

N ° | _ | _ | _ | _ | _ | _ | _ | _ | _ |

THESE

Présentée à

L'Université de Pau et des Pays de l'Adour

Ecole Doctorale des Sciences Exactes et de leurs Applications

Par

Hélène TABOURET

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR

Spécialité : Environnement et Matériaux

**RECHERCHE DES MARQUEURS D'EXPOSITION AUX CONTAMINANTS ET DE FREQUENTATION
DES HABITATS CHEZ L'ANGUILLE *ANGUILLA ANGUILLA* DE L'ESTUAIRE DE L'ADOUR : DE LA
REPONSE MOLECULAIRE A LA MICROCHIMIE DE L'OTOLITHE**

Après avis des rapporteurs :

Pr. E. Feunteun	Museum National d'Histoire Naturelle, Dinard
Dr. R. Lecomte-Finiger	CNRS/EPHE, Perpignan

Devant la commission d'examen formée de :

Dr. H. De Pontual	IFREMER, Brest	
Pr. P. Bustamante	Université de la Rochelle, CNRS UMR6250, La Rochelle	
D.R. O.F.X. Donard	IPREM – UPPA – CNRS UMR 5254, Pau	
Dr. P. Prouzet	IFREMER LRHA, Anglet	
Dr. C. Cagnon	IPREM – UPPA - CNRS UMR 5254, Pau	
Dr. G. Bareille	IPREM – UPPA - CNRS UMR 5254, Pau	(Invité)
Dr. C. Pécheyran	IPREM – UPPA - CNRS UMR 5254, Pau	(Invité)

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier chaleureusement l'ensemble des personnes qui ont contribué à la réalisation et à la valorisation de ce travail. Ma mémoire me jouera peut être des tours quant à la restitution des noms de cette longue liste mais ma gratitude, elle, malgré mes oublis, n'en est pas moins réelle et exhaustive.

Ma reconnaissance va en premier lieu à mes deux directeurs de thèse, Patrick Prouzet et Olivier Donard, qui m'ont permis d'intégrer leurs équipes respectives de l'I FREMER-LRHA et de l'IPREM et d'y évoluer avec aisance. Je les remercie vivement de m'avoir permis de participer à de nombreuses conférences scientifiques nationales et internationales, d'avoir favorisé les rencontres et échanges scientifiques et contribué au développement de mes connaissances dans les différents domaines abordés.

J'adresse ma profonde gratitude à Gilles Bareille sans qui ce travail n'aurait pu être ce qu'il est aujourd'hui. Un immense et chaleureux merci pour avoir eu confiance en moi dès le début de cette aventure, pour le temps qu'il a su m'accorder tout au long de ce travail, sa disponibilité, pour son engagement dans le projet, sur le terrain, pour l'écriture et la révision des articles, mais avant tout pour son soutien scientifique et humain de tout instant. Je me souviendrai longtemps de ces longues discussions passionnées sur les anguilles, les Gaves et la pêche...

Merci à Christine Cagnon pour avoir supervisé les travaux de biologie moléculaire et pour avoir apporté son expérience et son aide indispensable dans les discussions et interprétations des résultats. Merci pour sa disponibilité et son soutien. Merci également à Claude Mouchès d'avoir soutenu ce projet dans ses premiers pas.

Je remercie chaleureusement Christophe Pécheyran pour m'avoir ouvert les portes du monde des « laseristes » ou « Jedis ». Merci pour sa formation sur les lasers et les ICPMS, sa présence lors du développement analytique et des « coups de fatigue » du couplage. Je le remercie grandement pour les précieux conseils et corrections qu'il a apportés sur la partie analytique de ces travaux. Les avancées analytiques n'auraient pu voir le jour sans son acharnement et sa rigueur scientifique. Merci d'avoir accepté l'invasion des otolithes...

Mes sincères remerciements à l'ensemble des membres du jury qui m'ont fait l'honneur de juger ce travail : Raymonde Lecomte-Finiger, Eric Feunteun, Paco Bustamante, Hélène de Pontual, Christine Cagnon, Gilles Bareille, Patrick Prouzet et Olivier Donard. Un grand merci à Raymonde Lecomte-Finiger et Eric Feunteun d'avoir accepté la lourde tâche d'examiner ce manuscrit et d'avoir apporté leurs précieux conseils scientifiques. Merci à Paco Bustamante d'avoir accepté de présider ma soutenance de thèse après m'avoir initiée à la chimie analytique il y a quelques années. Merci à Hélène de Pontual d'avoir accepté de participer à cette aventure et d'apporter ses précieux conseils en termes d'analyse chimique des otolithes. Votre présence aura permis de rassembler une équipe scientifique à l'image de la pluridisciplinarité de ce sujet.

Ce travail n'aurait pas pu voir le jour sans le soutien financier de l'I FREMER, de la Région Aquitaine et du Conseil des Elus du Pays Basque. Toute ma reconnaissance à ceux et celles qui ont porté ce projet.

Je tiens à remercier Nathalie Caill-Milly pour m'avoir accueillie dans son équipe à Anglet, pour sa disponibilité et sa sympathie. Merci également à Ryszard Lobinski, responsable du LCABIE, et à Robert Duran, responsable de l'EEM, pour m'avoir accueillie dans leurs laboratoires. Merci également aux personnels de ces trois laboratoires pour leur accueil.

Merci à ceux qui ont mis en place et participer aux campagnes d'échantillonnage. Merci aux agents de l'ONEMA et notamment à l'équipe de Michel Goillon, aux agents de MI GRADOUR et plus particulièrement à Samuel Marty et David Barracou. Merci de m'avoir fait découvrir les Barthes et les coteaux.

Tous mes remerciements à ceux qui ont accepté de m'accompagner et de m'aider sur le terrain : Adrien, Solange, Eléna, Ina, Benoît, Julie, Léa... Merci également aux pêcheurs professionnels pour leur participation dans la collecte d'échantillons estuariens.

Je tiens à adresser toute ma gratitude à Elena Aubry et à Fanny Claverie. Merci Eléna de m'avoir initiée à la biologie moléculaire et de m'avoir guidée pas à pas, même à l'autre bout de la France. Merci pour ta patience et ton soutien. Merci Fanny pour ton aide, ta disponibilité, ton soutien dans les analyses en laser même à des heures tardives...sans vous deux, tout aurait été plus difficile...

Ce travail est aussi le fruit de rencontres, de collaborations et de discussions avec de nombreux passionnés. Merci à Noelle Bru pour son accompagnement en statistiques et pour son implication dans le traitement des signaux élémentaires. Merci à Tony Robinet pour ses conseils et les discussions au combien stimulantes et passionnées sur nos bestioles favorites. Merci à Françoise Daverat pour sa participation aux traitements de données, pour sa bonne humeur et ses précieux conseils.

D'immenses remerciements à tous ceux et celles qui m'ont soutenue au laboratoire comme dans la vie de tous les jours :

- A Pau, dans le couloir des galères ou sur le tatami, il y a toujours un sourire, un mot, un chocolat, de la bonne humeur, pour faire disparaître les nuages : Fanny, Aurélie, Estelle, Yoana, Eléna, Léa, Julien, Jérôme, Guilhem, Raph, Georgia, Zoyné, Sylvain, Marion, Nico, Adrien, Alex, Sandrine, Ludo, Lionel, Sabrina, Clara, Isa, Gilles et Sandra F., Yves D., Jean-Claude, Laurent, Régis, Isabelle F. et les autres « black and white »...
- En France et au-delà des frontières, il y a toujours quelqu'un qui écoute, qui rassure, qui partage : Pascaline « wiki »...toujours prête à partager une bonne blanche au Corrigan ou tout simplement un bon morceau de musique, Benoît...toujours la « patate » et prêt à faire du body dans le Gave, Elodie...l'autre chuchoteuse aux oreilles des anguilles, Mimi, Chapi, Galou, Yann, Stéphanie, Marie, Pascal, Pierre, Olivier, Yves, ...

Je souhaite enfin adresser mes derniers remerciements à mes proches : un grand merci à toute la famille pour m'avoir soutenue physiquement et moralement durant toutes ces années malgré la distance et mon absence. Je remercie plus particulièrement mes parents pour toute leur aide et leur affection, pour m'avoir laissé libre et m'avoir soutenue dans chacun de mes choix.

Ces trois années palloises auront favorisé les rencontres, une en particulier, sans doute la plus précieuse... Merci Ismaël pour les pauses thé et mikado mais surtout merci pour ta patience, ta présence, ton écoute et ton soutien de tous les jours...merci d'avoir été à mes côtés...merci d'être à mes côtés...



« Eels » Bafuku Ohno

A mes parents,

Sommaire

ABRÉVIATIONS	5
LISTE DES FIGURES	7
LISTE DES TABLEAUX	13
INTRODUCTION	17
CONTEXTE DE L'ETUDE	17
OBJECTIFS DE LA THESE	19
PRESENTATION DU TRAVAIL	24
CHAPITRE I	25
PROBLEMATIQUE SCIENTIFIQUE	25
FREQUENTATION DES HABITATS ET PRESSION CHIMIQUE SUBIE PAR L'ANGUILLE EUROPEENNE (<i>ANGUILLA ANGUILLA</i>) DU BAS ADOUR: MISE EN PLACE D'UNE APPROCHE PLURIDISCIPLINAIRE.	25
1. Le bassin de l'Adour et les zones humides associées	27
1.1 Géographie :	27
1.2 Etat de la pression chimique dans l'estuaire de l'Adour	30
2. L'anguille européenne (<i>Anguilla anguilla</i>, Linné)	36
2.1. Systématique et cycle biologique	36
2.2. Utilisation des habitats : une espèce migratrice sur de longues et courtes distances	40
2.3. Une espèce en déclin : état des stocks et causes du déclin	43
2.4. Intérêt de gestion et de restauration	46
3. Evaluation de la pression chimique s'exerçant sur les organismes	48
3.1. Origine des polluants et notion d'échelle d'intégration	48
3.2. Bioaccumulation dans les tissus mous	51
3.3. Réponses des organismes aux stress chimiques	53
4. Apport de la microchimie des biominéraux carbonatés dans la reconstruction des conditions environnementales et des historiques de vie.	62
4.1 Le carbonate de calcium : formes et affinité avec les éléments traces	62
4.2 Les différentes pièces calcifiées biogéniques : marqueurs et proxis	64
4.3 Cas particulier des otolithes	67

CHAPITRE II	77
DE L'ÉCHANTILLONNAGE À LA MISE EN PLACE DES DIFFÉRENTES TECHNIQUES ANALYTIQUES	77
1. Caractéristiques des sites et de la population d'anguilles d'intérêt	79
1.1. Sites d'études	79
1.2. Caractéristiques de l'échantillonnage biologiques	83
2. Caractérisation chimique des milieux	88
3. Recherche de la pression chimique et de la réponse moléculaire au stress chimique de l'anguille	90
3.1. Analyse chimique des tissus mous	90
3.2. Mesure de l'expression hépatique du gène <i>CYP1A1</i> par RT-PCR quantitative	93
3.3. Traitement statistique	98
4. Analyse multi élémentaire des otolithes par ablation laser femtoseconde-ICP-MS et estimation de l'âge	99
4.1. Préparation des otolithes	99
4.2. Mise en place de la fs-LA-ICP-MS	100

CHAPITRE III **109**

MICROANALYSE ÉLÉMENTAIRE QUANTITATIVE DES OTOLITHES D'ANGUILLE : UN OUTIL POUR LA DÉTERMINATION DE L'UTILISATION DES HABITATS DANS LA PARTIE AVAL DU BASSIN DE L'ADOUR **109**

PARTIE 1. DÉTERMINATION DE LA COMPOSITION ÉLÉMENTAIRE DES OTOLITHES D'ANGUILLE PAR ABLATION LASER FEMTOSECONDE HAUTE FREQUENCE/ICP-MS : COMMENT AMÉLIORER LES LIMITES DE DÉTECTION ET LA RÉOLUTION SPATIALE ? **113**

1. Introduction	117
2. Experimental	119
2.1. Fish collection and otoliths preparation	119
2.2. Laser ablation ICPMS coupling	120
2.3. Ablation cells	121
2.4. Ablation strategies	122
2.5. Standardisation	125
2.6. Roughness measurements	125
2.7. Evaluation of the ablation cell washout time and spatial resolution	126
3. Results and discussion	127
3.1. In depth penetration of the laser beam	127
3.2. Signal sensitivity and accuracy	129
3.3. Washout time and temporal resolution	133
3.4. Monitoring the temporal variation of elements within the European eel (<i>Anguilla anguilla</i>) otolith	137
4. Conclusion:	139

PARTIE 2. UTILISATION SIMULTANEE DES RAPPORTS STRONTIUM:CALCIUM ET BARIUM:CALCIUM DANS LES OTOLITHES COMME MARQUEURS DES HABITATS : APPLICATIONS A L'ANGUILLE EUROPEENNE (ANGUILLA ANGUILLA) DU BASSIN DE L'ADOUR. _____ **141**

1. Introduction	145
2. Materials and Methods	146
2.1. Fish sampling	146
2.2. Water chemistry	148
2.3. Otolith preparation and Sr:Ca and Ba:Ca ratio determination by fs LA-ICP-MS analysis	149
2.4. Relationships between water chemistry and otolith Sr:Ca and Ba:Ca ratios	151
2.5. Qualitative presence of vaterite inclusions as perturbation of continuous elemental profiles	152
3. Results	152
3.1. Sr:Ca and Ba:Ca ratios in water bodies of the Adour estuary (freshwater, marine waters and salinity gradient)	152
3.2. Otolith background levels and water chemistry	154
3.3. Check for possible vaterite disturbances in otolith ablated sections	156
3.4. Sr:Ca and Ba:Ca continuous profiles in otoliths to reconstruct historical migrations	156
4. Discussion	159
4.1. Water and otolith chemistry	159
4.2. Simultaneous use of strontium and barium to avoid vaterite disturbance	162
4.3. Reconstruction of eel habitat-use.	163

CHAPITRE IV _____ **167**

BILAN DE LA PRESSION CHIMIQUE S'EXERÇANT SUR L'ANGUILLE EUROPEENNE DANS LE BASSIN DE L'ADOUR **167**

PARTIE 1. EVALUATION DE LA PRESSION CHIMIQUE PAR LES METAUX LOURDS ET LES COMPOSES ORGANOCHLORES S'EXERÇANT SUR L'ANGUILLE EUROPEENNE (ANGUILLA ANGUILLA) DANS L'ESTUAIRE DE L'ADOUR ET LES ZONES HUMIDES ASSOCIEES (FRANCE). _____ **171**

1. Introduction	175
2. Material and methods	177
2.1. Eel sampling sites and procedures	177
2.2. Chemical analysis of eel soft tissues	179
3. Results and discussion	182
3.1. Levels and distribution of heavy metals in eel soft tissues	183
3.2. Organochlorinated compounds	189
3.2. Quality class and human exposure	194
4. Conclusion	198

PARTIE 2. BIOCONCENTRATION DU METHYLMERCURE DANS LE MUSCLE DE L'ANGUILLE EUROPEENNE (ANGUILLA ANGUILLA) DE L'ESTUAIRE DE L'ADOUR (GOLFE DE GASCOGNE, FRANCE). _____ **199**

PARTIE 3. RESULTATS PRELIMINAIRES DE L'EXPRESSION HEPATIQUE DE CYP1A1 CHEZ L'ANGUILLE JAUNE (ANGUILLA ANGUILLA) DU BASSIN DE L'ADOUR. _____ **207**

1. Introduction	211
2. Material and methods	213
3. Results and discussion	216

CHAPITRE V	221
DES DESCRIPTEURS VERS L'ÉVALUATION DE LA QUALITÉ ET DE LA FRÉQUENTATION DES HABITATS	221
1. Introduction	223
2. Matériel et Méthodes : définition des descripteurs.	224
2.1 Descripteurs de la pression chimique et du comportement de l'anguille:	224
2.2 Taux de croissance en longueur et coefficient de condition	226
3. Résultats :	228
3.1. Bilan de la pression chimique sur le bas Adour	228
3.2. Relation poids-taille et étude des allométries	229
3.4. Des usages des habitats aux performances de croissance :	232
4. Discussion : Entre performances de croissance, qualité du milieu et utilisation de l'habitat : quels compromis ?	235
4.1 Qualité chimique des différents habitats	235
4.2 Fréquentation des habitats	237
5. Conclusion et perspectives	244
CHAPITRE VI	247
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	247
BILAN METHODOLOGIQUE ET PERSPECTIVES	249
APPORTS SUR L'ÉCOLOGIE DE L'ANGUILLE DE L'ADOUR ET PERSPECTIVES	252
CHAPITRE VII	255
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	255
CHAPITRE VIII	305
ANNEXES – ÉTUDE COMPLÉMENTAIRE	305
I. Introduction	309
II. Material and methods	311
1. Sampling	311
2. Otolith preparation and Sr:Ca and Ba:Ca ratio determination by femtosecond laser ablation ICP –MS analysis.	313
III. Results	316
1. Vanuatu samples	316
2. New Caledonian samples	316
IV. Discussion	320
V. Conclusion	326
VI. References	328

Abréviations

Aldrin	1,2,3,4,10,10 – Hexachloro – 1,4,4a,5,8,8a – hexahydro – 1,4:5,8 - dimethanophtalène
AMS	Spectrométrie magnétique alpha
ARN	Acide RiboNucléique (ARNm : messenger)
2,4' DDD	2,4' Dichlorodiphényldichloroéthane
2,4' DDE	2,4' Dichlorodiphényldichloroéthylène
2,4' DDT	2,4' Dichlorodiphényltrichloroéthane
4,4' DDE	4,4' Dichlorodiphényldichloroéthylène
4,4' DDT	4,4' Dichlorodiphényltrichloroéthane
ADN	Acide DésoxyriboNucléique (ADNc : complémentaire)
CIEM	Conseil International pour l'Exploration de la Mer
DEPC	DiEthylenePyroCarbonate
Dieldrin	1,2,3,4,10,10 – Hexachloro – 6,7 – epoxy – 1,4, 4a,5,6,7,8,8a – octahydro – endo,exo – 1,4:5,8 - dimethanophtalène
ECOD	7-éthoxycoumarine <i>O</i> -dééthylase
EDS	Spectrométrie à énergie dispersive
EROD	7-éthoxyrésorufine <i>O</i> -dééthylase
HCB	Hexachlorobenzène
HR-ICP-MS	Spectrométrie de masse haute résolution à plasma induit
HR-LA-ICP-MS	Ablation laser couplée à la spectrométrie de masse haute résolution à plasma induit
ICP-AES	Spectrométrie d'émission atomique à plasma induit
IRMS	Spectrométrie de masse des rapports isotopiques
LA-ICP-MS	Ablation laser couplée à la spectrométrie de masse à plasma induit
LA-IRMS	Ablation laser couplée à la spectrométrie de masse des rapports isotopiques
OCP	Pesticides OrganoChlorés
ONEMA	Office National de l'Eau et des Milieux Aquatiques
pb	paire de bases
PBDE	PolyBromoDiphénylEthers
PCB	PolyChloroBiphényles
PCR	Réaction de Polymérisation en Chaîne (Polymerase Chain Reaction)

PIXE	Emission X induite par bombardement de proton
RT-PCR	Reverse transcription – Polymerase Chain Reaction (Amplification en Chaîne par Polymérisation après Transcription Inverse)
SB-ICP-MS	Spectrométrie de masse à plasma induit basée sur la mise en solution de l'échantillon
SIMS	Spectrométrie d'émission ionique secondaire
TIMS	Spectrométrie de masse à ionisation thermique
WDS	Spectrométrie à longueur d'onde dispersive
XRE	élément de réponse aux xénobiotiques (Xenobiotic - Responsive Element)
γ-HCB (lindane)	γ - Hexachlorocyclohexane

Liste des figures

Pages

Introduction et Chapitre I :

Figure 1. Les axes de recherche du GDR Adour : une approche pluridisciplinaire	20
Figure 2. Schéma conceptuel de l'étude et des collaborations.	23
Figure 3. Carte de l'estuaire de l'Adour et de ses principaux affluents. (Point, 2004)	27
Figure 4. Coupe générale d'une barthe (val d'Adour maritime)	28
Figure 5. L'estuaire de l'Adour et sa zone urbaine (Point, 2004)	30
Figure 6. Variation saisonnière des concentrations en mercure inorganique et méthylmercure dans les sédiments sur 4 sites de références de l'estuaire de l'Adour.	33
Figure 7. Distribution et aire de répartition de l'anguille européenne.	36
Figure 8. Cycle de vie de l'anguille européenne (<i>Anguilla anguilla</i>).	38
Figure 9. Variations du Sr:Ca le long de transects partant du premier annulus jusqu'au bord de l'otolithe d'anguilles européennes représentatives de 6 schémas différents d'utilisation des habitats dans la Gironde, Sud Ouest France.	42
Figure 10. Diminution des indices de recrutement pour les trois espèces d'anguilles tempérées de l'hémisphère Nord : l'anguille européenne (<i>A. anguilla</i>), l'anguille américaine (<i>A. rostrata</i>) et l'anguille japonaise (<i>A. japonica</i>).	43
Figure 11. Sources et transports des contaminants inorganiques et organiques dans les environnements aquatiques.	49
Figure 12. Echelles d'intégration de la contamination par les éléments traces dans les différents organes des poissons.	50
Figure 13. Caractéristiques structurales des enzymes à cytochrome P450 et CYP1A.	55
Figure 14. Structure du gène <i>CYP1A1</i> .	56
Figure 15. Induction de l'expression du gène <i>CYP1A1</i> par la voie du récepteur arylhydrocarbon (Ah) et production de la protéine P450 suite à la pénétration d'un xénobiotique dans la cellule.	58
Figure 16. Gène <i>CYP1A1</i> chez l'anguille japonaise <i>A. japonica</i> .	60
Figure 17. Induction de l'ARNm <i>CYP1A1</i> hépatique chez de jeunes anguilles européennes.	61
Figure 18. Exemple de profils élémentaires de Sr et Ba ($\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$), et $\delta^{18}\text{O}$, obtenus dans une coquille de clam (<i>Mercenaria mercenaria</i>), prélevée dans le Delaware (E.U.) en 1993.	66
Figure 19. Schéma de l'emplacement des otolithes à l'intérieur de l'oreille interne d'un Téléostéen.	67

	<i>Pages</i>
Figure 20. Synthèse des données existantes sur la composition des otolithes d'espèces occupant trois principaux types d'habitats.	69
Figure 21. Schéma des différentes voies et barrières entre l'eau de mer et l'otolithe, avec une estimation du taux de transfert pour certains éléments à chaque barrière physiologique (d'après Campana, 1999).	70
Figure 22. Exemple de profils de Sr et de Zn obtenus le long d'un transect nucleus-bord de l'otolithe par microsonde (Scanning proton microprobe) chez un Omble chevalier (<i>Salvelinus alpinus</i>) anadrome.	74

Chapitre II :

Figure 1. Carte des sites choisis sur le bassin de l'Adour pour le prélèvement des anguilles jaunes et des échantillons d'eau. La ligne en pointillé indique la limite de l'influence de la marée saline.	80
Figure 2. Fréquence des effectifs (%) d'anguilles jaunes échantillonnées par site et classes de taille (cm).	85
Figure 3. Schéma général d'un spectromètre de masse à plasma induit (ICP-MS).	89
Figure 4. Exemple de courbe de fusion obtenue à partir du standard à trois dilutions (50 ^e , 250 ^e , 1250 ^e), du blanc PCR et d'un échantillon d'ADNc <i>CYP1A1</i> .	97
Figure 5. Protocole de préparation des otolithes (extraction, nettoyage, ponçage).	100
Figure 6. Schéma synoptique des principales applications de la microchimie de l'otolithe.	101
Figure 7. Schéma du couplage ablation laser spectrométrie de masse à plasma induit (LA-ICP-MS).	103
Figure 8. Protocole de préparation des otolithes d'anguille européenne pour l'estimation de l'âge.	107

Chapitre III:

Partie 1

Figure 1. Ablation cells dimensions – a) Cell A: 15 cm ³ , b) cell B, 3.7 cm ³	122
Figure 2. Scheme, characteristics and resulting profiles of the four ablation strategies.	124
Figure 3. Ablation set up used to assess the signal intensity drop when the laser crosses 20x30 μm and 40x30 μm grooves engraved in the NIST 612 glass.	126
Figure 4. Three dimension structure of a sagittal otolith	128
Figure 5. Typical trend of the limits of detection as a function of the ablation rate for both ablation cells, case of ⁵⁵ Mn.	131
Figure 6. End of continuous profile of ⁴³ Ca (cps) resulting from 2D scan ablation in cell A and cell B showing the washout time (s) for a loss of 90% and 99%.	134
Figure 7. Sr continuous profiles resulting from the ablation of a succession of ink bands using 2D scan strategy in a) cell A and b) cell B. LS: Laser Shot.	136
Figure 8. Example of Sr continuous profiles provided by a 2D scan ablation in cell A.	138

Partie 2

Figure 1. Map of the Adour basin showing the sampling sites for water (square) and yellow eels (star).	147
Figure 2. Otolith of yellow European eel (33.6 cm total length, age 8 years) from freshwater site showing the entire continuous transect made by fs-LA-ICP-MS.	149
Figure 3. Relationship between Sr:Ca ratio in water and salinity (a), Ba:Ca ratio in water and salinity (b), Ba :Ca and Sr :Ca in water (c), and temporal evolution of Sr:Ca and Ba:Ca ratios along 2007 in the Gave de Pau river (d).	153
Figure 4. Relationship between Sr:Ca ratio and Ba:Ca in otolith of eel <i>Anguilla anguilla</i> from the Adour estuary for the two end-members, freshwater sites (Cauneille: triangle, SLG: lozeng, Termi: open square) and brackish (filled square).	155
Figure 5. Relationship between Sr:Ca ratio in otolith and Sr:Ca in water (a), Ba:Ca ratio in otolith and Ba:Ca in water (b).	155
Figure 6. Continuous profiles showing the evolution of Sr:Ca (grey line) and Ba:Ca (black line) ratios in otoliths of a) a freshwater resident b) an estuary resident c) a downstream nomad or interhabitat shifter.	158

Chapitre IV:

Partie 1

- Figure 1.** Map of the sampling site distribution on the Adour estuary. 178
- Figure 2.** Mean concentrations (ng.g⁻¹) of Cu, Cd, Ag, Zn and Pb in gills, liver and muscle of yellow european eels from Termi, St Laurent de Gosse (SLG), the Adour downstream estuary (Redon) and the Gave de Pau river (GP). 184
- Figure 3.** Average heavy metal concentrations in liver (ng.g⁻¹ ww) of yellow eels from Termi in April (N=15), July (N=9) and October 2006 (N=10). 187
- Figure 4.** Contribution (%) of each PCB indicator congener in the sum of total PCBs in muscle of yellow eels from the Adour estuary (Redon) and the two watersheds (Termi, St Laurent de Gosse SLG). 191
- Figure 5.** Percentage of eel from the estuary and freshwater sites classified according to the four quality classes of Belpaire and Goemans (2007) for the sum of the seven indicators PCBs in muscle. 196

Partie 2

- Figure 1.** Sampling area locations in the lower estuary and upper estuary floodplain (Adour River, France). 202
- Figure 2.** Concentration of MeHg (µg Hg g⁻¹ as wet weight) according to the length of the eels from the downstream urban estuary and from the floodplains of the Adour River. 204
- Figure 3.** Percentage of MeHg according to the length of the eels from the downstream urban estuary and from the floodplains of the Adour River. 205

Partie 3

- Figure 1.** Sites of European yellow eel sampling (black star) on the Adour basin (South West, France). 214
- Figure 2.** Mean hepatic expression level of *CYP1A1* according sampling site and date. 217

Chapitre V:

Figure 1. Relation taille-poids observée chez les anguilles jaunes prélevées en eau douce (Termi, St Laurent de Gosse SLG, Gave de Pau GP) et dans l'estuaire aval.	229
Figure 2. Indice de condition de Fulton des anguilles jaunes prélevées sur les sites du Gave de Pau (GP ; N=6), du Termi (N=53), de St Laurent de Gosse (N=23) et de l'estuaire aval de l'Adour (N=21).	230
Figure 3. Indice de condition de Fulton ($g.cm^{-3}$) des anguilles jaunes en fonction des dates et des sites de prélèvement (GP : Gave de Pau ; SLG : St Laurent de Gosse). Les flèches noires indiquent la variation significative observée en juillet 2006 sur Termi et SLG.	231
Figure 4. Profils continus illustrant l'évolution conjointe du Sr :Ca et du Ba :Ca dans l'otolithe (a) d'une anguille résidant en eau douce, (b) d'une anguille résidant en milieu estuarien ou côtier, (c) d'une anguille ayant résidé en eau douce avant de rejoindre l'estuaire ou la zone côtière.	233
Figure 5. Profil continu illustrant l'évolution du Sr :Ca dans l'otolithe d'une anguille jaune (âge : 7ans) pêchée dans l'estuaire de l'Adour. Le triangle marque le premier annulus.	234
Figure 6. Taux de croissance en longueur moyen ($cm.an^{-1}$) de l'anguille en fonction des sites d'étude [Gave de Pau (GP), du Termi, St Laurent de Gosse (SLG), bas estuaire] (a), et du comportement d'utilisation des habitats.	235

Chapitre VIII:

Figure 1: Sampling locations in New Caledonia and Vanuatu	313
Figure 2: <i>S. lagocephalus</i> (SL = 32 mm) sagittal otolith from the Co-Daru Kwatéa River (New Caledonia), showing the entire continuous transect made by femtosecond laser ablation ICP-MS.	314
Figure 3: Changes in Sr:Ca and Ba:Ca ratios along the sagittal otolith edge-to-edge transect for 3 <i>S. lagocephalus</i> specimens from Vanuatu.	317
Figure 4: Changes in Sr:Ca and Ba:Ca ratios along the sagittal otolith edge-to-edge transect for 5 <i>S. aiensis</i> specimens from Vanuatu.	318
Figure 5: Changes in Sr:Ca and Ba:Ca ratios along the sagittal otolith edge-to-edge transect for 3 <i>S. lagocephalus</i> specimens from New Caledonia.	319
Figure 6: Changes in Sr:Ca and Ba:Ca ratios along the sagittal otolith edge-to-edge transect for 4 <i>S. sarasini</i> specimens from New Caledonia.	320

Liste des tableaux

Pages

Chapitre I :

Tableau 1. Gamme de concentrations d'éléments traces (U, Cu, Cd, Zn, Co, Ag, et Pb), en mercure inorganique (IHg) et méthylmercure (MMHg) et en carbone organique (OC) particulaire et dissous dans les différentes sources alimentant l'estuaire de l'Adour.	31
Tableau 2. Constante de solubilité de différents éléments métalliques mesurées à 25°C et pour une force ionique nulle.	63

Chapitre II:

Tableau 1. Périodes spécifiques d'usage des sols et phases migratoires de l'anguille européenne sur le bassin de l'Adour.	84
Tableau 2. Classes de taille (cm) préconisées par Lambert et Rigaud (1999) et correspondance biologique.	84
Tableau 3. Effectifs des anguilles jaunes prélevées à chaque campagne d'échantillonnage.	85
Tableau 4. Effectif d'anguilles jaunes traitées dans le cadre des analyses des composants organiques dans le muscle (M) et le foie (F). SLG : Estey de Loustaounaou.	94
Tableau 5. Séquences des amorces utilisées pour l'amplification des fragments du gène <i>CYP1A1</i> et du gène de la β -lactine, taille (pb) et température de fusion (T_m en °C) des amplicons.	96

Chapitre III:

Partie 1

Table 1. Operating conditions of the fs-LA-ICP-MS coupling.	121
Table 2. Mean depth, volume and ablation rate for each ablation strategy.	128
Table 3. Limits of detection ($\mu\text{g g}^{-1}$) obtained for each ablation cell and strategy.	129
Table 4. fs-LA-ICPMS analysis of fish otolith certified material NIES22.	132
Table 5. Percentage of ablation signal loss (%) linked to a perturbation simulated by a groove of 20 μm or 40 μm width, for 2D scan and 1D scan ablation, and for both ablation cells (A and B).	134

Partie 2

Table 1. Characteristics of the sampling sites and yellow eels analysed	147
Table 2. Operating conditions of the fs-LA-ICP-MS	150

Chapitre IV:

Partie 1

Table 1. Mean heavy metal concentrations, standard deviation and range (in ng.g ⁻¹ wet weight) in yellow eel muscle from the Adour estuary, two associated watershed (Termi, St Laurent de Gosse SLG) and the Gave de Pau River.	180
Table 2. Mean organochlorine compounds concentrations, standard deviation and range (in ng.g ⁻¹ wet weight) in yellow eel muscle from the Adour estuary, two associated watershed (Termi, St Laurent de Gosse SLG) and the Gave de Pau River.	190
Table 3. Comparison of the ratio between the \sum PCBs and the sum of compounds CB50, CB28 and CB52 in sediment, suspended particles (SPM) from the downstream estuary, the upper estuary, one industrial discharge point and eel liver from the freshwater and downstream estuary.	193
Table 4. Percentage of eel from the Adour basin classified according to the four quality classes of Belpaire and Goemans (2007) for heavy metals Cu, Zn, Cd, Pb and total mercury (T Hg) in muscle.	195

Partie 2

Table 1. Results obtained in the analysis of the certified reference material DORM 2 (dogfish mussel tissue).	203
Table 2. Mean values of the methyl mercury, inorganic mercury and total mercury concentrations (μ g Hg g ⁻¹ wet weight) in the muscle tissues of <i>A. anguilla</i> collected from the two sampling sites of the Adour Estuary.	203
Table 3. Comparison of total mercury and methyl mercury concentrations in eels obtained in similar studies (μ g Hg g ⁻¹ as wet weight).	204

Partie 3

Table 1. Characteristics of yellow eels caught on Termi and St Laurent de Gosse. 215

Table 2. Correlation (Pearson coefficient r) between hepatic expression level of *CYP1A1* and biometric characteristics (length, weight, age), lipid content in muscle (% of body weight), sum of PCBs or POCs (ng.g^{-1} muscle wet weight) based on 5 yellow eels from Termi. 218

Chapitre V:

Tableau 1. Paramètres des droites de régression du poids en fonction de la taille après transformation logarithmique des variables. 229

Chapitre VIII:

Table 1: Sampling locations in Vanuatu and New Caledonia for the three *Sicyopterus* species and the number of specimens sampled (N). 312

Table 2: Operating conditions for the femtosecond laser ablation ICP-MS. 315

INTRODUCTION

CONTEXTE DE L'ETUDE

L'anthropisation croissante de notre planète, conjuguée aux cycles hydrologiques et atmosphériques, a conduit à la contamination de l'ensemble des écosystèmes, en particulier des écosystèmes aquatiques, par une grande diversité de polluants chimiques (métaux lourds, pesticides, hydrocarbures...). Nombre de ces polluants peuvent conduire à la perturbation du fonctionnement des biocénoses et de la résilience des écosystèmes. Cette pression chimique s'ajoute aux contraintes physiques qui pèsent également sur les organismes aquatiques, en particulier celles résultant des modifications des habitats (assèchement, irrigation, changements de régimes hydrologiques), de la mise en place de barrières physiques (barrages, turbines) entravant la libre circulation ou encore la pression liée aux pêcheries. Il est alors devenu indispensable de déterminer la présence de ces contaminants et d'évaluer leur potentiel de perturbation avant que des effets délétères ne soient observés sur les populations et ne portent atteinte aux ressources renouvelables. Les réponses des organismes aux facteurs environnementaux peuvent être mesurées à partir des réponses immédiates, comportementales (utilisation des habitats par exemple), et physiologiques (capacité métabolique, rythme ventilatoire). Ces réponses peuvent également être illustrées à une échelle plus intégrative par des variables telles que la croissance, les indices de conditions ou encore la distribution géographique. Ainsi, les recherches se sont en partie focalisées sur la définition de descripteurs d'exposition aux contaminants (mesure des concentrations dans l'organisme, étude de la croissance, modification de la physiologie, mesure des activités enzymatiques...) et leurs effets chez des organismes vivants présentant un caractère ubiquiste et la capacité à concentrer et à résister aux polluants. L'anguille européenne (*Anguilla anguilla*, L.) présente de telles caractéristiques notamment une grande capacité à accumuler certains polluants lipophiles de par sa quantité de graisse plus importante que chez d'autres poissons et sa place de prédateur dans le réseau trophique, mais également une bonne résistance aux conditions physico-chimiques (Tesch, 2003).

Ce bon modèle biologique est aussi considéré comme une espèce en danger. En effet, l'espèce amphihaline connue pour ses grandes migrations, de sa zone de reproduction dans la mer des Sargasses jusqu'aux zones de croissance continentales (larves leptocéphales) et inversement au stade

adulte (anguille argentée), voit ses stocks décliner massivement depuis les années 70. Ce déclin est tel que le CIEM (Conseil International pour l'Exploration de la Mer) a déclaré la population de l'anguille européenne en dehors de ses limites biologiques (European Commission, 1998). Par ailleurs, il s'agit d'une espèce présentant un intérêt économique et écologique de taille. En juin 2007, l'anguille est classée à l'annexe II de la CITES (convention sur le commerce international des espèces de faune et de flore sauvage menacées d'extinction) et le 17 septembre 2007 est édité au Journal Officiel le règlement européen 1100/2007 dont les objectifs sont la reconstitution, la protection et l'utilisation durable des stocks d'anguille. Afin d'établir un diagnostic fiable, il est nécessaire d'analyser les facteurs responsables du déclin observé.

De nombreux facteurs naturels et anthropiques sont soupçonnés d'avoir un effet négatif sur le stock d'anguilles (Feunteun, 2002). Si les pêcheries sont souvent pointées du doigt, elles ne peuvent être considérées comme l'unique responsable du déclin observé. Le nombre de géniteurs arrivant dans la mer des Sargasses serait dépendant de la quantité d'anguilles argentées qui sont en mesure de quitter les estuaires et les zones côtières et d'effectuer la migration transocéanique. Il est donc également dépendant de la survie et de la qualité des autres stades de croissance (civelles, anguillettes, anguilles jaunes) qui, lors de leur développement dans les milieux côtiers et continentaux, peuvent subir l'influence des facteurs anthropiques. Il est alors essentiel de prendre en compte ces différents stades et d'évaluer la qualité des habitats que les anguilles colonisent durant leur phase de croissance. La qualité de ces habitats a notamment été classée par le réseau INDICANG (INDICateurs d'abondance et de colonisation sur l'ANGuille européenne, coordonné par l'IFREMER) parmi les descripteurs permettant d'avoir une indication sur la productivité de l'habitat de l'espèce. Par ailleurs, il est essentiel d'identifier l'utilisation de ces habitats par les anguilles et les mouvements migratoires qu'elles sont en mesure de réaliser afin de mieux concevoir les suivis et les analyses visant à établir l'état du stock. De plus, le comportement migratoire peut notamment conditionner l'exposition aux contaminants comme aux barrières physiques (barrages, turbines) entravant la survie et le retour des géniteurs vers l'océan.

L'aspect migratoire suscite un intérêt particulier depuis quelques années. Les études par télémétrie se sont multipliées et ont conduit à la mise en évidence d'un schéma élaboré de colonisation des habitats par l'anguille (Feunteun *et al.*, 2003). La détermination de l'utilisation des habitats par la ressource s'est vue récemment affinée grâce à la microchimie de l'otolithe. Cette petite pièce calcifiée présente dans l'oreille interne des poissons téléostéens, en particulier sa microstructure formant des stries successives de croissance, était déjà largement utilisée dans l'estimation de l'âge, la

détermination de stock, de changement de milieu (Lecomte-Finiger, 1992 ; Campana et Casselman, 1993 ; Mounaix et Fontenelle, 1994). L'apparition de techniques analytiques fines, notamment l'ablation laser couplée à l'ICP-MS (spectrométrie de masse à plasma induit), a permis l'analyse de la composition élémentaire ou isotopique de nombreuses archives carbonatées naturelles comme les foraminifères (Eggins *et al.*, 2003), les coraux (Sinclair *et al.*, 1998 ; Wyndham *et al.*, 2004), les coquilles de mollusques bivalves (Lazareth *et al.*, 2003 ; Barats *et al.*, 2008) et les otolithes (Campana *et al.*, 1997 ; De Pontual *et al.*, 2000 ; Thorrold et Shuttleworth, 2000 ; Arai *et al.*, 2007). Chez l'anguille, ces techniques ont permis d'accéder à la composition élémentaire des stries de croissance tout en conservant l'échelle naturelle qu'elles procuraient. La mise en relation des changements de composition élémentaire dans l'otolithe et des compositions élémentaires dans le milieu ambiant, notamment des rapports Sr:Ca, ont permis de mettre en évidence une mosaïque de comportements d'utilisation des habitats d'eau douce, saumâtre et marine, chez les anguilles européennes (Daverat *et al.*, 2005) mais également japonaises (*Anguilla japonica*) (Tzeng *et al.*, 2002 ; Arai et Hirata, 2006), américaines (*Anguilla rostrata*) (Jessop *et al.*, 2002), ou encore australiennes (*Anguilla australis*) (Arai *et al.*, 2004). Cependant, l'analyse élémentaire fine est souvent confrontée aux problèmes des très faibles concentrations élémentaires présentes dans les otolithes et à l'interprétation des résultats en fonction des variations des conditions environnementales et physiologiques des individus. Améliorer les outils afin d'obtenir de nouveaux marqueurs des conditions de vie et de conforter l'interprétation des signaux est un intérêt majeur visant à mieux comprendre les interactions entre les populations et leur environnement.

