaude et al., 2004a). Thus, the variations of isotopic ratios recorded in surface POM with higher $\delta^{15}\text{N}$ values in November 2004 reflected mainly the stable isotopic variations of the continental organic matter brought by the Rhone River into the Gulf of Lions. The significantly lower $\delta^{13}\text{C}$ of surface POM observed in site 1 and the higher $\delta^{15}\text{N}$ values recorded in sites 1 and 2 revealed a higher influence of continental material in the sites

located in front of the Rhone River delta. This influence was particularly evident in autumn when >90% of the surface POM in front of the Rhone River was of terrestrial origin. In May, this proportion was lower due to dilution by the high phytoplankton biomass, especially off the river mouth where the inputs of nutrients favoured the primary production (Sempéré et al., 2000; Naudin et al., 2001). The higher participation of degraded material and bacterial activity in front of the Rhone River was also indicated by the higher PON/Chl *a* ratios in this area whatever the season.

No significant seasonal variations of phytoplankton isotopic signatures were recorded in our study, nor in the Bay of Marseille (Darnaude et al., 2004a), whereas large seasonal variations of stable isotopic ratios in Mediterranean phytoplankton were recorded by Dauby et al. (1990) and Vizzini and Mazzola (2003). Mean isotopic values for microphytoplankton in the Gulf of Lions ($\delta^{13}\text{C} = -20.1 \pm 0.8\text{‰}$; $\delta^{15}\text{N} = 4.4 \pm 0.7\text{‰}$) were close to those observed eastward in the Bay of Marseille ($\delta^{13}\text{C} = -22.4 \pm 0.2\text{‰}$; $\delta^{15}\text{N} = 2.3 \pm 0.1\text{‰}$) (Darnaude et al., 2004a) and in a coastal Italian lagoon ($\delta^{13}\text{C} = -20.0 \pm 1.9\text{‰}$; $\delta^{15}\text{N} = 5.9 \pm 2.1\text{‰}$) (Vizzini and Mazzola, 2003). All these values are in the range found for typical isotopic composition of marine phytoplankton in temperate seas that varies from -23‰ to -19‰ for $\delta^{13}\text{C}$ (Gearing et al., 1984) and from 3‰ to 12‰ for $\delta^{15}\text{N}$ (Owens, 1987). The lower $\delta^{13}\text{C}$ value (-24.4 ± 1.6‰) recorded in surface POM by Carlier et al. (2007) westward in the Bay of Banyuls indicates a participation of particles of terrestrial origin issued probably from both the nearby Baillaury River and the distant Rhone River, as it was demonstrated that Rhone small-sized particles are transported westward all over the Gulf of Lions to the Banyuls region (Durrieu de Madron et al., 2000; Tesi et al., 2007).

4.3. Importance of phytoplankton composition

Variability of stable isotope ratios in phytoplankton mainly results from nutrient forms and concentrations, and isotopic fractionation. This last metabolic process depends on species, but also growth rate and environmental conditions such as light, temperature, pH, and vary during the course of a phytoplankton bloom (Decolas and Fontugne, 1985; Savoye et al., 2003). Thus, taxonomic data are important for interpreting POM isotopic signatures as the different phytoplanktonic organisms present different isotopic fractionation (Falkowski, 1991). Typically diatoms present higher $\delta^{13}\text{C}$ than dinoflagellates with values ranging from -19‰ to -15‰ for diatoms compared to -22‰ to -20‰ for dinoflagellates in marine waters (Fry and Wainwright, 1991). In our study, no relationship was found between C and N isotopic ratios and the numerical or volumetric percentages of diatoms or dinoflagellates, and no seasonal or spatial variations in spite of varying phytoplanktonic composition. The mean $\delta^{13}\text{C}$ value (-20.1‰) recorded for the microphytoplankton of the Gulf of Lions testified from its diatoms and dinoflagellates mixed composition. If we assumed a mean $\delta^{13}\text{C}$ of -19‰ for diatoms as usually found for temperate species (Waite et al., 2005), the mean $\delta^{13}\text{C}$ of dinoflagellates in the Gulf of Lions was -23‰, which was in accordance with literature data (Fry and Wainwright, 1991). The 6–63 μm fraction analysed at site 4 contained only half of the Chlorophyll *a* content recorded in the 63–200 μm fraction. It was also mainly composed of diatoms (99% in abundance) and dinoflagellates, more than 50% of the cells counted in this fraction being represented by the small diatom *Cylindrotheca closterium*. However, the proportion of heterotrophic dinoflagellates in the 63–200 μm fraction could not be quantified. It was likely that seasonal variations of heterotrophy observed with C/N and PON/Chl *a* ratios were not only due to bacterial activity but also