OBJECTIFS DE LA THESE

A l'heure actuelle, peu de travaux intègrent les différentes composantes de comportement migratoire et de pression chimiques du milieu. Cette thèse consistant dans une approche pluridisciplinaire a donc été initiée pour pallier à ce manque en cherchant à mettre en place des descripteurs de chacune de ces composantes et en les confrontant.

Ce travail, cofinancé sur trois années (IFREMER et Région Aquitaine), s'inscrit dans le cadre du Groupement de Recherche Adour. Ce groupe de recherche, par une approche pluridisciplinaire à plus grande échelle (22 chercheurs impliquant 10 laboratoires partenaires français en liaison avec des chercheurs espagnols et portugais), a pour objectif d'évaluer l'impact des facteurs anthropiques sur le système estuarien de l'Adour et de sa zone d'influence basco-landaise au travers d'un modèle

biologique : l'anguille européenne (*Anguilla anguilla*). Le travail développé ci après constitue un élément de réponse aux trois problématiques du GDR 1) la caractérisation des usages des sols du bassin du bas Adour et notamment des zones humides (Barthes), 2) la détermination des caractéristiques écologiques et physico-chimiques du bassin versant inférieur de l'Adour, et 3) l'évaluation des réponses des communautés écologiques aux perturbations anthropiques (Fig. 1).

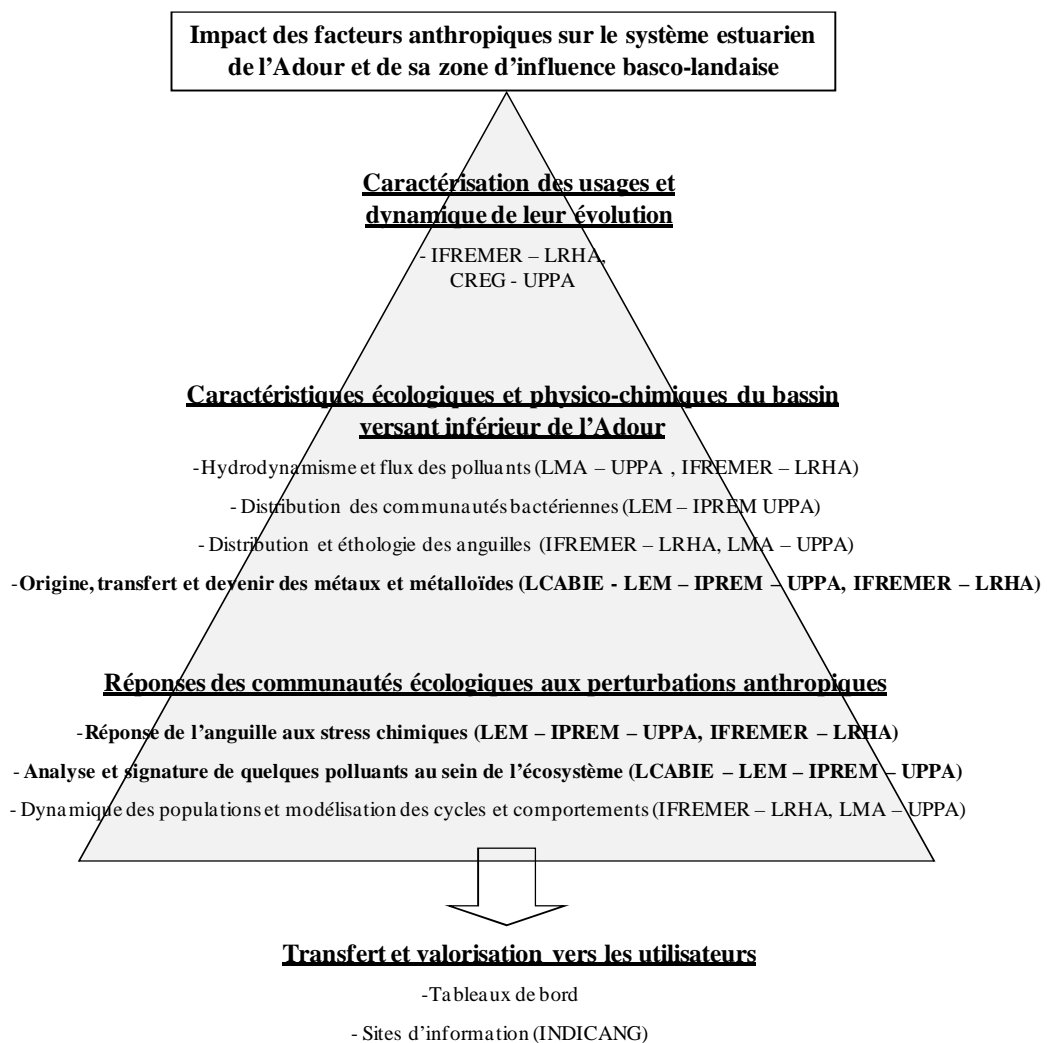


Figure 1. Les axes de recherche du GDR Adour : une approche pluridisciplinaire

Plus particulièrement la thèse présentée ici s'est attachée à :

- **la détermination du comportement migratoire, de l'utilisation des habitats dans le bassin aval de l'Adour (Sud Est, France) par microchimie des otolithes**
- **l'évaluation de la pression chimique inorganique (métaux lourds, méthylmercure) et organique (PCBs, phytosanitaires) s'exerçant sur la ressource par analyse de la bioaccumulation des composés dans les tissus mous**
- **la détermination de la réponse au stress chimique par étude de l'expression du gène *CYP1A1* au niveau transcriptionnel.**

Le **premier objectif** de cette étude, menée au sein du LCABIE (Laboratoire de Chimie Analytique Bio-Inorganique et Environnement) à l'IPREM (Institut Pluridisciplinaire de Recherche sur l'Environnement et les Matériaux - Pau), ciblait l'analyse multi élémentaire des otolithes par ablation laser couplée à la spectrométrie de masse à plasma induit (LA-ICPMS) pour reconstruire l'historique d'utilisation des habitats de l'anguille voire des conditions environnementales. Cette approche analytique, notamment le couplage ablation laser nanoseconde – ICP-MS, a déjà fait ses preuves au LCABIE sur le modèle biologique de la coquille St Jacques (Barats, 2006). La mise au point d'un prototype d'ablation laser femtoseconde couplé à un ICP-MS a également montré de grandes capacités en terme d'échantillonnage et d'analyses multi-élémentaire de microéchantillons solides. Ce système présente en effet une grande sensibilité et des avantages en terme d'interaction avec la surface de l'échantillon et notamment de fractionnement élémentaire comparé au système d'ablation laser nanoseconde (Poitrasson *et al.*, 2003 ; Liu *et al.*, 2004 ; Fernandez *et al.*, 2007). Notre approche a consisté à mettre en place, pour la première fois au laboratoire, l'utilisation de ce système pour révéler les signatures élémentaires des stries de croissance d'otolithe de poisson, plus particulièrement d'anguille. Le prototype de station d'ablation laser femtoseconde développé au LCABIE (Claverie, 2009) permet d'accéder à une infinité de stratégies d'ablation. Ainsi, une partie du travail s'est attachée au développement et la comparaison de plusieurs stratégies d'échantillonnage (ablation) capables de répondre aux diverses problématiques liées aux otolithes (enregistrement temporel des conditions environnementales, signature d'habitats spécifiques, signature ontogénique,...). Dans un deuxième temps, les recherches se sont focalisées sur le Strontium (Sr), déjà utilisé chez l'anguille européenne, et le Baryum (Ba) en tant que marqueurs d'habitat. D'autres éléments comme le Mn, le Mg, le Zn, le Pb

ont été analysés. L'interprétation de ces signatures, confrontées aux données environnementales, vise à reconstruire les historiques de vie à savoir l'utilisation des habitats par les anguilles du bas Adour et l'évolution des conditions environnementales (contamination, processus biogéochimiques, ...).

Le **deuxième objectif** cherchait à évaluer la pression chimique organique (PCBs, OCPs, PBDE) et inorganique (métaux et métalloïdes) qui s'exerce sur le modèle biologique choisi à savoir les anguilles jaunes peuplant les zones humides et l'estuaire de l'Adour. L'analyse des tissus mous (branchies, foie et muscle) est réalisée de façon à estimer les niveaux de contamination, mais également à déterminer les voies d'exposition («directe» par la respiration branchiale et/ou tégumentaire ou «indirecte» par la voie trophique), tout en s'appuyant sur les connaissances existantes en terme de pression chimique sur le milieu. La pression s'exerçant sur la partie aval du bassin de l'Adour (estuaire et zone fluviale) a notamment été au centre d'une thèse soutenue en 2004 par David Point au LCABIE. De même la contamination du réseau trophique avait déjà fait l'objet d'une étude (Monperrus *et al.*, 2005). Les données obtenues doivent, par ailleurs, apporter des informations quant au risque sanitaire potentiel lié à la consommation des groupes d'anguille analysés et à l'impact potentiel sur les performances biologiques (croissance, succès reproducteur).

Le **troisième objectif** était d'évaluer l'existence ou non d'effets précoces de contaminants organiques sur l'anguille par une approche moléculaire. Des travaux de recherche réalisés dans le cadre de la thèse d'Eléna Aubry (2006) ont montré le potentiel de l'analyse de l'expression du gène *CYP1A1* hépatique au niveau transcriptionnel, par RT-PCR en temps réel (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction), pour la mise en évidence de l'exposition des anguilles européennes à une contamination organique (analogue de flavonoïdes naturels et fraction hydrosoluble de gasoil). Si les tests ont été concluants en milieux contrôlés, aucun test n'a été réalisé jusqu'à présent sur des individus vivant en milieu naturel. L'objectif de cette thèse était donc de tester la méthodologie de mesure des niveaux d'expression hépatique du gène *CYP1A1* par RT-PCR en temps réel sur les individus prélevés dans les zones humides de l'Adour. Cette partie, réalisée au sein de l'Equipe Environnement et Microbiologie (EEM) de l'IPREM, visait également à apporter des informations sur les capacités d'adaptation des anguilles à la contamination de leur environnement, mais également sur la qualité des individus. Ces deux derniers axes de recherche, basés sur l'étude des tissus mous, doivent permettre d'établir un bilan de la pression chimique sur la ressource et ses différents habitats.

Enfin, l'association des différents axes de recherche vise à fournir et valider des outils d'aide à la compréhension de l'interaction entre l'anguille et son environnement en termes de qualité de ressources et d'habitat. La figure 2 illustre les interconnexions entre ces différentes voies de recherche. Par ailleurs, l'ensemble des résultats combinés aux données de croissance devrait permettre de déterminer à quel point les sites étudiés peuvent constituer des habitats d'intérêt pour la ressource.

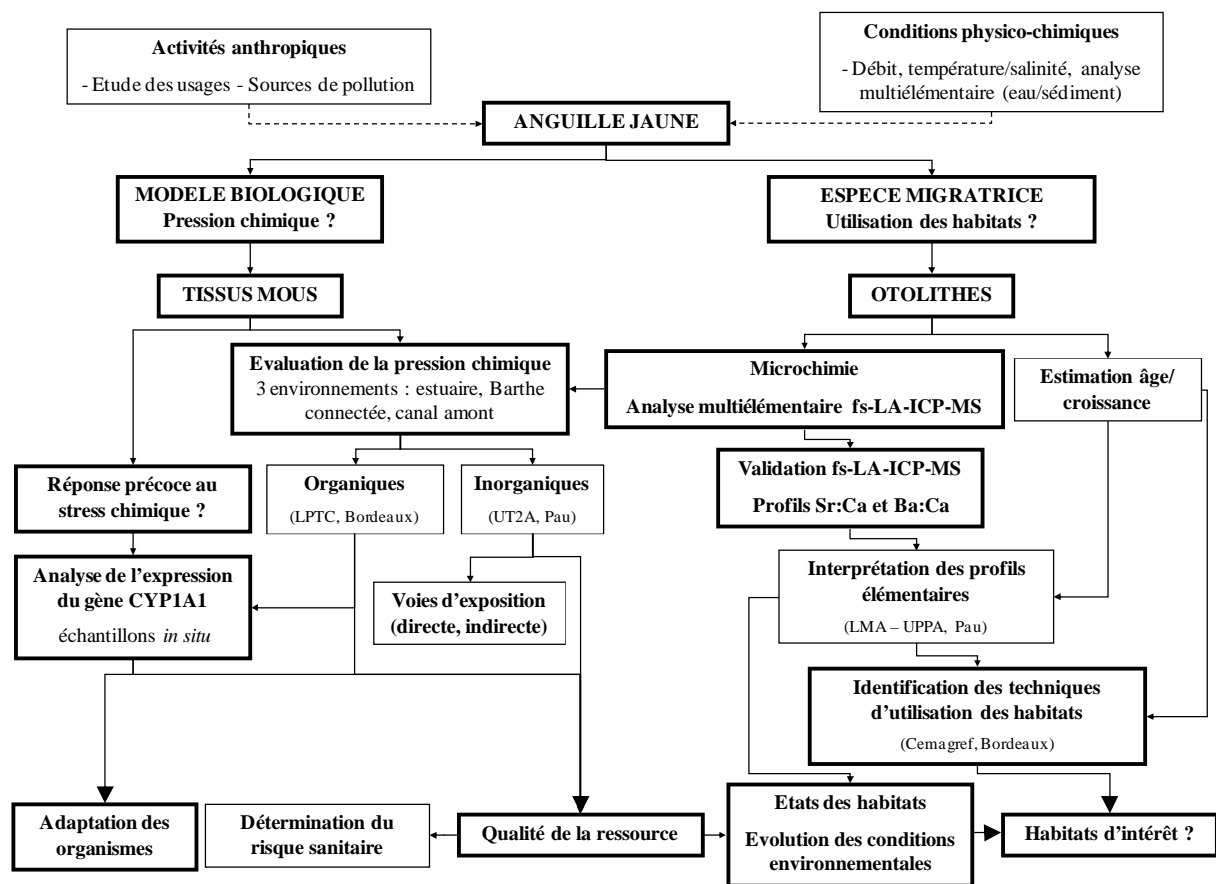


Figure 2. Schéma conceptuel de l'étude et des collaborations. Les principaux axes de recherche et problématiques sont encadrés en gras. LMA : Laboratoire de Mathématiques Appliquées ; UPPA : Université de Pau et des Pays de l'Adour ; LPTC : Laboratoire de Physico-ToxicoChimie des systèmes naturels ; UT2A : Ultra Traces Analyses Aquitaine.

PRESENTATION DU TRAVAIL

Avant de répondre aux objectifs fixés, la problématique scientifique sera développée en rappelant les caractéristiques du bassin de l'Adour en terme de pression chimique, l'intérêt de l'anguille européenne *Anguilla anguilla* en tant que modèle biologique et espèce en déclin, les méthodes d'évaluation de la pression chimique et de la réponse au stress chimique par les organismes et enfin l'apport de la microchimie des biominéraux carbonatés dans la reconstruction des conditions environnementales et des historiques de vie.

Le deuxième chapitre de ce manuscrit sera consacré à la description des sites étudiés dans le bas Adour, de la stratégie d'échantillonnage, des caractéristiques des échantillons et à la description des méthodologies innovantes qui ont été mises en œuvre pour valider et appliquer ces différents biomarqueurs. Ce chapitre sera suivi des principaux résultats obtenus, déclinés sous forme de publications acceptées, soumises ou en cours de finalisation.

Ainsi, le troisième chapitre s'attache à l'étude des otolithes par ablation laser femtoseconde couplée à un ICP-MS. Dans un premier temps, la mise au point de la méthodologie, la comparaison des différentes stratégies d'ablation testées et de leur potentiel seront exposés. Dans un second temps, la validation des signatures en Sr:Ca et Ba:Ca pour la détermination des histoires de vie, en particulier des stratégies d'utilisation des habitats chez l'anguille de l'Adour, sera développée.

Le chapitre 4 vient en réponse directe à la problématique posée par le GDR Adour, à savoir l'évaluation de la pression chimique s'exerçant sur l'anguille. Après avoir effectué un bilan de la contamination de l'anguille et des voies d'exposition aux polluants organiques et inorganiques, le cas particulier du mercure sera évoqué. Parallèlement à ce bilan, la réponse précoce des anguilles du bas Adour au stress chimique sera évaluée par l'évaluation du taux d'expression du gène *CYP1A1* par RT-PCR en temps réel.

L'ensemble des résultats au cours de cette approche pluridisciplinaire sera confronté dans une cinquième partie afin d'évaluer la qualité de la ressource, de son habitat et des interactions existant entre eux.

CHAPITRE I

PROBLÉMATIQUE SCIENTIFIQUE

**FREQUENTATION DES HABITATS ET PRESSION CHIMIQUE SUBIE PAR
L'ANGUILLE EUROPEENNE (*ANGUILLA ANGUILLA*) DU BAS ADOUR:
MISE EN PLACE D'UNE APPROCHE PLURIDISCIPLINAIRE.**

1. Le bassin de l'Adour et les zones humides associées

1.1 Géographie :

- Le bassin de l'Adour et ses barthes

L'estuaire de l'Adour se situe dans l'extrémité Sud-Ouest de la France (Figure 3). Son bassin hydrographique s'étend sur 17000km² des Pyrénées, au sud, aux Landes au Nord-Ouest. Ce bassin s'inscrit dans une région agricole (Maïsiculture, Viticulture) et industrielle incluant différents pôles (papeterie, chimie,...) (Figure A-14). Il débouche sur le golfe de Gascogne au niveau de Bayonne, au coeur de la zone côtière Basque.

Le fleuve Adour, d'une longueur de 355km, prend sa source dans les Pyrénées au col du Tourmalet. Il est alimenté par de nombreux affluents issus des coteaux béarnais, gersois et chalossais. Le Gave de Pau et le Gave d'Oloron constituent les affluents majoritaires. Ces deux tributaires se rejoignent tous deux, pour prendre le nom de Gaves Réunis, avant d'être connectés à l'Adour en amont de la zone estuarienne. Les Gaves peuvent avoir un débit deux fois supérieur à celui de l'Adour. Le bassin de l'Adour, au relief plutôt plat, est principalement recouvert par la forêt (42%) et par les surfaces agricoles (28%). Le sous bassin versant des Gaves Réunis, sous influence montagneuse, est surtout occupé par les surfaces agricoles (40%) et moins par la forêt (25%) (Veysy, 1998).

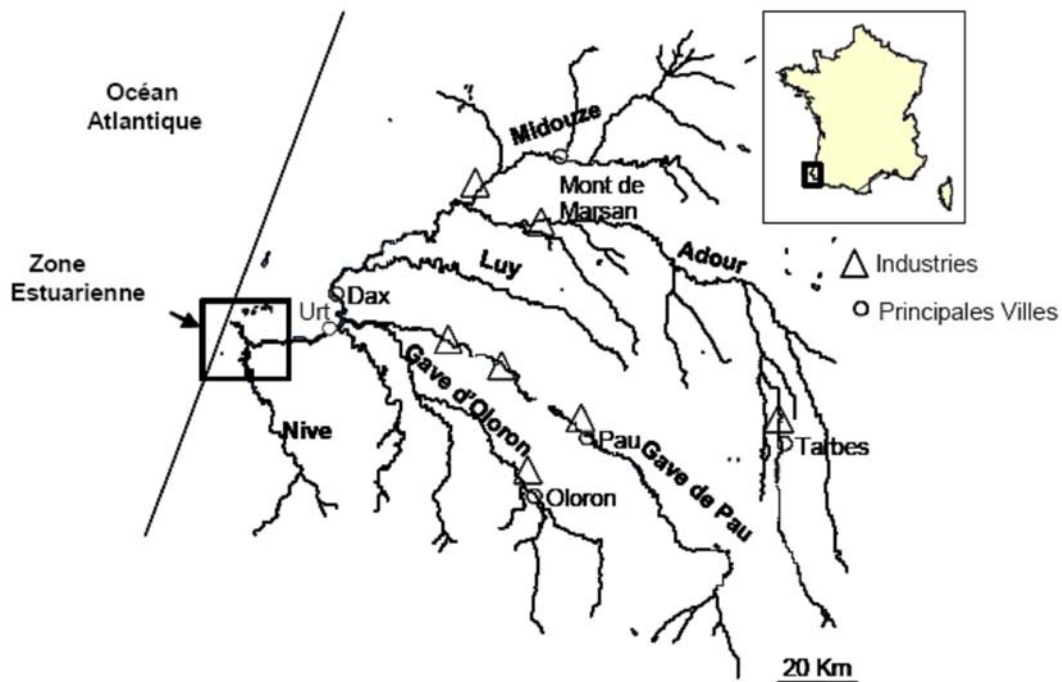


Figure 3. Carte de l'estuaire de l'Adour et de ses principaux affluents. (Point, 2004)

Le bassin de l'Adour est également caractérisé par des milieux aquatiques variés et écologiquement riches comprenant des plans d'eau, des cours d'eau, l'estuaire lui-même et des zones humides en particulier des barthes. Les barthes désignent des plaines alluviales inondables situées de chaque côté de l'Adour et de deux de ses affluents (Fig. 4). Leur superficie est de 10750 hectares répartis sur 32 communes.

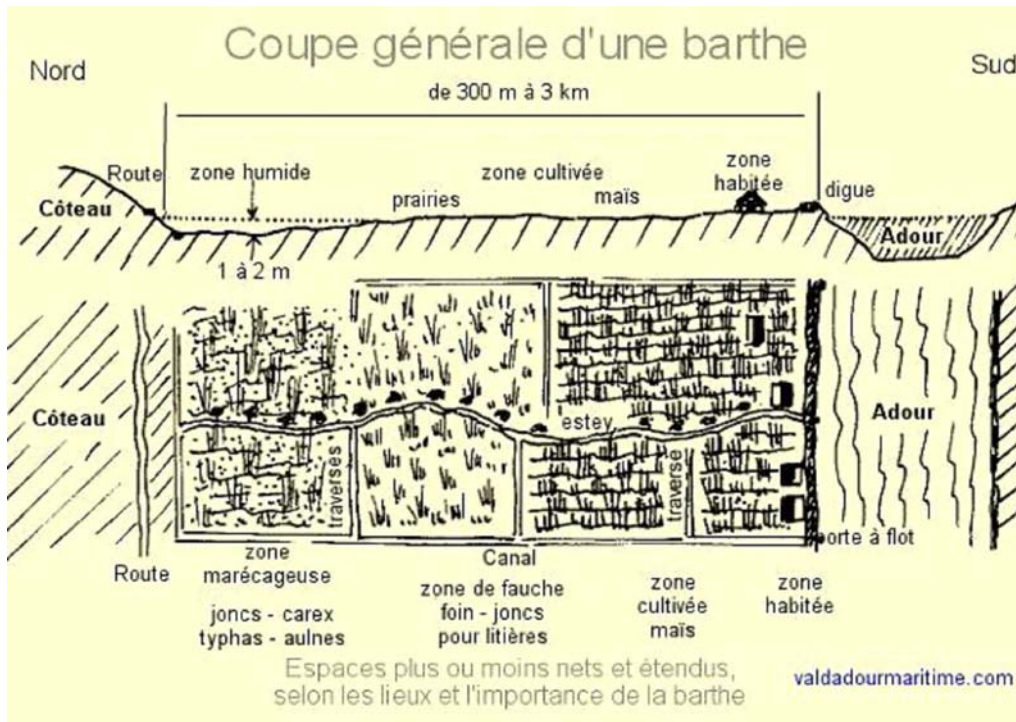


Figure 4. Coupe générale d'une barthe (val d'Adour maritime)

Depuis plusieurs décennies l'homme est intervenu sur ces zones humides, isolant en grande partie certaines de ces barthes de l'axe de l'estuaire (barthes fermées) alors que d'autres sont restées alimentées par les eaux de l'estuaire (barthes ouvertes). La majorité de cette superficie est dédiée au boisement (47%). Les prairies humides couvrent 26%, les cultures 20%, les tourbières 6%, et les canaux 1%. Du fait de leur faible pente, l'écoulement d'eau y est très faible. Ce milieu humide particulier, représente un grand intérêt écologique puisqu'il constitue un lieu de gagnage important pour différentes espèces d'oiseaux (limicoles, anatidés, cigogne blanche) et de vertébrés (vison d'Europe, cistude) (Béguinet et Regnacq, 2005). A ce titre, les barthes ont été classées en ZNIEFF (Zones Naturelles d'Intérêt Ecologique Floristique et Faunistique) et ont été proposées pour intégrer le réseau Natura 2000.

D'un point de vue piscicole, l'Adour accueille toutes les espèces de poissons migrateurs présents en France à savoir l'anguille, le saumon atlantique, la grande alose et l'alose feinte, la lamproie marine et la lamproie fluviatile. Seul l'esturgeon ne figure pas à la liste des espèces rencontrées sur le bassin.

La population du bassin est estimée à environ 940 000 habitants essentiellement repartis dans les grandes agglomérations (Pau, Tarbes, Bayonne, Orthez). En termes d'activités, le bassin est marqué principalement par l'expansion de l'industrie agro-alimentaire liée au développement de l'élevage et des pratiques culturales intensives. Il connaît également un développement des activités chimiques et parachimiques principalement au niveau du site industriel de Lacq, et une augmentation du site papetier de Tartas. Mais l'activité la plus importante dans le bassin de l'Adour reste l'industrie métallurgique et électrique.

➤ L'estuaire de l'Adour

L'estuaire de l'Adour est un estuaire urbain caractérisé en tant que pôle socioéconomique jouant un rôle important au plan régional, au travers des activités concernant particulièrement la pêche, le tourisme ainsi que les activités portuaires et industrielles. Cet estuaire est aussi le siège d'une activité biologique intense où la rencontre des eaux douces du bassin versant et des eaux salées de l'Atlantique constitue une formidable niche écologique et zone de nurserie pour les espèces piscicoles ainsi qu'une zone de reproduction pour de nombreux poissons migrateurs (salmonidés).

L'influence anthropique directe se situe au coeur de la zone de mélange (25Km) située entre l'embouchure (pK 135) et le pK 110 (Fig. 5), particulièrement dans la partie aval (district Bayonne, Anglet, Biarritz pK 135-121) avec de nombreuses activités portuaires et industrielles associées (Aciérie, Traitement de surface,..). A l'heure actuelle environ 50 % à peine des rejets domestiques sont traités par les stations d'épuration. La partie amont de la zone de mélange (pK 121-110) est principalement caractérisée par des zones de Barthes agricoles.

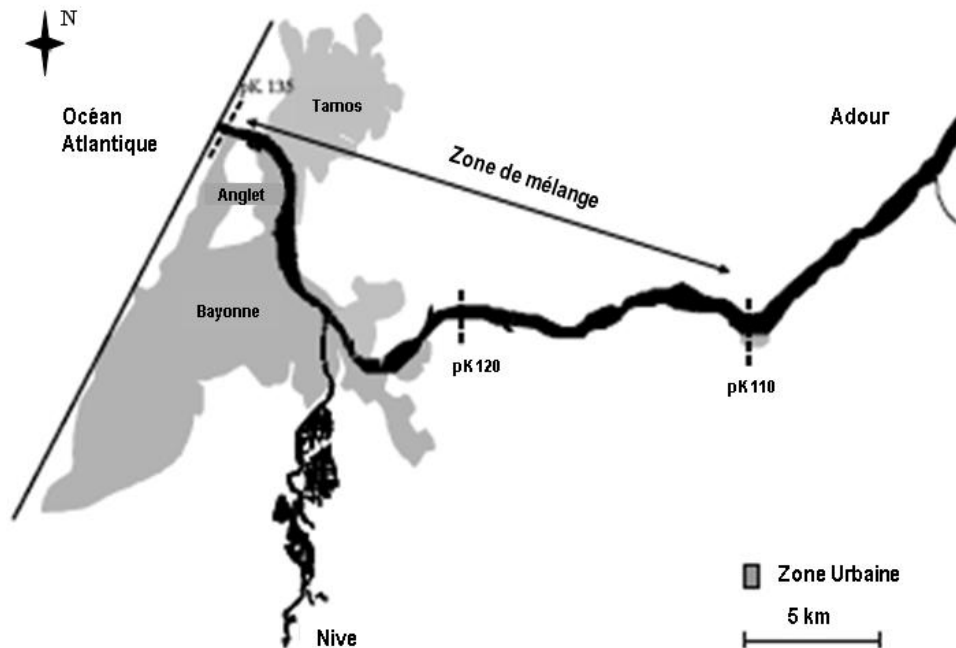


Figure 5. L'estuaire de l'Adour et sa zone urbaine. pK : point kilométrique (Point, 2004)

1.2 Etat de la pression chimique dans l'estuaire de l'Adour

Avant 2000, peu de choses étaient connues sur l'importance de la pression chimique exercée sur les eaux de l'estuaire de l'Adour. Au regard des effets néfastes pour l'environnement aquatique de certaines pollutions invisibles à l'œil nu - en particulier les pollutions chimiques -, de la faiblesse des connaissances disponibles sur l'estuaire de l'Adour et des priorités fortes qui se dégagent de l'ensemble des mesures du SDAGE Adour-Garonne (axe migrants prioritaires (axes bleus), milieux aquatiques remarquables (zones vertes), et programmes de lutte contre la pollution), un diagnostic de l'état de pression chimique a été engagé sur cet estuaire entre 2000 et 2004 (Trut et Mayeur, 2004 ; Point, 2004). Ces investigations avaient plusieurs objectifs majeurs : premièrement, l'établissement d'un état de référence de la qualité générale des eaux et des sédiments ; deuxièmement, la recherche des origines des pollutions chroniques locales et leur quantification, ainsi que celles issues du bassin versant (rivières Adour et Gaves réunis) ; et enfin, l'évaluation des contributions Amont – Aval. Compte tenu de la dynamique des contaminants chimiques inorganiques (métaux et métalloïdes) et organiques (PCB, HAP, pesticides) dans les milieux aquatiques, différents compartiments de l'environnement estuarien ont été examinés, de l'eau aux matrices solides (matières en suspension et sédiments), ainsi que les tissus d'organismes vivants (huîtres sauvages, *Crassostrea gigas* ; macrobenthos) (Trut et Mayeur, 2004 ; Point, 2004 ; Bareille *et al.*, 2005 ; Monperrus *et al.*, 2007). Ces compartiments fournissent des informations a priori différentes quant à la contamination de l'estuaire, ponctuelles dans

le cas des eaux et des matières en suspension et intégratives dans le cas des organismes vivants et des sédiments. Les organismes vivants étudiés fournissaient également des indications par rapport à la colonne d'eau (eaux saumâtres pour les huîtres) et/ou le substrat sédimentaire (macrobenthos).

1.2.1. Cas des éléments traces et des organométalliques

La contribution relative des apports du bassin versant et des rejets liés aux activités de l'estuaire aval a été évaluée entre 2000 et 2003 (Point, 2004). Les apports intra-estuariens ont été regroupés en trois catégories, les eaux traitées de Station d'Épuration (STEP), des eaux recevant potentiellement des rejets multiples d'origines industrielle et urbaine, des eaux drainant la décharge de Bacheforêt. Seuls les rejets diffus chroniques (en période sèche : sans pluie) ont été examinés. Au niveau des rejets intra-estuariens, les résultats obtenus montrent une très large gamme de concentrations en contaminants (métalliques, organométalliques), les teneurs les plus élevées étant observées dans la zone industrielle dans l'estuaire aval, suivie par les rejets de STEP. La contribution relative des trois catégories est variable suivant le contaminant considéré (Tableau 1).

Tableau 1. Gamme de concentrations d'éléments traces (U, Cu, Cd, Zn, Co, Ag, et Pb), en mercure inorganique (IHg) et méthylmercure (MMHg) et en carbone organique (OC) particulaire et dissous dans les différentes sources alimentant l'estuaire de l'Adour. STPs : effluents des stations d'épuration ; Part. : particulaire ; Dis. : Dissous (d'après Point, 2004).

Eléments	Phase	Effluents locaux			Eaux amont		
		Effluents de décharge	STPs	Effluents combinés	Estuaire amont	Nive	Adour et Gaves
OC	POC (mg.g ⁻¹)	34 - 179	66 - 556	33 - 458	44 - 78	57 - 150	36 - 89
	DOC (mg.l ⁻¹)	2.8 - 70	5.3 - 29	2 - 635	1 - 7.4	0.8 - 2.7	1.8 - 5.5
U	Part. (nmol.g ⁻¹)	70 - 130	1.26 - 122	0.168 - 58	3.78 - 28.2	2.94 - 13.4	0.25 - 15.5
	Dis. (nM)	0.8 - 5.0	0.04 - 1.26	0.25 - 4.6	2.1 - 2.5	0.4 - 1.26	1.68 - 2.52
Cu	Part. (nmol.g ⁻¹)	0.3 - 5.2	1 - 10.5	0.07 - 81	0.25 - 0.85	0.25 - 1.5	0.6 - 0.9
	Dis. (nM)	1.2 - 566	12.5 - 295	6.3 - 4327	7.8 - 11	14 - 17	9.4 - 14
Cd	Part. (nmol.g ⁻¹)	1.3 - 200	1 - 36	2.6 - 369	0.35 - 9	3 - 6	5.3 - 13
	Dis. (nM)	35 - 3214	44 - 712	35 - 8007	18 - 106	18 - 62	62 - 142
Zn	Part. (nmol.g ⁻¹)	1 - 27	0.4 - 50	0.2 - 840	1.2 - 4	2.6 - 6	5.3 - 13
	Dis. (nM)	18 - 6591	6 - 880	10 - 9000	10 - 40	9 - 26	13 - 143
Co	Part. (nmol.g ⁻¹)	0.1 - 0.4	0.01 - 5	0.01 - 3.4	0.14 - 0.37	0.2 - 0.3	0.1 - 0.42
	Dis. (nM)	2.5 - 195	3 - 29	3 - 326	1.5 - 4	0.8 - 2	1 - 5
Ag	Part. (nmol.g ⁻¹)	5 - 48	16 - 510	7 - 450	8 - 9	13 - 14	8 - 12
	Dis. (nM)	9 - 555	27 - 8330	18 - 1296	27	0 - 37	27 - 46
Pb	Part. (nmol.g ⁻¹)	0.12 - 2.00	0.074 - 3.64	0.012 - 12	0.095 - 0.932	0.057 - 0.5	0.23 - 0.63
	Dis. (nM)	0.048 - 49	0.24 - 8.7	0.043 - 12.4	0.063 - 1.8	0.18 - 2.8	0.16 - 1.7
IHg	Part. (nmol.g ⁻¹)	0 - 32	0.4 - 9	0 - 34	0 - 2.5	1 - 3.5	0.05 - 2
	Dis. (nM)	0 - 93	0 - 44	0 - 123	0 - 6.5	8 - 13	5 - 20
MMHg	Part. (nmol.g ⁻¹)	5 - 6.5	0 - 0.5	0 - 6	0	0 - 1	0 - 0.5
	Dis. (nM)	0 - 6.5	0 - 5	0 - 8	0	0 - 1.5	0 - 2

Selon Point (2004), les rejets chroniques dans l'estuaire aval contribuent en général pour moins de 10% des apports en micropolluants à l'estuaire en périodes d'étiages, à l'exception de l'argent dont la contribution peut parfois dépasser 20% et le tributylétain (TBT) dont la contribution apparaît plus variable. Par ordre d'importance, la contribution des différents micropolluants est en moyenne en période sèche de : 31% pour l'Ag, 7,5% pour le Zn, 6,5% pour le Cu, 3,7% pour le Pb, 3,6% pour le Cd, 3,3% pour le Hg, 3,2% pour les HAP, 2,9% pour le Co, 2,5% pour les PCB, 2,1% pour l'As.

Cependant, ce sont avant tout les apports du bassin versant, largement majoritaires par rapport aux rejets locaux, avec des niveaux de concentration modérés tant en solution que dans les MES, qui permettent d'expliquer le faible degré de contamination général des eaux et sédiments de l'estuaire (Point *et al.*, 2003). Sur l'ensemble du bassin, 186 établissements sont redevables à l'Agence de l'Eau au titre de pollution. Ces établissements produisent une pollution brute correspondant à 2 245 000 équivalents-habitant, pour un rejet après traitement estimé à 420 000 équivalents-habitant soit 19% des rejets produits. Le Gave de Pau transporte 22% des rejets métalliques du bassin, du fait de l'implantation des activités chimiques et pétrolières au niveau du bassin de Lacq et de l'activité aéronautique (Turboméca) en amont de l'agglomération de Pau. Le Gave d'Oloron transporte 12% des métaux rejetés dans le bassin et provenant essentiellement des industries métallurgiques du Bassin Arudy-Oloron. Enfin, la partie amont de l'Adour accueille 26% rejets métalliques provenant des activités métallurgiques et mécaniques de l'agglomération de Tarbes (Béguinet et Regnacq, 2005).

Concernant la distribution dans le cas des sédiments, les études réalisées sur les contaminants inorganiques (métaux et organo-métaux) dans l'estuaire de l'Adour ont permis de distinguer deux zones présentant des degrés de contamination distincts. Ces deux zones sont également valables pour la contamination par les composés organiques (HAPs, PCBs,...). Une première zone, constituant la majorité de la couverture sédimentaire de l'estuaire, présente des concentrations en micropolluants métalliques typiques des estuaires anthropisés à contamination modérée (Donard *et al.*, 1983 ; Robbe *et al.*, 1985). La seconde zone regroupe des zones très localisée à proximité de rejets locaux et présente des concentrations en contaminants parfois importantes témoins d'apports chargés dans la partie aval de l'estuaire (Bareille *et al.*, 2005). Si la contamination des sédiments sur l'ensemble de l'estuaire est modérée, les organoétains présentent des niveaux élevés et variables dans l'espace.

D'autre part, les résultats obtenus sur les sédiments de l'estuaire ont également montré que la contamination en éléments traces métalliques (Cd, Cu, Pb, Zn) avait une certaine stabilité dans le temps et ce quel que soit le régime hydrologique (Bareille *et al.* 2006). Cependant, dans le cas du

mercure et de ses composés, une variabilité saisonnière a pu être mise en évidence, avec une augmentation du méthylmercure lors d'un étiage prolongé à l'été 2001 conjointement à la diminution du mercure inorganique (Stoichev *et al.*, 2004) (Fig. 6). Cette saisonnalité serait associée à des processus de biotransformation du mercure inorganique en méthylmercure par des bactéries sulfato-réductrices en condition anaérobie (Stoichev *et al.*, 2004 ; Dias *et al.*, 2008).

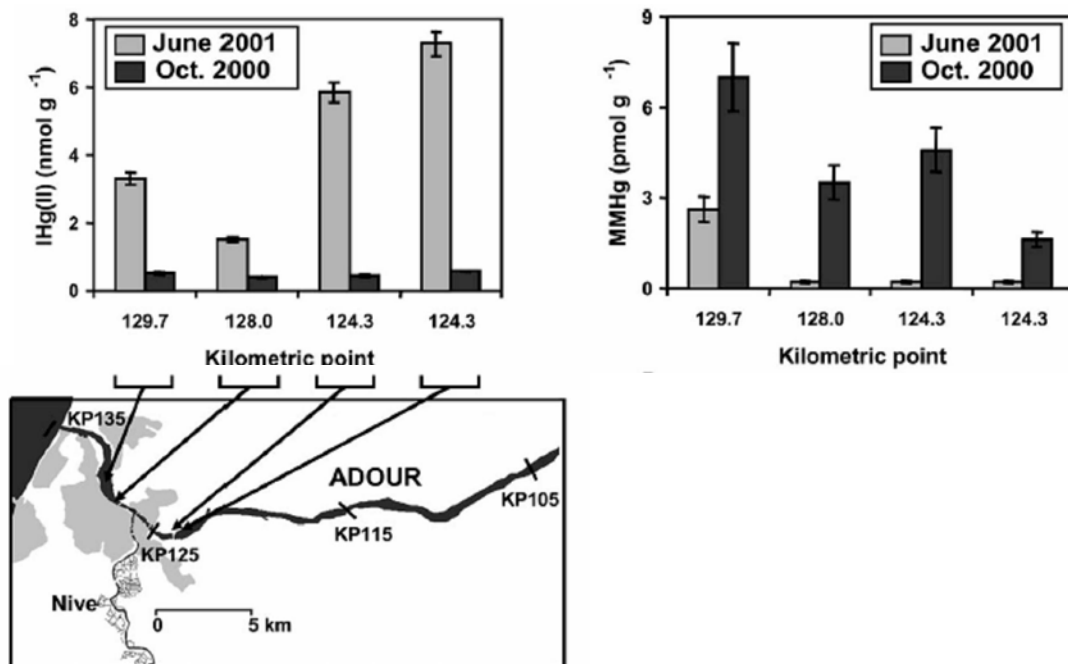


Figure 6. Variation saisonnière des concentrations en mercure inorganique et méthylmercure dans les sédiments sur 4 sites de références de l'estuaire de l'Adour (d'après Stoichev *et al.*, 2004)

En ce qui concerne les eaux et les matières en suspension, les niveaux de concentrations en métaux à l'entrée de la zone à influence saline de l'estuaire de l'Adour (Urt) sont relativement similaires (Point *et al.*, 2007) à ceux d'estuaires peu contaminés tels que la Gironde (sauf pour le Cd), le Rhône et la Loire (Yvon, 1982 ; Boutier *et al.*, 1993 ; Elbaz-Poulichet *et al.*, 1993 ; Krapiel *et al.*, 1997 ; Masson *et al.*, 2006). Les résultats obtenus dans la chair des huîtres ont permis de définir deux classes de contaminants en fonction de leur niveau de présence dans l'estuaire (fort ou modéré à faible) en comparaison à la médiane nationale évaluée par l'IFREMER dans le cadre du réseau nationale de surveillance (RNO) à partir de divers estuaires et baies françaises. La première classe comprend les composés de l'étain (TBT) et le chrome pour lesquels le niveau de pollution est préoccupant, ainsi que le cuivre et le zinc pour lesquels les niveaux sont élevés mais moins préoccupants. La deuxième classe

comprend tous les autres micropolluants (HAP, PCB, Cd, Hg, Pb, ...) pour lesquels le niveau de présence dans l'Adour est peu préoccupant. Les résultats ont également montré une relative stabilité des niveaux de pollution au cours des trois années, en accord avec les observations relevées à partir des compartiments sédiment et eaux et matières en suspension.

Comme cités précédemment, les niveaux de TBT sont préoccupants. Le TBT est un puissant biocide, extrêmement toxique, utilisé comme pesticide et dans les peintures antisalissure des bateaux à partir de 1960. Il s'agit également d'un leurre hormonal qui, à faibles doses, est capable de masculiniser des femelles de gastéropodes (Gibbs *et al.*, 1991). Malgré une restriction des usages dès 1982 en France, le TBT est encore utilisé dans les pesticides destinés à l'agriculture, mais aussi dans l'industrie du plastique et de la peinture. Du fait de sa faible solubilité et sa forte affinité pour la matière organique, le TBT est surtout associé à la phase particulaire. Le bilan effectué par Ifremer indique une contamination importante par le TBT au niveau de la partie aval de l'estuaire de l'Adour, sur des zones influencées par des sources locales provenant de Bayonne sur la rive gauche et du port de commerce de Boucau/Tarnos sur la rive droite. En termes de TBT, le bon état écologique d'une eau est défini à 1 ng.L^{-1} par le programme SEQ-Eau (source site internet du Ministère de l'Ecologie et du Développement Durable). La valeur médiane des eaux de l'estuaire atteint cependant 35 ng.L^{-1} . Seule la partie amont et la zone d'embouchure rive gauche ne sont pas concernées par cette contamination. Cependant, les valeurs observées sont inférieures aux valeurs limites d'influence à long terme sur la reproduction des poissons ($1 \text{ à } 10 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$; Alzieu, 1989).

Enfin, le dosage des contaminants métalliques et organo-métalliques dans certains organismes benthiques, regroupé par niveaux trophiques distincts (détritivore, carnivores, suspensivores), a montré un degré de contamination des maillons trophiques relativement modérée, en accord avec les observations des sédiments de l'estuaire et des huîtres (Monperrus *et al.*, 2007).

1.2.2. Les contaminants organiques

➤ Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs) :

Les émissions anthropiques de HAP sont principalement dominées par le secteur domestique suivi par le transport routier et l'industrie manufacturière. L'intérêt porté aux HAPs vient essentiellement de leur caractère cancérigène, de leur faculté à être stockés dans les graisses et leur persistance. Le bilan réalisé dans l'Adour (Trut et Mayeur, 2004) s'appuie sur l'analyse des 16 HAPs reconnus au plan international comme présentant des risques de toxicité majeurs pour l'environnement et retenus par

l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA) pour définir une valeur guide dans les produits de la mer. Selon ce bilan, les résultats obtenus sur le vivant et dans l'eau de l'estuaire pour les HAPs indiquent des contaminations modérées à faibles. Ces niveaux sont un peu plus élevés que ceux de la médiane nationale Manche-Atlantique ($204 \mu\text{g.kg}^{-1}$ ps) déterminée par le RNO (Réseau National d'Observation, Ifremer). Dans la partie basse de l'estuaire, les HAPs sont dominés par des produits de combustion comme le phénanthrène (13%), le fluoranthène (16%), le pyrène (16%) également retrouvé dans les pesticides et les plastiques, le chrysène (10%), le naphthalène (31%). En amont de l'Adour, les valeurs sont inférieures à la médiane RNO. Le phénanthrène (17%), le fluoranthène (17%) et le pyrène y sont principalement représentés (Trut et mayeur, 2004). Une pollution plus importante a été relevée uniquement sur trois effluents de trois émissaires de l'Adour situés dans le bas estuaire.

➤ Les polychlorobiphényles (PCBs) :

Les PCBs sont des composés organochlorés fabriqués de manière synthétique depuis les années 1930. Du fait de leur grande stabilité, de leur toxicité chronique et de leur persistance dans l'environnement, ils ont été progressivement interdits.

Sur les 209 congénères, caractérisés par leur nombre et la position des atomes de chlore fixés sur la molécule, 11 forment la liste des composés les plus présents dans les matrices communément étudiées (aliments, eau, sédiment, air, organismes vivants) ou les plus toxiques. Les données Ifremer résultent de l'étude de ces 11 congénères indicateurs, en particulier du CB153. Les niveaux en PCBs sont considérés comme modérés restent inférieurs à d'autres estuaires comme la Gironde (195%) ou la Seine (1500%) (Trut et Mayeur, 2004).

➤ Le DDT (dichloro-diphényl-trichloroéthane), DDD (dichloro-diphényl-dichloroéthane) et DDE (1,1-dichloro-2,2 bis (p-chlorophényl)-éthylène) :

Le DDT est un insecticide organochloré. Ses effets toxiques et sa faible biodégradabilité font interdire son utilisation en Europe et aux Etats Unis en 1972. Le DDD et le DDE sont les métabolites du DDT. Bien que les teneurs observées soient largement inférieures aux valeurs relevées dans les années 1980, l'Adour présente des valeurs supérieures à celles du RNO. Trut et Mayeur (2004) soulignent la possibilité d'intrusion de DDT résultant de relargage aux niveaux des sols anciennement traités sur les bassins versant de l'Adour et des gaves réunis.

➤ Le lindane ou gamma-hexachlorocyclohexane (γ HCH) :

Le lindane est un insecticide utilisé en agriculture et dans le traitement des bois d'œuvre depuis les années 1950. Il s'agit d'un composé neurotoxique dont l'usage est actuellement particulièrement réglementé. Il est interdit dans 50 pays et des discussions sont en cours quant à sa classification dans la liste des polluants organiques persistants. D'après le suivi réalisé sur 2001-2002 et 2003, le lindane serait peu ou pas présent dans l'estuaire de l'Adour, dans la mesure où les teneurs sont inférieures aux limites de détection.

2. L'anguille européenne (*Anguilla anguilla*, Linné)

2.1. Systématique et cycle biologique

L'anguille européenne (*Anguilla anguilla*) décrite en 1758 par Linné, appartient à la classe des poissons téléostéens, au super-ordre des Elopomorpha et fait partie des 15 espèces et sous-espèces constituant le genre *Anguilla*. Ces 15 espèces et sous espèces sont réparties en 4 groupes : indo-atlantique, océanie, pacifique tropical et indo-pacifiques selon des critères phylogénétiques (Aoyama *et al.*, 2001). L'aire de répartition de l'anguille européenne (*Anguilla anguilla*), s'étend des côtes de la Mauritanie (30°N) jusqu'à la mer de Barents (72°N) (Fig. 7).

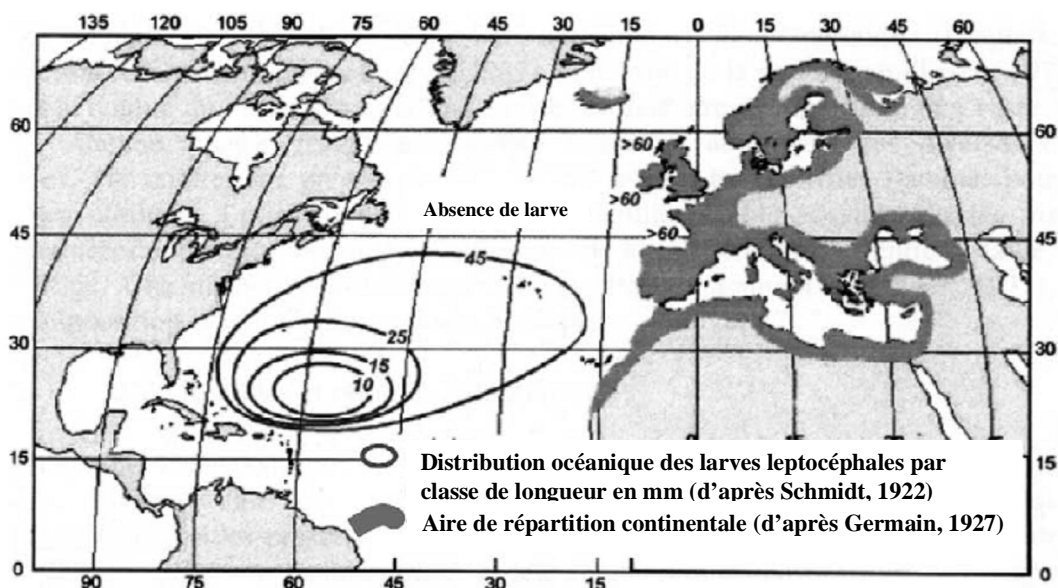


Figure 7. Distribution et aire de répartition de l'anguille européenne (d'après Feunteun, 2002)

L'anguille est un poisson amphihalín catadrome, c'est-à-dire que la croissance s'effectue en eau douce et la reproduction en mer, et thalassotoque, l'aire de reproduction se trouvant dans l'océan. Certaines parties de ce cycle sont encore mal connues à l'heure actuelle, en particulier en ce qui concerne la phase marine et la reproduction. En effet, cette dernière n'a jamais été observée en milieu naturel et aucun œuf ou adulte n'a jamais été capturé dans l'aire de frai présumé (Nilo et Fortin, 2001). L'anguille européenne est connue pour avoir la migration la plus longue des 18 espèces et sous-espèces d'anguille (6000km).

La zone de reproduction d'*Anguilla anguilla* se chevaucherait à celle d'*Anguilla rostrata* au niveau de la mer des Sargasses où les plus petites larves ont été observées (Schmidt, 1922). La localisation des aires de frai serait influencée par la convergence subtropicale (Kleckner *et al.*, 1983) au niveau d'un front de densité (McCleave, 1993). La capture des plus petites larves entre 300 et 400 mètres de profondeur (Schoth et Tesch, 1982), l'observation d'une anguille à 2000 mètres de profondeur au large des Bahamas (Robins *et al.*, 1979), la morphologie des reproducteurs (peau épaisse, pupilles dilatées, transformation rétinienne, ligne latérale marquée) et la nécessité d'avoir des pressions fortes pour déclencher l'émission des gamètes en conditions expérimentales, confortent l'hypothèse d'une reproduction à plusieurs centaines de mètres de fond dans la zone épipélagique (Kleckner *et al.*, 1983). La fécondité des femelles de l'anguille européenne est comprise entre 0,7 et 2,6 millions d'œufs pour des individus mesurant de 630 à 790mm (Boëtius et Boëtius, 1980).

Les larves, appelées leptocephales, se nourrissent de plancton (Bertin, 1951). Bien qu'elles aient la capacité de réaliser des mouvements verticaux pouvant atteindre plusieurs centaines de mètres (de 35 à 600m de profondeur ; Tesch, 1982), les larves sont transportées de manière passive par les courants océaniques. Les larves d'*Anguilla anguilla* sont ainsi transportées par le Gulf Stream jusqu'au plateau continental européen et nord-africain (Fig. 8). La durée de ce déplacement est sujette à discussion. Certains auteurs suggèrent une durée de trois ans (Tesch, 1998 ; McCleave *et al.*, 1998). En effet, les modèles physiques de transport larvaire récemment publiés indiquent que des particules inertes mettent trois ans pour être transportées par le Gulf Stream de la mer des Sargasses jusqu'aux côtes européennes (Kettle et Haines, 2006). Cependant, les études sur la microstructure des otolithes des civelles suggèrent que la migration serait accomplie en moins d'une année (Lecomte-Finiger et Yahyaoui, 1989 ; Lecomte Finiger, 1992; Desaunay et Guérault, 1997).

Lorsqu'elles arrivent au niveau du talus continental vers la fin de l'été, les larves se transforment en civelles et vont coloniser le domaine côtier et estuarien. L'arrivée des civelles est étalée dans le temps. Elles arriveraient dans les estuaires du Golfe de Gascogne à la mi-octobre, en Bretagne en janvier, et en Manche en février (de Casamajor *et al.* 2001 ; Quéro et Vayne, 2005).

A ce stade, les civelles sont transparentes, ne s'alimentent pas et leur capacité de nage est réduite. La pigmentation se met en place au fur et à mesure du stade V_A (peu pigmentée, Elie *et al.*, 1982) au stade VI_B (totalement pigmentée) marquant la fin du stade civelle. La reprise de l'alimentation revient au stade VI_{A2}. Au stade VII correspondant à l'apparition de pigment jaune, les individus sont appelés « anguillettes » et présentent un comportement de plus en plus benthique. La migration des civelles vers l'amont des systèmes fluviaux s'effectue passivement derrière l'avancée du front de marée dynamique avec une position des flux de civelles dans la colonne d'eau dépendant de l'intensité de la lumière (De Casamajor *et al.*, 1999). Cette migration a été particulièrement bien décrite dans l'Adour (Prouzet, 2003). Sur l'Adour, la remontée s'effectue par vagues sur une période d'octobre à mars.

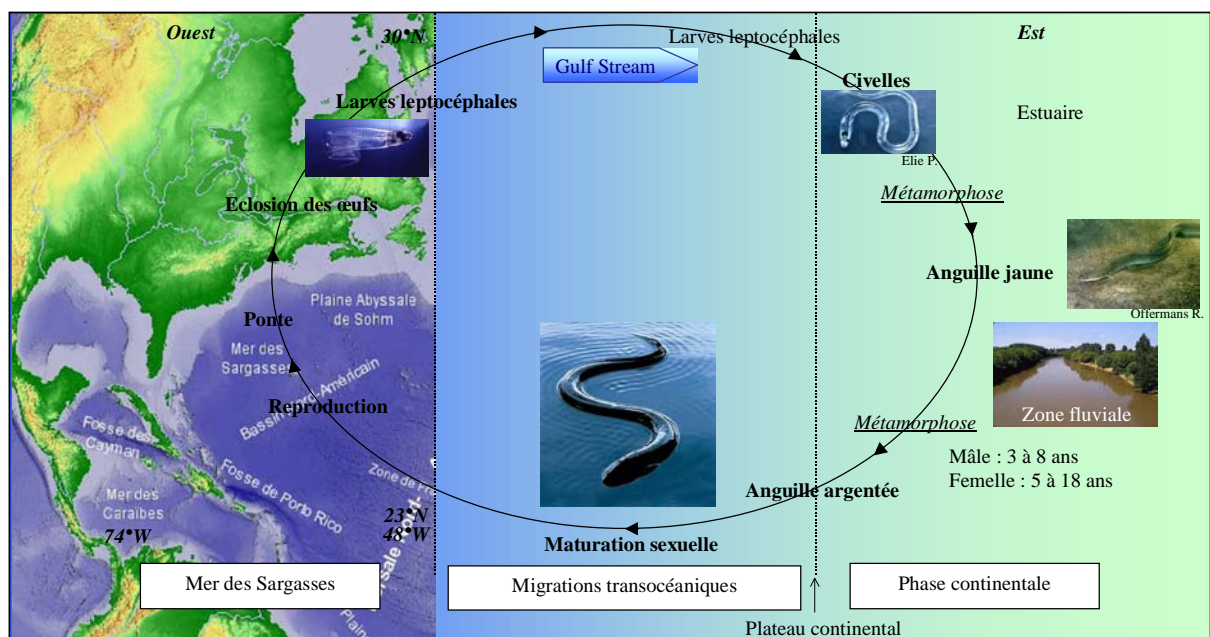


Figure 8. Cycle de vie de l'anguille européenne (*Anguilla anguilla*) (d'après Schmidt, 1922 ; Kleckner and McCleave, 1985).

La fin de la migration portée marque le passage du comportement pélagique et passif chez la civelle au comportement de plus en plus actif et autonome chez l'anguillette et l'anguille jaune. Le comportement de colonisation des différents habitats (habitats amont dulçaquicoles, estuariens, côtiers) s'est révélé complexe et résulte en une mosaïque de comportements décrits dans le paragraphe suivant 2.2.

Les anguilles ayant colonisé les différents habitats se nourrissent alors sur une large gamme de proie allant des insectes jusqu'aux poissons en passant par les crustacés (Bergersen et Klemetsen, 1988 ; Costa *et al.*, 1992). Elles ne s'alimentent que la nuit et en dehors des saisons froides pendant lesquelles elles s'enfouissent dans le sédiment. Pendant le stade anguille jaune, l'ovogénèse et la spermatogénèse se déroulent parallèlement dans la gonade, la première débute vers 14 cm et l'autre vers 18cm. Cette étape hermaphrodite précède une phase de masculinisation et féminisation définitive (Bertin, 1951).

Une période de croissance, de 3 à 8 ans pour les mâles et de 8 à 15 ans pour les femelles (Feunteun, 2002) permet aux anguilles de constituer des réserves énergétiques sous forme de triglycérides stockés principalement dans les muscles (Boëtius et Boëtius, 1985). Ces réserves lipidiques ont un rôle majeur dans la phase migratoire de dévalaison puisqu'elles doivent être suffisantes pour couvrir les dépenses énergétiques de la migration transocéanique de 6000km et de la reproduction (van Ginneken et van den Thillart, 2000 ; van Ginneken, 2005). La phase de croissance aboutit à une seconde métamorphose. Les anguilles deviennent argentées (Tesch, 1977) et subissent de profondes modifications physiologiques (Fontaine, 1994 ; van Ginneken *et al.*, 2007) comme la pigmentation de la ligne latérale, le développement des organes sensoriels tels que la rétine (Schmidt, 1906), les modifications de la paroi de la vessie gazeuse ou encore l'épaississement du mucus et de la peau. Ces modifications permettraient aux anguilles d'effectuer leur migration en profondeur de sorte qu'elles pourraient utiliser les contre-courants profonds du Gulf Stream pour atteindre les zones de frai (Tucker, 1959). Par ailleurs, parallèlement aux transformations physiologiques que subissent les anguilles, une période de jeûne se met en place et succède à la période d'accumulation de graisses pendant la phase sédentaire (Fricke et Kaese, 1995). La dévalaison s'effectue tout au long de l'année avec une intensité variant de l'été au printemps et dépendant des latitudes et des obstacles à la dévalaison (Feunteun *et al.*, 2000). Dans la zone centrale de l'aire de répartition (Golfe de Gascogne), la dévalaison a lieu en général en automne-hiver (Langon et Dartiguelongue, 1997 ; Gosset *et al.*, 2000). Le déclenchement de cette migration serait sous influence de différents facteurs environnementaux (température, débit, pressions atmosphériques, rythmes lunaires...) (Gosset *et al.*, 2000 ; Durif, 2003). La pression subie par les anguilles dans les grandes profondeurs durant leur migration transocéanique de retour vers la mer des Sargasses déclencherait la maturation sexuelle (Fontaine, 1994). Enfin, une zone d'ombre subsiste sur la fin de la migration transocéanique et sur la zone de reproduction du fait également des grandes profondeurs.

2.2. Utilisation des habitats : une espèce migratrice sur de longues et courtes distances

Comme exposé précédemment, du fait de la séparation des sites de reproduction et de croissance par des milliers de kilomètres, l'anguille européenne, au même titre que les autres espèces, est considérée comme une grande migratrice. Cependant, si les deux migrations transocéaniques sont bien documentées et approuvées, l'étude des migrations à plus petite échelle et de l'utilisation des différents habitats au sein de l'aire de croissance continentale est beaucoup plus récente.

Les anguilles sont décrites comme étant des poissons ubiquistes et opportunistes. En France, l'anguille européenne est une des espèces piscicoles qui occupent la plus grande diversité d'habitats (Laffaille *et al.*, 2003 et 2004). Les anguilles sont capables de coloniser tous types d'habitats aquatiques accessibles, des environnements côtiers aux habitats en amont des fleuves (Moriarty and Dekker, 1997 ; Feunteun *et al.*, 1999 ; Baisez *et al.*, 2000). Elles représentaient par ailleurs jusqu'à très récemment, jusqu'à 50% de la biomasse piscicole dans la majorité des environnements aquatiques européens (Moriarty et Dekker, 1997 ; Feunteun *et al.*, 1999).

Cette colonisation des différents habitats d'un bassin versant serait due au comportement des civelles. Celles-ci seraient attirées vers l'entrée des estuaires et des environnements aquatiques liés à la mer par l'odeur « terrigène » des eaux estuariennes (Tesch, 2003). En France, Bertin (1951) a suggéré que la diffusion vers l'amont des anguillettes se fasse à partir d'une zone d'accumulation des anguilles en estuaire. A l'heure actuelle, le phénomène de colonisation de toutes les niches écologiques d'un bassin versant à l'échelle de la population reste encore flou. Selon Edeline *et al.* (2004), un stress ou une mauvaise condition physiologique pourraient conduire les civelles à stopper leur migration et à s'établir en aval.

Si les anguilles étaient considérées comme strictement catadromes, depuis quelques années cette catadromie stricte est remise en cause. En effet, l'étude de la microchimie et des microstructures (marques d'arrêt de croissance) de l'otolithe a permis d'illustrer récemment la possibilité des anguilles de réaliser tout leur cycle de croissance sans ou avec un court passage en eau douce (Mounaix et Fontenelle, 1994 ; Tsukamoto *et al.*, 1998 ; Tzeng *et al.*, 2000 ; Daverat *et al.*, 2005 ; Daverat et Tomas, 2006). Ces résultats ont été également confortés par les données de pêche et des suivis de marquage montrant des niveaux de capture d'anguilles jaunes plus importants dans les lagunes, baies et les estuaires que dans d'autres milieux d'eau douce (Moriarty, 1996 ; Morrisson et Secor, 1994).

En réalité, la colonisation et l'utilisation des habitats par l'anguille résultent d'une mosaïque de comportements. Cette mosaïque est de mieux en mieux décrite grâce aux observations de terrain mais aussi par le biais de la microchimie de l'otolithe. Feunteun *et al.* (2003) décrit ainsi 4 catégories de comportements migratoires des anguilles. Les deux premiers concernent principalement des stades anguillettes, c'est à dire de jeunes anguilles pigmentées. Il s'agit dans un premier temps d'un comportement dit de « pionnier » désignant des anguilles colonisant les zones fluviales amont quelles que soient les caractéristiques de la population et les conditions environnementales. Ces anguilles stoppent leur migration au niveau d'obstructions physiques (barrage, sécheresse, inondations, températures extrêmes) ou lorsqu'elles arrivent en tête de bassin. La seconde catégorie dite des « fondateurs » regroupent des anguilles migrant vers l'amont jusqu'à trouver un habitat libre, c'est à dire à faible densité d'anguilles, et favorable. Ce comportement est supposé densité-dépendant.

Deux autres comportements sont ensuite observés chez des anguilles plus âgées : le comportement dit « sédentaire » et le comportement dit « nomade ». Le premier comportement a été illustré par de nombreuses études sur différentes espèces. Il désigne des individus présents dans un habitat donné et n'effectuant que des mouvements de faibles amplitudes. Ainsi, dans le Frémur en Bretagne, 95% des individus marqués ont été recapturés à moins de 100m de leur site de capture initial (Guillouët *et al.*, 2000). Cette résidence existe aussi bien pour des habitats dulçaquicoles que des habitats saumâtres ou côtiers. Elle a notamment été largement confortée par la microchimie de l'otolithe, aussi bien chez les anguilles européennes (Daverat *et al.*, 2005 ; Tzeng *et al.*, 1997 ; Tsukamoto *et al.*, 1998 ; Limburg *et al.*, 2003), que chez les anguilles japonaises (Tsukamoto et Arai, 2001 ; Tzeng *et al.*, 2002 ; Arai *et al.*, 2003 ; Kotake *et al.*, 2003) et américaines (Jessop *et al.*, 2002 ; Morrisson *et al.*, 2003 ; Cairns *et al.*, 2004).

Le comportement nomade semble plus complexe. Il regroupe des anguilles ne s'étant pas installées sur un site spécifique et pouvant effectuer des mouvements sur des distances plus importantes. Ce comportement est illustré par certaines expériences sur le comportement de résidence et dans lesquelles des anguilles ont été recapturées loin du site de capture et de marquage initial tandis que d'autres n'ont pas été retrouvées (Morrisson et Secor, 2003).

La microchimie de l'otolithe apporte plus de précision quant à la diversité de ces mouvements et l'âge auquel ils sont réalisés. Ainsi chez l'anguille européenne, les résultats de Tzeng *et al.* (2000) et Limburg *et al.* (2003) ont suggéré la capacité de certains individus à terminer leur croissance en mer Baltique après avoir effectué un séjour de quelques années en eau douce.

De manière plus approfondie, les études de Tsukamoto et Arai (2001) sur l'anguille japonaise et de Daverat *et al.* (2006) sur l'anguille européenne dans la Gironde suggèrent l'existence de six comportements migratoires possibles (Fig. 9) : un comportement de résidence dans les trois environnements de salinité distincte (eau douce, saumâtre et marine), un comportement pour lequel un seul changement d'habitat est observé, de l'eau douce à une eau plus salée ou inversement, et enfin un comportement pour lequel des changements erratiques ou saisonniers sont observés tout au long de la vie de l'individu.

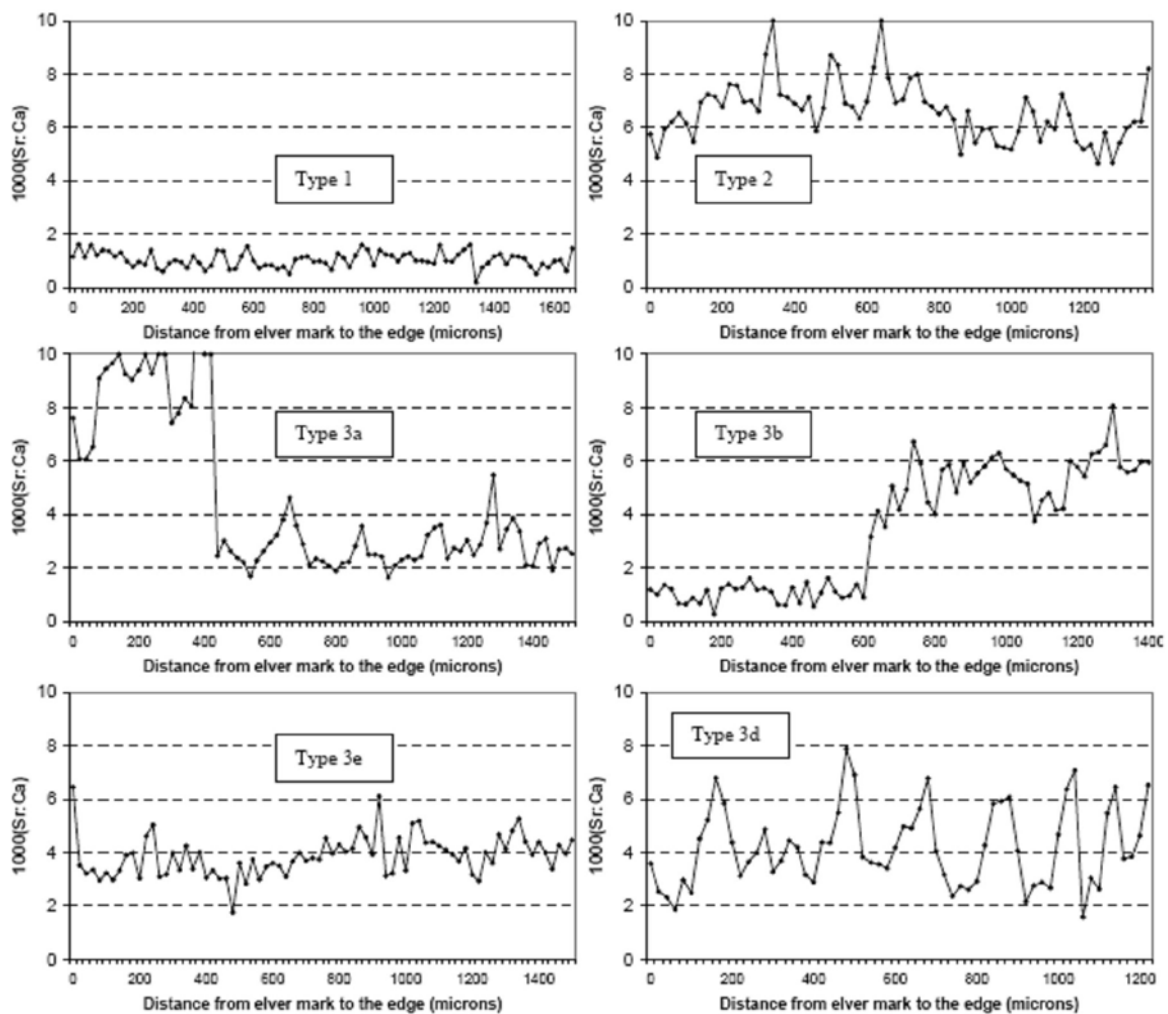


Figure 9. Variations du Sr:Ca le long de transects partant du premier annulus jusqu'au bord de l'otolithe d'anguilles européennes représentatives de 6 schémas différents d'utilisation des habitats dans la Gironde, Sud Ouest France. Type 1 : Résidence en eau douce ; Type 2 : Résidence en environnement côtier ; Type 3e : Résidence en estuaire ; Type a-d : mouvements nomades ; 3a : Résidence en compartiment marin, mouvement vers l'estuaire ; 3b : Résidence en eau douce, mouvement vers l'estuaire ; 3d : Mouvements saisonniers entre la partie haute et la partie basse de l'estuaire (Daverat *et al.*, 2006).

Différentes hypothèses sont émises quant à l'origine de ces comportements. Il pourrait s'agir de comportements intrinsèques, ils pourraient être dus à des changements d'habitats liés à la taille des individus, ou encore être induits par les conditions environnementales (température, étiages, crues, marée, perturbations anthropiques) (Feunteun *et al.*, 2003). Toutefois si l'origine précise de ces comportements est encore mal définie, cette mosaïque permet aux anguilles de coloniser l'ensemble du système fluvial.

2.3. Une espèce en déclin : état des stocks et causes du déclin

Espèce considérée comme nuisible en France il y a 25 ans, l'anguille européenne, comme les autres espèces d'anguille tempérées de l'hémisphère Nord, connaît un déclin significatif sur l'ensemble de son aire de répartition (Fig. 10) depuis les années 1970.

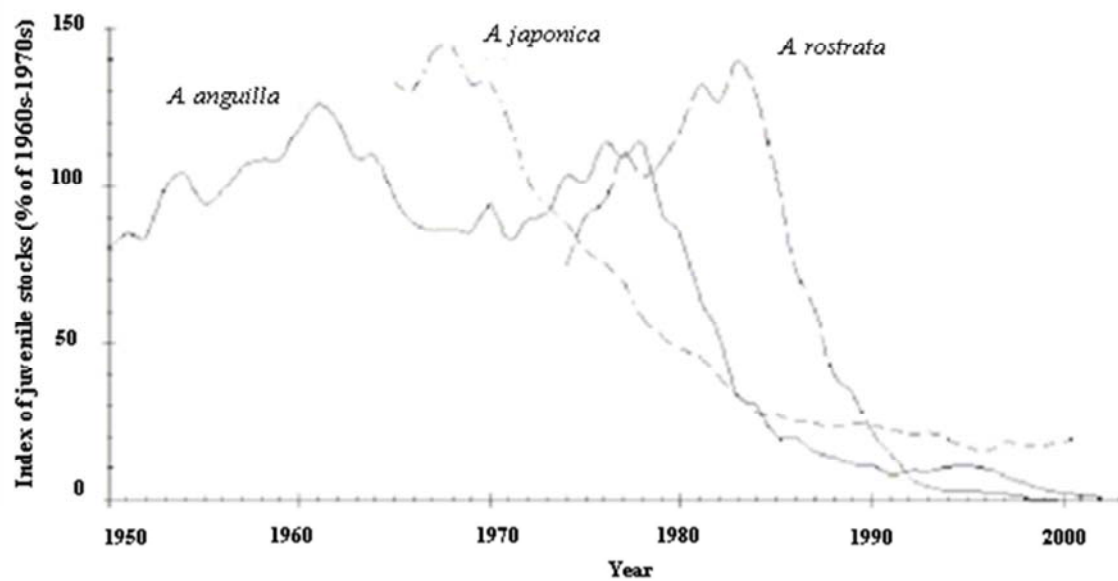


Figure 10. Diminution des indices de recrutement pour les trois espèces d'anguilles tempérées de l'hémisphère Nord : l'anguille européenne (*A. anguilla*), l'anguille américaine (*A. rostrata*) et l'anguille japonaise (*A. japonica*) (Dekker, 2004)

Le recrutement en civelles aurait diminué d'un facteur 10 en une dizaine d'années (Castelnaud *et al.*, 1994 ; Moriarty et Dekker, 1997). Les statistiques des pêches maritimes françaises déclaraient une moyenne des captures annuelles de 1800 à 2800 tonnes entre 1974 et 1979, et de seulement 380 tonnes en 1994 (Quéro et Vayne, 2005).

Selon le CIEM (Comité International pour l'Exploitation de la Mer) et la FAO (Food and Agriculture Organisation), le stock d'anguille est en dehors de ses limites biologiques, de sorte que les pêcheries ne peuvent plus maintenir leur production dans la plupart des bassins versants concernés (ICES, 1998).

Un facteur à lui seul ne peut expliquer la diminution des stocks observée. Ce déclin peut être attribué à deux influences majeures : l'influence des variations naturelles des conditions environnementales et l'impact des activités anthropiques à la côte et au niveau des systèmes fluviaux.

2.3.1 Causes naturelles

Le recrutement des anguilles à la côte dépend essentiellement de la capacité de reproduction en mer des adultes et de la survie des larves pendant la migration de la mer des Sargasses aux côtes européennes et africaines. Les modifications du climat, en particulier les variations des pressions atmosphériques, joueraient un rôle majeur sur la survie des larves. En effet, dans la mesure où elles induiraient une modification des courants, par exemple une déviation du Gulf Stream, la période de migration se trouverait allongée entraînant la mort des larves avant qu'elles n'aient atteint les sites de colonisation (Castonguay *et al.*, 1994). Dekker (1998) suggère également un rôle à long terme de la diminution de la productivité océanique sur la réduction de la taille des civelles recrutées dans les eaux continentales.

2.3.2 Causes anthropiques

Au niveau du continent, les principaux problèmes sont dus à la perte ou à la dégradation de l'habitat en termes de qualité et de capacité d'accueil. En effet, les systèmes fluviaux sont de plus en plus anthropisés. Les barrages hydroélectriques constituent une barrière infranchissable pour la migration des anguilles jaunes, qui se retrouvent bloquées en aval, et la dévalaison des anguilles argentées se trouvant à l'amont du système (Moriarty et Dekker, 1997). Par ailleurs, l'installation des turbines hydroélectriques conduirait à une augmentation significative de la mortalité (Larinier et Dartiguelongue, 1989 ; Winter *et al.*, 2006). Un autre facteur est la diminution des zones humides par la pratique croissante de l'assèchement, des dragages et des drainages pour les activités agricoles, industrielles et urbaines. Selon Moriarty et Dekker (1997), la perte des zones humides aurait conduit à la diminution de 50% des habitats exploitables par les anguilles en Europe.

La perte de ces habitats s'accompagne également d'une perte de qualité de l'environnement encore disponible. La réduction et l'assèchement se combinent en effet avec une intensification de l'utilisation de contaminants notamment les pesticides. Par ailleurs, les anguilles de par leur quantité de graisse (Tesch, 1977), leur place dans le réseau trophique, l'importance de leur respiration cutanée, leur vie benthique et la durée de leur cycle vital, sont particulièrement exposées à ces contaminants et représentent de bons bioaccumulateurs (Amiard-Triquet *et al.*, 1987 ; Linde *et al.*, 1996). Les effets des polluants sur la qualité et la mortalité des anguilles ont été largement étudiés du fait de leur sensibilité particulière (Bruslé, 1994 ; Robinet et Feunteun, 2002). D'après Knights (1997), les concentrations des xénobiotiques observées dans l'environnement sont souvent inférieures aux seuils de toxicité létale pour les anguilles. Cependant, l'impact de concentrations sub-létales sur la physiologie des anguilles a été montré. En effet, chez les poissons, des concentrations sub-létales de métaux lourds, de composés organochlorés et de pesticides peuvent provoquer des troubles au niveau des cycles hormonaux et de ce fait diminuer le succès reproducteur (Kime, 1995). Fontaine *et al.* (1985), ont montré que des concentrations sub-létales de métaux lourds pouvaient modifier la production de phéromones des civelles. Cette atteinte pourrait provoquer des problèmes de recrutement. Chez les anguilles jaunes, des altérations, des mortalités de cellules sanguines de la rate et une diminution de l'immunité cellulaire ont été observées suite à une exposition aux effluents contaminés du Rhin (Spazier *et al.*, 1992). L'exposition aux métaux traces, notamment au cadmium et au mercure, provoquent des lésions aux niveaux branchial, hépatique, et tégumentaire, ayant pour conséquences des troubles de la respiration et de l'osmorégulation. Les contaminants organiques (pesticides, HAPs, ...) ont également des effets délétères sur les anguilles. Des perturbations structurales des branchies et de la peau ont, par exemple, été montrées chez des anguilles jaunes suite à une exposition au lindane en Camargue (Schachter *et al.*, 1969). Les branchies sont également altérées par ces composés en particulier les hydrocarbures. Un des effets préoccupants est également l'atteinte des organes de reproduction (dégénérescence des follicules ovariens, nécrose d'oocytes) et la diminution des réserves glycogéniques pouvant donc réduire le succès reproducteur des anguilles exposées (Bruslé, 1994). Par ailleurs, les polluants accumulés dans les lipides des individus peuvent être remobilisés au cours de la migration, être redirigés vers les ovaires au moment de la reproduction et ainsi diminuer non seulement le succès reproducteur mais aussi la survie des futures larves.

Un autre facteur soupçonné d'accentuer la diminution des stocks d'anguille européenne est la prolifération, depuis 1983, d'un parasite importé d'Asie : *Anguillicola crassus*. Ce parasite se place au niveau de la vessie nataoire des anguilles et affecterait leur capacité de nage et donc leur migration océanique vers les zones de ponte (Feunteun, 2002 ; Gollock *et al.*, 2004).