to changes in autotrophic/heterotrophic composition of plankton. A more accurate analysis of the different size-classes of phytoplankton, including pico- and nanoplankton remains to be conducted in Mediterranean waters and can be envisaged using the new techniques of flow cytometry with fluorescence activated cell sorting combined with highly sensitive isotopic mass spectrometry.

5. Conclusion

To properly reconstruct marine food webs and determine precise trophic levels of consumers, it is important to use appropriate food web baselines (Post, 2002). As collecting pure samples of phytoplankton is difficult, most scientists use isotope ratios of surface POM as a proxy of phytoplankton isotopic signatures used as marine end-member. In the present paper, we demonstrated that a huge discrepancy existed between stable isotope ratios of surface water POM and phytoplankton in an area submitted to high river inputs like the Gulf of Lions. Surface water POM influenced by organic matter of detrital and continental origin presented lower $\delta^{13}\text{C}$ and higher $\delta^{15}\text{N}$ values than those of phytoplankton. It is thus of prime importance to collect true phytoplankton material at the fluorescence maximum or outside the area influenced by the river outflow for analysing food webs, particularly in estuarine and deltaic ecosystems.

Acknowledgements

Thanks are expressed to the crews of the R.V. "Europe" and "Téthys" for their collaboration at sea and to Alicia Bautista and Françoise Cubizolles for assistance in sampling. We would like to thank especially Charlie Scrimgeour (Scottish Crop Research Institute) for stable isotope analyses. This study was financially supported by the French research programmes PNEC-MEDOC, MEDICIS and ECCO-PNBC and the regional Languedoc-Roussillon programme SYSCOLAG. We are grateful to the Guest Editor and three anonymous reviewers for most valuable comments and improvement of the manuscript.

References

- Aminot, A., Keruel, R., 2004. Hydrologie des écosystèmes marins. Paramètres et analyses. Edition Ifremer, 336pp.
- Aminot, A., Rey, F., 2002. Chlorophyll *a*: determination by spectrometric methods. ICES Technical and Marine Environmental Sciences 30, 1–18.
- Arin, L., Estrada, M., Salat, J., Cruzado, A., 2005. Spatio-temporal variability of size fractionated phytoplankton on the shelf adjacent to the Elbro river (NW Mediterranean). Continental Shelf Research 25, 1081–1095.
- Bosc, E., Bricaud, A., Antoine, D., 2004. Seasonal and interannual variability in algal biomass and primary production in the Mediterranean Sea, as derived from four years of SeaWiFS observations. Global Biogeochemical Cycles 18 (GB), 1005.
- Cabana, G., Rasmussen, J.B., 1996. Comparison of aquatic food chains using nitrogen isotopes. Proceedings of the National Academy of Sciences 93, 10844–10847.
- Carlier, A., Riera, P., Amouroux, J.M., Bodiou, J.Y., Grémare, A., 2007. Benthic trophic network in the Bay of Banyuls-sur-Mer (northwest Mediterranean, France): an assignment based on stable carbon and nitrogen isotopes analysis. Estuarine, Coastal and Shelf Science 72, 1–15.
- Cauwet, G., Miller, A., Brasse, S., Fengler, G., Mantoura, R.F.C., Spitz, A., 1997. Dissolved and particulate organic carbon in the western Mediterranean Sea. Deep-Sea Research II 44, 769–779.
- Conan, P., Pujot-Pay, M., Raimbault, P., Leveau, M., 1998. Variabilité hydrologique et biologique du golfe du Lion: II. Productivité sur le bord interne du courant. Oceanologica Acta 21, 767–782.
- Damaude, A.M., Salen-Picard, C., Polunin, N.V.C., Harmelin-Vivien, M.L., 2004a. trophodynamic linkage between river runoff and coastal fishery yield elucidated by stable isotope data in the Gulf of Lions (NW Mediterranean). Oecologia 138, 325–332.
- Damaude, A.M., Salen-Picard, C., Hamelin-Vivien, M.L., 2004b. Depth variation in terrestrial particulate organic matter exploitation by marine coastal benthic

- communities off the Rhone River delta (NW Mediterranean). *Marine Ecology Progress Series* 275, 47–57.
- Dauby, P., Mosora, F., Vertez, M., 1990. A yearly study of $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ isotopic ratio variations in the Calvi's Bay plankton. *Rapport de la Commission Internationale pour la Mer Méditerranéenne* 32, 202.
- De Niro, M.J., Epstein, S., 1978. Influence of diet on the distribution of carbon isotopes in animals. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 42, 495–506.
- Descolas-Gros, C., Fontugne, M.R., 1985. Carbon fixation in marine phytoplankton: carboxylase activities and stable carbon-isotope ratios: physiological and paleoclimatological aspects. *Marine Biology* 87, 1–6.
- Durrieu de Madron, X., Nyffeller, F., Godet, C., 1990. Hydrographic structures and nepheloid spatial distribution in the Gulf of Lions continental margin. *Continental Shelf Research* 10, 915–929.
- Durrieu de Madron, X., Abassi, A., Heussner, S., Monaco, A., Aloisi, J.C., Radakovitch, O., Gresse, P., Buscail, R., Kerhervé, P., 2000. Particulate matter and organic carbon budgets of the Gulf of Lions (NW Mediterranean). *Oceanologica Acta* 23, 717–730.
- Falkowski, P.G., 1991. Species variability in the fractionation of ^{13}C and ^{12}C by marine phytoplankton. *Journal of Plankton Research* 13 (Suppl.), 21–28.
- Ferraton, F., Harmelin-Vivien, M., Mellon-Duval, C., Souplet, A., 2007. Spatio-temporal variation in diet may affect condition and abundance of juvenile European hake in the Gulf of Lions (NW Mediterranean). *Marine Ecology Progress Series* 337, 197–208.
- Fry, B., Scheer, E.B., 1984. $\delta^{13}\text{C}$ measurements as indicators of carbon flow in marine and freshwater ecosystems. *Contributions in Marine Science* 27, 13–47.
- Fry, B., Wainwright, S.C., 1991. Diatom sources of ^{13}C -rich carbon in marine food webs. *Marine Ecology Progress Series* 76, 149–157.
- Gearing, J.N., Gearing, P.J., Rudnick, D.T., Requejo, A.G., Hutchins, M.J., 1984. Isotopic variability of organic carbon in a phytoplankton-based, temperate estuary. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 48, 1089–1098.
- Grall, J., Le Loch, F., Guyonnet, B., Riera, P., 2006. Community structure and food web based on stable isotopes ($\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$) analysis of a North Eastern Atlantic maerl bed. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 338, 1–15.
- Hasle, G.R., 1988. The inverted microscope method. In: Sournia, A. (Ed.), *Phytoplankton Manual*. UNESCO, Paris.
- Hillebrand, H., Durselen, C.D., Kirchtel, D., Pollinger, U., Zohary, T., 1999. Biovolume calculation for pelagic and benthic microalgae. *Journal of Phycology* 35, 403–424.
- Kikuchi, E., Wada, E., 1996. Carbon and nitrogen stable isotope ratios of deposit-feeding polychaetes from the Nanakita River estuary, Japan. *Hydrobiologia* 321, 69–75.
- Lantoiné, F., Neveux, J., 1993. Spectrofluorometric analysis of photosynthetic pigments in the Gulf of Lions (Mediterranean Sea) with an emphasis on the autotrophic picoplankton. *Annales de l'Institut Océanographique* 69, 173–175.
- Lefevre, D., Minas, H.J., Minas, M., Robinson, C., Le B. Williams, P.J., Woodward, E.M.S., 1997. Review of gross community production, primary production, net community production and dark community respiration in the Gulf of Lions. *Deep-Sea Research II* 44, 801–832.
- Legendre, L., Rassoulzadegan, F., 1995. Plankton and nutrient dynamics in marine waters. *Ophelia* 41, 153–172.
- Lochet, F., Leveau, M., 1990. Transfers between a eutrophic ecosystem, the river Rhône, and an oligotrophic ecosystem, the north-western Mediterranean Sea. *Hydrobiologia* 207, 95–103.
- Loick, N., Dippner, J., Doan, H.N., Liskow, I., Voss, M., 2007. Pelagic nitrogen dynamics in the Vietnamese upwelling area according to stable nitrogen and carbon isotope data. *Deep-Sea Research I* 54, 596–607.