Enfin, en termes de pêche, tous les stades de développement de l'anguille (civelle, anguille jaune, anguille argentée) sont exploités (Dekker, 2003). Cependant, l'analyse historique de l'abondance de l'espèce suggère que la pêche n'est pas le facteur déclenchant mais plutôt un facteur ayant amplifié le déclin des stocks (Prouzet, 2003). L'intensité de l'activité de pêche est très variable en fonction des bassins et pour toutes les écophases. Les taux d'exploitation réalisés sur les taux de civelles vont de 0% (en Europe du Nord ou en Méditerranée où la pêche des civelles est interdite) à plus de 90% à l'aval des barrages d'estuaire empêchant toute migration (Anonyme, 2002). Les études menées sur certains systèmes français comme l'Adour ou encore la Loire ont montré que ce taux d'exploitation pouvait ne pas dépasser 30% (Bouvet *et al.*, 2006) soit une portion modérée des flux de civelle estimés (Prouzet *et al.*, 2008).

Sur le bassin de l'Adour, l'exploitation de l'anguille jaune est très peu développée et l'anguille argentée est peu ou pas exploitée. Ainsi, l'impact de la pêcherie y serait modéré (MEDD, 2005). Au contraire, sur la façade méditerranéenne les anguilles jaunes et argentées sont exploitées (Farrugio *et al.*, 2006). En France, l'exploitation de l'espèce, quel que soit le stade, a tendance à diminuer de façon importante du fait de la raréfaction de la ressource et de la faible attractivité du métier de pêcheur professionnel vis-à-vis des jeunes.

2.4. Intérêt de gestion et de restauration

L'anguille européenne, présente dans des habitats nombreux et divers, est une composante majeure de nombreux hydrosystèmes fluviaux et estuariens. Par ailleurs, de par ses caractéristiques précédemment citées (prédateur, grande quantité de graisse, vie longue, vie benthique, sensibilité aux pollutions diffuses), et plus particulièrement son caractère amphihaline, sa présence constitue un bon indicateur non seulement de l'accessibilité des habitats mais également de leur qualité physico-chimique (Feunteun, 2002 ; Robinet et Feunteun, 2002). En terme écologique, l'anguille participe également de façon significative au réseau trophique des hydrosystèmes continentaux en tant que proie de mammifères comme la loutre (Tesch, 1985) ou encore des oiseaux tels que les ardéidés (Feunteun et Marion, 1994). Elle participe également aux flux de matière (Laffaille *et al.*, 2000). Les programmes de restauration engagés seraient donc profitables non seulement à l'anguille, mais également à toutes les autres espèces qui y sont liées (Feunteun, 2002).

D'un point de vue humain, sur l'ensemble de son aire de répartition européenne, la pêche d'*Anguilla anguilla* concerne 25000 personnes. En Europe, la production globale annuelle est estimée à environ 20 000t (Dekker, 2000). En France, 2 millions de pêcheurs amateurs se focalisent sur l'anguille, également principale ressource de 776 pêcheurs professionnels (Changeux, 2002). Le programme PECOSUDE a révélé que les pêcheries côtières de civelles représentaient d'un point de vue économique 97% de la production des marins pêcheurs en zones estuariennes et 62% de celle des pêcheurs fluviaux (Léauté et Caill-Milly, 2003). En 2000, la pêche à la civelle représentait 80% du chiffre d'affaire pour la pêche professionnelle au niveau de l'Adour (Prouzet, 2002). Son importance économique est donc de taille et se traduit par un impact social très fort qui s'exerce dans le cadre des petites pêches côtières, estuariennes et continentales. Ces activités de pêche ont par ailleurs un effet structurant très important sur les économies régionales (données PECOSUDE). D'autre part, la pêche à l'anguille est également synonyme d'entretien d'habitats à forte valeur patrimoniale, notamment de nombreuses zones humides comme, par exemple, les marais de Brière, de Bourgneuf et le marais Poitevin (Masse et Rigaud, 1998 ; Baisez *et al.*, 2000 ; Cucherousset *et al.*, 2007). L'intérêt socio-économique de la gestion des populations des anguilles est donc réel.

Ainsi, des mesures de reconstitution des stocks de l'anguille européenne ont été promulguées dans le règlement (CE) n°1100/2007 du conseil du 18/09/07 publié dans le Journal Officiel de l'Union Européenne (22/09/07). En juin 2007, l'anguille européenne est classée à l'annexe II de la CITES (convention sur le commerce international des espèces de faune et de flore sauvage menacées d'extinction) traitant des espèces « ne présentant pas nécessairement un risque d'extinction, mais pour lesquelles le commerce doit être contrôlé pour éviter des utilisations incompatibles avec leur survie ». Pour finir, le CIEM recommande que toute exploitation et tous les autres impacts anthropiques sur la production et l'échappement d'anguille soient réduits au niveau le plus bas possible, jusqu'à ce qu'il y ait des signes clairs de reconstitution.

3. Evaluation de la pression chimique s'exerçant sur les organismes

3.1. Origine des polluants et notion d'échelle d'intégration

L'expansion des activités anthropiques a conduit à une contamination par des mélanges parfois complexes de polluants inorganiques et organiques de l'ensemble des écosystèmes aquatiques. Les éléments traces proviennent d'une large gamme de sources anthropiques (industrielles, urbaines, portuaires, agricoles) et naturelles (volcanisme, lessivage des sols, diffusion, upwelling). Ils sont introduits dans l'environnement par voie atmosphérique, par rejets directs dans le milieu d'effluents traités ou non et par lessivages des sols agricoles et urbains. Les pesticides organochlorés, dont le DDT (dichloro-diéthyl-trichloroéthane) et la dieldrine, ont été largement introduits dans l'agriculture dans les années 1950 (Maguire *et al.*, 2001). De même, la grande stabilité chimique et la résistance électrique des PCBs (polychloro-biphényles) ont amené à leur large utilisation dans les applications industrielles mais également à leur grande persistance dans l'environnement (Tanabe, 1988). Les transports par l'eau et l'atmosphère contribuent à la distribution de ces éléments sur l'ensemble du globe et les écosystèmes aquatiques jouent le rôle de réceptacles de ces différents apports (Fig. 11). Ils sont aujourd'hui intégrés dans le cycle hydrologique et atmosphérique de l'eau et participent aux cycles de la matière des continents aux océans.

Ces contaminations, de par leur persistance et leur toxicité potentielle, représentent un risque pour les biocénoses et la préservation des ressources. C'est à ce titre que la Directive Cadre Eau (2000/60/CE) du 23/10/2000 a fait de la protection des milieux aquatiques naturels une de ses priorités, avec pour objectif un retour à un « bon état écologique » pour les eaux de surface avant 2015.

En effet, une fois dans l'environnement, les éléments traces, du fait de leur non biodégradabilité, vont pouvoir être bioconcentrés dans les organismes par le biais des processus métaboliques et de biosorption (Hodson, 1988 ; Wicklund-Glynn, 1991), et ce en fonction de la forme physico-chimique des éléments. De même, le caractère lipophile et persistant des contaminants organiques et organométalliques (Hg, Sn) facilite leur bioaccumulation chez les organismes. Accumulés à des concentrations toxiques les contaminants vont pouvoir occasionner des dommages physiologiques sur les organismes puis à un niveau supérieur des perturbations écologiques.

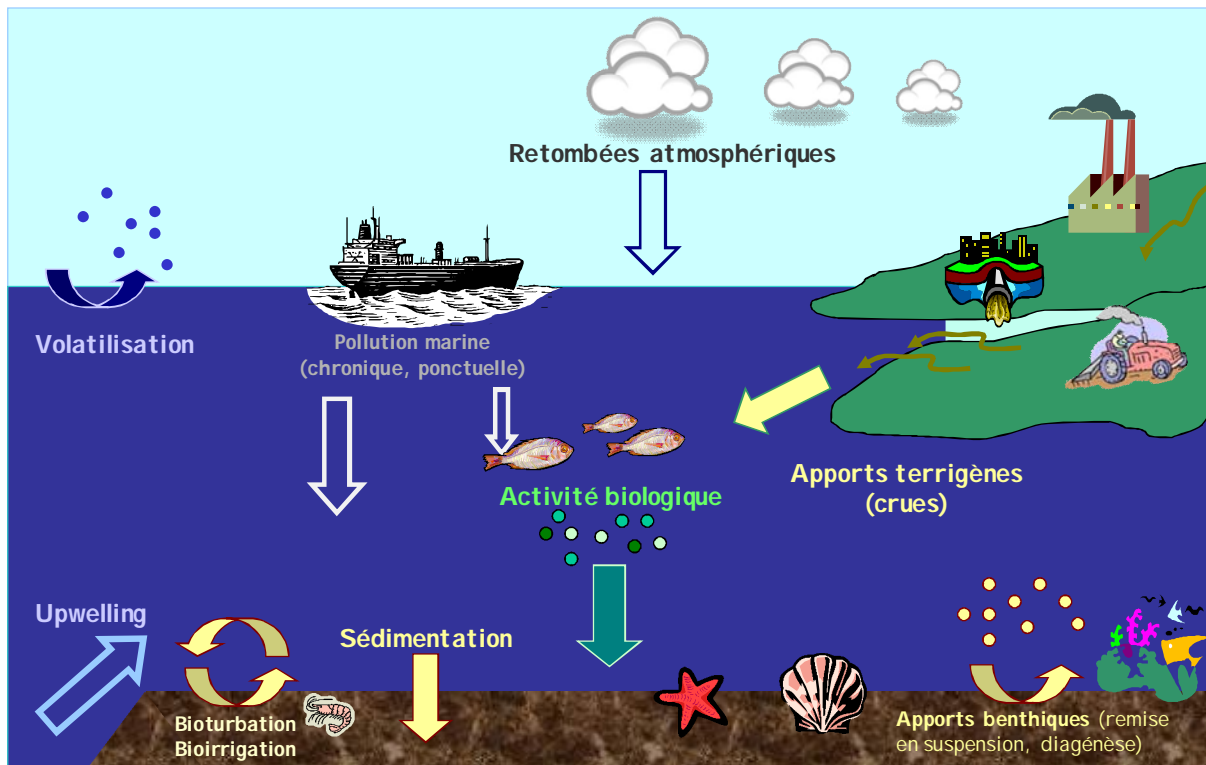


Figure 11. Sources et transports des contaminants inorganiques et organiques dans les environnements aquatiques.

Cependant, il convient de faire la distinction entre deux types de pollution : les pollutions ponctuelles résultant d'un accident dans le temps et aboutissant à l'introduction de fortes quantités de polluants dans le milieu de vie de l'organisme, et les pollutions chroniques désignant l'introduction de faibles quantités de polluants sur une longue période. A cette notion d'introduction différentielle dans l'environnement dans le temps viennent s'ajouter les notions de toxicité aiguë et chronique. Ces notions reposent sur la mise en place de tests expérimentaux rendant compte de la relation existant entre la dose (ou concentration) d'un toxique et une réponse biologique (Forbes *et al.*, 1997). Dans les essais de toxicité aquatique, une réponse de l'organisme ou d'un groupe d'organismes observée dans les 96h suivant l'exposition au contaminant est considérée comme aiguë. La réponse la plus fréquemment observée est la mortalité (Forbes *et al.*, 1997).

La toxicité chronique présente des effets qui apparaissent après une exposition prolongée à une substance (pollution chronique) mais qui restent non détectables sur une courte échelle de temps. Le seuil de toxicité aiguë est toujours supérieur au seuil de toxicité chronique. La toxicité associée à une exposition chronique à des substances en concentrations subléthales est donc plus difficile à observer en apparence car les effets sur les populations ne se déclarent qu'après plusieurs mois voire

plusieurs années d'exposition (Wicklund *et al.*, 1990). Détecter ces effets sur les individus, afin d'agir avant que les dommages ne s'expriment de façon délétère sur la population est un enjeu de taille.

Les différents compartiments physiques des poissons (tissus mous, tissus durs, sang, bile...) sont capables d'enregistrer ou du moins porter la marque de la composition chimique de leur environnement et ce en fonction de l'affinité des éléments chimiques avec ces différents compartiments et de la nature de la pollution (ponctuelle, chronique) (Rao et Padmaja, 2000 ; Wepener *et al.*, 2001). De plus, ces compartiments n'ont pas le même niveau d'activité métabolique.

Il en résulte une échelle d'intégration variable en fonction du tissu. En fonction de la demi-vie de l'élément étudié dans ces tissus, l'évaluation des concentrations permet de déterminer une contamination globale résultant de l'intégration de l'exposition sur une période de temps allant de quelques semaines à quelques années (Fig. 12).

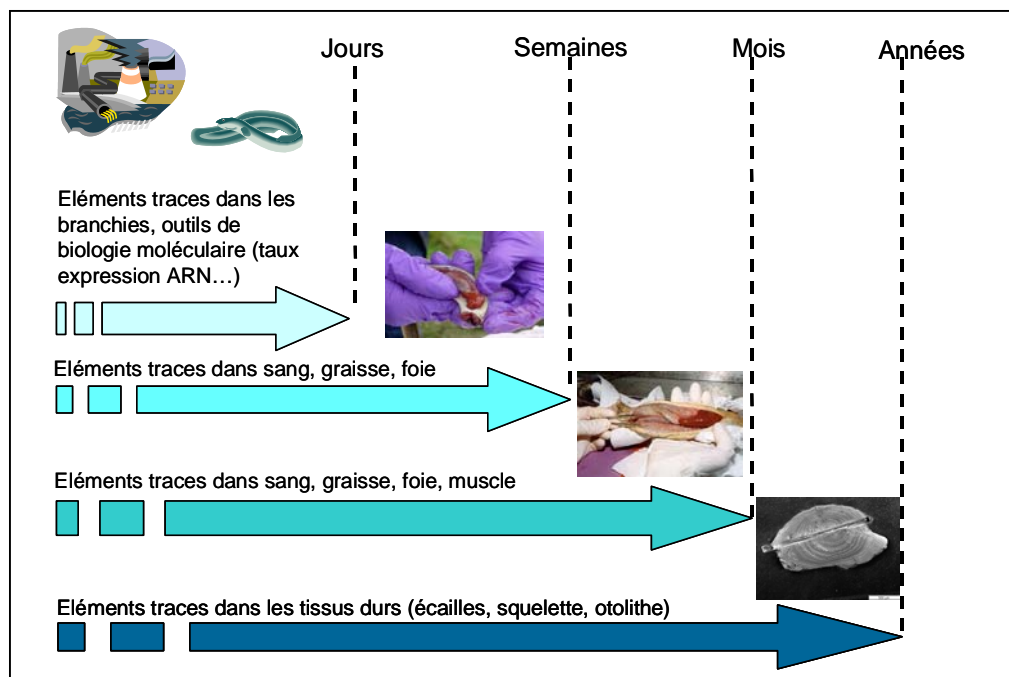


Figure 12. Echelles d'intégration de la contamination par les éléments traces dans les différents organes des poissons.

Par exemple, les branchies constituent une des premières interfaces entre l'eau et l'organisme. Du fait de leur rôle capital dans le prélèvement d'éléments essentiels à la vie (Ca, Na, K, oligoéléments) directement à partir du milieu de vie, les branchies sont aussi le site initial d'adsorption et d'accumulation des métaux. Leur interaction avec la surface extérieure des branchies et le taux d'assimilation vont dépendre des propriétés chimiques des métaux (Wepener *et al.* 2001) et des

facteurs physiologiques comme le taux de ventilation. Les concentrations en éléments traces des branchies reflètent ainsi en générale la composition du milieu ambiant sur un temps court (Kalay et Canli, 2000), en particulier si la pollution est ponctuelle. En revanche, le foie est connu pour ses fonctions de stockage et de régulation des éléments (Wepener *et al.*, 2001 ; Kalay et Canli, 2000). La signature observée dans cet organe va pouvoir alors résulter de l'accumulation sur plusieurs semaines et être conservée jusqu'à quelques mois avant d'être remobilisée. Enfin, les poissons sont dotés de structures calcifiées (écailles, os, otolithes) capables d'enregistrer les signatures élémentaires tout au long de la vie de l'individu. L'otolithe, en particulier, est connu pour ne subir aucune remobilisation dans sa composition élémentaire dans le temps et en fonction d'événements métaboliques (métamorphose, reproduction...), contrairement aux écailles, et est considéré comme une véritable archive des historiques de vie des individus (Panfili *et al.*, 2002).

Ainsi, la pression chimique exercée sur les poissons au cours de leur vie peut être suivie, les organes et leur composition chimique apparaissant comme de véritables indicateurs de cette perturbation et de son évolution. Les paragraphes suivants exposent les caractéristiques de certains de ces outils.

3.2. Bioaccumulation dans les tissus mous

La bioaccumulation regroupe tous les processus par lesquels un contaminant va pouvoir entrer dans un organisme, être modifié par des phénomènes de métabolisation, puis être stocké ou excrété dans l'environnement. Tous ces phénomènes vont également conditionner les perturbations plus ou moins délétères des fonctions biologiques (Boudou et Ribeyre, 1989ab). La bioaccumulation des contaminants va être particulièrement influencée par leurs propriétés physico-chimiques, elles-mêmes soumises à l'influence des facteurs abiotiques du milieu. Elle est également dépendante du métabolisme propre à chaque organisme.

En effet, la répartition des éléments dans les organes comme les transferts entre les organes, les processus d'excrétion et les effets toxiques vont être dépendants de la forme physico-chimique de l'élément, de la forme de stockage des contaminants et de la physiologie de l'organisme (Ney et Van Hassel, 1983).

3.2.1 Cas des éléments traces métalliques

La bioaccumulation des métaux non essentiels amène à une intoxication des organismes pouvant affecter les organes et les fonctions physiologiques (Oliveira Ribeiro *et al.*, 2000, 2002). Les métaux essentiels comme le Zn, le Cu, le Mn et le Mg ont des fonctions physiologiques mais peuvent être toxiques au-delà d'une certaine concentration (Rietzler *et al.*, 2001).

Les éléments traces métalliques vont pouvoir être stockés sous forme de dépôts granuleux constitués de couches concentriques dans le cytoplasme. Ils peuvent également précipiter sous formes de sels minéraux insolubles (ex. : sélénure de mercure). Enfin, ils peuvent être pris en charge par des protéines de faible poids moléculaire, comme les métallo-thionéines, localisées au niveau des branchies, du foie, des reins, de l'intestin et en faible quantité dans le sang. Ce sont surtout l'Ag, le Cd, le Cu, le Hg et le Zn qui seront pris en charge par ces protéines (Boudou et Ribeyre, 1989).

De nombreuses études soulignent l'affinité des métaux lourds comme le Cu, le Zn et le Cd pour le foie dont les capacités de stockage et de régulation de ces métaux ont été largement décrites dans la littérature chez l'anguille, mais également chez d'autres poissons (Linde *et al.*, 1999 ; Avenant-Oldewage et Marx, 2000 ; Kalay et Canli, 2000 ; Usero *et al.*, 2003 ; De Boeck *et al.*, 2004 ; Oliveira Ribeiro *et al.*, 2005). Comme les branchies qui accumulent les éléments présents dans le milieu de vie du poisson, le foie est recommandé en tant qu'indicateur des pollutions aquatiques (Carpene et Vasak, 1989). Par ailleurs, les branchies apportent une information essentielle quant à la contribution de la voie directe (respiration) dans la contamination de l'individu. De même, l'analyse du tractus gastro-intestinal peut apporter des informations sur la contribution de la nourriture (voie indirecte) dans l'exposition du poisson. Enfin, les éléments traces présentent peu d'affinité pour les muscles, excepté pour des éléments lipophiles comme le mercure. En revanche, des concentrations importantes des muscles en d'autres éléments peuvent être révélatrices d'une contamination déjà importante.

3.2.2 Cas des xénobiotiques organiques

La présence des composés organiques (hydrocarbures aromatiques polycycliques HAPs, polychloro biphényles PCBs...) dans l'environnement est un problème majeur en raison de leurs propriétés cancérogènes et mutagènes (Shailaja et D'Silva, 2003), de leur capacité à se bioconcentrer fortement dans les organismes aquatiques dont les poissons, et de leur large distribution dans les environnements (Tanabe, 1988).

La principale caractéristique des xénobiotiques organiques est leur lipophilie, et de ce fait, leur capacité à traverser les membranes biologiques et à s'accumuler dans les tissus des organismes comme le muscle. Cette lipophilie, ainsi que la stéréochimie et le degré d'halogénéation des composés vont déterminer leur bioconcentration et leur élimination. Dans le cas des PCBs, les congénères avec un faible degré d'halogénéation sont plus aisément métabolisés et éliminés que ceux dont le degré d'halogénéation est élevé (Bordajandi *et al.*, 2003).

Chez les poissons, les branchies sont des sites de diffusion passive des composés lipophiles, vers et en provenance de l'organisme. Les contaminants absorbés sont distribués dans les compartiments lipidiques dans l'organisme (Gray, 2002). Cependant, chez l'anguille, la contamination se fait majoritairement par voie trophique, en particulier dans le cas des pesticides (Bruslé, 1994). De façon à détoxifier et excréter les composés lipophiles, les organismes utilisent une succession d'enzymes de biotransformation particulièrement présentes dans le foie, permettant de rendre hydrosolubles ces composés (Bonacci *et al.*, 2003). Les xénobiotiques organiques et leurs métabolites sont donc particulièrement retrouvés dans les sites de métabolisation, de transformation et d'excrétion. Ainsi, l'analyse des métabolites des HAPs dans la bile s'est révélée être une méthode sensible et simple pour évaluer la contamination des poissons par ces composés et un bon biomarqueur pour détecter leur exposition à des contaminants aromatiques (Aas *et al.*, 2000 ; Budzinski *et al.*, 2004 ; Oliveira Ribeiro *et al.*, 2005). La réponse des organismes à la pression chimique et notamment les réactions mises en œuvre dans le cadre de la métabolisation de ces composés peuvent également servir d'indicateur ou biomarqueur.

3.3. Réponses des organismes aux stress chimiques

3.3.1 Notion de biomarqueur

Dans le milieu, les organismes peuvent subir de nombreux stress liés à des variations de facteurs naturels (température, salinité, turbidité, oxygénation,...) ou à l'introduction de contaminants (PCBs, HAPs, métaux lourds...). Ces stress peuvent conduire à long terme à l'altération de la santé des organismes et les contraignent donc à s'adapter pour survivre. L'assimilation des composés peut venir perturber certaines fonctions vitales comme les activités enzymatiques de détoxification, les flux ioniques, la régulation de l'influx nerveux, le métabolisme hormonal, les défenses immunitaires et

provoquer des altérations de l'ADN. Cette perturbation peut être considérée comme une étape précoce permettant de signaler des effets non curables. De façon à évaluer cette réponse biologique, des biomarqueurs d'exposition aux polluants sont utilisés (Burgeot *et al.*, 1999).

Lagadic *et al.* (1997) définissent un biomarqueur comme étant un changement observable et/ou mesurable au niveau moléculaire, biochimique, cellulaire, physiologique ou comportemental, qui révèle l'exposition présente ou passée d'un individu à au moins une substance chimique à caractère polluant. Les biomarqueurs permettent d'évaluer l'impact des différents stress qui agissent sur les organismes et l'état physiologique de ceux-ci avant l'apparition de pathologies et de mortalités, dans le cas d'une exposition ponctuelle à des polluants dont les concentrations sont importantes, ou d'une exposition à des concentrations faibles mais chroniques.

Différents biomarqueurs sont utilisés. Dans le cas des métaux, les métallothionéines (MT), qui visent à réguler les métaux en circulation dans l'organisme, sont étudiées. Lorsqu'il s'agit de composés organiques nocifs, les activités enzymatiques visant à rendre ces composés hydrophiles et donc à faciliter leur excrétion par voie rénale, biliaire ou branchiale, sont observées.

La détoxification des xénobiotiques organiques se manifeste par trois types de réactions et donc par trois groupes d'enzymes. Les enzymes de la réaction I sont dites enzymes de fonctionnalisation. Leur rôle est d'introduire une fonction nouvelle sur le composé de façon à le rendre plus polaire. Les réactions de type II sont dites de conjugaison. Il s'agit d'un ajout d'un radical hydrophile sur le composé brut ou sur le métabolite résultant de la réaction I (Goksoyr et Förlin, 1992). Il permet d'augmenter la polarité du xénobiotique et de faciliter son élimination. La réaction III implique des enzymes qui sont souvent des glycoprotéines membranaires. De ce fait, elles participent au transport actif des xénobiotiques ou de leurs métabolites et à leur excrétion (Bellamy, 1996). Chez les poissons, Payne, dès 1976, proposait d'utiliser l'induction de ces différentes enzymes de transformations de composés organiques comme biomarqueur de pollution environnementale. Parmi toutes ces activités enzymatiques, l'activité EROD (éthoxyrésorufin-O-dééthylase) est communément utilisée.

Enfin, les organismes ont également mis en place des mécanismes de résistance aux xénobiotiques, c'est le cas des protéines MXR (multi-xenobiotic resistance). Ce système est basé sur l'action de protéines situées au niveau de la membrane cellulaire et agissant comme des pompes d'expulsion (Burgeot *et al.*, 1999).

3.3.2 Réponse liée au système enzymatique à cytochrome P450

➤ Généralités sur les enzymes à cytochrome P450

Le terme de « cytochrome P450 » désigne une hémoprotéine liée à la membrane microsomale et dont la forme liée au monoxyde de carbone est caractérisée par un pic d'absorption à 450nm (Omura et Sato, 1964). Les enzymes à cytochrome P450 appartiennent à des complexes multi-enzymatiques qui participent au transport d'électrons. Elles sont liées à la membrane phospholipidique du réticulum endoplasmique ou des mitochondries.

La super famille des enzymes à cytochrome P450 regroupe plus de 200 membres, présents chez les bactéries, les champignons, mais également les plantes et les animaux (Nelson *et al.*, 1993 ; Omura, 1999). Les isoenzymes de cette superfamille sont constituées d'une chaîne polypeptidique, appelée apoprotéine et d'un groupement prosthétique formé par une protoporphyrine IV et un atome de fer (Gosoyr et Förlin, 1992). La chaîne polypeptidique est formée de 12 hélices α notées de A à L (Fig. 13) et de 5 feuilletts β (Poulos *et al.*, 1985). Cinq régions conservées constituent les éléments structuraux caractéristiques de la super famille P450.

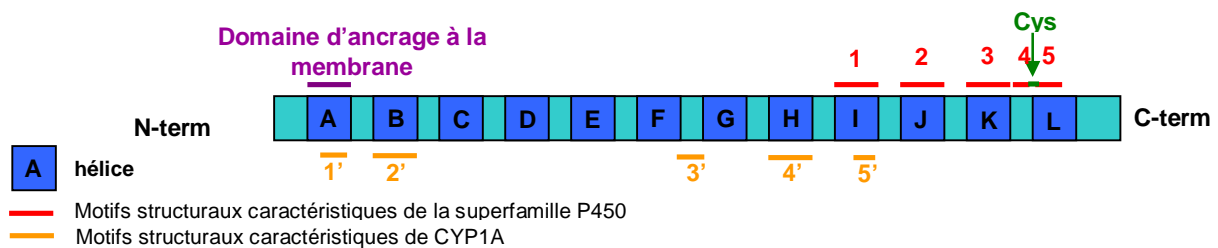
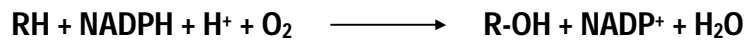


Figure 13. Caractéristiques structurales des enzymes à cytochrome P450 et CYP1A. Les motifs de 1 à 5 représentent la signature des enzymes à cytochrome P450 et ceux notés de 1' à 5' la signature des enzymes CYP1A. Le résidu cystéine (Cys) est impliqué dans la liaison de l'apoprotéine au groupement prosthétique (d'après Aubry, 2006).

Ces enzymes sont des catalyseurs d'oxydation au niveau de la phase I du métabolisme. Suite à la fixation du substrat sur la partie catalytique de l'enzyme, le fer du groupement prosthétique est réduit par le transfert d'un premier électron. La fixation d'un atome d'oxygène et le transfert d'un deuxième électron provoque l'activation du substrat.

La dernière étape consiste en la libération du substrat hydroxylé (R-OH) après le transfert d'un second atome d'oxygène au substrat selon l'équation suivante (Stegeman et Hahn, 1994) :



Ces enzymes participent à la biosynthèse, la biodégradation et au métabolisme oxydatif de substrats d'origine variée, à savoir des molécules endogènes de type stéroïdes, acides gras, prostaglandines, leukotriènes, phéromones ou encore hormones thyroïdiennes (Nebert, 1991), mais également des molécules exogènes telles que des drogues, des produits chimiques synthétiques, des polluants, des molécules carcinogènes et mutagènes. Les transformations subies par ces substrats lors de leur pénétration dans l'organisme vont conduire à une modification de leur réactivité biologique et à la transformation d'un produit lipophile en un produit polaire et hydrosoluble que l'organisme va pouvoir excréter. Il est important de noter que, dans certains cas, ces transformations peuvent également aboutir à la formation de dérivés dont la toxicité est supérieure à celle du substrat d'origine.

L'intérêt pour les enzymes à cytochrome P450 vient en partie de leur capacité à être régulées par leurs substrats. Ceux-ci peuvent entraîner des augmentations de l'induction de l'expression des enzymes (Nebert, 1991) et ainsi leur confèrent une des caractéristiques d'un bon marqueur d'exposition à des xénobiotiques. Le cas est notamment observé pour les enzymes à CYP1A1 (Fig. 13) connues pour métaboliser des polluants environnementaux comme les dioxines, les HAPs et PCBs.

Les enzymes CYP1 sont regroupées en deux sous-familles CYP1A et CYP1B. Les enzymes CYP1A sont codées par deux types de gènes *CYP1A1* et *CYP1A2* dont la présence est commune à tous les mammifères. Le gène *CYP1A1* est composé de 7 exons et 6 introns pour une taille d'environ 6kpb (Fig. 14).

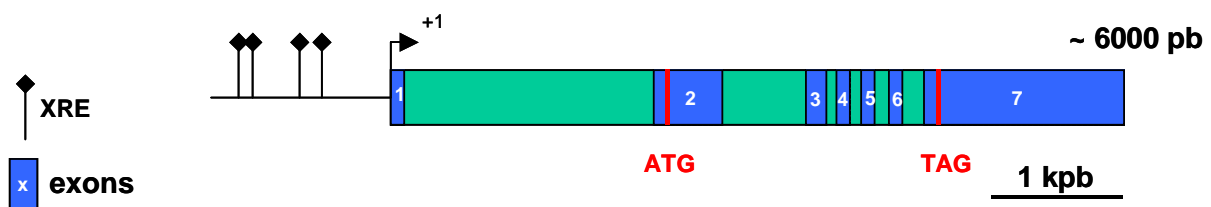


Figure 14. Structure du gène *CYP1A1*. D'après Kimura *et al.* (1984 ; n° accession : X01681, souris), Corchero *et al.* (2001 ; n° accession : AF253322, homme) et la séquence du gène *CYP1A1* du rat (n° accession : NC005107). XRE : xenobiotic-responsive element.

Le gène *CYP1A1* n'est pas exprimé de manière constitutive (Kimura *et al.*, 1986). Son inductibilité, en réponse à des xénobiotiques, est assurée par la présence dans la région promotrice de séquences xenobiotic-responsive element (XRE), 5'-TNGCGTG-3' (Whitlock *et al.*, 1996). Jusqu'à 12 de ces séquences ont été observées dans la région promotrice du gène (Fisher *et al.*, 1990 ; Kubota *et al.*, 1991; Corchero *et al.*, 2001). La réaction d'induction du gène est régulée par le récepteur aryl hydrocarbure (Ah) (Whitlock, 1999) (Fig. 15). Le *CYP1A1* est induit par la présence de HAPs, PCBs, de polychloro-dibenzodioxines (PCDDs) et polychlorodibenzofurannes(PCDFs). Cette induction a été observée chez des poissons, le foie étant alors le site majoritaire de l'induction observée (Claisse *et al.*, 1994).

L'expression du gène *CYP1A* peut être quantifiée au niveau de la production de protéine, par immunodétection en utilisant des anticorps polyclonaux ou monoclonaux, ou encore par mesure d'activités catalytiques dépendantes des activités des enzymes codées par le gène *CYP1A* comme les activités aryle hydrocarbure hydroxylase (AHH), l'éthoxyrésorufin-O-dééthylase (EROD), et 7-éthoxycoumarine O-dééthylase (ECOD), ou la benzo[a]pyrène hydroxylase (Payne et Penrose, 1975 ; Stegeman *et al.*, 1987). Les activités enzymatiques catalysées par *CYP1A*, notamment AHH, EROD, et ECOD, ont montré une différence d'induction en fonction de l'inducteur chez les poissons (Erickson *et al.*, 1988 ; Leaver *et al.*, 1988 ; Celander et Förlin, 1991).

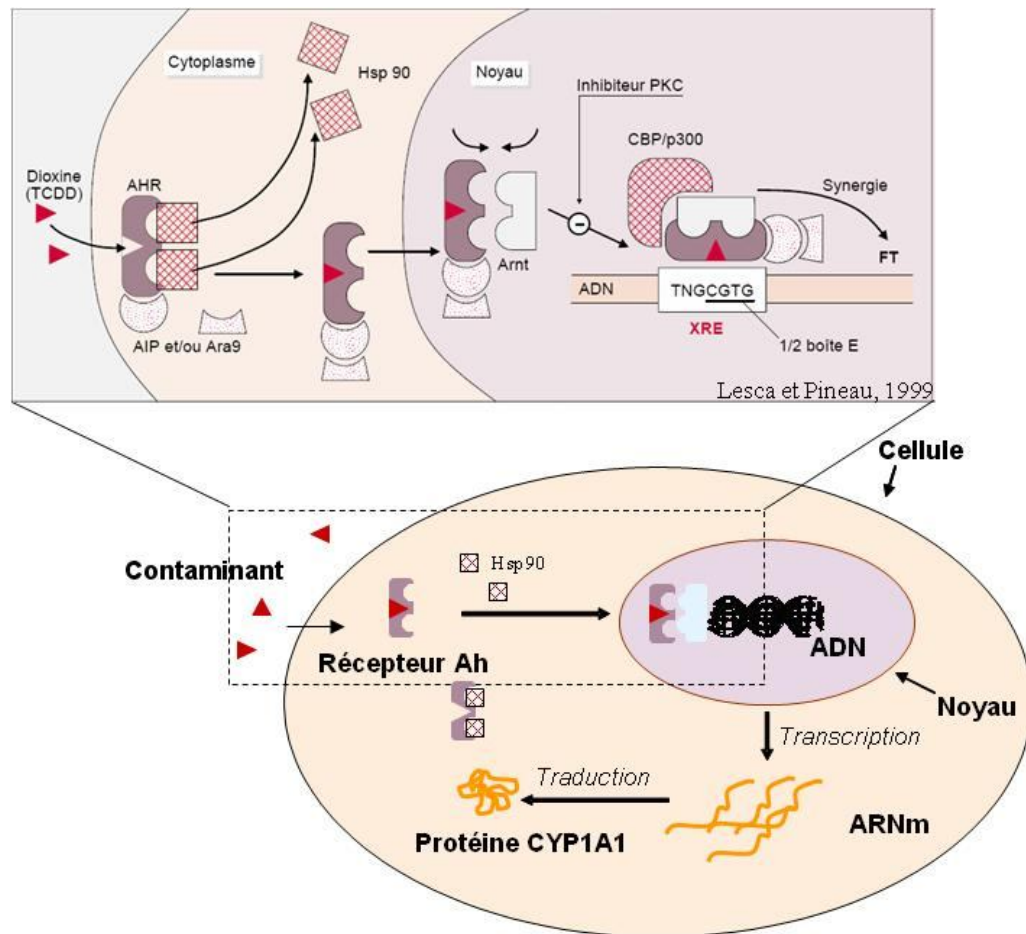


Figure 15. Induction de l'expression du gène *CYP1A1* par la voie du récepteur arylhydrocarbon (Ah) et production de la protéine P450 suite à la pénétration d'un xénobiotique dans la cellule (d'après Stegeman et Hahn, 1994 et Lesca et Pineau, 1999). Le récepteur cytosolique, sans faculté de dimérisation, est complexé à la protéine hsp90. La fixation du ligand déstabilise l'association à hsp90 et AhR adopte une conformation permettant l'hétérodimérisation nucléaire avec le partenaire Arnt (Ah Receptor Nuclear Translocator). Le complexe interagit avec l'ADN au niveau des sites XRE (Xenobiotic Responsive Element) et peut agir avec différents facteurs transcriptionnels (FT) induisant l'expression du gène et la synthèse d'enzyme *CYP1A1*.

Mesure de l'activité enzymatique EROD :

L'activité enzymatique EROD est catalysée par le système enzymatique à cytochrome P450. Cette activité enzymatique est couramment dosée pour évaluer l'expression du gène *CYP1A1*. La méthode consiste à fournir un substrat à l'enzyme l'éthoxyrésorufine. L'enzyme va catalyser la réaction de dééthylation du substrat qui va libérer la résorufine. Cette dernière ayant la propriété naturelle de fluorescence, l'intensité de fluorescence, proportionnelle à l'activité enzymatique, est mesurée à l'aide d'un spectrofluorimètre.

Il s'agit du premier biomarqueur à avoir été retenu dans un programme de surveillance marin français (Réseau National d'Observation) et il est de plus en plus utilisé dans ce domaine (Claisse *et al.*, 1994). Il est, par ailleurs, largement employé dans le cadre d'études sur la mise en évidence de l'impact de contaminants organiques chez l'anguille européenne (Van Der Oost *et al.*, 1996 ; Agradi *et al.*, 2000 ; Maria *et al.*, 2002 ; Gorbi et Regoli, 2004). Bonacci *et al.* (2003) ont montré que le benzo[a]pyrène et la β -naphthoflavone, un analogue de flavonoïdes naturels, induisaient des variations significatives de l'activité EROD hépatique chez l'anguille européenne, avec notamment une relation dose-réponse significative pour des concentrations de 0,1 à 10mg.kg⁻¹. De même Pacheco et Santos (1998) ont mis en évidence la pertinence de l'utilisation de l'activité EROD hépatique chez l'anguille du fait de sa sensibilité à l'exposition aux HAPs, et notamment à une exposition aux HAPs présent dans l'eau à des concentrations potentiellement retrouvées dans l'environnement.

Cependant, si l'activité enzymatique peut être induite par de nombreux composés, elle peut également être inhibée par d'autres (Testa, 1990) et certains ions métalliques divalents (Bozcaarmutlu et Arinç, 2004) comme le cadmium ou encore par les organoétains (Fent et Bucheli, 1995 ; Fent *et al.*, 1998). Enfin, des études ont également signalé l'inhibition de l'activité CYP1A pendant les périodes de reproduction (Stegeman et Hahn, 1994). Ces interactions remettent en cause l'utilisation de l'activité enzymatique comme biomarqueur unique en particulier dans des environnements complexes comme les environnements naturels. Ainsi, les recherches se sont dirigées vers l'étude de la réponse du gène *CYP1A1* au niveau transcriptionnel c'est à dire en amont de la synthèse de la protéine et donc des interactions possibles avec d'autres contaminants.

➤ Etude de l'induction du gène *CYP1A1* au niveau transcriptionnel :

La truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) a été le premier poisson dont l'ADNc *CYP1A1* a été séquencé (Heilmann *et al.*, 1988). Dans le cas de l'anguille, l'ADNc *CYP1A1* a été séquencé par Aoki *et al.* en 1999 chez l'espèce japonaise (Fig. 16), puis chez l'anguille européenne par Mahata *et al.* (2003) et Aubry (2006).

L'ARNm, au même titre que la protéine ou l'activité enzymatique *CYP1A1*, a été détecté dans de nombreux tissus des poissons comme le foie, site majeur d'activité des enzymes de détoxification, les branchies, l'intestin, le rein chez le saumon (Campbell et Devlin, 1996 ; Rees *et al.*, 2003 et 2005), les

fibres musculaires chez l'esturgeon (Sarasquete *et al.*, 2001), la rate chez la carpe par exemple (Reynaud *et al.*, 2005) ou encore le cœur et le système vasculaire chez l'anguille américaine (Schlezinger et Stegeman, 2000 ; Garrick *et al.*, 2005). Chez l'anguille européenne, ils ont été détectés dans le foie, le cerveau, la vésicule biliaire, la rate, l'intestin, la vessie gazeuse, le rein, les branchies et le muscle (Aubry, 2006).

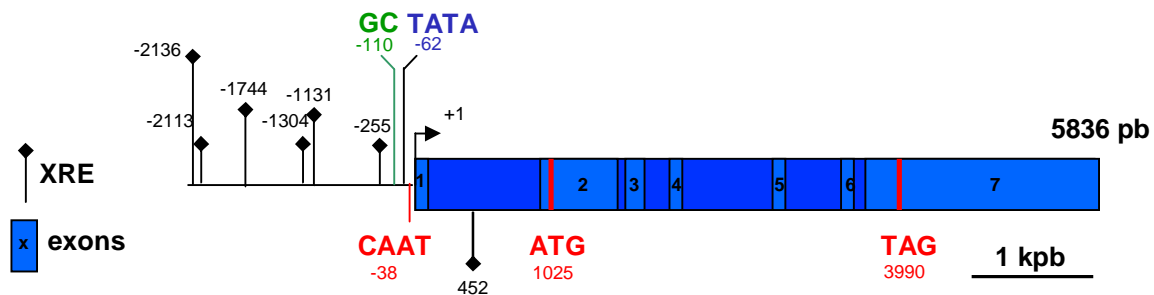


Figure 16. Gène *CYP1A1* chez l'anguille japonaise *A. japonica* d'après Aoki *et al.*, 1999 ; Ogino *et al.*, 1999. La position des motifs XRE (xenobiotic-responsive element), des boîtes GC, CAAT, TATA, du codon d'initiation de la traduction (ATG) et du codon de terminaison (TAG) sont données par rapport au site de transcription (+1).

L'utilisation de la quantification de l'ARNm *CYP1A1* comme biomarqueur repose sur l'observation chez de nombreuses espèces de poissons d'une augmentation des niveaux d'ARNm *CYP1A* précédant l'augmentation des niveaux de protéines due à une exposition à des polluants (Van der Oost *et al.*, 2003). Cette induction est dépendante de la concentration de l'inducteur (Courtenay *et al.*, 1993 ; Miller *et al.*, 1999) et du temps d'exposition, avec une expression élevée persistante après une longue période. Ces phénomènes ont été observés chez l'anguille européenne dans le cas d'une exposition à la β -naphthoflavone (Aubry *et al.*, 2007a ; Fig. 17) et à une fraction hydrosoluble de gasoil (Aubry *et al.*, 2007b). L'analyse de l'expression au niveau transcriptionnel de *CYP1A1*, par la technique de RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction) en temps réel, s'est révélée être un biomarqueur efficace de l'exposition de l'anguille européenne à des contaminants, en milieu contrôlé, et ce tant en termes de concentration de l'inducteur que de temps d'exposition (Aubry *et al.*, 2007a).

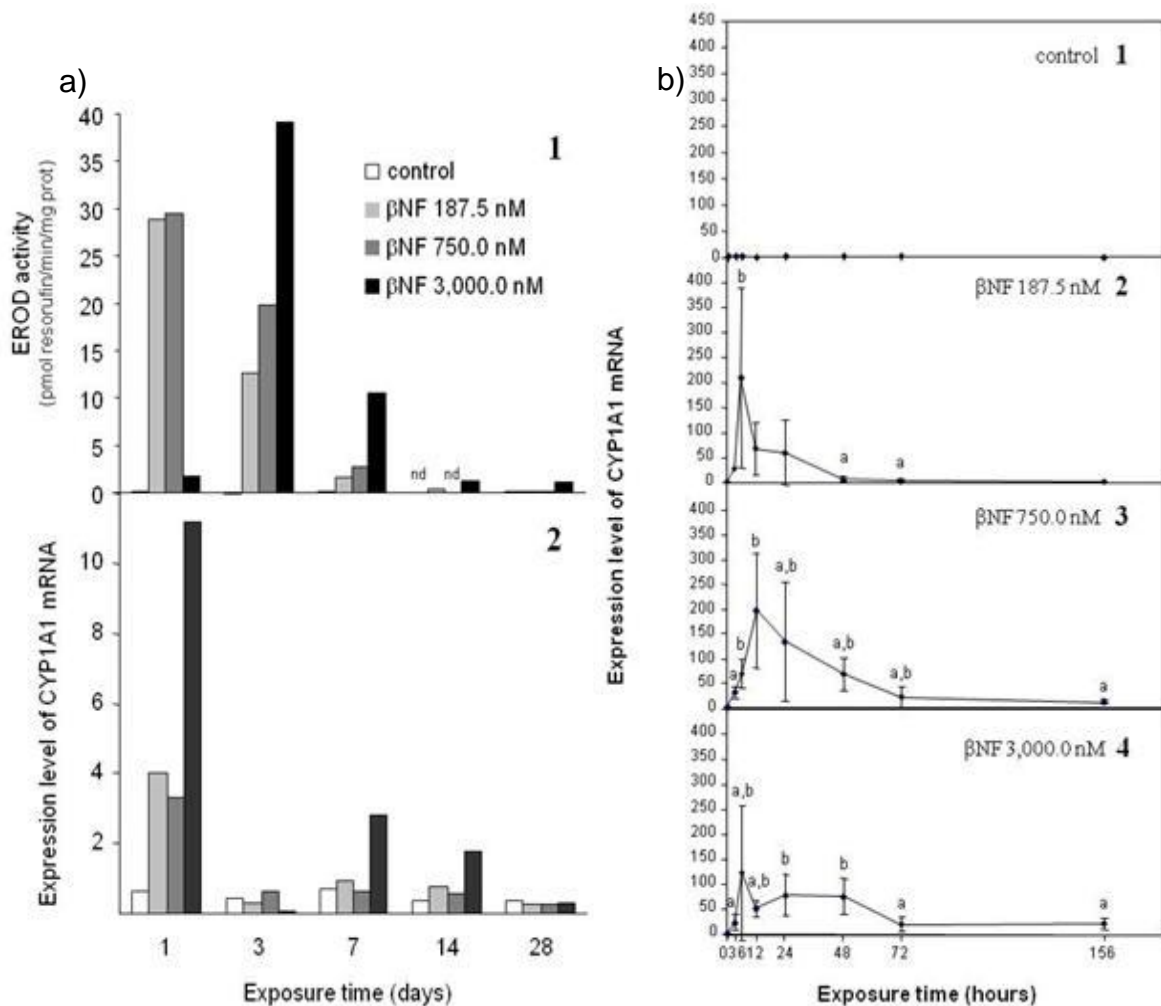


Figure 17. Induction de l'expression hépatique de l'ARNm *CYP1A1* chez de jeunes anguilles européennes suite à l'exposition à différentes concentrations de β -naphthoflavone (β NF), a) suivi sur 28 jours et comparaison à l'activité EROD, b) cinétique d'expression durant les 7 premiers jours suivant l'exposition (d'après Aubry *et al.*, 2007a).

Les tissus mous peuvent apporter des informations essentielles sur les conditions environnementales et la pression chimique connue par l'organisme, et ce même de façon précoce. Cependant, ils sont soumis à un turn over ou une remobilisation de leurs constituants qui rend cette information éphémère à plus ou moins long terme, en particulier lorsqu'il s'agit d'une exposition ponctuelle. Pour mieux comprendre et interpréter la réponse des organismes face à leur environnement, il convient de savoir comment ces organismes évoluent dans leur environnement au cours de leur vie, d'autant plus s'ils ont des capacités de mouvement importantes. Les structures carbonatées peuvent, dans certains cas et en particulier chez les poissons téléostéens, apporter des réponses quant à l'évolution des conditions environnementales connues par un individu et l'utilisation des habitats.

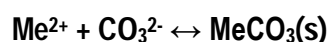
4. Apport de la microchimie des biominéraux carbonatés dans la reconstruction des conditions environnementales et des historiques de vie.

4.1 Le carbonate de calcium : formes et affinité avec les éléments traces

Dans les environnements aquatiques, en particulier le milieu marin, l'intérêt pour les carbonates est grandissant. De manière générale, le cycle des carbonates joue un rôle essentiel en tant que système tampon des océans et son contrôle sur la circulation du carbone entre les différents compartiments (biosphère, hydrosphère, atmosphère, lithosphère) (Butcher *et al.*, 1992 ; Libes, 1992 ; Millero, 2006). En outre, l'augmentation des gaz à effet de serre résultant des activités anthropiques tend à augmenter les températures mais également à déplacer les équilibres du système carbonate vers une acidification du milieu aquatique. Il en résulte à terme en une perturbation des biotopes dépendant fortement des carbonates comme les écosystèmes coralliens (Orr *et al.*, 2005). L'intérêt d'étudier le système carbonate porte donc à la fois sur une meilleure compréhension de la réponse de l'océan face à l'augmentation des gaz à effet de serre mais aussi sur les implications climatiques et écologiques.

Dans l'environnement, le carbonate de calcium (CaCO_3) peut être trouvé sous deux formes principales : la calcite (symétrie trigonale) et l'aragonite (symétrie orthorhombique). En milieu marin, à température et pression normales de l'eau de mer de surface, la formation de calcite est privilégiée.

De nombreuses études paléo-océanographiques s'appuient depuis longtemps sur la composition en éléments traces de carbonates biogènes afin de reconstituer les paléo-environnements et de mieux comprendre la géochimie de la sédimentation des minéraux carbonatés et de leur diagenèse. L'intégration des éléments traces dans les carbonates est en effet possible par substitution du Ca^{2+} par des éléments le plus souvent métalliques Me^{2+} :



$$K_s = [\text{Me}^{2+}] \times [\text{CO}_3^{2-}]$$

Cette substitution est contrôlée par la constante de solubilité (K_s) de chaque élément (Tableau 2). Ainsi, certains éléments comme le Cd, le Hg ou encore le Pb ont une faible constante de solubilité ce qui se traduit par une forte affinité avec les carbonates. Les constantes de solubilité des éléments sont influencées par la composition, le pH, la température, la salinité, la pression de l'eau de mer et la quantité de matière particulaire (Morse et Bender, 1990 ; Rimstidt *et al.*, 1998). Si certains éléments comme le Cd, le Hg ou encore le Pb ont une grande affinité pour les carbonates (K_s faibles), ils sont en faibles à très faibles concentrations dans l'eau de mer ($Cd=0,1\mu g.l^{-1}$; $Hg=0,03\mu g.l^{-1}$; $Pb=0,0005\mu g.l^{-1}$) (Brown *et al.*, 1989) ce qui peut expliquer les faibles concentrations observées parfois dans les matrices carbonatées. Les éléments traces, présents sous forme anionique dans l'environnement peuvent également être incorporés dans la matrice carbonatée par substitution des carbonates par des formes telles que SnO_3^{2-} , MoO_4^{2-} , CrO_4^{2-} , SO_4^{2-} .

Tableau 2. Constante de solubilité de différents éléments métalliques mesurées à 25°C et pour une force ionique nulle (Barats, 2006, d'après Morel et Hering, 1993).

	CO_3^{2-}	$-\log K_s$
Ca^{2+}	$CaCO_3(s)$ aragonite	8,22
	$CaCO_3(s)$ calcite	8,35
Mg^{2+}	$MgCO_3(s)$	7,45
Sr^{2+}	$SrCO_3(s)$	9
Ba^{2+}	$BaCO_3(s)$	8,3
Mn^{2+}	$MnCO_3(s)$	9,3
Fe^{2+}	$FeCO_3(s)$	10,7
Co^{2+}	$CoCO_3(s)$	10
Ni^{2+}	$NiCO_3(s)$	6,9
Cu^{2+}	$CuCO_3(s)$	9,6
Zn^{2+}	$ZnCO_3(s)$	10
Pb^{2+}	$PbCO_3(s)$	13,1
Hg^{2+}	$HgCO_3(s)$	16,1
Cd^{2+}	$CdCO_3(s)$	13,7
Ag^{2+}	$AgCO_3(s)$	11,1

4.2 Les différentes pièces calcifiées biogéniques : marqueurs et proxis

Dans un contexte de changement climatique et de perturbations des écosystèmes par les activités anthropiques, les scientifiques ont, depuis de nombreuses années, cherché à utiliser des structures capables d'enregistrer, sur des périodes plus ou moins longues, les variations des conditions environnementales (Klein *et al.*, 1996 ; Eggins *et al.*, 2003 ; Reuer *et al.*, 2003 ; Shen *et al.*, 2005). Parmi ces structures, l'intérêt pour les matrices carbonatées issues des organismes biologiques est grandissant. Cet intérêt repose sur la capacité de certains organismes (coraux, mollusques, poissons...) à former un squelette caractérisé par une succession de couches de matrice carbonatée de façon journalière, saisonnière ou annuelle, au cours de leur croissance. Cette structure périodique, liée aux variations du taux de croissance induites par des facteurs environnementaux (biotiques ou abiotiques) et des facteurs endogènes comme les événements ontogéniques (Bagenal, 1974 ; Summerfelt et Hall, 1987) va conditionner la résolution de l'archivage en fonction de chaque organisme.

Le carbonate de calcium biogénique peut précipiter sous forme de calcite ou d'aragonite. Au moment de la formation de la matrice carbonatée, les éléments traces en particulier les cations Me^{2+} comme le Sr^{2+} , le Mg^{2+} et le Ba^{2+} disponibles dans l'environnement de l'organisme, vont pouvoir être intégrés à la structure calcifiée par substitution au calcium et/ou par coprécipitation ou adsorption dans les espaces inter-cristallins (Raith *et al.* 1996 ; Stecher *et al.*, 1996 ; Campana, 1999 ; Vander Putten *et al.*, 1999 ; Lazareth *et al.*, 2000 ; De Pontual et Geffenet *et al.*, 2002 ; Lazareth *et al.*, 2003 ; Lorrain *et al.*, 2005). Le squelette carbonaté, de par ses caractéristiques de croissance et par sa composition élémentaire, apparaît alors comme un véritable enregistrement des conditions environnementales (température, salinité, perturbation chimique) en milieu aquatique.

L'incorporation des éléments traces et leur remobilisation vont dépendre, comme dans le cas du carbonate minéral, de la constante de solubilité des éléments, de leur biodisponibilité et des caractéristiques du milieu (température, pression, pH) dans lequel l'organisme se trouve. L'affinité d'un élément trace pour le carbonate biogénique peut être défini à partir de la formule du facteur d'enrichissement :

$$D_{Me} = \frac{[Me/Ca]_{calc}}{[Me/Ca]_{sw}}$$

Le facteur d'enrichissement (D_{Me}) ici reflète la distribution de l'élément (Me) entre le carbonate de calcium (calc) et le milieu où se fait la précipitation (sw).

Il a déjà été calculé pour différentes structures carbonatées comme les foraminifères (Hintz *et al.*, 2006a ; Hintz *et al.*, 2006b), les otolithes (Campana, 1999 ; Bath *et al.*, 2000) ou encore les coquilles de mollusques (Gillikin *et al.*, 2006 ; Gillikin *et al.*, 2005).

De plus en plus d'études portent sur l'utilisation de la composition chimique ou isotopique des carbonates biogènes comme témoin des variations des conditions environnementales et des processus biogéochimiques dans les environnements marins. Ces études visent à mettre en place des proxis et des traceurs de ces changements. Dans l'environnement marin, plusieurs éléments traces, en particulier le Mg et le Sr, ont été démontrés comme étant de bons proxis de changements océaniques (Henderson, 2002), de même pour certains rapports isotopiques comme le $\delta^{18}\text{O}$ présent dans les coquilles de bivalve et reflétant la température de l'eau (Watanabe *et al.*, 2001 ; Carre *et al.*, 2005).

Chez les foraminifères, organismes unicellulaires pélagiques ou benthiques présents en grand nombre dans tous les océans du globe, à cycle de vie court (3 mois) et excellents bioindicateurs de la qualité et des changements de l'environnement, la majorité des études menées ont porté sur l'utilisation du Sr et du Mg, présents dans le test calcaire, comme marqueurs des températures de l'eau de mer de surface (Eggins *et al.*, 2003 ; Hendericks et Bollmann, 2003 ; Hintz *et al.*, 2006). Cependant, le $\delta^{44}\text{Ca}$ semble présenter un potentiel comme traceur des paléo-températures (Nagler *et al.*, 2000), de même pour le chrome, cuivre, nickel, cadmium et zinc comme traceurs des pollutions (Armynot du Châtelet *et al.*, 2004).

Les principaux résultats obtenus sur les coraux sont basés sur l'utilisation du Sr et du Mg, la plupart du temps exprimés en rapport molaire Sr/Ca et Mg/Ca, comme paléo thermomètres (Sinclair *et al.*, 1998 ; Vander Putten *et al.*, 2000 ; Cardinal *et al.*, 2001 ; Richardson *et al.*, 2004 ; Rosenheim *et al.*, 2005) et traceurs des changements saisonniers de la salinité de l'eau de mer de surface (Watanabe *et al.*, 2001). De nombreux autres éléments comme l'U ou le B sont connus pour varier avec les températures de surface (Sinclair *et al.*, 1998). Les variations de Ba et de Cd seraient susceptibles d'illustrer les événements d'upwelling océaniques (Fallon *et al.*, 1999 ; Lea *et al.*, 1989 ; Reuer *et al.*, 2003), ou encore, dans le cas du Ba, des apports fluviaux (Alibert *et al.*, 2003 ; Sinclair et McCulloch, 2004). Le Cu, Pb et Zn incorporés dans le squelette carbonaté seraient eux de bons indicateurs des apports anthropiques (Esselmont *et al.*, 2004 ; Fallon *et al.*, 1999). Chez les coquilles de mollusques bivalves, la composition en Sr et Mg témoignent principalement des variations de température d'eau de mer de surface et de salinité (Gillikin *et al.*, 2005 ; Lazareth *et al.*, 2003) (Fig. 18).

Le Ba peut également apporter des informations quant à la salinité et des phénomènes d'efflorescences phytoplanctoniques (Stecher *et al.*, 1996 ; Gillikin *et al.*, 2006 ; Barats *et al.*, 2008). Les concentrations en Pb, Cu, Zn, Cd, et U se sont également révélées être de bons indicateurs des activités anthropiques (Gillikin *et al.*, 2005 ; Richardson *et al.*, 2001 ; Giusti *et al.*, 1999 ; Raith *et al.*, 1996). Quelques études se sont également intéressées à ce type d'archivage par les dents de mammifères, notamment pour la reconstruction des historiques de vie des morses et des bélugas à partir des rapports isotopiques du Pb (Outridge *et al.*, 1997 ; Stewart *et al.*, 2003).

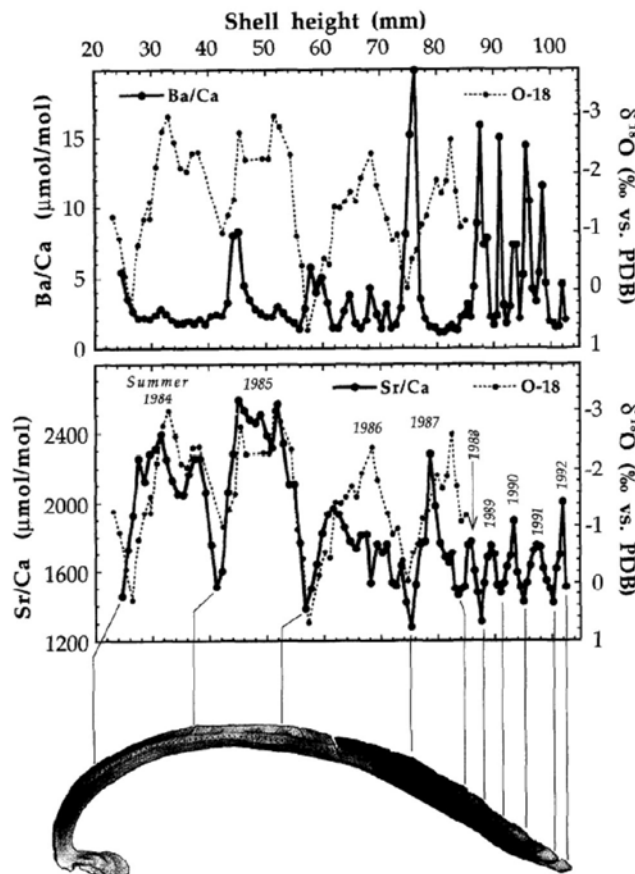


Figure 18. Exemple de profils élémentaires de Sr et Ba ($\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$), et $\delta^{18}\text{O}$, obtenus dans une coquille de clam (*Mercenaria mercenaria*), prélevée dans le Delaware (E.U.) en 1993 (Stecher *et al.*, 1996).

De nombreuses études se sont focalisées sur les pièces calcifiées des poissons (os, écailles, otolithes), sur leur capacité à intégrer les éléments et dans le cas des otolithes à ne pas être remobilisés lors d'événements physiologiques contrairement aux autres pièces calcifiées (écailles, os). Le paragraphe suivant décrit les caractéristiques et les avantages des otolithes en tant qu'outil de reconstruction des histoires de vie des poissons.

4.3 Cas particulier des otolithes

4.3.1 L'otolithe : composition et propriétés

Les otolithes sont des pièces calcifiées, qui chez les poissons téléostéens constituent une partie de l'oreille interne. Ils font partie du système sensoriel qui permet de positionner le poisson en fonction des variations de la gravité ou encore de l'accélération (Popper and Fay, 1993 ; Wright *et al.*, 2002).

L'oreille interne est composée de trois parties : l'utricule, le saccule et la lagena. Chacune d'entre elles est constituée d'une macula sensorielle couverte par une membrane qui innerve l'otolithe. Le saccule, situé dans la partie basse de l'oreille interne, contient le plus gros des trois otolithes appelé le « sagitta ». L'otolithe « lapillus » est situé dans l'utricule et l'otolithe « asteriscus » dans la lagena (Fig. 19). Les otolithes baignent dans l'endolymphe (Wright *et al.*, 2002).

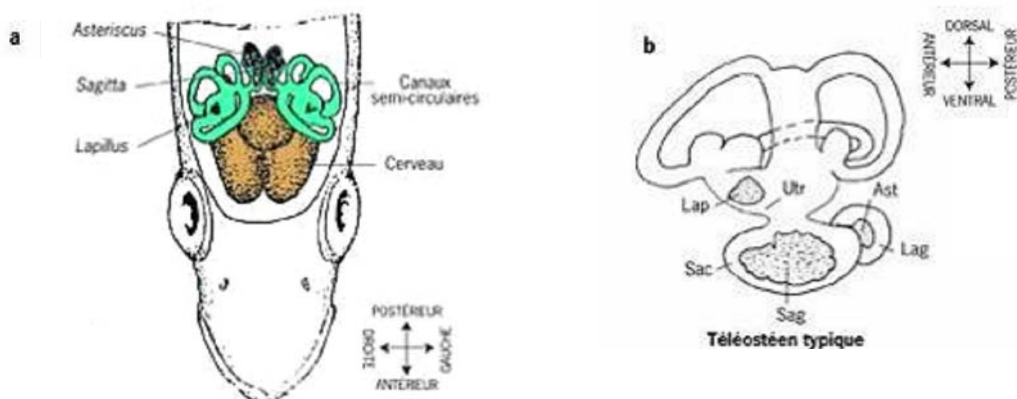


Figure 19. Schéma de l'emplacement des otolithes à l'intérieur de l'oreille interne d'un Téléostéen. a) vue dorsale de l'appareil vestibulaire ; b) Situation des otolithes à l'intérieur du système de labyrinthe de l'oreille interne. Ast : asteriscus ; Lag : lagena ; Lap : Lapillus ; Sac : saccule ; Sag : sagitta ; Utr : utricule (Wright *et al.*, 2002).

Les otolithes sont composés de cristaux de carbonate de calcium sous forme d'aragonite (CaCO_3). Ces cristaux s'accumulent de façon cyclique dans les trois dimensions à partir d'un noyau central ou primordium, et ce au travers d'une matrice protéique composée en majorité par une protéine proche de la kératine : l'otoline. L'alternance des couches de carbonate de calcium et de protéines fait apparaître une structure similaire à celle d'un bulbe d'oignon.

Plusieurs niveaux de résolution temporelle sont observés dans cette structure. Le premier niveau, composé des accroissements primaires, a une résolution journalière (Pannella, 1971) même si chez certaines espèces le dépôt n'est pas journalier ou est difficilement discernable (Wright *et al.*, 2002). Ces accroissements primaires sont observables à fort grossissement. En lumière naturelle transmise, les zones riches en minéral appelées « zones L » apparaissent claires tandis que les couches riches en matière organique appelées « zones D » apparaissent sombres (Kalish *et al.*, 1995). Leur épaisseur varie de moins de 1µm à 12µm. Les zones sombres sont moins épaisses (<1µm) que les zones claires (0,4 à 10µm). Le deuxième niveau comprend les zones saisonnières. En lumière transmise, les zones opaques sont sombres et les zones translucides lumineuses. Par ailleurs, les deux types de zones présentent des différences de la largeur d'accroissement primaires qui les constituent, de la fréquence des discontinuités de croissance et des couches organiques, du rapport carbonate de calcium/matrice protéique et les quantités d'éléments traces (Morales-Nin, 1987 ; Mugiya *et al.*, 1985 ; Kalish, 1989). La résolution est de l'ordre de quelques mois voire d'une saison de croissance. Le troisième niveau est constitué par les accroissements annuels. Les zones saisonnières sont parfois visibles à l'œil nu ou à faible grossissement et ont une largeur pouvant faire une centaine de µm. Enfin, à l'occasion de stress, des discontinuités structurales de l'otolithe plus ou moins régulières peuvent apparaître (Wright *et al.*, 2002).

L'analyse chimique des otolithes a permis de révéler la présence de 31 éléments. La majorité des éléments sont des éléments majeurs (>100µg.g⁻¹) et des éléments mineurs (<100µg.g⁻¹) (Fig.20). Les éléments mineurs retrouvés sont Na, Sr, K, S, N, Cl et P. Les éléments traces sont retrouvés à des niveaux inférieurs à 10µg.g⁻¹. La concentration en calcium correspond à 38,02±0,50% et 40,72±1,82% du poids des otolithes pour les espèces marines et d'eau douce respectivement (Campana, 1999). La quantité de protéines peut atteindre 3 à 4% du poids des otolithes (Campana, 1999). 50% de ces protéines sont insolubles dans l'eau et auraient un rôle important dans le taux de calcification de l'otolithe.

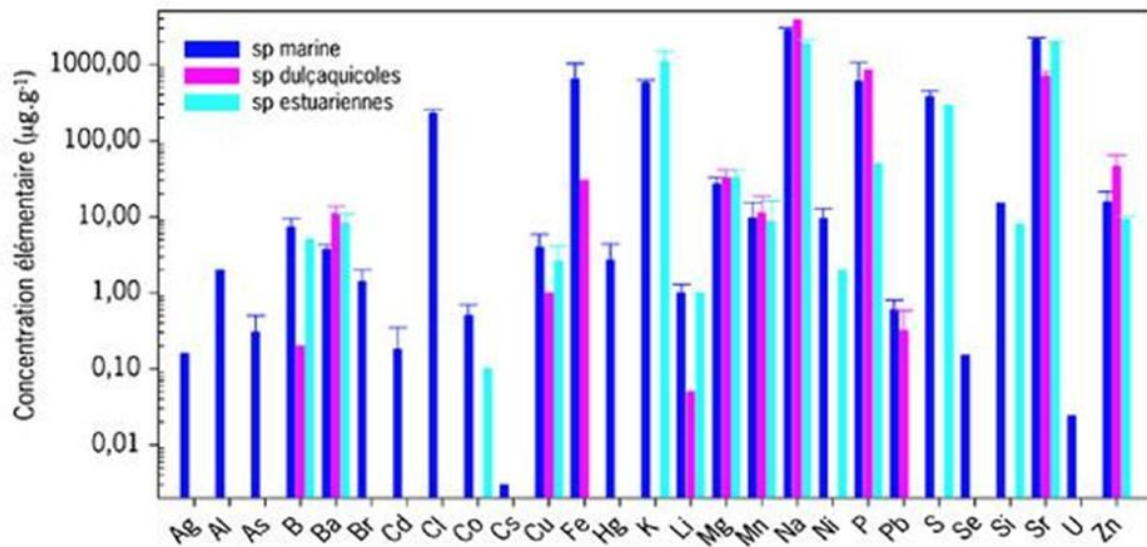


Figure 20. Synthèse des données existantes sur la composition des otolithes d'espèces occupant trois principaux types d'habitats. L'absence de barre d'erreur indique les concentrations observées lors d'une seule étude. (De Pontual et Geffen, 2002 d'après Campana, 1999)

La plupart des éléments inorganiques contenus dans les otolithes proviendraient de l'eau, à raison de 80 à 90% dans le cas du Ca et du Sr dans les poissons d'eau douce selon Farrell et Campana (1996), de même chez les poissons marins selon Walther et Thorrold (2006). D'autres études (Kennedy *et al.*, 2000), ont montré que la nourriture était la source prédominante de ces mêmes éléments. Cette importance relative des deux sources peut changer en fonction de la disponibilité du Ca dans la colonne d'eau (Farrell et Campana, 1996).

Avant d'atteindre l'otolithe, les éléments doivent franchir plusieurs barrières où a lieu une discrimination. Les éléments contenus dans l'eau ou dans la nourriture vont devoir franchir les branchies ou le système digestif, lieux de l'osmorégulation. Une fois dans le sang, les éléments vont devoir franchir la barrière sang/endolymphe puis endolymphe/cristal. La discrimination est variable en fonction du lieu et de l'élément concerné (Fig. 21). D'après Campana (1999), la composition élémentaire diminue de façon importante du plasma vers l'endolymphe, pour tous les éléments excepté le K ; la composition de l'endolymphe étant plus proche de celle de l'otolithe par rapport au plasma sanguin et à l'eau ambiante.

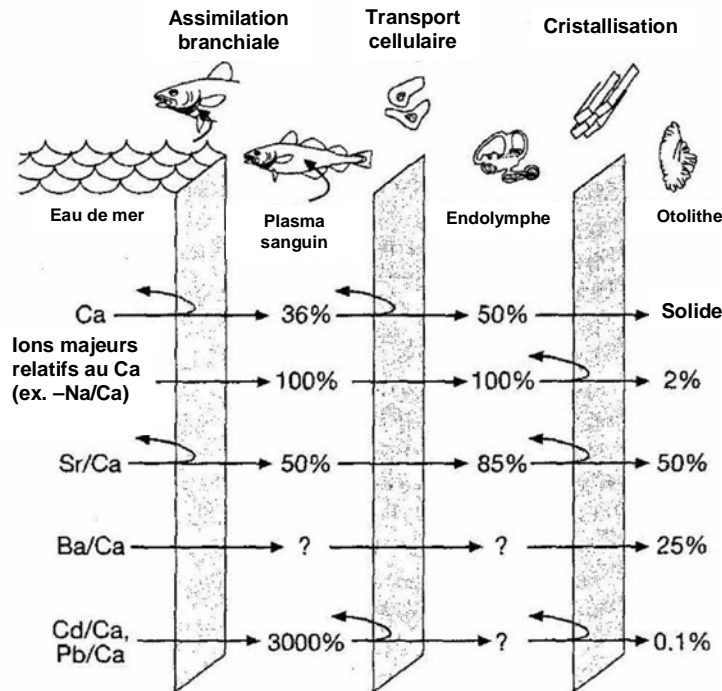


Figure 21. Schéma des différentes voies et barrières entre l'eau de mer et l'otolithe, avec une estimation du taux de transfert pour certains éléments à chaque barrière physiologique (d'après Campana, 1999).

Les éléments traces peuvent être intégrés à l'otolithe soit à travers les cristaux d'aragonite en formation combinés à la matrice organique, soit grâce à la précipitation directe du carbonate de calcium et des éléments traces présents dans l'endolymphe (Panfili *et al.*, 2002). Le facteur d'enrichissement ou coefficient de distribution d'un élément (DME), entre l'eau et l'otolithe, décrit précédemment, est un bon indicateur du niveau de régulation physiologique de l'élément et de sa discrimination à l'une ou plusieurs des interfaces (Fig. 21). D'après Campana (1999), Na, K et Cl ont de faibles coefficients de distribution ($<0,05$). En revanche, le Sr présente un coefficient de distribution d'environ 0,14. Pour un grand nombre d'éléments le coefficient est inférieur à 0,25 voire proche de 1. Par ailleurs, les études réalisées sur l'affinité du Sr, Zn, Pb, Mn, Ba et Fe pour les otolithes suggèrent que leur abondance relative dans l'environnement pourrait être reflétée dans l'otolithe (De Pontual et Geffen, 2002).

En termes de composition chimique, un des avantages de l'otolithe par rapport aux autres pièces du squelette est d'être métaboliquement inerte. Il est peu susceptible d'être résorbé ou remanié (Campana et Neilson, 1985). Cette propriété, associée à son accroissement continu durant toute la vie du poisson, le présente comme un des outils ayant le potentiel d'information environnementale le plus important des pièces calcifiées existantes.

4.3.2 Applications

➤ Détermination de l'âge et des stades de vie

L'utilisation des otolithes comme estimateurs de l'âge des poissons apparaît en 1899 avec les observations des annuli par Reibisch. Cette utilisation s'accroît en 1971 avec la découverte des stries journalières par Pannella. De nombreux articles traitent de cette méthode et de son utilisation (Pajuelo *et al.*, 2002 ; Geffen *et al.*, 2002 ; Fablet and Le Josse, 2005 ; Campana, 2005). Par ailleurs, l'étude de la microstructure des otolithes a permis d'établir la durée de la phase larvaire chez certaines espèces. Par exemple, chez *Anguilla anguilla* et d'autres espèces d'anguilles l'observation des otolithes a permis de pallier l'absence d'informations sur les œufs. Les diverses étapes constituant la phase larvaire, comme le passage du milieu marin au milieu estuarien, et leurs caractéristiques peuvent être plus amplement décrites (Lecomte-Finiger *et al.*, 1992 ; Arai *et al.*, 2000 ; de Casamajor *et al.*, 2001 ; Réveillac *et al.*, 2008). Cependant, la comparaison de McCleave (2008) entre les données obtenues par lecture des stries journalières chez des civelles de plusieurs espèces d'anguille et les données des pêches de petites leptocephales souligne les difficultés liées à la lecture des stries de croissance notamment chez les civelles d'anguille européenne et met en garde sur l'interprétation des résultats basés sur cette lecture.

Chez d'autres espèces, des changements de comportement alimentaire ou un passage d'une vie pélagique à la vie benthique peuvent être caractérisés grâce aux otolithes (Fisher, 2005). Par ailleurs, le taux de croissance du poisson peut être estimé à partir de la microstructure de la sagitta (Morales-Nin et Panfili, 2002). Ces observations sont possibles grâce à l'influence des événements environnementaux et physiologiques sur la minéralisation de l'otolithe. En effet, la température, la salinité, le changement de nourriture, la photopériode vont induire, au travers du métabolisme du poisson, des variations dans la calcification (Campana, 1999 ; Bath *et al.*, 2000).

Du fait de l'absence de remaniement des éléments intégrés, la microanalyse chimique de l'otolithe présente également de nombreuses applications, relatives aux historiques de vie (changement de conditions environnementales, événements ontogéniques, influences anthropogéniques), largement décrites par Campana (1999) et De Pontual et Geffen (2002). Les études font appel à l'analyse de la composition élémentaire de l'otolithe entier (analyse globale) ou d'une portion de l'otolithe (analyses de surface) (voir Fig. 6 du chapitre II) en fonction de l'information recherchée. Les analyses globales présentent l'avantage d'augmenter les limites de détection analytique et d'accéder à une large gamme d'empreintes élémentaires. Cependant, elles mènent à la destruction de l'échelle temporelle

représentée par la succession de stries de croissance. Au contraire, les analyses de surface (par exemple par ablation laser couplée à la spectrométrie de masse), permettent de conserver les microstructures malgré une sensibilité analytique moindre.

➤ Détermination de stock

De même, du fait que les poissons peuvent passer une partie de leur vie dans différentes masses d'eau qui induisent des changements dans la composition élémentaire de la sagitta, cette composition peut servir de marqueur de différents stocks de poissons (Gao *et al.*, 2001 ; Gillanders, 2002 ; Swan *et al.*, 2003). Selon Thresher *et al.* (1999), Na, Sr, Ba et Mg sont des éléments couramment utilisés pour les applications de discrimination des stocks. Campana *et al.* (2000) suggèrent l'utilisation des éléments traces pour déterminer des stocks de *Gadus morhua*, Bergenius *et al.* (2005) pour décrire la structure des stocks de poissons de récifs coralliens. Plus récemment Rooker *et al.* (2008) ont utilisé la composition chimique des otolithes de thon rouge *Thunnus thynnus* comme marqueur des zones de nurseries. D'autres auteurs ont utilisé les éléments traces et les rapports isotopiques du Pb (Spencer *et al.*, 2000) pour déterminer les zones de nurseries chez différentes espèces comme la sole *Solea solea* (De Pontual *et al.*, 2000) ou encore l'alose *Alosa spadissima* (Thorrold *et al.*, 1998).

➤ Détermination du passé environnemental

Parmi les empreintes élémentaires à disposition, l'empreinte en Sr s'est révélée un outil de choix pour retracer le passé environnemental des poissons en particulier des espèces anadromes et catadromes (Secor *et al.*, 1995 ; Gao and Beamish, 1999 ; Tsukamoto and Arai, 2001 ; Limburg *et al.*, 2003). En effet, en milieu océanique, les concentrations en Sr et le rapport Sr/Ca sont stables et beaucoup plus élevés que dans les eaux douces (Sr=60 $\mu\text{g.l}^{-1}$ en eau douce, Sr=8000 $\mu\text{g.l}^{-1}$ en eau de mer) (De Pontual et Geffen, 2002). Cette relation à la salinité, l'affinité du Sr pour les carbonates et les techniques analytiques récentes à résolution spatiale fine, permettent de retracer de manière fiable les changements d'habitats au cours de la vie des individus en se basant sur la composition élémentaire de l'otolithe. Ainsi, la concentration en Sr dans les otolithes a été utilisée pour étudier l'avalaison des aloses *Alosa spp.* (Limburg, 1995), pour discriminer différents comportements d'utilisation d'habitat par exemple chez les salmonidés (Kalish, 1990 ; Halden *et al.*, 1995) ou encore chez certaines populations de bar d'Amérique *Morone saxatilis* (Secor *et al.*, 1995).

Selon, Tzeng (1996) les variations du rapport Sr/Ca seraient dues aux variations de salinité mais également aux métamorphoses en particulier au passage du stade de larve leptocéphale au stade civelle chez l'anguille japonaise (*Anguilla japonica*). De ce fait, il constituerait un bon marqueur de cette métamorphose.

Les études se sont également portées sur l'utilisation des isotopes de l'oxygène pour retracer les historiques de température. La majorité des études expérimentales menées sur les poissons ont montré une relation marquée entre la température du milieu ambiant et les rapports isotopiques de l'oxygène observés. En milieu naturel, plusieurs travaux de recherche se sont basés sur cet outil (Devereux, 1967 ; lacumin *et al.*, 1992 ; Gauldie *et al.*, 1994)

Enfin, le dosage des éléments traces peut aider à la reconstitution du passé environnemental lié à l'influence des activités anthropiques (Burke *et al.*, 1993 ; Saquet *et al.*, 2002 ; Arslan et Secor, 2005). Geffen *et al.* (2003) ont mis en évidence des différences de concentrations en éléments traces dans les otolithes de sole (*Pleuronectes platessa*) et de merlan (*Merlangius merlangus*) provenant d'un site irlandais anthropisé et d'un autre moins contaminé. De même, Hanson et Zdanowicz (1999) ont étudié les variations de la composition élémentaire de l'otolithe le long d'un gradient de pollution dans un estuaire (Gavelston Bay, Texas) chez le tambour brésilien (*Micropogonias undulatus*).

Cependant, la majorité de ces études ont été réalisées à partir de dissolutions de la totalité de l'otolithe ou de l'analyse d'une partie de l'otolithe, de sorte que l'échelle temporelle que représente l'otolithe et les informations qui peuvent être apportées par la succession des stries de croissance ne sont pas exploitées. Avec des analyses par micro-PIXE ou avec un couplage ablation laser ICP-MS, il est possible d'établir des profils spécifiques individuels. Ainsi, Halden *et al.* (2000) ont mis en évidence des variations oscillatoires de la distribution du zinc dans l'otolithe de l'Omble chevalier (*Salvelinus alpinus*) du noyau vers la périphérie (Fig. 22). De même, Saquet *et al.* (2002) ont observé des variations significatives du Zn et du Sr chez des poissons prélevés au niveau de rejets de sites miniers. Mais les études de ce type sont encore peu nombreuses. Par ailleurs, les résultats existants soulignent l'importance de l'influence des facteurs physiologiques sur l'empreinte élémentaire de l'otolithe et la possibilité de modification de cette empreinte par une exposition à des contaminants organiques (Hanson et Zdanowicz, 1999).