- Lorenzen, C.J., 1967. Determination of chlorophyll and phaeopigments: spectrophotometric equations. *Limnology and Oceanography* 12, 343–346.
- Lund, J.W.G., Kipling, C., Le Cren, E.D., 1958. The inverted microscope method of estimating algal numbers and the statistical basis of estimations by counting. *Hydrobiologia* 11, 143–170.
- L'Helguen, S., Maguer, J.F., Madec, C., 2003. Seasonal changes of phytoplankton production in response to high nitrogen load in the Bay of Seine. *Geophysical Research Abstracts* 5, 13898.
- Maguer, J.F., L'Helguen, S., Le Corre, P., 2000. Nitrogen uptake by phytoplankton in a shallow water tidal front. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 51, 349–357.
- McCutchan, J.H., Lewis Jr, W.M., 2002. Relative importance of carbon sources for macroinvertebrates in a Rocky Mountain stream. *Limnology and Oceanography* 47, 742–752.
- Michener, R.H., Kaufman, L., 2007. Stable isotope ratios as tracers in marine food webs: an update. In: Michener, R., Lajtha, K. (Eds.), *Stable Isotopes in Ecology and Environmental Science*. Blackwell Publishing, Oxford, UK, pp. 238–282.
- Millot, C., 1990. The Gulf of Lion's hydrodynamics. *Continental Shelf Research* 10, 885–894.
- Minagawa, M., Wada, E., 1984. Stepwise enrichment of ^{15}N along food chains: further evidence and the relation between $\delta^{15}\text{N}$ and animal age. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 48, 1135–1140.
- Naudin, J.J., Cauwet, G., Chretiennot-Dinet, M.J., Deniaux, B., Devenon, J.L., Pauc, H., 1997. River discharge and wind influence upon particulate transfer at the land-ocean interaction. Case study of the Rhone River plume. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 45, 303–316.
- Naudin, J.J., Cauwet, G., Fajon, C., Oriol, L., Terzic, S., Devenon, J.L., Broche, P., 2001. Effect of mixing on microbial communities in the Rhone River plume. *Journal of Marine Systems* 28, 203–227.
- Owens, N.J.P., 1987. Natural variations in ^{15}N in marine environment. *Advances in Marine Biology* 24, 389–451.
- Perga, M.E., Gerdeaux, D., 2004. Changes in the $\delta^{13}\text{C}$ of pelagic food webs: the influence of lake area and trophic status on the isotopic signature of whitefish (*Coregonus lavaretus*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 61, 1485–1492.
- Peterson, B.J., Howarth, R.W., Garritt, R.H., 1985. Multiple stable isotopes used to trace the flow of organic matter in estuarine food webs. *Science* 227, 1361–1363.
- Philipps, D.L., Gregg, J.W., 2003. Source partitioning using stable isotopes: coping with too many sources. *Oecologia* 136, 261–269.
- Pinnegar, J.K., Polunin, N.V.C., 2000. Contributions of stable-isotope data to elucidating food webs of Mediterranean rocky littoral fishes. *Oecologia* 122, 399–409.
- Post, D.M., 2002. Using stable isotopes to estimate trophic position: models, methods and assumptions. *Ecology* 83, 703–718.
- Rau, G.H., Teysie, J.L., Rassoulzadegan, F., Fowler, S.W., 1990. $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ and $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ variations among size-fractionated marine particles: implications for their origin and trophic relationships. *Marine Ecology Progress Series* 59, 33–38.
- Riera, P., Stal, L.J., Nieuwenhuize, J., Richard, P., Blanchard, G., Gentil, F., 1999. Determination of food sources for benthic invertebrates in a salt marsh (Aiguillon Bay, France) by carbon and nitrogen stable isotopes: importance of locally produced sources. *Marine Ecology Progress Series* 187, 301–307.
- Riera, P., Montagna, P.A., Kalke, R.D., Richard, P., 2000. Utilization of estuarine organic matter during growth and migration by juvenile brown shrimp *Penaeus aztecus* in a South Texas estuary. *Marine Ecology Progress Series* 199, 205–216.