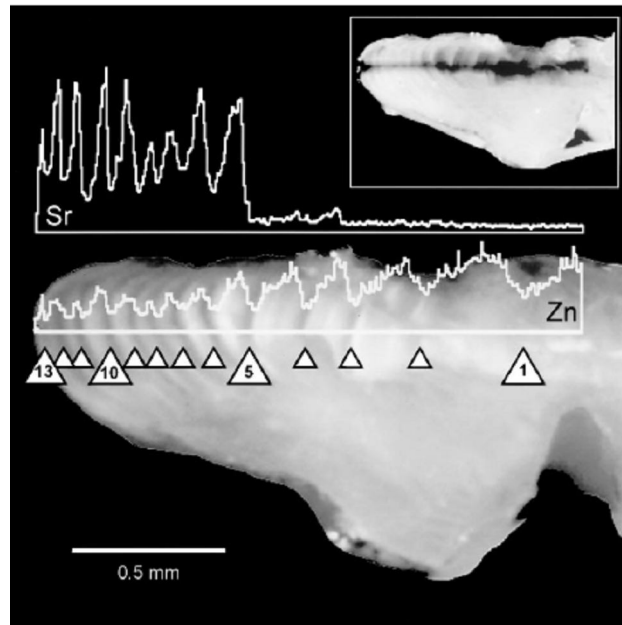


Figure 22. Exemple de profils de Sr et de Zn obtenus le long d'un transect nucleus-bord de l'otolithe par microsonde (Scanning proton microprobe) chez un Omble chevalier (*Salvelinus alpinus*) anadrome (Halden *et al.*, 2000).

4.3.3 Apports de la microchimie de l'otolithe chez l'anguille

Si la microstructure de l'otolithe a permis d'apporter de nombreuses informations en termes d'âge, de croissance, de recrutement, de développement larvaire et de migration chez l'anguille (Lecomte-Finiger, 1992 ; Mounaix et Fontenelle, 1994 ; Réveillac *et al.*, 2008), plus récemment, la microchimie de l'otolithe tend à approfondir les connaissances sur son cycle de vie en particulier sur son comportement migratoire (Tzeng *et al.*, 1996 ; Tsukamoto *et al.*, 1998 ; Tzeng *et al.*, 2002 ; Daverat, *et al.*, 2005 ; Daverat et Tomas, 2006). Chez d'autres poissons, l'analyse du Sr et du Ca le long des stries de croissance de l'otolithe s'est révélé être un outil de choix pour mettre en évidence les passages dans des habitats de composition différente en Sr, très souvent liée à la salinité. Cet outil appliqué aux otolithes de différentes espèces d'anguille (européennes, japonaises, américaines, néo zélandaises) a permis de définir, au-delà de la catadromie facultative des anguilles, plusieurs comportements d'utilisation des habitats (Tzeng *et al.*, 2002 ; Limburg *et al.*, 2003 ; Arai *et al.*, 2004 ; Daverat et Tomas, 2006). En effet, des concentrations en Sr plus élevées ont été trouvées dans des otolithes d'anguilles pêchées en milieu saumâtre que dans ceux d'anguilles pêchées en eau douce (Tsukamoto, 1998 ; Tsukamoto et Arai, 2001 ; Jessop *et al.*, 2006). L'observation de différents profils a montré des changements drastiques de concentration en Sr au cours de la vie des individus analysés

(voir Fig. 9) (Tzeng *et al.* 2002 ; Arai *et al.*, 2004 ; Shiao *et al.*, 2006). En France, ces comportements ont été particulièrement observés chez l'anguille européenne du bassin Gironde-Garonne-Dordogne (Daverat *et al.*, 2005). Ces différentes stratégies ont été décrites précédemment (voir paragraphe 2.2). Malgré des problèmes d'interprétation dus à des signaux beaucoup plus aléatoires, aux phénomènes de régulation des éléments par les anguilles, d'autres éléments tels que le Mg, le Cr, le Mn et le Ba ont été étudiés afin d'apporter des informations complémentaires sur les histoires de vie ou conforter certaines données apportées par le Sr (Arai et Hirata, 2006 ; Tzeng *et al.*, 2007).

L'augmentation de la gamme des éléments détectables dans les otolithes, tout en conservant une partie ou la totalité de la microstructure, a été possible grâce à l'apparition de systèmes d'échantillonnage et analytiques de plus en plus performants tel que l'ablation laser – ICP-MS (voir Chapitre IV, partie 2).

CHAPITRE II

DE L'ÉCHANTILLONNAGE À LA MISE EN PLACE DES DIFFÉRENTES TECHNIQUES ANALYTIQUES

« Toute technologie avancée est magique »

Arthur Charles Clarke

L'approche pluridisciplinaire développées durant ce travail de thèse a nécessité, premièrement la mise en œuvre de protocoles existant, tant au niveau des prélèvements des divers échantillons (eau, sédiment, anguilles) que des analyses, et deuxièmement l'adaptation de méthodologies appartenant à des domaines aussi différents que la chimie analytique et la biologie moléculaire. Le chapitre suivant se propose de présenter dans un premier temps les caractéristiques des sites et des groupes d'anguilles jaunes ciblés. Puis les méthodes nécessaires à la caractérisation chimiques des milieux seront abordées. La troisième partie sera dédiée aux méthodologies visant à évaluer la pression chimique s'exerçant sur l'anguille et la réponse de cette espèce au stress chimique respectivement par analyses chimiques des tissus mous et par mesure du taux d'expression hépatique du gène *CYP1A1* par RT-PCR (reverse transcription - polymérase chain reaction) en temps réel. Enfin, la technique du couplage ablation laser femtoseconde – spectromètre de masse à plasma induit appliquée à la microchimie de l'otolithe en vue de la reconstruction des historiques de vie des individus sera présentée.

1. Caractéristiques des sites et de la population d'anguilles d'intérêt

1.1. Sites d'études

Les objectifs principaux de ce travail étaient, comme explicités précédemment, d'évaluer le comportement des anguilles dans le périmètre estuarien de la zone saline à la zone fluviale tout en regardant l'importance et les effets potentiels de la pression chimique. Par conséquent, le choix des sites s'est porté sur quatre secteurs connus pour accueillir l'espèce et présentant des caractéristiques différentes en termes d'anthropisation et de caractéristiques physico-chimiques. Ainsi un site à dominance saline a été retenu dans la partie aval de l'estuaire, proche de l'embouchure (Redon) (Fig. 1). A l'opposé, trois sites avec une influence fluviale à faiblement saline ont été choisis dans la partie haute de l'estuaire. Parmi ces trois sites et compte tenu de l'importance écologique et socio-économique des Barthes, deux ont été retenus dans ces zones humides (Estey de Loustaounaou, rive droite de l'Adour) et à proximité (Termi, rive gauche de l'Adour). Par ailleurs, ces sites ont constitué les deux zones d'étude du projet « Zones Humides » dans lequel s'inscrit également cette thèse. Ce volet du GDR Adour, financé par l'IFOP (Instrument Financier d'Orienté de la Pêche), visait à établir les pressions anthropiques et l'évolution des habitats de l'anguille européenne au travers d'une étude des deux types d'habitats, l'un situé dans une zone naturelle, l'autre dans une zone plus ou moins cultivée.

Cette partie avait pour but de déterminer l'évolution de l'usage des sols sur les deux rives, de mettre au point des outils moléculaires permettant de mesurer les flux et les effets des contaminants sur la physiologie des anguilles et enfin caractériser les populations et comparer les deux habitats. Parallèlement, l'échantillonnage du site aval (Redon) rentrait dans le cadre d'un programme de recherche régional sur le transfert de matière à l'océan financé par le CEPB (Conseil des Elus du Pays Basque).

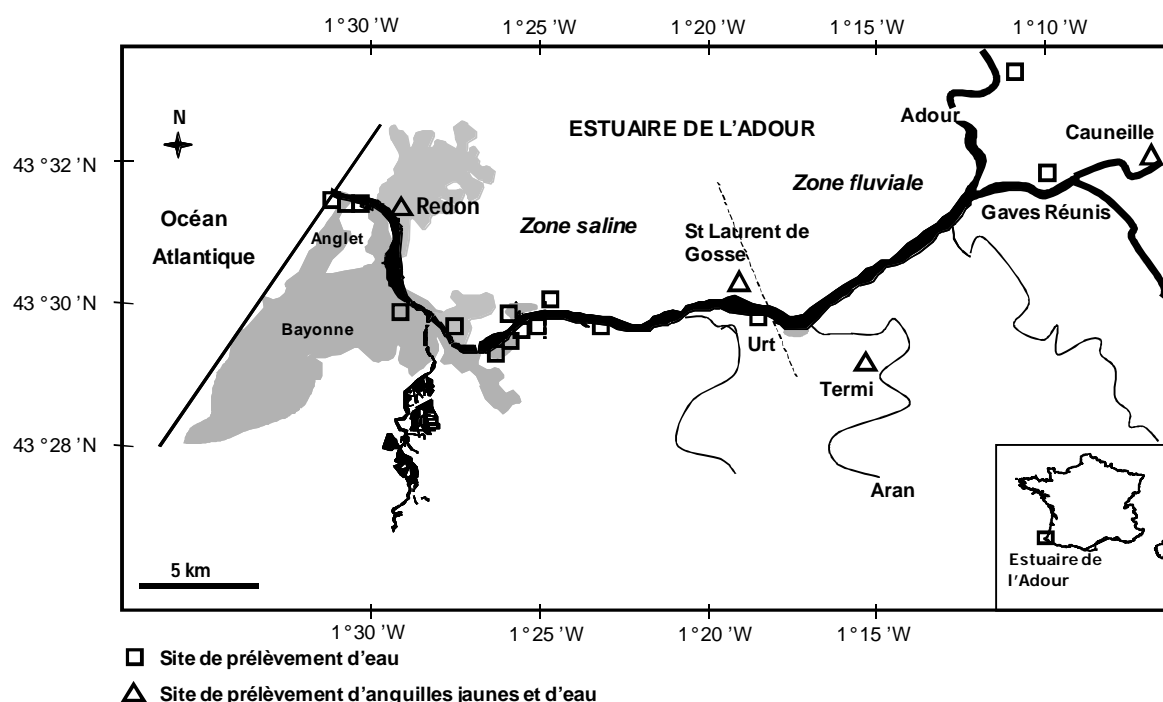


Figure 1. Carte des sites choisis sur le bassin de l'Adour pour le prélèvement des anguilles jaunes et des échantillons d'eau. La ligne en pointillé indique la limite de l'influence de la marée saline.

1.1.1 Les zones humides

➤ L'Estey de Loustaounaou et l'Estey de Montpellier

Les esteyes sont les premiers canaux à avoir été creusés dans les plaines inondables de l'Adour. Leur rôle est de capter les eaux de ruissellement (sources, pluie et eaux résiduelles) et de les conduire vers l'Adour tout en évitant qu'elles ne s'épandent dans la barthe.

L'Estey de Loustaounaou est situé sur la rive droite de l'Adour sur la commune de St Laurent de Gosse (SLG) (Fig. 1). Il s'agit d'un canal traversant les barthes maritimes relié directement à l'Adour par une porte à flot en bois, plus ou moins étanche du fait de sa vétusté. Il est soumis à l'influence de la marée et reçoit les eaux mélangées issues du bassin versant de l'Adour dans son ensemble. Il traverse en amont des parties boisées et une tourbière, tandis que dans les 200m de la partie aval, il traverse une zone cultivée saisonnièrement par du maïs. Le fond du canal est généralement sableux mais il subit un envasement continu nécessitant un curage régulier. Pendant la période prévue pour l'échantillonnage, un curage a été réalisé en avril 2006. L'échantillonnage a donc eu lieu sur un canal présentant des caractéristiques strictement identiques (Estey de Montpellier) situé à 300m en amont de l'Estey de Loustaounaou.

Le recensement piscicole effectué par l'ONEMA et MIGRADOIR, a montré un fonctionnement plutôt perturbé du système illustré par la variabilité de la diversité spécifique (5 à 12 espèces en fonction de la campagne d'échantillonnage). Par ailleurs la biomasse piscicole totale était faible (142 kg.ha⁻¹). L'anguille y a été retrouvée dans des densités (0 à 5598 individus.ha⁻¹) et des tailles très variables (de l'alevin à 56cm). Après le curage d'avril une centaine d'anguillettes (6-11cm) ont été retrouvées. En revanche, l'anguille était absente sur l'Estey de Montpellier en avril 2006 (seulement deux individus de petite taille recensés) et sur l'Estey de Loustaounaou en octobre 2006 (Caill-Milly, 2007).

➤ Le ruisseau du Termi

Le ruisseau du Termi est situé sur la rive gauche de l'Adour sur la commune de Bardos (Fig. 1). Ce tributaire, issu de résurgences des coteaux bordant l'estuaire, se jette dans l'Aran, affluent de l'Adour à moins d'un kilomètre du point de prélèvement. Il ne subit que très faiblement l'influence de la marée dynamique et est majoritairement sous influence de son bassin versant. Son parcours méandreux lui fait traverser, à Bardos et à Guiche, une zone de coteaux. Contrairement au site précédent, il est rarement entouré de cultures céréalières mais borde l'autoroute Pau-Bayonne sur une partie de son cours.

Ce cours d'eau de 4,7km est le seul sur la rive gauche à ne pas présenter d'aménagement de type porte à flot ou clapet à marée qui pourrait entraver la remontée des anguilles. Au niveau du site de prélèvement, le fond du ruisseau est surtout composé de cailloux, de blocs avec formation de petits radiers. Ce faciès s'accompagne de berges bien pentues et ombragées du fait de la présence d'arbres, d'arbustes et de deux ponts. Par ailleurs il n'est que très peu soumis à l'envasement.

12 à 17 espèces piscicoles ont été recensées lors des opérations menées par l'ONEMA et MIGRADOIR. Ces derniers ont observé une relative stabilité du système avec un peuplement mixte à composante salmonicole et cyprinicole conforme à ce type de milieu très peu soumis à l'influence de la marée. La composante salmonicole et plus particulièrement la présence d'épinoche marque la nature des eaux de source du ruisseau. L'observation de flets, mulets, gambusies et d'anguilles signale également le caractère estuarien du site. Dans le cas des anguilles, des densités moyennes mais régulières (1356 à 2254 individus.ha⁻¹) ont été observées, avec des classes de taille similaires à chaque campagne de recensement (de 7 à 35cm) (Caill-Milly, 2007).

1.1.2 L'estuaire salin : zone du Redon

L'estuaire de l'Adour est un estuaire macrotidal (3-5m) ouvert sur le golfe de Gascogne, et peu turbide (teneur moyenne en matière en suspension : 10mg.l⁻¹). Il subit une forte influence continentale puisque l'influence marine ne représente que 20 à 25% du volume total de l'estuaire en moyenne, ce qui limite les effets dynamiques de la marée. Les débits moyens liquides d'eau douce entrant dans la zone estuarienne varient de 60 à 1800 m³.s⁻¹ en fonction des conditions hydrologiques (crues, étiages), avec une moyenne de 255 m³.s⁻¹ soit le 5^e rang français après le Rhône, la Seine, la Garonne et la Loire. La zone de mélange entre les eaux douces et les eaux salées (25km) située entre l'embouchure (pK135) et le pK110 est soumise à l'influence anthropique (Point, 2004).

Les estuaires sont des lieux subissant non seulement l'influence des activités anthropiques locales, mais ils sont également un véritable réceptacle des eaux contaminées provenant de l'ensemble des activités des bassins versants qui les alimentent. Ce sont aussi des zones caractérisées par de forts gradients physico-chimiques où de nombreux processus biogéochimiques interviennent aux niveaux du comportement des contaminants. Dans la mesure où l'anguille a été montrée comme ayant la capacité d'effectuer la totalité de sa croissance en milieu estuarien ou côtier, il était important de pouvoir avoir une idée de la pression chimique qui pouvait s'exercer sur la ressource dans ce milieu. Ainsi, grâce au concours des pêcheurs professionnels de l'estuaire, 15 anguilles jaunes ont pu être pêchées par nasse en juillet 2005, et 5 anguilles jaunes en juillet 2007 dans l'estuaire au niveau de la zone du Redon. Cette zone se situe à proximité de l'embouchure de l'estuaire (Fig. 1) et est largement sous influence marine. La salinité y est souvent comprise entre 10 et 20 (psu), mais peut monter jusqu'à 25-35 en fonction des coefficients de marée et des conditions hydrologiques (crue, étiage).

1.2.2 Le Gave de Pau : Cauneille

Le Gave de Pau représente une part importante des apports métalliques à l'estuaire (22%, voir chapitre 1) du fait de la présence de nombreuses activités chimiques, pétrolières, d'agglomérations de taille moyenne et de l'héritage d'anciennes activités minières. L'anguille est présente dans la partie aval de cet affluent principal de l'estuaire de l'Adour. Recueillir certains individus vivants dans ce tributaire pouvaient constituer ainsi une bonne opportunité de comparaison entre les sites des zones humides, de l'estuaire et ce site connu pour avoir une signature métallique importante. Un seul échantillonnage de 6 individus a été possible le 10 octobre 2006 sur la commune de Cauneille. Le point d'échantillonnage est localisé à environ 600m en amont du bourg de Cauneille.

1.2. Caractéristiques de l'échantillonnage biologiques

1.2.1 Période et méthodes d'échantillonnage

La stratégie d'échantillonnage découle des études de dynamique de population effectuées par le LRHA (Prouzet, 2002). Les périodes de prélèvement ont été déterminées en fonction des phases de colonisation-sédentarisation-dévalaison de l'anguille, et des périodes spécifiques aux pratiques agricoles (culture du maïs, irrigation, traitements phytosanitaires) (Tableau 1), elles correspondent aux mois d'avril, juillet et octobre. Le prélèvement des anguilles a été réalisé par pêche électrique au niveau de l'Estey de Loustaounaou, du ruisseau du Termi et de Cauneille par les agents de l'ONEMA et MIGRADOUR et par pêche à la nasse dans l'estuaire aval avec le concours des pêcheurs professionnels de l'estuaire.

Tableau 1. Périodes spécifiques d'usage des sols et phases migratoires de l'anguille européenne sur le bassin de l'Adour.

Mois	O	N	D	J	F	M	A	M	J	Jt	A	S	O	N	D
Culture maïs															
Irrigation															
Traitements phytosanitaires															
Colonisation															
Sédentarisation															
Dévalaison															

1.2.2 Caractéristiques de la population échantillonnée

L'étude ne ciblait que l'anguille jaune qui représente le stade de croissance durant laquelle l'anguille va constituer ses stocks lipidiques en vue de sa maturation, sa dévalaison, sa migration transocéanique et sa reproduction. C'est également durant cette phase que l'anguille va être confrontée aux problèmes d'accessibilité aux habitats (barrages, turbines,...) et subir la pression chimique résultant des activités anthropiques environnantes et pouvant altérer la qualité biologique des futurs géniteurs. L'échantillonnage devait répondre à deux critères principaux : représenter la population d'anguilles jaunes en place sur les différents sites choisis et permettre les analyses chimiques et moléculaires prévues. Selon les préconisations du Cemagref (Lambert et Rigaud, 1999), suivies par le réseau anguille sur le bassin de l'Adour (Marty, 2005), il existe cinq classes de taille pertinentes pour l'interprétation des résultats de pêche électrique effectuées entre mai et octobre en France en milieu dulçaquicole. Une signification biologique correspond à chacune de ces classes (Tableau 2).

Tableau 2. Classes de taille (cm) préconisées par Lambert et Rigaud (1999) et correspondance biologique.

Classe de taille (cm)	Correspondance biologique
] 5 ; 15[Civelle et jeune anguille jaune de 1 été
[15 ; 30[Anguille jaune non sexuellement différenciée d'au moins 2 étés
[30 ; 45[Anguille mâle jaune et argentée, femelle jaune
[45 ; 60[Anguille femelle jaune et argentée, anguille mâle présentant un retard dans sa migration génésique (minoritaire)
[60 ; 120[Anguille femelle présentant un retard dans sa migration génésique et dont la sédentarisation est possible

Les échantillonnages visaient à prélever au minimum 3 à 5 individus de chacune de ces classes en fonction des disponibilités sur site. Seule la classe]5 ; 15] cm, qui regroupait des individus présentant des quantités de tissus trop faibles pour les analyses, n'a pas été échantillonnée. En effet, d'un point de vue analytique, nous avons préféré exclure, de manière arbitraire, cette classe de taille et privilégier la variabilité inter individuelle plutôt que de réaliser une analyse globale sur des pools d'individus. Sur les sites dulçaquicoles, la totalité des anguilles prélevées pour le recensement piscicole ont été mesurées et pesées. Suite à ces mesures biométriques, 3 à 5 individus de chaque classe ont été choisis. Seule l'appartenance à une classe de taille a été prise en compte pour le choix des individus. Dans le cas du site estuarien (Redon), ce choix a été difficile à mettre en œuvre car les anguilles ont été obtenues grâce aux pêcheurs professionnels qui ont eux-mêmes effectué une sélection lors de la relève des nasses. La table 3 récapitule les effectifs prélevés pour chaque site et campagne d'échantillonnage. Sur l'ensemble de l'étude, 114 anguilles jaunes ont été récupérées.

Tableau 3. Effectifs des anguilles jaunes prélevées à chaque campagne d'échantillonnage.

Site/Date	05/07/05	20/10/05	11/04/06	25/07/06	16/10/06	03/05/07	02/07/07	Total
Estey de Loustaounaou	-	12	-	10	0	1	0	23
Estey de Montpellier	-	-	0	-	-	-	-	0
Ruisseau du Termi	-	-	16	17	12	10	10	65
Cauneille (Gave de Pau)	-	-	-	-	6	-	-	6
Redon (Estuaire)	15	-	-	-	-	-	5	20
Total	15	12	16	27	18	11	15	114
% de l'effectif total	13	10	14	24	16	10	13	100

Les anguilles jaunes présentes sur les sites de l'Estey de Loustaounaou (SLG), Termi et Cauneille appartenaient en majorité aux classes de taille [15 ; 30[et [30 ; 45[. En 2004, ces deux classes de taille étaient également majoritaires sur l'ensemble du réseau anguille mis en place sur le bassin de l'Adour. L'échantillonnage reflète cette tendance (Fig. 2). Sur le site estuarien (Redon), les anguilles fournies par les pêcheurs professionnels sont de tailles plus importantes et sont réparties de manière sensiblement équivalente dans les classes [30 ; 45[et [45 ; 60[cm.

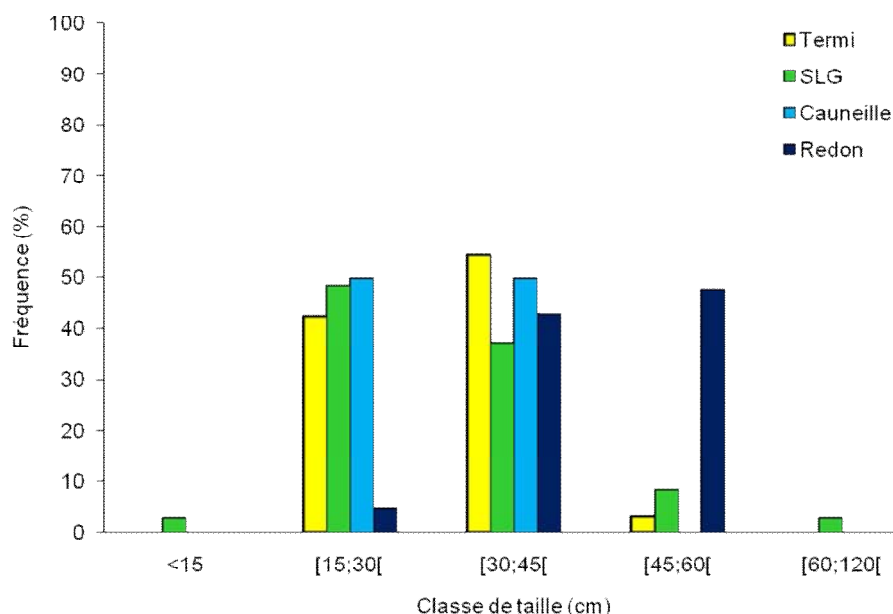


Figure 2. Fréquence des effectifs (%) d'anguilles jaunes échantillonnées par site et classes de taille (cm). SLG : Estey de Loustaounaou.

Sur les sites dulçaquicoles, les individus choisis, préalablement anesthésiés à l'eugénol, sont sacrifiés par section de la tête. Le foie est retiré et une partie de cet organe, ou l'organe entier si l'individu est très petit, est récupéré rapidement et placé dans un tube cryogénique dans de la carboglace (Cryoexpress, France). Cette précaution est indispensable à la conservation de l'intégrité des ARN qui serviront à l'étude de l'expression du gène *CYP1A1*. La partie du foie restante est placée dans un tube 10ml, décontaminé auparavant à l'acide, et conservée dans de la glace avec le reste de l'individu. Au laboratoire, les échantillons destinés aux analyses de biologie moléculaire sont placés à -80°C, tandis que les échantillons destinés aux analyses chimiques sont placés à -20°C. Le lendemain les individus sont disséqués, plus particulièrement les otolithes sagittaux sont extraits et nettoyés selon le protocole décrit dans la partie 4 de ce chapitre. Les tissus mous obtenus sont conservés à -20°C en attendant les analyses chimiques. Les individus prélevés par les pêcheurs professionnels dans la zone du Redon n'ont pas pu être disséqués sur place. De plus, la méthode de prélèvement et de conservation des individus sur le bateau avant débarquement pouvait laisser supposer un stress important des individus qui aurait pu biaiser l'interprétation des données d'expression du gène *CYP1A1*. Ces individus ont donc été exclus des analyses moléculaires.

La différenciation sexuelle des anguilles débute fréquemment pour des anguilles dont la taille est comprise entre 15 et 25 cm. Cependant, certains individus d'une taille supérieure à 35 cm peuvent être sexuellement indifférenciés (Rigaud *et al.*, 2008). Lorsque le sexe n'est pas clairement différencié les gonades se présentent comme deux filaments translucides et sans structures particulières à l'œil nu. La détermination macroscopique du sexe peut être confirmée par un examen histologique ou biochimique. Cependant, dans le cadre de notre étude, pour des raisons techniques nous avons choisi de ne pas prendre en compte le sexe des individus.

2.1.2. Échantillonnage d'eau

De façon à relier les informations chimiques et moléculaires obtenues sur les anguilles, il convenait de caractériser chimiquement l'environnement dans lequel elles évoluent. Cette caractérisation, notamment sur l'ensemble du gradient salin de l'Adour, est essentielle pour l'interprétation des signatures élémentaires de l'otolithe et la discrimination des signatures liées uniquement aux conditions environnementales (salinité, processus géochimiques). Par ailleurs, la stabilité de chaque environnement a été caractérisée.

Des données étaient déjà disponibles, en particulier sur le gradient salin et les tributaires principaux. Le LCABIE travaille en effet sur la distribution et le comportement des éléments traces métalliques (ETM) depuis 1998. Les données issues de mesures relatives à ces recherches (non publiées pour certaines) et des travaux de thèse de D. Point (2004) ont donc été utilisées. Néanmoins, certains éléments présentant un intérêt vis-à-vis de leur présence dans les otolithes (Sr, Ba) n'avaient été analysés que rarement lors des campagnes précédentes. D'autre part, aucune donnée n'était disponible sur les deux zones humides étudiées dans le cas présent. Aussi, quatre campagnes de prélèvements ont été réalisées entre 2007 et 2008 : deux couvrant le gradient salin et les deux zones humides réalisées dans le cadre de cette thèse, et deux autres sur la partie aval de l'estuaire jusqu'à la zone côtière effectuée par une autre équipe du laboratoire.

Les deux échantillonnages réalisés sur l'Estey de Loustaounaou, Termi et le long du gradient salin, se sont déroulés lors des faibles débits d'été (Adour : $89 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$) le 5 septembre 2007, et le 26 juin 2008, lors de débits plus importants de printemps (Adour : $272 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$). Dans le cas du gradient salin, 19 points ont été échantillonnés de la partie amont (Peyrehorade) à l'embouchure de l'estuaire (Anglet) (Fig. 1).

D'autre part, nous nous sommes également appuyés sur les données provenant d'un échantillonnage haute fréquence effectué sur le Gave de Pau dans le cadre d'un autre projet (Projet Gave de Pau). Ce suivi a été conduit à raison d'un prélèvement par semaine, de mars à octobre 2007. Cette fréquence visait à suivre, sur un tributaire majeur de l'Adour, l'évolution de la chimie de l'eau pendant un cycle hydrologique annuel avec des débits variant de $28 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ à $219 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$. Enfin, les deux campagnes ciblant la partie aval de l'estuaire et la zone côtière adjacente ont été menées en avril et juillet 2007. Ces prélèvements ont été focalisés sur le panache de l'estuaire dans le cadre d'un projet d'évaluation des flux de contaminants métalliques à la côte par l'estuaire.

A chaque station, la température, la conductivité et le pH sont mesurés grâce à une sonde multiparamètres (NEOTEK-PONSEL Aquaclip 3000) et son terminal d'acquisition (Actéon 3000). Chaque échantillon est prélevé directement sous la surface de l'eau et est conditionné selon un protocole ultra propre (Point *et al.*, 2007). L'ensemble du matériel utilisé subit auparavant une décontamination par bains successifs d'acide nitrique HNO_3 (10%) (J.T. Baker, Suprapur). 50ml d'eau sont prélevés à l'aide d'une seringue et sont filtrés sur un filtre PVDF $0,45 \mu\text{m}$ (diamètre 25 mm, Millipore). Ils sont ensuite récupérés dans un tube 50ml et stabilisés avec 1% d' HNO_3 (J.T. Baker, Ultrex) avant d'être conservés sous double poche hermétique à 4°C .

2. Caractérisation chimique des milieux

Les éléments et composés analysés peuvent être séparés en deux groupes :

- les éléments et composés pouvant signaler une influence anthropique (métaux lourds, composés organochlorés)
- les traceurs géochimiques (Sr, Ba, Ca) qui marquent essentiellement des masses d'eau ou leur mélange.

Dans le cadre de cette thèse, seule la caractérisation chimique inorganique du milieu a été réalisée. Concernant les composés organiques et organométalliques, nous nous sommes basés sur les données déjà existantes sur l'estuaire et le bassin de l'Adour (Trut et Mayeur, 2004 ; Stoichev *et al.*, 2004 ; Budzinski, comm. pers.).

Les échantillons d'eau prélevés sur chaque site et le long du gradient sont analysés par spectrométrie de masse à plasma induit (ICP-MS) à l'aide d'un ICP-MS Thermo elemental series X7 CCT (Thermo Electron, Windsford, UK). L'ICP-MS est une technique d'analyse multi élémentaire (de 40 à 60 éléments pouvant être analysés simultanément) plutôt récente (1983) dont les performances en terme de sensibilité ($1 < LD < 10 \mu\text{g.g}^{-1}$), de sélectivité et de rapidité en font une technique de choix pour l'analyse des éléments traces en particulier dans des matrices environnementales. L'échantillon liquide est introduit sous forme d'aérosol dans le système grâce à un nébuliseur. Un plasma d'Argon (Ar) atomise et ionise l'échantillon. Les ions sont ensuite dirigés vers le spectromètre de masse à l'aide d'une interface, formée par deux cônes successifs, ici en Ni. Des lentilles ioniques permettent de focaliser le faisceau d'ions divergents avant son introduction dans le filtre de masse (quadrupole). Les ions sont sélectionnés en fonction de leur rapport masse/charge (M/Z) et détectés par un multiplicateur d'électron (Fig. 3).

Dans le cas d'une analyse en ICP-MS quadripolaire, des interférences spectrales peuvent intervenir, par exemple lorsque deux ions élémentaires ont une même charge nominale m/Z (ex : $^{92}\text{Zr}^+$ et $^{92}\text{Mo}^+$) ou encore quand un ion polyatomique présente un rapport m/Z identique à celui de l'isotope à analyser (ex : $^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}^+$ et ^{56}Fe). Ces interférences peuvent être causées par le plasma d'Ar, le solvant, l'air, les acides, les oxydes stables et les ions doublement chargés. Pour éviter de prendre en compte un élément qui serait interféré, plusieurs isotopes d'un même élément sont analysés.

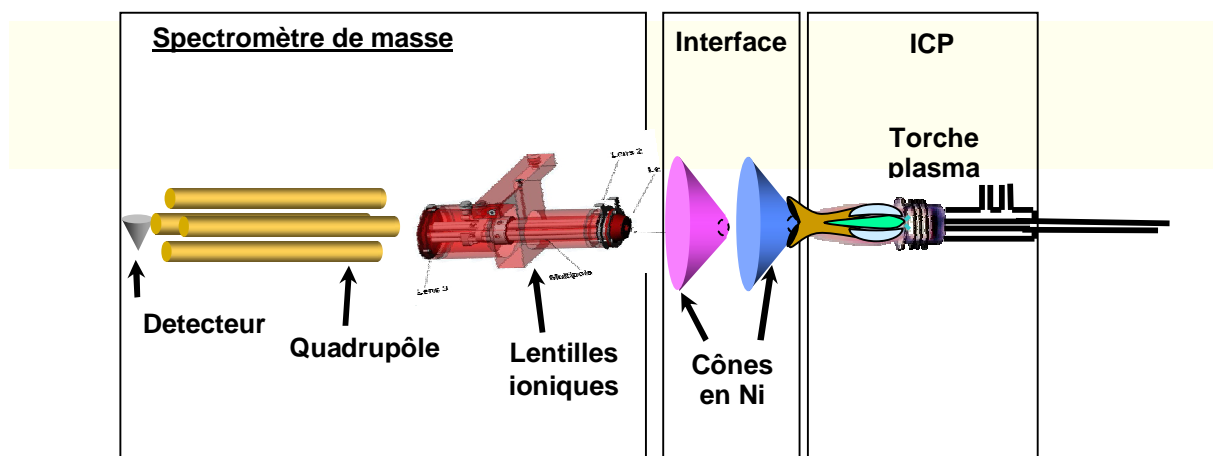
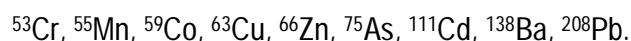


Figure 3. Schéma général d'un spectromètre de masse à plasma induit (ICP-MS).

Les rapports isotopiques de chaque élément sont calculés et comparés aux rapports théoriques. Seuls les isotopes pour lesquels les rapports isotopiques sont comparables aux rapports isotopiques théoriques sont conservés. L'isotope le plus abondant est alors retenu pour le reste des analyses. Les isotopes conservés dans notre caractérisation des eaux sont les suivants :



Avant l'analyse, les échantillons salins sont dilués de façon à obtenir une salinité finale de 2‰ permettant de réduire les interférences liées à la salinité. Cependant, l'analyse des éléments traces en milieu salin reste un challenge. Au laboratoire, des recherches ont été réalisées visant à mettre au point une méthodologie pouvant permettre une analyse multi-élémentaire simple de ce genre de matrice. Cette méthodologie, basée sur l'utilisation de l'ICP-MS, d'une cellule de collision et l'introduction d'eau saline certifiée simultanément à l'échantillon, a notamment permis d'obtenir des données sur la partie aval de l'estuaire (Pinel-Raffaitin, comm.pers.).

Dans le cas des échantillons faiblement salins et dulçaquicoles, la matrice est analysée selon les protocoles classiques d'analyse des liquides par ICP-MS. Pour l'ensemble de nos prélèvements, une solution d'Indium est ajoutée à chaque échantillon (concentration finale : $2\mu\text{l.l}^{-1}$) afin de suivre une éventuelle dérive du signal au cours de l'analyse. Compte tenu des fortes concentrations le Ca, le Sr et le Mg sont analysés par ICP-AES (spectromètre d'émission atomique à plasma induit) (PANORAMA, Horiba Jobin Yvon). Le principe de l'ICP-AES, technique adaptée pour la mesure des éléments majeurs, repose sur le fait que les électrons des atomes excités (ionisés), lorsqu'ils retournent à l'état fondamental, émettent un photon dont l'énergie est caractéristique de l'élément. La lumière émise par le plasma est analysée par un réseau polychromateur. La lumière émise par l'élément recherché est alors

détectée et mesurée, et son intensité comparée à celle émise par le même élément contenu par les solutions constituant la gamme étalon. Les performances analytiques des deux méthodes (ICP-MS et ICP-AES) sont contrôlées en utilisant les solutions certifiées SLRS-4 (eau de rivière certifiée, NRCC, Canada) et CASS-4 (eau côtière certifiée, NRCC, Canada). Des blancs (eau MilliQ 18,2MΩ acidifiée à 1%) sont traités de la même façon que les échantillons et analysés afin de pallier à toute contamination extérieure à ces derniers.

3. Recherche de la pression chimique et de la réponse moléculaire au stress chimique de l'anguille

3.1. Analyse chimique des tissus mous

Cette analyse vise à répondre à deux questions principales :

- Quelles sont les voies d'exposition des anguilles jaunes aux contaminants, en particulier les contaminants inorganiques ?
- Quelle est la pression chimique inorganique et organique s'exerçant sur ces individus ?

Pour tenter d'apporter des éléments de réponse, nous nous sommes intéressés à trois organes principaux :

- Les branchies : il s'agit de la première barrière physiologique (avec le tégument) entre le milieu et l'organisme. Elles représentent donc un bon indicateur de l'exposition ponctuelle de l'individu par voie directe c'est-à-dire par respiration
- Le foie : ses fonctions de détoxification et de stockage des contaminants en font un bon indicateur d'exposition en particulier à des contaminations chroniques non seulement par voie directe mais également par voie indirecte (trophique)
- Le muscle : sa quantité de graisse importante en fait un organe privilégié pour le stockage des contaminants lipophiles (mercure, contaminants organiques...). Par ailleurs, il peut être consommé et est donc un indicateur du risque sanitaire encouru par le consommateur en cas de contamination.

Ces trois organes sont donc prélevés sur chaque individu. Le prélèvement est réalisé à l'aide d'outils préalablement nettoyés à l'acide et rincés à l'eau MilliQ (18,2M Ω) et de gants afin de prévenir au maximum toute contamination. Les échantillons sont placés dans des tubes de 10ml ayant subi également une décontamination (acide, eau MilliQ).

Les contaminants inorganiques (métaux) ont été examinés au LCABIE sur ces trois compartiments tandis que les composés du mercure (inorganique, méthylmercure) ont été analysés uniquement dans les muscles d'un nombre limité d'échantillons de la zone humide St Laurent de Gosse et l'estuaire aval. Les composés organochlorés ont portés eux aussi sur un nombre limité d'échantillons de foie et de muscle, la quantité d'échantillon étant limitante vis-à-vis des nombreuses analyses effectuées sur un même individu (métaux, spéciation du mercure, analyse des organochlorés, biologie moléculaire), mais également en raison du coût des analyses effectuées par le LPTC de Bordeaux (Laboratoire de Physico-Toxicolo-Chimie des Systèmes Naturels).

3.1.1 Analyse des contaminants inorganiques

➤ Préparation des échantillons

Afin de déterminer les concentrations en éléments traces des tissus précédemment cités, les organes sont lyophilisés (48h à -45°C) puis broyés et homogénéisés au mortier. La deuxième étape consiste en la minéralisation des échantillons. 200mg de tissu broyé sont dissous par ajout de 2ml d'acide nitrique (HNO₃, J.T. Baker, Ultrex) pendant 24h puis par ajout d'1ml d'eau oxygénée (H₂O₂, J.T. Baker, Ultrex). L'ensemble est ensuite placé sur un système chauffant (Digiprep, SCP-Sciences) dans lequel il subit une digestion selon des conditions de température contrôlées (rampe de 20°C à 80°C en 30min, palier à 80°C pendant 120min). Le tout est ramené à sec (75°C pendant 30 min) et repris dans 10ml d'acide nitrique Ultrex 2% (J.T. Baker). Les 10ml sont ensuite conservés dans des tubes 10ml décontaminés. Le même protocole est appliqué pour des blancs (traitement sans échantillon) et pour des matériaux de référence : DORM-2 (CNRC, Canada ; muscle d'aiguillat *Squalus acanthias*) pour la validation des données de muscle, et DOLT-3 (CNRC, Canada ; foie d'aiguillat) pour la validation des données de foie d'anguille. Chaque échantillon est traité en duplicat et analysé à l'aide d'un ICP-MS de type ELAN 6000 (Perkin Elmer) en ajustant la concentration des échantillons par dilution avec de l'acide nitrique à 1% si nécessaire. Les isotopes retenus pour ces analyses sont les suivants :

⁵⁹Co, ⁶⁰Ni, ⁶³Cu, ⁷⁵As, ⁶⁶Zn, ⁸⁶Sr, ¹⁰⁹Ag, ¹¹¹Cd, ¹³⁸Ba, ²⁰⁸Pb.

L'anguille est un poisson présentant de grandes réserves lipidiques, de ce fait elle a la capacité d'accumuler dans ses tissus, en particulier le muscle, des polluants lipophiles comme le mercure. Si l'analyse du mercure total dans les tissus renseigne sur une contamination globale du système, elle ne donne cependant aucune information sur le risque toxicologique liée à la forme la plus toxique du mercure à savoir le méthylmercure. Les données existantes sur la spéciation du mercure chez l'anguille sont rares et chez l'anguille européenne inexistantes. Il était donc intéressant d'examiner cet élément et sa spéciation chez l'anguille. La spéciation du mercure nécessite l'utilisation de techniques analytiques spécifiques qu'il nous était difficile de mettre en œuvre compte tenu des développements en cours pour la microchimie de l'otolithe. Le cas du mercure a donc été traité individuellement lors d'un stage de Master (Ina Arleny) en étroite collaboration avec l'équipe spécialiste du mercure au LCABIE.

Les anguilles issues des premières campagnes d'échantillonnage sur St Laurent de Gosse et l'estuaire ont été analysées en vue de la spéciation du mercure. Cette partie a fait l'objet d'un article (Arleny *et al.*, 2007) présenté au chapitre 4 de ce manuscrit. Brièvement, le muscle lyophilisé et homogénéisé sont digérés dans de l'hydroxyde tetraméthylammonium (TMAH) à l'aide d'une extraction par micro-onde (70°C pendant 4 minutes). Le pH de l'extrait obtenu est ajusté à pH=4 avec une solution tampon d'acide acétique/sodium acétate. Les espèces mercurielles sont ensuite dérivatisées à l'aide de sodium tetrapropylborate (NaBPr₄) après addition de d'éthylmercure comme standard interne et 5 minutes de mélange mécanique. Elles sont finalement extraites dans de l'isooctane et analysées par GC-ICP-MS (chromatographie en phase gazeuse –spectrométrie de masse à plasma induit) et GC-MIP-AED (chromatographie en phase gazeuse – détection par émission atomique à plasma induit par micro-onde). Les méthodologies sont validées par analyse de matériel de référence certifiée DORM-2 (CNRC, Canada).

3.1.2 Analyse des contaminants organiques

L'analyse des contaminants organiques et plus particulièrement des pesticides, PCBs et PBDEs nécessitait une méthodologie non disponible au LCABIE. C'est pourquoi nous avons fait appel aux compétences du LPTC de Bordeaux (Laboratoire de PhysicoToxico Chimie des systèmes naturels). Seuls le foie et les muscles ont été analysés. Cette partie a été réalisée après les analyses des éléments traces. La quantité de tissu ayant été limitante chez certaines anguilles, seulement quelques individus provenant des trois sites principaux ont pu être sélectionnés, tout en tenant compte de l'ensemble des données déjà disponibles, et traités (Table 4).

Tableau 4. Effectif d'anguilles jaunes traitées dans le cadre des analyses des composants organiques dans le muscle (M) et le foie (F). SLG : Estey de Loustaounaou.

Site	Organe	PCBs+PBDEs	OCPs
SLG	M	6	6
	F	6	6
Termi	M	6	7
	F	3	3
Redon	M	3	3
	F	1	1

Les composés ciblés ont été choisis en fonction des connaissances acquises sur l'estuaire (chapitre 1), de leur utilisation connu dans le bassin versant de l'Adour, de leur persistance dans l'environnement, de leur capacité à être bioaccumulés dans les organismes et de leurs effets (cancérogènes, perturbateurs endocriniens, atteintes hépatiques...). Parmi les PCBs, 7 congénères décrits comme étant des congénères indicateurs couramment retrouvés dans la littérature ont été analysés (50+28, 52, 101, 118, 153, 138, 180). Ces congénères sont reconnus comme étant représentatifs de l'ensemble des PCBs du fait de leur prédominance dans les matrices biotiques et abiotiques (ATSDR, 2000). Le lindane et 13 composés organochlorés persistants (OCPs) viennent compléter la liste des contaminants organiques recherchés : HCB, Heptachlor, Aldrin, Hepoxide, 2,4' DDE, Cis Chlordane, Trans Nonachlor, 4,4' DDE, Dieldrin, 2,4' DDD, 2,4' DDT, 4,4' DDT.

3.2. Mesure de l'expression hépatique du gène *CYP1A1* par RT-PCR quantitative

Le foie est le site majeur d'expression de nombreuses enzymes de détoxification de phase I dont *CYP1A1*. Les analyses se sont donc portées sur cet organe, extrait sur le site d'échantillonnage et placé à -80°C pour assurer l'intégrité des ARN. L'évaluation de l'expression du gène *CYP1A1* nécessitait l'utilisation d'une méthodologie sensible et demandant une faible quantité de tissu. La RT-PCR en temps réel (real-time Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction) présente de telles caractéristiques (Campbell et Devlin, 1996) et est une des méthodes les plus performantes utilisées pour l'évaluation de l'expression des gènes de poisson (Tom et Auslander, 2005). Elle a notamment été utilisée pour quantifier l'ARNm *CYP1A1* chez des salmonidés (Chung-Davidson *et al.*, 2004), chez le flet (Dixon *et al.*, 2002 ; George *et al.*, 2004) et surtout chez l'anguille européenne (Aubry *et al.*, 2007a,

b). L'ensemble des campagnes d'échantillonnage n'a pas pu être couvert par ces analyses. Les foies des campagnes d'octobre 2005 et 2006 n'ont pas pu être conservés dans de la carboglace ou de l'azote liquide et ont donc été exclus. En tout, les foies de 49 individus provenant de Termi et de l'Estey de Loustaounaou ont subi le premier traitement visant à en extraire les ARN totaux.

3.2.1. Extraction et quantification des ARN totaux

Environ 50 mg de foies congelés sont placés individuellement dans des tubes RNase free (SafeLock Eppendorf) avec une bille de 5mm de diamètre en acier inoxydable traitées au DEPC (DiethylenePyrocarbonate, inactivateur des RNases). Ils sont alors placés dans broyeur MM 300 Mixer Mill (Qiagen) où ils subissent quatre broyages à froid successifs (30 Hz, 30 sec) alternés par des périodes de congélation afin de garantir l'intégrité des ARN. Le broyat obtenu est ensuite homogénéisé dans 500µl de TRIzol (Invitrogen). Les ARN totaux sont ensuite extraits selon les recommandations du fabricant. Le protocole consiste en plusieurs traitements successifs au TRIzol, au chloroforme, isopropanol et éthanol. L'extrait est finalement repris dans de l'eau RNase free. La qualité des échantillons est vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose à 1% en contrôlant l'intégrité des bandes 28S et 18S.

La quantification des ARN totaux est effectuée à l'aide du RiboGreen RNA Quantitation Reagent And Kit (Invitrogen). Une gamme étalon et la quantification sont réalisées à partir d'une solution d'ARN standard selon les recommandations du fournisseur. Les quantités sont obtenues par lecture des microplaques d'échantillons sur MxPro3005 (Stratagene) ($\lambda_{Exc}=480nm$; $\lambda_{Em}=520nm$). La transcription inverse nécessitant environ 2µg d'ARN totaux, les échantillons présentant des quantités plus faibles sont écartés du reste de l'analyse. 38 échantillons sont conservés pour l'étape suivante.

3.2.2. Transcription inverse

L'équivalent de 2,5 µg d'ARN totaux dans un volume final de 22 µl est dans un premier temps traité à la TurboDNase (3 µl/tube, 30min, 37°C). La DNase est ensuite inactivée par ajout de 2,5 µl de DNase Inactivation Reagent (2min à température ambiante). Deux transcriptions inverses sont réalisées à partir de chaque échantillon d'ARN totaux à l'aide du iScript cDNA Synthesis Kit (BioRad). 10 µl de l'échantillon traité sont placés dans un tube PCR Rnase free . 10µl de mix RT comprenant 4 µl de iScript Reaction Mix (tampon RT, mix de dNTP, RT primer), 1µl de iScript Reverse Transcriptase et 5 µl d'eau RNase free sont ajoutés.

Un blanc RT est également préparé en remplaçant les 1µl de reverse transcriptase par 1µl d'eau RNase free. Un blanc « ADN » est réalisé de la même manière en remplaçant l'échantillon par de l'eau RNase free, ceci en vue de mettre en évidence toute contamination au cours de l'analyse. Les tubes sont incubés 5 minutes à 25°C, 30 minutes à 42°C, 5 minutes à 85°C. Les ADNc obtenus sont stockés à -20°C.

3.2.3. Quantification du taux d'expression par PCR en temps réel

Avant de réaliser la PCR en temps réel pour l'évaluation de l'expression du gène *CYP1A1*, une PCR classique est réalisée à partir des deux couples d'amorces dessinées par E. Aubry (2006). Ces deux couples d'amorces ciblent le gène d'intérêt à savoir le gène *CYP1A1* mais également le gène de codant pour la β-actine choisi comme gène de ménage. Ce dernier permet de normaliser les données. Un gène de ménage est en effet un gène exprimé de manière constitutive et dont l'expression est identique dans toutes les cellules de l'organisme. Le tableau 5 donne les séquences de chacune des amorces et les caractéristiques des amplicons correspondant.

Tableau 5. Séquences des amorces utilisées pour l'amplification des fragments du gène *CYP1A1* et du gène de la β-actine, taille (pb) et température de fusion (T_m en °C) des amplicons.

Gène ciblé		Séquence	Taille de l'amplicon (pb)	T_m (°C)
β-actine	amorce sens ACT5	5' -TTCCTGGGTATGGAGTCCTG- 3'	200	85,5
	Amorce antisens ACT6	5' -TGGGGCAATGATCTTGATTT- 3'		
CYP1A1	amorce sens CYT13	5'-CATGGGCTGTTGTGTACCTG- 3'	171	80,5
	amorce antisens CYT14	5' -AGGGCAGGAAGGAAGAATGT- 3'		

Les amorces ci-dessus sont utilisées sur nos échantillons dans le cadre d'une première PCR afin de vérifier la bonne amplification et la taille attendue pour l'amplification de l'ADNc. Pour cela, 0,4 µl d'ADNc sont placés en présence de 10 µl de Red'y'starMix (Eurogentec), de 0,4 µl de chaque type d'amorce à 10 µM dans un volume final de 20 µl. Le mélange réactionnel est placé dans un thermocycleur (MJ Research PTC100) et est soumis au protocole d'amplification suivant :

- 10 minutes à 95°C
 - 30 secondes à 95°C
 - 30 secondes à 60°C
 - 30 secondes à 72°C
- } 40 fois

Une électrophorèse sur gel d'agarose à 1% est réalisée à partir des brins obtenus pour vérifier la taille des produits PCR. L'ADN est visualisé par coloration au BET (Bromure d'Ethidium). La taille des fragments ayant été vérifiée et validée, la PCR en temps réel peut être effectuée.

Les réactions sont réalisées sur microplaques (ABgene) à l'aide du kit SYBR green (Stratagene) et du thermocycleur MxPro3005 (Stratagene). La PCR en temps réel est effectuée en duplicat pour chaque échantillon d'ADNc. Afin de pouvoir accéder à la quantification des échantillons, une gamme étalon doit être mise en place. Dans le cadre de notre étude nous n'avons pas d'individu pouvant servir de standard, de référence, et provenant d'un milieu non contaminé ou au contraire d'un milieu dont la contamination était connue et importante. Différentes gammes d'étalonnage ont donc été testées à partir de plusieurs de nos échantillons dont la concentration en ARN totaux initiale était importante. La quantification à partir de ces gammes est testée sur des échantillons dont la quantité d'amplicons *CYP1A1* était très faible et très importante (approximation sur gel d'électrophorèse), de façon à situer ces échantillons de concentrations extrêmes par rapport à la gamme. Ces différents essais ont permis d'élaborer une gamme étalon à partir des dilutions au 10^e, 50^e, 250^e, 1250^e et 6250^e d'un échantillon spécifique, encadrant l'ensemble des autres échantillons dilués au 250^e.

Chaque mélange réactionnel, placé dans un puits de la microplaque et d'un volume final de 25 µl, contient 12,5 µl de Mix SYBR Green, 0,5µl d'amorce sens (10 µM) et d'amorce antisens (10 µM) et 10µl d'échantillon d'ADNc dilué au 250^e. Une microplaque est réservée à la quantification de l'expression du gène *CYP1A1*, l'autre est réservée à la quantification du gène de ménage. Chacune de ces plaques contient non seulement la gamme étalon et les échantillons mais également les blancs ADN, RT et un blanc PCR ne contenant ni les amorces ni le mix SYBR Green.

Chaque plaque est placée dans le thermocycleur MxPro3005 (Statagene) et suit le programme suivant :

- 10 minutes à 95°C
 - 30 secondes à 95°C
 - 45 secondes à 60°C
 - 30 secondes à 72°C.
- } 40 fois

Après l'amplification, une courbe de fusion permet de confirmer la spécificité des amplicons par l'observation d'un T_m de 80,5°C pour les amplicons d'ADNc *CYP1A1*, et un T_m de 85,5°C pour les amplicons d'ADNc de la β -actine (Fig. 4).

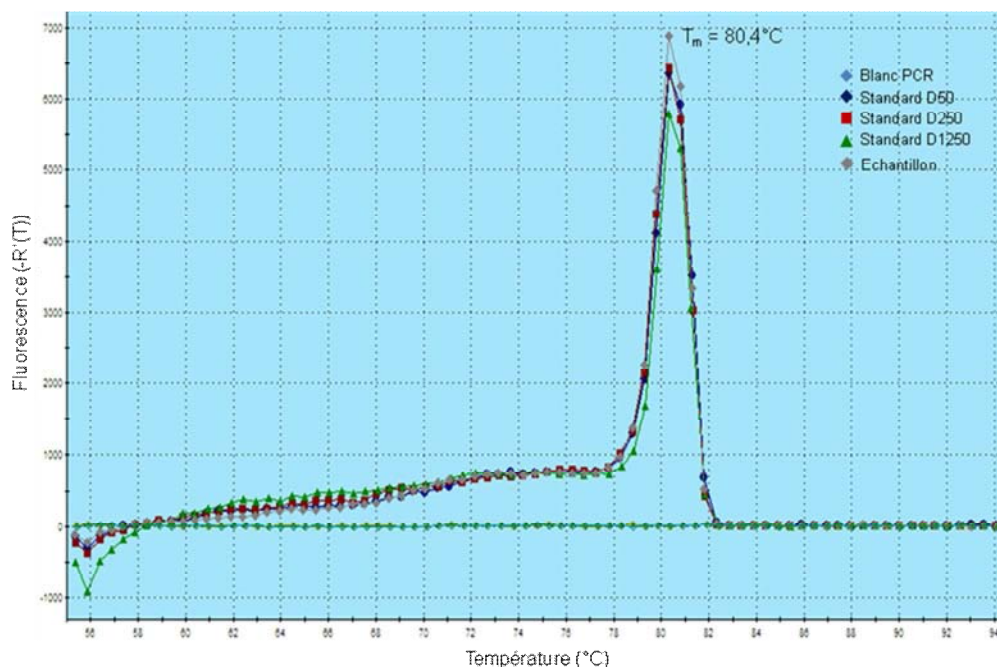


Figure 4. Exemple de courbe de fusion obtenue à partir du standard à trois dilutions (50^e, 250^e, 1250^e), du blanc PCR et d'un échantillon d'ADNc *CYP1A1*. T_m : température de demi-dénaturation.

Le taux d'expression relatif (R) des ARNm *CYP1A1* dans les échantillons est exprimé en tant que ratio d'expression du transcrite *CYP1A1* normalisé par le transcrite de la β -actine par rapport à l'échantillon référence. Le calcul de R nécessite de connaître l'efficacité de la PCR (E) pour chaque type d'ADNc. L'efficacité de la PCR, dont la valeur théorique est 2, est connue en réalisant une régression logarithmique linéaire des valeurs de ΔC_t des points de la gamme étalon. E correspond à $10^{(-1/\text{pente})}$ de cette gamme.

Les ratios d'expression relative sont calculés grâce à l'équation décrite par Pfaffl (2001) :

$$R = E_{\text{ADNc cible}} \cdot 2^{-\Delta\text{Ct}_{\text{ADNc cible}} (\text{Ref-Echantillon})} / E_{\beta\text{act}} \cdot 2^{-\Delta\text{Ct}_{\beta\text{act}} (\text{Ref-Echantillon})}$$

où E est l'efficacité de la PCR à partir des ADNc cibles *CYP1A1* ou à partir de l'ADNc codant pour la β -actine. $\Delta\text{Ct}_{\text{ADNc cible}}$ correspond à la moyenne des quatre valeurs de ΔCt obtenues pour un échantillon d'ARN.

Les données recueillies seront les premières données d'expression hépatique du gène *CYP1A1* à être obtenues sur des individus d'anguilles jaunes européennes provenant d'un milieu naturel et donc complexe. Elles seront confrontées aux niveaux de contamination évalués dans les tissus mous.

3.3. Traitement statistique

Le traitement statistique des données de concentration dans les tissus mous et d'expression du gène *CYP1A1* a été réalisé grâce à Xlstat-Pro 7.5.2 (Addinsoft, France) en utilisant le test non paramétrique de Kruskal-Wallis et le test *U* de Mann Whitney.

Parallèlement à l'évaluation du stress chimique s'exerçant chez les anguilles jaunes du bas Adour, nous nous sommes intéressés aux informations potentiellement contenues dans le « journal de bord », l'otolithe, de ces anguilles.

4. Analyse multi élémentaire des otolithes par ablation laser femtoseconde-ICP-MS et estimation de l'âge

4.1. Préparation des otolithes

Les méthodes de microanalyses chimiques de l'otolithe nécessitent des précautions particulières lors de la préparation des otolithes afin d'éviter toute contamination (Fig. 5). Les otolithes sont extraits de chaque individu à l'aide de pinces en plastique préalablement décontaminées. Ils subissent ensuite un protocole de nettoyage mis en place d'après Jones et Chen (2003). Il consiste en plusieurs rinçages de l'otolithe à l'eau milliQ et d'un traitement à l'eau oxygénée ultra pure. Les otolithes sont ensuite séchés à température ambiante sous hotte à flux laminaire puis stockés dans des microtubes préalablement décontaminés.

Les otolithes sont inclus dans une résine de type araldite (Escil, France) ne contenant pas les éléments ciblés par l'analyse multi élémentaire suivante. De plus, cette résine, résistante à la chaleur, permet un bon maintien de l'échantillon, et donc son intégrité durant l'analyse par ablation laser-ICP-MS (De Pontual et Geffen, 2002). L'inclusion de l'otolithe permet dans un premier temps de réaliser le ponçage. Ce dernier vise à effectuer une coupe selon le plan sagittal passant par le primordium (centre de croissance). La coupe permet de mettre à jour les différentes stries de croissance. Le ponçage est réalisé à l'aide d'une polisseuse (Escil, France) et de disques de papier silice arrosés par de l'eau MilliQ (18,2 M Ω). L'ablation laser nécessitant un bon état de surface, un polissage de la surface est effectué à l'aide de papiers diamantés (Escil, France) de grain décroissant (9 μm , 3 μm , 0,1 μm). Entre chaque étape de ponçage et polissage l'otolithe est abondamment rincé à l'eau MilliQ. Les inclusions sont séchées et stockées dans des tubes décontaminés placés dans une double poche hermétique avant d'être analysées.

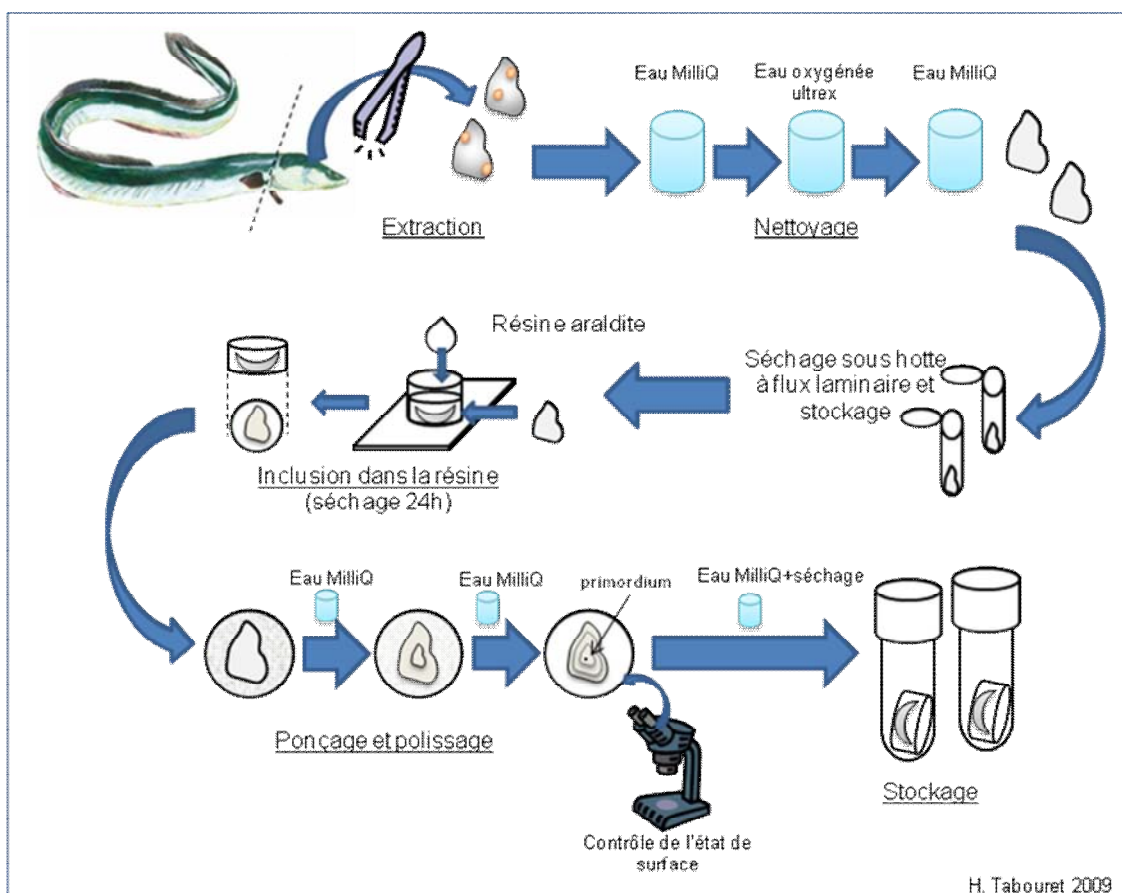


Figure 5. Protocole de préparation des otolithes (extraction, nettoyage, ponçage).

4.2. Mise en place de la fs-LA-ICP-MS

4.2.1. Choix de la méthodologie

L'objectif de cette étude était de reconstruire les histoires de vie des individus en termes de conditions environnementales (salinité, pollution...) en se basant sur la composition multi élémentaire de chaque strie de croissance de l'otolithe. Pour cela, il était nécessaire d'utiliser une technique de surface capable d'échantillonner de très faibles quantités d'échantillon calcifié et d'en assurer l'analyse chimique avec une grande sensibilité de manière à couvrir la plus large gamme d'éléments possibles.

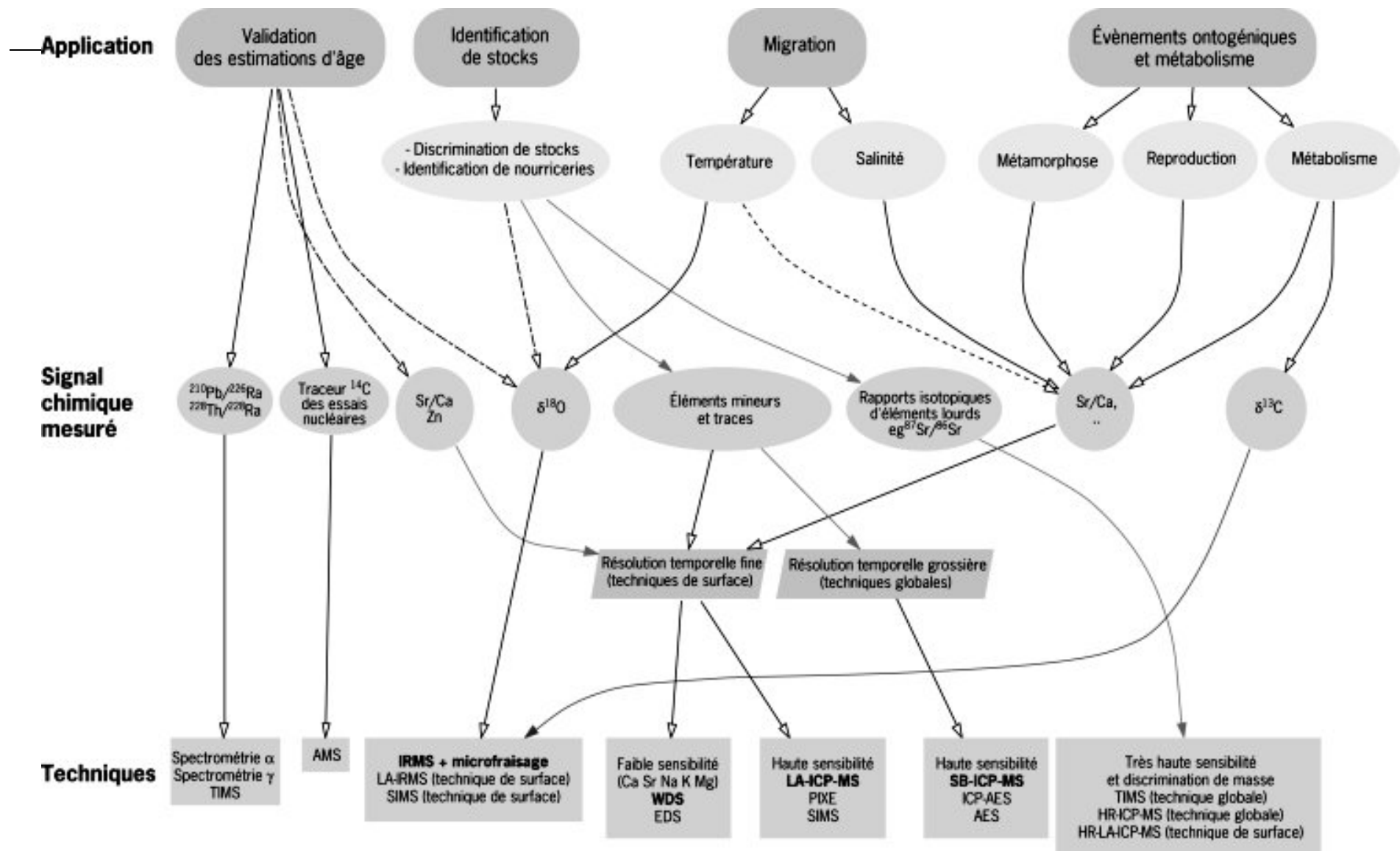


Figure 6. Schéma synoptique des principales applications de la microchimie de l'otolithe. Pour chaque application, le signal chimique mesuré et précisé avec les techniques analytiques appropriées. Flèches solides : méthodes généralement utilisées ; flèches en traits et points : méthodes plus rarement utilisées ; flèches en pointillées : méthodes non recommandées ; texte en caractère gras : techniques les plus fréquemment utilisées (De Pontual et Geffen, 2002).

En microchimie de l'otolithe, de nombreuses techniques peuvent être utilisées en fonction de la problématique d'origine et du signal chimique recherché (Fig. 6, De Pontual et Geffen, 2002). Le choix de la technique analytique appropriée dépend de plusieurs facteurs : l'application voulue, l'information chimique à extraire, la sensibilité requise et le degré de résolution temporelle désiré. L'étude de Campana *et al.* (1997) s'est attachée à évaluer et comparer la performance et la précision de quatre de ces techniques, WD-EM (microsonde électronique à dispersion de longueur d'onde), ED-EM (microsonde électronique à dispersion d'énergie), PIXE (l'émission X induite par proton) et LA-ICP-MS, dans le cadre d'une analyse multiélémentaire d'otolithe de tambour brésilien (*Micropogonias undulatus*). Globalement, les techniques de microsondes électroniques sont performantes pour la mesure des éléments les plus abondants tels que Na ou Ca. La PIXE et l'ablation laser/ICP-MS semblent, elles, plus adaptées pour la mesure des éléments traces tels que Ba, Cu, Fe, Mg, Ni, Pb et Zn. La ED-EM présente cependant les limites de détection les plus élevées et la précision la plus faible des quatre techniques. Pour le Sr, les résultats sont comparables pour la WD-EM, la PIXE et LA-ICP-MS. Cependant, selon Jones et Chen (2003) la PIXE est trop coûteuse pour la plupart des scientifiques pour être utilisée en routine. L'ablation laser apparaît donc comme un bon compromis entre la précision, les possibilités en termes d'acquisition d'informations spatiales, et de coût. Plus récemment, l'amélioration des microsondes ioniques a permis le développement d'un nouvel outil le nanoSIMS (spectrométrie d'émission ionique secondaire) répondant à la demande croissante d'analyses en éléments traces et d'analyses isotopiques à des échelles fines. Le NanoSIMS permet de combiner la microscopie haute résolution aux analyses isotopiques avec une bonne sensibilité et une excellente résolution spatiale (inférieure à 50nm) (Hermann *et al.*, 2007). Cette technique est déjà utilisée en cosmochimie (Hoppe, 2006), en géologie (Hellebrand *et al.*, 2005), en biologie (Smart *et al.*, 2007). En 2007, Zumohlz *et al.* ont illustré, au travers de l'analyse de statolithes de céphalopodes, la pertinence du NanoSIMS pour les analyses microchimiques d'aragonite à une échelle de l'ordre du nanomètre. Cette technique permettant en effet d'accéder à des informations sur les processus de calcification ou encore des histoires de vie individuelles. Par ailleurs, Sano *et al.* (2008) ont utilisé cette technique afin d'obtenir les rapports isotopiques du Sr ($^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$) dans des otolithes d'ayu (*Plecoglossus altivelis*). Cependant, le NanoSIMS reste une technique coûteuse et sensible à l'état de surface. Dans notre étude, du fait de ses caractéristiques et de l'accès direct au couplage au laboratoire nous avons donc choisi la méthode de l'ablation laser/ICP-MS.

4.2.2. Principe de l'ablation laser et couplage à l'ICP-MS

Le principe de l'ablation laser repose sur la capacité de volatiliser de la matière à l'aide d'une grande quantité d'énergie lumineuse focalisée à la surface d'un échantillon (taille de 10-500 μm). Cette technique permet l'analyse directe de micro-échantillons solides, sans mise en solution au préalable, et ainsi limite les possibilités de contaminations. Par ailleurs, le confinement de l'ablation sur une très petite surface donne accès à une très bonne résolution spatiale et la possibilité d'acquérir des informations spatiales sur la distribution des éléments analysés (Günther *et al.*, 1999 ; Liu *et al.*, 2004). De plus, du fait que l'échantillon soit introduit à sec, les interférences polyatomiques produites par l'interaction avec les espèces de l'eau ou de l'acide avec le plasma d'argon sont évitées. L'aérosol produit par l'ablation est véhiculé par l'Argon (Ar) ou l'Hélium (He) jusqu'à l'ICP-MS (Fig. 7).

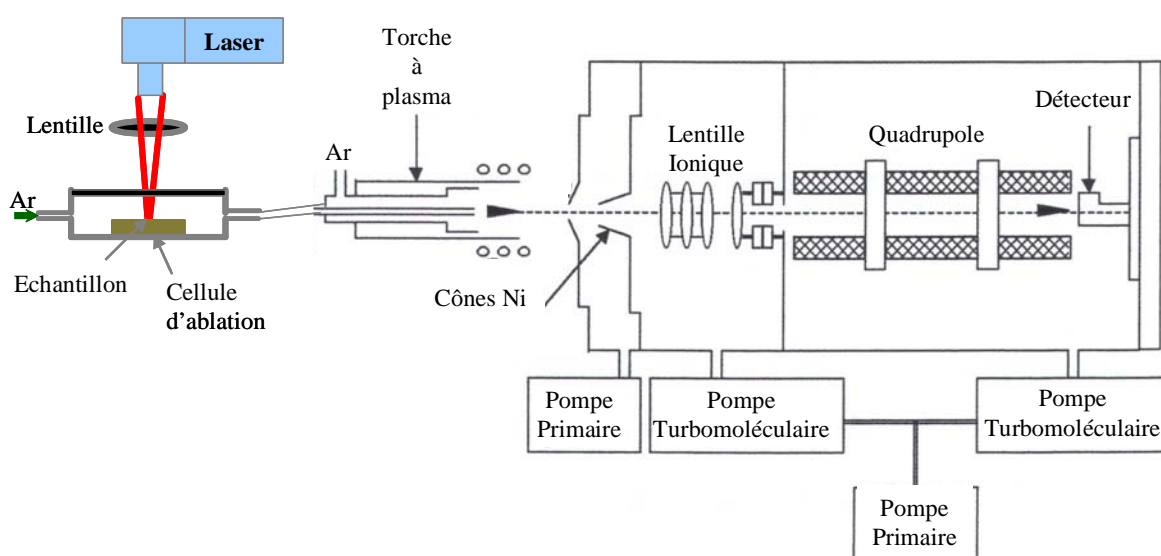


Figure 7. Schéma du couplage ablation laser spectrométrie de masse à plasma induit (LA-ICP-MS)

Différents types de laser peuvent être utilisés. Ils sont principalement caractérisés par le type de source lumineuse (Ultra violet UV ou Infra Rouge IR), de leur longueur d'onde, et de leur durée d'impulsion, longue (nanoseconde) ou courte (femtoseconde). Ces différents paramètres vont conditionner les mécanismes d'ablation, notamment les interactions entre le faisceau lumineux et la surface de l'échantillon, et les phénomènes plus ou moins importants de fractionnement. Les courtes impulsions (femtoseconde) conduisent à un fractionnement réduit qui n'est pratiquement plus distinguable comparé à l'incertitude analytique et à une quantité ablatée plus grande (González *et al.*,

2004 ; Poitrasson *et al.*, 2003). L'énergie du laser étant délivrée en quelques femtosecondes seulement, la densité de puissance apportée est telle que la matière est éjectée du matériau avant que la chaleur n'ait le temps de diffuser dans la matrice. Les particules produites sont fines (<200nm) et sont alors atomisées de manière plus efficace dans le plasma de l'ICP-MS provoquant une réduction du fractionnement élémentaire, une amélioration de la sensibilité et de la répétabilité. Ce type d'ablation est appelé « ablation froide ». Le développement de lasers femtoseconde couplés à l'ICP-MS permet une nouvelle approche analytique pour la détermination des éléments traces dans les matériaux solides (Pécheyrans *et al.*, 2005 ; Pécheyrans *et al.*, 2007 ; Claverie, 2009).

Les lasers femtoseconde sont encore peu répandus, mais un prototype est actuellement développé et accessible au LCABIE. Dans le cadre de cette thèse, il a donc été choisi de mettre en place la méthodologie LA-ICP-MS à partir de ce laser femtoseconde. Le laser femtoseconde (Alfamet, Novalase, France) utilisé présente une source lumineuse de type IR (1030nm) et peut fonctionner à haute cadence de tir (<10 000Hz). Il présente également une platine mobile selon deux axes (X, Y). Cette mobilité de l'échantillon permet d'accéder ainsi à une multitude de stratégies d'ablation et de les adapter en fonction du solide et de la problématique ciblée. Plusieurs stratégies d'ablation ont été développées et testées sur les otolithes d'anguille : une stratégie dite de cratère permettant d'ablater une très petite surface (diamètre de 20µm) et donc d'accéder à une bonne résolution spatiale, une stratégie dite 1Dscan (20 µm de largeur) permettant l'obtention de profils élémentaires continus, une stratégie complexe appelée « flash » du fait sa rapidité et permettant de réaliser un échantillonnage d'une strie cible, et enfin une stratégie appelée 2D scan permettant d'obtenir des profils continus et visant à améliorer les limites de détection. Leurs caractéristiques et leurs performances ont fait l'objet d'un article présenté dans le chapitre suivant. Le laser est couplé à un ICP-MS de type Elan DRC II (Perkin Elmer). L'analyse est réalisée en plasma humide grâce à une connexion en Y. En outre, une solution d'eau MilliQ (18,2MΩ) acidifiée à 1% d'HNO₃ (J.T. Baker, Ultrex) est nébulisée et introduite dans le système simultanément à l'aérosol produit par l'ablation. Cette configuration permet de s'affranchir des problèmes de dépôts de carbonate de calcium le long de la torche comme observé précédemment en configuration de plasma sec (Barats *et al.*, 2006b). Du thallium (1 ng.g⁻¹) est ajouté à la solution nébulisée afin de suivre et de corriger la dérive du signal pouvant apparaître au cours de l'analyse.

4.2.3. Analyse multi élémentaire des otolithes

Afin de reconstruire l'ensemble de l'historique de vie des anguilles jaunes des différents sites d'étude, nous avons recherché à obtenir un profil continu de la signature élémentaire d'un bord de l'otolithe au noyau. L'otolithe est une structure en trois dimensions. La stratégie d'ablation choisie pour cette analyse a donc cherché à tenir compte de l'épaisseur (en profondeur) des couches de croissance de façon à obtenir un signal élémentaire le plus proche possible de celle d'une strie individuelle. Les conditions d'ablation ont également été choisies de façon à avoir une grande sensibilité. Cette sensibilité permet de couvrir une large gamme d'éléments traces présents en très faibles quantités dans la matrice otolithique. En tout, 13 éléments et 19 isotopes ont été ciblés (Mg, V, Mn, Cu, Zn, Sr, Mo, Cd, Sn, Ba, Pb, U, Ca). Le Ca est choisi comme standard interne dans la mesure où sa signature ne varie pas le long des transects réalisés le long des otolithes. Il permettra de réaliser une normalisation de l'ensemble des résultats. La stratégie résultant de ce compromis est une stratégie continue dite « 2D » car elle n'effectue pas un trajet simple linéaire mais un transect linéaire dont la largeur (80 μm) est conditionnée par un mouvement en N du faisceau à la surface de l'échantillon. Cette largeur d'ablation assure une quantité d'échantillon ablaté importante et donc une meilleure sensibilité et stabilité (voir chapitre 3). La vitesse de l'échantillon sur la platine est de 5 $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$. Avant chaque ablation, une pré-ablation très rapide (50 $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$) est appliquée afin de prévenir toute contamination provenant de l'extérieur et de la manipulation de l'échantillon avant analyse (Wyndham *et al.*, 2004).

Le principal point noir des analyses en LA-ICP-MS est le manque de matériaux de référence. Les verres certifiés NIST sont couramment utilisés. Souvent en microchimie de l'otolithe des CRMs (matériaux de référence) géologiques sont utilisés. Mais ces CRM au même titre que les otolithes artificiels (Campana *et al.*, 1997) et les pastilles de poudre de carbonates ne correspondent pas exactement à la matrice d'aragonite et de protéines de l'otolithe. Cependant, suite à l'étude de Yoshinaga *et al.* (2000), un CRM, préparé à partir d'otolithes de Lutjan rouge (*Lutjanus sebae*), est disponible pour les analyses en solution. Pour ce matériel les valeurs de Ba, Ca, K, Mg, Na et Sr sont certifiées, et des valeurs de références sont données pour Cd, Cu, Pb et Zn.

Dans le cadre de notre étude, nous nous sommes procurés le CRM d'otolithe (CRM NIES n°22, National Institute for Environmental Studies, Japon). De façon à pouvoir quantifier les éléments, nous avons également utilisé des pastilles obtenues par une méthode d'enrichissement (dopage) par une solution multi-élémentaire et de co-précipitation de carbonate de calcium pur mise au point au LCABIE. La pertinence de l'utilisation de ces pastilles pour l'analyse multi élémentaire de carbonates

biogènes a déjà été illustrée auparavant (Barats *et al.*, 2007). Pour réaliser les pastilles de la gamme étalon et du NIES 22, 20 mg de chaque poudre sont pesés puis placés dans un moule de 3mm de diamètre. Une pression de 0,5 bar est appliquée pendant 1min30 avant que la pastille n'en soit retirée.