- Rolf, C., 2000. Seasonal variation in $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ of size-fractionated plankton at a coastal station in the northern Baltic proper. *Marine Ecology Progress Series* 203, 47–65.
- Rolf, C., Elmgren, R., 2000. Use of riverine organic matter in plankton food webs of the Baltic Sea. *Marine Ecology Progress Series* 197, 81–101.
- Savoye, N., Aminot, A., Tréguer, P., Fontugne, M., Naullet, N., Kérouel, R., 2003. Dynamics of particulate organic matter $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$ during spring phytoplankton blooms in a macrotidal ecosystem (Bay of Seine, France). *Marine Ecology Progress Series* 255, 27–41.
- Schmidt, K., McClelland, J.W., Mente, E., Montoya, J.P., Atkinson, A., Voss, M., 2004. Trophic-level interpretation based on $\delta^{15}\text{N}$ values: implications of tissue-specific fractionation and amino-acid composition. *Marine Ecology Progress Series* 266, 43–58.
- Sempéré, R., Charnière, B., Van Vambeke, F., Cauwet, G., 2000. Carbon inputs of the Rhône River to the Mediterranean Sea: biogeochemical implications. *Global Biogeochemical Cycles* 14, 669–681.
- Sholto-Douglas, A.D., Field, J.G., James, A.G., van der Merwe, N.J., 1991. $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ and $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ isotope ratios in the Southern Benguela Ecosystem: indicators of food web relationships among different size-classes of plankton and pelagic fish: differences between fish muscle and bone collagen tissues. *Marine Ecology Progress Series* 78, 23–31.
- Sweeting, C.J., Barry, J., Bames, C., Polunin, N.V.C., Jennings, S., 2007. Effects of body size and environment on diet-tissue $\delta^{15}\text{N}$ fractionation in fishes. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 340, 1–10.
- Tesi, T., Miserocchi, S., Goñi, M.A., Langone, L., 2007. Source, transport and fate of terrestrial organic carbon on the western Mediterranean Sea, Gulf of Lions, France. *Marine Chemistry* 105, 101–117.
- Thomas, C.J., Cahoon, L.B., 1993. Stable isotope analyses differentiate between different trophic pathways supporting rocky-reef fishes. *Marine Ecology Progress Series* 95, 19–24.
- Travers, A., Travers, M., 1962. Recherches sur le phytoplancton du golfe de Marseille. *Recueil des Travaux de la Station Marine d'Endoume* 41, 7–139.
- Uehlinger, V., 1964. Etude statistique des méthodes de dénombrement planctonique. *Archives des Sciences*, 17, fasc.2, 11–223.
- Vander Zanden, M.J., Rasmussen, J.B., 2001. Variation in $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$ trophic fractionation: implications for aquatic food web studies. *Limnology and Oceanography* 48, 2061–2066.
- Videau, C., Ryckaert, M., L'Helguen, S., 1998. Phytoplankton in the Bay of Seine (France). Influence of the river plume on primary productivity. *Oceanologica Acta* 21, 907–921.
- Vizzini, S., Mazzola, A., 2003. Seasonal variations in the stable carbon and nitrogen isotope ratios ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ and $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$) of primary producers and consumers in a western Mediterranean coastal lagoon. *Marine Biology* 142, 1009–1018.
- Waite, A.M., Gustafsson, Ö., Lindahl, O., Tiselius, P., 2005. Linking ecosystem dynamics and biogeochemistry: sinking fractionation of organic carbon in a Swedish fjord. *Limnology and Oceanography* 50, 658–671.
- Waite, A.M., Muhling, B.A., Holl, C.M., Beckley, L.E., Montoya, J.P., Strzelecki, J., Thompson, P.A., Pesant, S., 2007. Food web structure in two counter-rotating eddies based on $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$ isotopic analyses. *Deep-Sea Research II* 54, 1055–1075.
- Waser, N.A.D., Harrison, W.G., Head, E.J.H., Nielsen, B., Lutz, V.A., Calvert, S.E., 2000. Geographic variations in the nitrogen isotope composition of surface particulate nitrogen and new production across the North Atlantic Ocean. *Deep-Sea Research I* 47, 1207–1226.

Résumé

La compréhension des mécanismes de bioaccumulation des contaminants organiques persistants (POP) est un enjeu majeur pour l'évaluation des risques environnementaux. Lors de ce travail, le devenir d'une famille de contaminants modèles, les polychlorobiphényles (PCB), a été étudié chez une espèce de rang trophique élevé du golfe du Lion, le merlu Européen (*Merluccius merluccius*). Des concentrations élevées en PCB ont été mesurées dans les merlus de ce secteur en comparaison à celles rencontrées dans la population du golfe de Gascogne. La mise en évidence d'une bioamplification des PCB le long de son réseau trophique, depuis le phytoplancton marin, suggère une influence importante de l'alimentation sur les niveaux de contamination. Le rôle d'autres processus biologiques a également été appréhendé afin de comprendre la forte variabilité des niveaux observés. Ainsi, la croissance, le sexe, mais également le degré de maturité sexuelle apparaissent comme des facteurs explicatifs majeurs des concentrations en PCB mesurées dans les poissons. Un modèle de bioaccumulation des PCB chez le merlu, basé sur la théorie de Budget d'Energie Dynamique (DEB), a été développé. Il s'agit d'une approche basée sur le couplage d'un modèle bioénergétique, reproduisant les principales fonctions physiologiques de l'organisme (nutrition, croissance et reproduction), avec un modèle de cinétique des contaminants. La croissance et l'évolution des niveaux de contamination de plusieurs congénères de PCB au cours de la vie des merlus mâles et femelles est simulée de manière satisfaisante, tant dans le golfe de Gascogne que dans le golfe du Lion, validant ainsi les processus pris en compte. Cette approche combinée de modélisation apparaît tout à fait adaptée à l'étude du devenir des contaminants chez les poissons, et ouvre la voie à une compréhension réaliste de leurs effets sur les grandes fonctions biologiques de ces organismes.

Mots clés : Contaminants organiques, polychlorobiphényles, bioaccumulation, merlu, réseau trophique, bioamplification, golfe du Lion, modèle bioénergétique, théorie DEB.

Abstract

Understanding bioaccumulation mechanisms of persistent organic pollutants (POPs) is a major issue for environmental risk assessment. In this work, polychlorinated biphenyls (PCBs), a model contaminant family, has been studied in the European hake (*Merluccius merluccius*), a high trophic level species from the Gulf of Lions. High concentrations of PCBs were measured in hake from this area compared to those encountered in the population of the Bay of Biscay. PCB biomagnification was highlighted along its food web from marine phytoplankton, suggesting a strong influence of diet on contamination levels. The role of other biological processes was also apprehended in order to understand the high variability of observed levels. Thus, growth, sex, and also the degree of sexual maturity appear as major factors explaining the measured concentrations in fish. A PCB bioaccumulation model in the hake, based on the Dynamic Energy Budget theory (DEB), was developed. This approach is based on a bioenergetic model, reproducing the main physiological functions of an organism (feeding, growth and reproduction), coupled with a kinetic model of contaminants. The growth and evolution of contamination levels of several PCB congeners during the life of male and female hakes is satisfactorily simulated, both in the Gulf of Lions and in the Bay of Biscay, validating the processes taken into account. This combined modelling approach appears well adapted to study the fate of contaminants in fish, and paves the way for a realistic understanding of their effects on major biological functions of fish.

Keywords: Organic contaminants, polychlorinated biphenyls, bioaccumulation, hake, food web, biomagnification, Gulf of Lions, bioenergetic model, DEB theory.