Les pastilles calcifiées et les otolithes sont analysés dans les mêmes conditions d'ablation. Les données sont recueillies à partir du logiciel d'acquisition de l'Elan DRC (Perkin Elmer), transférées et traitées sur Excel.

4.3. Estimation de l'âge

Après avoir été analysés par ablation laser-ICP-MS, les otolithes sont préparés afin d'estimer l'âge de chaque individu et de recalibrer les profils élémentaires obtenus sur chaque strie de croissance annuelle. L'estimation de l'âge s'appuie sur la validation du dépôt annuel des stries de croissance chez l'anguille européenne. Celle-ci a été validée par examen des marques présentes dans des otolithes d'anguilles européennes (Berg, 1985 ; Svedang *et al.*, 1998) et australiennes (Pease *et al.*, 2003) d'âge connu. La validation mettait en évidence le dépôt d'une marque d'arrêt de croissance par année. Parfois, des stries surnuméraires provoquées par un stress peuvent apparaître et entraîner un biais dans l'estimation de l'âge. Cependant, ce biais est peu important dans les écosystèmes estuariens et fluviaux (Mounaix et Fontenelle, 1994). L'âge des individus de cette étude a donc été évalué, à plus ou moins un an, en se basant sur ces marques d'arrêt de croissance.

Les marques de croissance sont révélées suite à la décalcification des otolithes par de l'EDTA 5% (Ultra grade, Fluka) pendant 2 à 3min puis par coloration au bleu de toluidine à 5% (Standard, Fluka). La figure 8 illustre le protocole employé. La lecture s'effectue à l'aide d'un stéréomicroscope (Optech, Sodipro, France) au grossissement 50. Chaque strie est recalée sur les profils élémentaires en fonction de la distance au nucleus et du transect d'ablation très facilement observable.

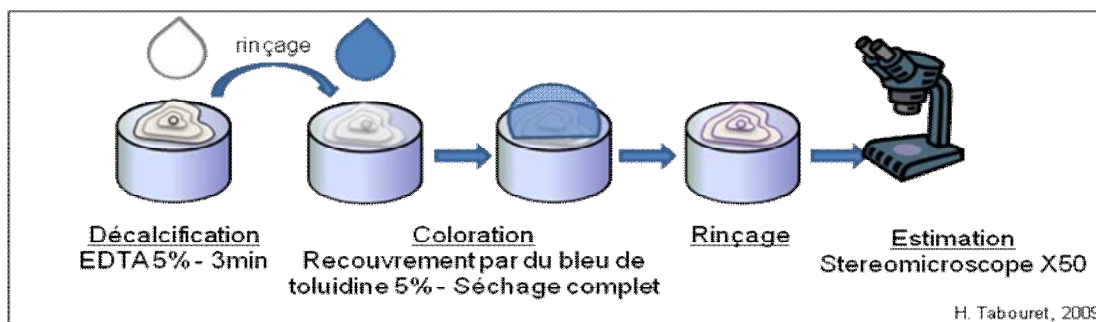


Figure 8. Protocole de préparation des otolithes d'anguille européenne pour l'estimation de l'âge.

Sur l'ensemble des otolithes analysés par ablation laser, 81 ont produits des données exploitables et ont pu servir à l'estimation de l'âge ainsi qu'au recalage des profils élémentaires. 14 appartiennent aux anguilles prélevées en estuaire, 14 aux individus de l'Estey de Loustaounaou, 49 au site du Termi et 4 proviennent des anguilles de Cauneille (Gave de Pau).

4.4. Traitement des données

Les données résultant de la microchimie de l'otolithe et de l'estimation de l'âge ont été soumises au traitement statistique. Les moyennes des concentrations ou rapports (Sr :Ca et Ba :Ca) élémentaires ont été traitées grâce au logiciel Xlstat-Pro 7.5.2 (Addinsoft, France) en utilisant le test non paramétrique de Kruskal-Wallis et le test *U* de Mann Whitney.

CHAPITRE III

MICROANALYSE ÉLÉMENTAIRE QUANTITATIVE DES OTOLITHES D’ANGUILLE : UN OUTIL POUR LA DÉTERMINATION DE L’UTILISATION DES HABITATS DANS LA PARTIE AVAL DU BASSIN DE L’ADOUR

*« Ne perdons rien du passé. Ce n’est qu’avec le passé qu’on fait l’avenir »
Anatole FRANCE*

L'analyse multiélémentaire des otolithes comme outil de reconstruction des historiques de vie des poissons fait l'objet d'études de plus en plus nombreuses du fait du potentiel de ces pièces calcifiées à enregistrer et conserver certains éléments en lien avec leur concentration dans l'environnement (Campana, 1999 ; De Pontual et Geffen, 2002). Les premières études de la composition élémentaire des otolithes étaient dépendantes des méthodes analytiques existantes, pour la plupart permettant une analyse globale de l'échantillon basée sur la dissolution de l'otolithe (Ireland 1999). Si ces analyses sensibles aboutissent à la discrimination de stocks ou de populations (Gao *et al.*, 2001 ; Gillanders, 2002), d'environnements aux caractéristiques chimiques marquées (Secor *et al.*, 1995 ; Hanson et Zdanowitz, 1999 ; De Pontual et Geffen, 2002), la dissolution des otolithes mènent à la destruction des informations portées par l'échelle temporelle représentée par la succession de stries de croissance (Campana 1999; Kingsford and Gillanders 2000).

Depuis une vingtaine d'année, parmi les techniques d'analyses de surface assurant la conservation des microstructures d'échantillons carbonatés, le développement de l'ablation laser couplée à la spectrométrie de masse à plasma induit (LA-ICP-MS), du fait de sa haute résolution spatiale (40-200 μm) et de sa sensibilité (du ng.g^{-1} au $\mu\text{g.g}^{-1}$), a montré ses capacités en termes d'analyse élémentaire et isotopique. Cette technique a notamment été utilisée dans des études environnementales basées sur différentes pièces carbonatées biogènes telles que les coraux (Fallon *et al.*, 2000 ; Sinclair *et al.*, 1998), les coquilles de mollusques bivalves (Belloto et Mikeley, 2000 ; Van der Putten *et al.*, 2000 ; Barats *et al.*, 2008) et les otolithes (Campana *et al.*, 1994 ; Fowler *et al.*, 1995 ; Gemperline *et al.*, 2002 ; Chu *et al.*, 2006 ; Arai *et al.*, 2007).

Les problèmes analytiques majeurs du couplage LA-ICP-MS sont principalement liés au manque d'échantillons solides certifiés permettant l'analyse quantitative des éléments traces dans les solides et la sensibilité moindre des analyses par rapport aux méthodes globales. Ce dernier point, lié à la faible quantité de matière transmise au système analytique, se confronte, dans le cas des otolithes, à la résolution spatiale requise pour la reconstruction des historiques de vie des poissons. Plus l'échantillonnage sera effectué sur une petite surface, meilleure sera la résolution spatiale et donc temporelle (chaque portion de l'otolithe correspondant à une période de vie), mais plus faible sera la sensibilité du fait de la faible quantité de matière apportée à l'ICP-MS (Sinclair, 1999).

Un autre problème a été soulevé récemment au niveau de l'interprétation des profils élémentaires continus obtenus par les techniques de surface en vue de la reconstitution des migrations anadromes et catadromes chez certains poissons dont l'anguille. Ce problème est lié à la présence de manière aléatoire dans l'otolithe de zones d'inclusions d'un autre polymorphe de carbonate de calcium : la vatérite (Tzeng *et al.*, 2007 ; Jessop *et al.*, 2008). La vatérite incorpore de plus faibles quantités d'éléments traces que l'aragonite en particulier le strontium et le barium

couramment utilisés comme marqueurs des habitats, et de plus fortes quantités pour des éléments comme le Mn et le Mg (Brown et Severin, 1999 ; Tzeng *et al.*, 2007). Ces variations de concentrations élémentaires peuvent donc conduire à un biais d'interprétation.

L'analyse d'éléments traces dans les otolithes de poissons à des fins de reconstitutions de fréquentations d'habitats doit donc résulter d'un compromis entre la résolution temporelle et l'affranchissement des problèmes liés à la vaterite. Ce dernier peut être abordé par une approche multi-élémentaire, en particulier par l'utilisation de Sr et de Ba qui sont caractérisés en général par un comportement inverse au niveau des interfaces continent-océan (Elsdon et Gillanders, 2005 ; Hamer *et al.*, 2006). Cependant, si le Sr est contenu en quantité importante dans les otolithes (plusieurs centaines de ppm), raison pour laquelle il est couramment utilisé, il n'est pas de même pour d'autres éléments comme le Ba ou le Mn (quelques ppm).

Notre travail sur la microchimie des otolithes a donc porté en simultané sur le développement d'une méthode intégrant rapidité, sensibilité et bonne résolution temporelle, et sur son application sous forme de profils continus multi-élémentaires interprétables sans ambiguïté.

La **première partie** de ce chapitre se propose donc de mettre en place et de comparer différentes stratégies d'ablation pour la détermination de la composition élémentaire d'otolithes de poissons tels que l'anguille européenne (*Anguilla anguilla* L.). Ces stratégies visent à évaluer différents compromis possibles entre la sensibilité de l'analyse (limites de détection) et la résolution spatiale. Le développement d'un large panel de stratégies simples et complexes était possible grâce à l'utilisation d'une station d'ablation laser innovante basée sur un système de laser femtoseconde (1030 nm, Alfamet-Novalase) (Claverie, 2009). Simultanément, les caractéristiques de rinçage et leurs effets sur la résolution temporelle finale de deux chambres d'ablation de volumes distincts (un petit, un grand) ont été testés. Enfin, la stratégie dite en « scan 2D » développée au cours de cette étude a été appliquée sur des otolithes d'anguilles jaunes provenant de sites dulçaquicoles et estuariens du bas Adour afin de mettre en évidence des changements de concentration élémentaire dans la matrice otolithique pouvant être lié à des événements spécifiques (changements de conditions environnementales, événements physiologiques) dans la vie des individus.

La **deuxième partie** de ce chapitre expose la validation et l'utilisation simultanée de deux marqueurs des habitats au comportement antagoniste à savoir le Sr et le Ba, dans le but de reconstituer l'utilisation des habitats dulçaquicoles et saumâtres par l'anguille européenne du bas Adour, ceci en s'affranchissant des problèmes éventuels de vaterite. Ce nouvel outil a été utilisé pour mettre en évidence les comportements d'utilisation d'habitats chez l'anguille européenne de l'estuaire de l'Adour et des zones humides associées.

Partie 1. Détermination de la composition élémentaire des otolithes d'anguille par ablation laser femtoseconde haute fréquence/ICP-MS : comment améliorer les limites de détection et la résolution spatiale ?

Determination of trace element in eel otoliths by high repetition rate femtosecond LA/ICP-MS: how to improve limits of detection and spatial resolution using a narrow laser beam.

H. Tabouret^{1,2}, F. Claverie¹, G. Bareille¹, O.F.X. Donard¹, C. Pécheyran¹.

¹ LCABIE-IPREM UMR 5254, Université de Pau et des Pays de l'Adour, Hélioparc Pau Pyrénées, 64053 Pau Cedex 9.

² IFREMER Laboratoire des Ressources Halieutiques d'Aquitaine, UFR côte Basque, 1 Allée du Parc Montauray, 64600 Anglet

Article soumis : *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*

Résumé : Le couplage ablation laser femtoseconde haute fréquence de tir – ICPMS (Spectrométrie de Masse à Plasma Induit) a été testé afin de déterminer la distribution en éléments traces dans les stries de croissance calcifiées des otolithes d'anguilles européennes (*Anguilla anguilla*). La résolution temporelle déterminée à partir de l'otolithe est directement liée à la résolution spatiale de l'analyse résultant du microéchantillonnage laser et du transport de l'échantillon. De ce fait, une attention particulière a été portée aux propriétés de deux cellules d'ablation de faibles volumes. Quatre stratégies d'ablation laser utilisant un fin faisceau laser (20 μ m) ont également été étudiées afin de trouver le meilleur compromis entre la haute résolution spatiale en 3D nécessaire à la discrimination des événements enregistrés par l'otolithe d'anguille (20-40 μ m) et la sensibilité analytique : i) des petits cratères discontinus, ii) un scan 1D continu et étroit (20 μ m de largeur), iii) une ablation très rapide dite « flash » (<0,5s) qui consiste à ablater quelques centaines de micromètres de chaque strie apparente en utilisant le faisceau laser en suivant la forme exacte de la strie, iv) une ablation continue 2D (100 μ m de large) en utilisant un mouvement de va et vient du faisceau laser et en déplaçant l'échantillon perpendiculairement. Les limites de détection obtenues sont particulièrement influencées par les stratégies d'ablation employées et leurs taux d'ablation respectifs. L'ablation flash permet d'obtenir une sensibilité 15 fois supérieure à celle produite par les cratères tout en conservant la même résolution spatiale (20 μ m). La résolution spatiale relative aux stratégies d'ablation continue a été démontrée comme étant gouvernée à la fois par la stratégie d'ablation et le volume de la chambre d'ablation. Une résolution de l'ordre de 20 μ m a été cependant obtenue avec la plus petite des chambres et les stratégies d'ablation continue 1D et 2D. Bien que l'ablation de 100 μ m de largeur amène à un plus grand volume d'échantillon ablaté que le scan 1D, la résolution spatiale n'est que légèrement affecté du fait du mouvement original de va et vient du faisceau laser. Des essais préliminaires de la méthodologie sur des otolithes d'anguilles jaunes provenant de différents habitats et ayant des histoires migratoires variées ont permis de révéler systématiquement un comportement opposé du Sr et du Ba.

Abstract: A high repetition rate and fast scanning beam femtosecond laser ablation - ICPMS approach was evaluated for the determination of trace element distribution within growth rings of eel otolith (*Anguilla anguilla*). As the temporal resolution read on the otolith is directly governed by the spatial resolution resulting from laser microsampling and sample transport, special care has been focused on designing two low volume ablation cells. Four laser ablation strategies using a narrow laser beam (20 μ m) were also studied in order to achieve the high 3D spatial resolution required for discriminating eel otolith events (in the range of 20-40 μ m) while keeping the best signal sensitivity: i) small discontinued craters, ii) sharp 1D raster scan (20- μ m wide lane), iii) flash ablation (<0.5 s) consisting in ablating subsequently hundreds micrometers of each apparent striae using the narrow laser beam following the exact shape of the striae, iv) continuous 2D ablation (100- μ m wide lane) using a back and forth movement of the laser beam while moving the sample in the perpendicular direction. Limits of detection were found to be mostly influenced by the laser ablation strategies employed in relation with their respective ablation rate. The flash ablation approach provided a 15 fold improvement factor compared to the crater mode while keeping the same spatial resolution of 20 μ m. Spatial resolution in continuous raster mode was found to be governed by the combination of the laser ablation approach and the ablation cell volume. Resolution in the range of 20 μ m was however obtained with the smallest cell for both 1D and 2D raster approaches. Although the ablation of 100 μ m wide lanes led to the higher sample volume removal than the 20 μ m 1D raster, the spatial resolution was only slightly affected due to the original back and forth movement of the small laser beam. Preliminary application of this methodology to yellow eels originating from different habitats and having different migratory patterns systematically revealed opposite Sr and Ba trends.

Key-words: Femtosecond laser ablation, Continuous 2D ablation, Flash ablation, ICP-MS, Eel otolith, Trace elements

1. Introduction

The elemental micro analysis of calcium carbonate structures is of growing concern for the reconstruction of historical trends in aquatic environments such as changes in environmental conditions or pollution events (Armynot du Châtelet *et al.*, 2004; Eggins *et al.*, 2003; Fallon *et al.*, 2002; Gillikin *et al.*, 2006). Several aquatic organisms or systems as corals and shells present physical temporal calcium carbonate structures, most often as growth rings, resulting from different growth rates governed by environmental conditions changes (yearly, seasonal or daily variations) and endogen factors (Wright *et al.*, 2002; Vander Putten *et al.*, 1999; Klevezal, 1996). Beyond the use of discernible structures for age determination (Richardson, 1987; Cailliet *et al.*, 2000) of these biominerals, the ability of the calcareous matrix to trap elements during calcification processes is more and more assessed (Hart and Cohen, 1996; Campana, 1999; Hintz *et al.*, 2006). Usual investigations are made on isotope ratios (Watanabe *et al.*, 2001 ; Carre *et al.*, 2005) or elemental ratios related to Ca such as Sr/Ca, U/Ca, B/Ca, Mg/Ca, Ba/Ca in order to reconstruct past environmental conditions. As an example, Ba/Ca variations in corals has shown to be a good indicator of river runoffs (Sinclair and McCulloch, 2004), oceanic upwelling and associated productivity (Lea *et al.*, 1989; Reuer *et al.*, 2003) whereas Sr, U, B and Mg variations have been associated to seawater temperature conditions (Fallon *et al.*, 1999; McCulloch *et al.*, 1996; Stirling *et al.*, 1995). Lead has also often been analysed in calcareous biogenic matrix to assess anthropogenic activity signal in aquatic habitats (Gillikin *et al.*, 2005; Labonne *et al.*, 1998). Finally, the analysis of elemental ratios can therefore provide information on historical life trends of organisms as Sr/Ca which allowed the reconstruction of fish migrations Veinott *et al.*, 1999; Secor and Rooker, 2000; Limburg *et al.*, 2003; Chang *et al.*, 2004; Milton and Chenery, 2005; Gibson-Reinemer *et al.*, 2009; Milton *et al.*, 2008) or Pb isotopic ratios in dentine layers which allowed the reconstruction of marine mammal migrations (Outridge *et al.*, 1997, Stewart *et al.*, 2003; Brophy *et al.*, 2004).

The discovery of otolith striae has enabled the age determination of fish since 1899 (Reibish, 1899) and with a growing interest since 1971 with the observation of daily annuli by Pannella. Fish otoliths are metabolically inert, excepted in case of extreme stress (Campana and Neilson, 1985; Wright *et al.*, 2002), allowing the preservation of the elemental records associated to environmental conditions changes. When applied to migratory fishes like eel, trace element microanalysis in otoliths is a tool of choice for discriminating habitats changes, migration routes or spawning grounds (Arai *et al.*, 1999; Tsukamoto and Arai, 2001; Arslan and Secor, 2005). However, high spatial resolution analysis of such tiny samples (< 2 mm diameter) is somehow challenging since it requires analytical methods combining micron scale sampling together with high sensitivity.

Among the analytical techniques used so far to investigate the elemental composition of biogenic carbonates, ICPMS is of particular interest due to its high sensitivity and multielemental capabilities. Bulk analysis of dissolved otoliths provides low level detection of trace element however without any spatial (and then temporal) information encoded by the otolith microstructure (Campana, 1999). For these reasons, surface analyses based on proton induced X-ray emission (PIXE; Elfman *et al.*, 1999; Halden *et al.*, 2000), electron microprobe (Thresher *et al.*, 1994), secondary ion mass spectrometry (SIMS; Seyama, 2003) and laser-ablation ICPMS (Campana *et al.*, 1994; Thorrold and Shuttleworth, 2000; Arai *et al.*, 2007) have received a great interest in the last years. Although electron microprobes allows high spatial resolution thanks to the use of a small beam (5 μm diameter), this approach is limited by poor limits of detection ($1000 \mu\text{g g}^{-1}$) (Campana, 1997). PIXE also provides good spatial resolution (beam diameter: 5-20 μm) and better signal sensitivity (around $\mu\text{g.g}^{-1}$) which appears however insufficient for some element like Mn, Pb, Zn, etc. SIMS provides similar sensitivity near $\mu\text{g g}^{-1}$ level, but limitations have been shown for atomic and molecular species which might differ only slightly in mass (Ireland, 1999).

Laser ablation - ICPMS has been intensively used to analyse trace elements in solid samples (Günther and Hattendorf, 2005) and especially hard biological structures such as otoliths (Campana *et al.*, 1997; Thorrold *et al.*, 2000; Veinott *et al.*, 2005; Arai and Hirata, 2006; Arai *et al.*, 2007) but also foraminifera (Eggins *et al.*, 2003), corals (Fallon *et al.*, 1999; Sinclair *et al.*, 1998; Wyndham *et al.*, 2004; Sinclair, 2005), shells (Stecher *et al.*, 1996; Lazareth *et al.*, 2003; Barats *et al.*, 2006) or teeth (Lochner *et al.*, 1999; Müller *et al.*, 2006). According to Campana *et al.* (1997), laser ablation/ICPMS is one of the best relevant methods for the analysis of trace elements such as Ba, Cu, Fe, Mg, Ni, Pb and Zn in otoliths, and appears as the best compromise between precision, sensitivity, spatial acquisition, sample throughput and cost. However quantification is still challenging in LA/ICPMS. This is particularly pronounced with conventional nanosecond lasers which might generate strong elemental fractionation when using non matrix matched standards (Guillong *et al.*, 2003; Kuhn and Günther, 2003). Despite this effect may be reduced by using UV or deep UV wavelength, the accuracy of LA/ICPMS remains affected. As an alternative to nanosecond lasers, the recent arising of femtosecond lasers has opened up new potential for LA/ICPMS in terms of accuracy, signal sensitivity and ablation quality (Margetic *et al.*, 2003; Poitrasson *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2004; Koch and Günther, 2007; Bian *et al.*, 2006). This basically results from the fact that the energy of the laser is delivered to the sample in a very short period of time limiting the energy dissipation into the irradiated sample volume. This provokes the ablation of the sample with very limited thermal effects and leads to the ejection of nano-particles subsequently easily transported and digested into the plasma of the ICPMS.

Recently, we have presented a promising approach based on the use of a high repetition rate femtosecond laser combined with a fast scanning beam device allowing designing original ablation trajectories (Pécheyran *et al.*, 2005; Fernandez *et al.*, 2007; Fernandez *et al.*, 2008a,b; Ballihaut *et al.*, 2007). This novel approach offers new ablation capabilities while keeping the inherent benefits of conventional fs laser ablation described above (Claverie *et al.*, 2009a,b). Here we evaluate the potential of this technology for otolith micro analysis using a small laser beam (20 μm) and different types of laser ablation strategies, in conjunction with two low volume ablation cells. The main idea being to find effective ablation methodologies providing the best signal sensitivity together with a spatial resolution in the range of 20 μm .

2. Experimental

2.1. Fish collection and otoliths preparation

The European yellow eels *Anguilla anguilla* (Linnaeus, 1758) were collected in April, July and October from 2005 to 2007 at four sites along the Adour basin following the salinity gradient (South west of France). These sites cover the Adour estuary, two watershed sites and a strict freshwater site on the Gave de Pau river, tributary of the Adour River. Estuarine specimens were caught by eel pot, whereas floodplains ones were caught by electrofishing.

Sagittal otoliths were removed, cleaned according Jones and Chen (2003) with H_2O_2 (Ultrex grade, J.T. Baker), rinsed with 18.2 MOhm Milli-Q water, and dried overnight. They were placed into polypropylene mould (10 mm diameter), embedded in araldite resin (araldite DBF CH Escil, Chassieu, France), sanded using a polisher sander machine to expose their cores, and polished with diamond paper of decreasing grain diameter (9, 3 and 0.1 μm) (Escil) until obtaining a smooth surface enhancing the striae visualisation. Otoliths were rinsed with 18.2 MOhm Milli-Q water and dried. Finally, prior to the laser ablation-ICP-MS analysis, the transect of interest was pre-ablated with the laser to remove potential surface contamination (see below).

2.2. Laser ablation ICPMS coupling

A femtosecond laser ablation system (Alfamet, Novalase SA – Amplitude SystemesFrance) fitted with a diode-pumped KGW-Yb laser was employed. It delivers 360 fs pulses at an IR-wavelength of 1030 nm and operates at high repetition rate from 1 Hz to 10 kHz. At such a high repetition rate, the energy delivered did not exceed 100 μJ , i.e. 40 μJ on the target. A galvanometric scanning beam device fitted between the laser source and the objective (50 mm focal length) permits to rapidly move (up to 280 mm s^{-1}) the laser beam with a high repositioning precision ($<1\mu\text{m}$). When operated at high repetition rate, this system allows ablating the sample very rapidly according to 2 dimensional trajectories as reported elsewhere (Pécheyrans *et al.*, 2005, 2007; Fernandez *et al.*, 2007, 2008a,b ; Claverie *et al.*, 2009). The ablation cell is mounted on a motorized XYZ stage. The software can synchronise the cell movement and the laser beam movements (scanner) to perform complex trajectories. The characteristics of the laser are described elsewhere (Ballihaut *et al.*, 2007).

The femtosecond laser ablation system was coupled to an Elan DRC II ICPMS (Perkin Elmer) using a polyimide tube (2 m length, 2,5 mm i.d.) connected to a Y-connection permitting the simultaneous introduction of the laser generated aerosol together with a nebulised acidified solution. These wet plasma conditions were found to prevent the calcium carbonate (CaCO_3) deposition along the torch injector that would otherwise occur after intensive ablation of calcite samples under dry plasma conditions (Barats *et al.*, 2006). A pneumatic concentric nebuliser (1 ml min^{-1}) fitted in a cyclonic spray chamber was used here. Thallium was also added (1 ng g^{-1}) to the acidified solution (2% HNO_3 , Ultrex grade, J.T. Baker) as external standard to correct for potential signal drift during the analysis. Helium was chosen as carrier gas in the ablation cell and argon as nebulisation gas. Optimization of the gas flows, plasma conditions, and lens voltage was performed ablating a NIST 612 (NIST, USA) glass series, with respect to oxides level less than 3% ($\text{ThO}/\text{Th}<3\%$), U/Th ratio of $1.00\pm 0,05$ in order to ensure optimal particle atomisation, and maximum signal sensitivity.

22 isotopes of interest were recorded (Table 1). Due to the low concentrations expected, isotopes were measured with a dwell time of 35 ms except ^{43}Ca (15 ms). ^{43}Ca was used as an internal standard in order to correct for mass removal variations due to uneven sample surface as well as ICPMS drift. Calcium being a major element of the otolith matrix, special care must be taken in order to prevent any detector overloading when recording ^{43}Ca . The first quadrupole (DRC) fitted into the mass spectrometer was used as an active filter to attenuate the number of ^{43}Ca ions entering into the second quadrupole (mass analyser) and then the ion counter.

Table 1. fs-LA/ICPMS, operating conditions

<i>Laser ablation</i> Femtosecond laser (Alfamet – Novalase. France)				
Pulse duration	360 fs			
Wavelength	1030nm			
Fluence	Ablation: 14.6 J cm ⁻² ; Pre-ablation: 1.5 J cm ⁻²			
Sampling strategies	Scan 1D	Scan 2D	Crater	Flash ablation
• Repetition rate	• 500 Hz	• 500Hz	• 100 Hz	• 5000 Hz
• Scanner speed	• /	• 1000 mm s ⁻¹	• /	• 250 mm s ⁻¹
• Sample speed (pre-ablation/ ablation)	• 50 mm s ⁻¹ / 5mm s ⁻¹	• 50 mm s ⁻¹ / 5 mm s ⁻¹	• /	• /
<i>ICPMS</i> Elan DRC II (Perkin Elmer)				
Torch	Quartz, internal injector diameter 1.5mm			
Nebulizer	Pneumatic concentric nebulizer 1ml.min ⁻¹			
Spray Chamber	Cyclonic			
Cones	Ni			
Coolant gas flow	15 L min ⁻¹			
Auxiliary gas flow rate (Ar)	1.2 L min ⁻¹			
Nebulizer gas flow rate (He)	0.6 L min ⁻¹			
Isotopes and Dwell time	24,25Mg, 51V, 55Mn, 63,65Cu, 66,68Zn, 86Sr, 95,98Mo, 111Cd, 115In, 118,120Sn, 136,138Ba, 205Tl, 208Pb, 238U (35ms/amu), 43Ca (15ms/amu)			
Internal normalisation	43Ca, rpq 0.85 (2D scan), 0.45 (1Dscan, flash, crater)			

A rpq value of 0.85 for 2D-scan trajectories and 0.45 for the other trajectories was then applied to ⁴³Ca, whereas conventional rpq value of 0.25 were applied for the other measured isotopes. Signal processing was performed using Elan Instrumental Software (Perkin Elmer).

2.3. Ablation cells

Two low volume ablation cells were evaluated as regards to their respective washout time. The first one, called Cell A, is a 15 cm³ cylindrical ablation cell (Fig. 1a). The second one, called Cell B, was designed to favour particles transport and shorten particles residence time according to Bleiner *et al.* (2001) and then Koch *et al.*(2008) studies. The outer regions were therefore narrowed to keep only the central channel of the gas flow and reduce the internal volume to 3.7 cm³ (Fig. 1b). It consists in a home made piece of translucent polycarbonate inserted in the cell A (Fig. 1b). The diameters of the gas inlet and outlet for both ablation cells are 1 and 4 mm respectively. Considering the resin mould size, 2 and

10 samples could be inserted simultaneously into cell B and cell A respectively. In addition, the ablation cells were designed to allow the underneath and side lighting of the samples in order to improve the visualisation of the seasonal annuli of the semi-transparent otoliths.

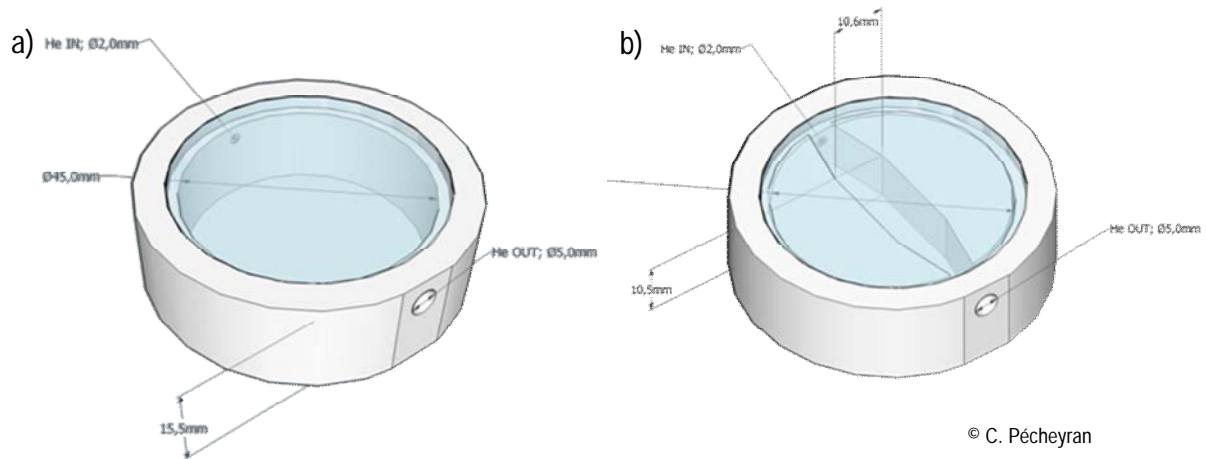


Figure 1. Ablation cells dimensions – a) Cell A: 15 cm³, b) cell B, 3.7 cm³

2.4. Ablation strategies

The use of a low-energy laser implies a strong laser beam focus resulting in a narrow beam in order to ensure the fluence above the ablation threshold. The laser beam size impacting the sample was specified upon the $1/e^2$ criterion, assuming the lateral beam profile to be Gaussian, and found to be around 20 μm . The use of this narrow beam (20 μm) results in a small ablated sample volume which is particularly suitable for microanalysis when high spatial resolution is required. However, as a consequence of the low ablation rate, the absolute amount of material transported to the ICP is low and results in poor signal sensitivity detected by the ICPMS. The opportunity of combining the ultra-fast beam scanning with the high repetition rate of the laser was considered as a solution to overcome this lack of sensitivity (Péchevran *et al.*, 2005; Fernandez *et al.*, 2007, 2008a, b; Claverie *et al.*, 2009). Indeed it permits to ablate the sample according to complex trajectories in two dimensions in a fast or slow beam scanning mode and therefore extends the potential of the LA-ICPMS coupling. Four laser ablation strategies based on the unusual characteristics of the femtosecond laser system used here were compared. Table 1 gives the LA-ICP-MS operating conditions. For each ablation scheme, a typical picture of the ablated otolith and the shape of the resulting ICPMS signal are presented figure 2. The fluence was maintained at 14.6 J cm⁻² throughout all the experiments.

The first strategy is a translational sampling (1D scan) consisting in ablating the otolith from one edge to the other passing through the core (Fig. 2a). This was performed fixing the laser beam position while moving the ablation cell in such a way that the laser ablates each striae perpendicularly (sample translation speed: $5 \mu\text{m s}^{-1}$). The laser beam was continuously and automatically refocused during the ablation, according to the topography of the sample. This ablation was carried out at 500 Hz and resulted in a 20- μm wide lane.

In order to achieve the best spatial resolution, samples were also ablated using small craters (20 μm diameter) distributed across the region of interest (Fig. 2b). These craters were obtained after 120 shots applied to the sample at a repetition rate of 100 Hz. The spatial resolution along the sample is here defined as a combination of the spot size and the number of craters drilled into the sample.

A third complex ablation strategy called "flash ablation" was tested (Fig. 2c) in order to enlarge the amount of material of a given striae transported into the ICPMS while keeping a high spatial resolution. It consisted in a very fast 1D scan along a given striae which allowed the entire ablated material to be sent into the ICPMS in a very short period of time. The laser beam was moved using the galvanometric scanner along the x and y axis in such a way that it followed exactly the shape of the striae of interest with a lane width of 20 μm . This ablation was carried out at high repetition rate (5 kHz) and a laser beam velocity of $250 \mu\text{m s}^{-1}$ during 2 s. Likewise crater ablation strategies, the spatial resolution along the sample is governed by the spot size and the number of ablation performed along the otolith.

Finally, a 2D scan ablation was developed in order to increase the amount of material introduced into the plasma of the ICPMS compared to the 1D scan approach. It consisted in increasing virtually the spot size of the laser beam by moving it in the perpendicular direction to the sample displacement (Fig. 2d). The laser beam, applied with a repetition rate of 500Hz, was rapidly moved by a back and forth displacement along the axis parallel to the annuli (y axis; speed 1 mm s^{-1}) while the otolith slowly advanced in the perpendicular direction (x axis; sample translation speed $5 \mu\text{m s}^{-1}$) as showed in Fig. 2d. This led to a N shaped scanning formed by the partly overlapped pulses of 20 μm (87% on the y axis and 94% on the x axis) and resulted in a whole ablated surface of a desired wide lane of 100 μm (y axis) whose length depends on the sagittal otolith size (x axis). Prior to the ablation, the thin aragonite surface layer (a few microns) likely to be contaminated was removed by operating the laser at low fluence (1.5 J cm^{-2}).

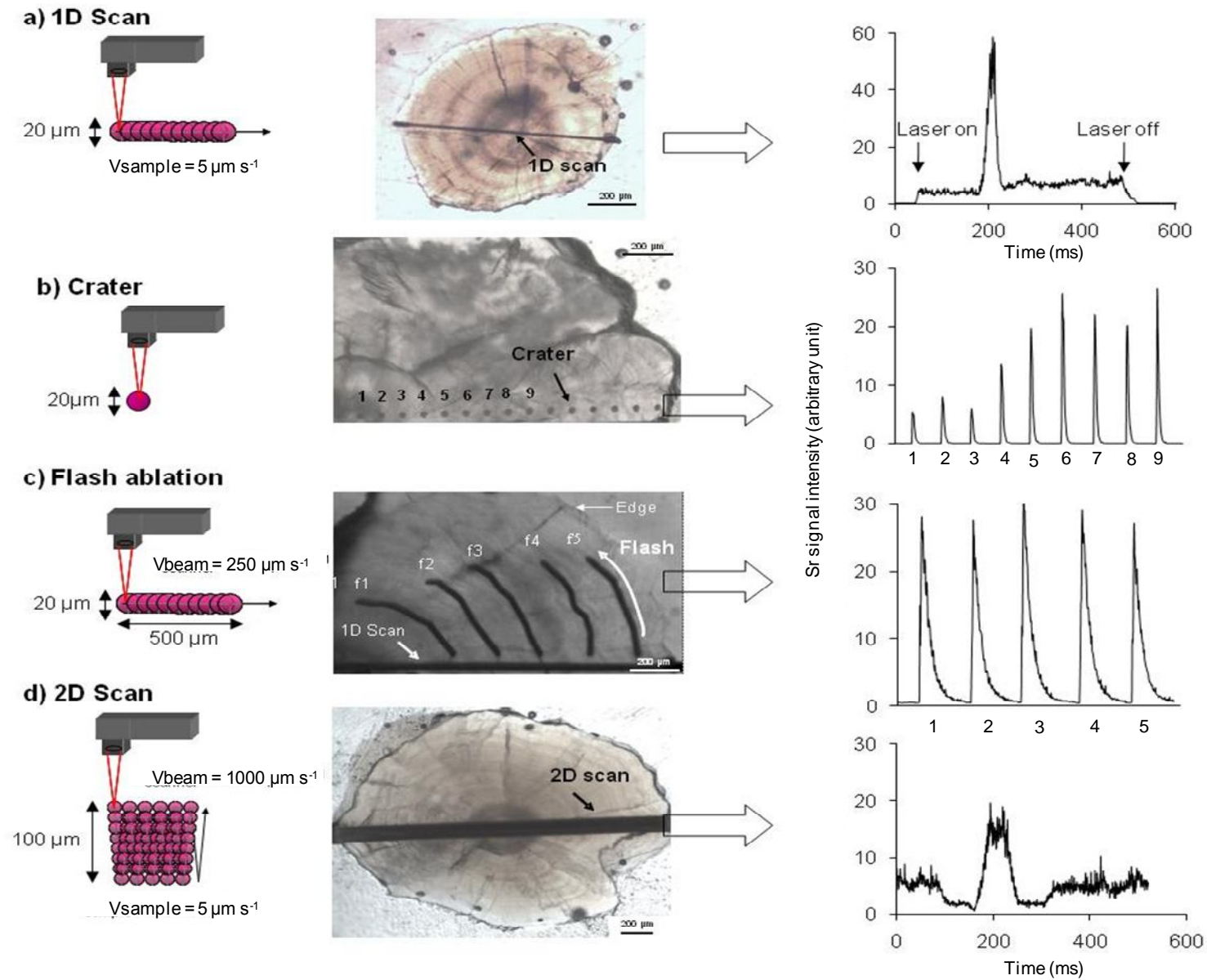


Figure 2. Scheme, characteristics and resulting profiles of the four ablation strategies. Pictures were provided by a microscope Leica with transmitted light (x50).

2.5. Standardisation

A series of twelve calcium carbonate standards containing twenty-four co-precipitated trace elements in expected concentrations ranging from 0.1 to 500 $\mu\text{g g}^{-1}$ were prepared as described elsewhere (Barats *et al.*, 2007). For each calcium carbonate standards, 20 mg of the co-precipitated powder were used and pressed in a 3-mm die (0.5 t for 2 minutes).

The fish otolith certified reference material n°22 (National Institute for Environmental Studies, Japan) (Yoshinaga *et al.*, 2000) was pelletized using the same protocol and used as certified reference material to assess the reliability of the CaCO_3 pellets and also to match with the high Sr concentrations ($> 2000 \mu\text{g g}^{-1}$) eventually found in eel otoliths (Daverat *et al.*, 2005; Arai and Hirata, 2006).

Trace elements in otoliths were quantified by external calibration using the enriched CaCO_3 pellets. Calibration was carried out at the beginning and at the end of each analytical series to compensate for ICPMS drift. Calcium carbonate standards were analysed in the same operating conditions as the otoliths, with an effective ablation time of 2 minutes per pellets for continuous 2D and 1D ablations, and 2 seconds for flash ablation and craters. ICPMS measurements were carried out in 3 successive replicates per pellet and per ablation strategy. Helium background was systematically measured prior the ablation to correct for potential memory effects.

2.6. Roughness measurements

In order to check the resulting sampling depth and volume ablated, roughness measurements were performed for the different ablation strategies on otoliths, by an optical surface profilometer Micromesure CHR150, developed by the STIL society (Aix en Provence, France). The Micromesure station was equipped with a high-resolution optical sensor with a field depth of 300 μm and a (Y) lateral axis resolution of 0.313 μm . Data were acquired by the SurfaceMap software and treated with the MountainMap universal software.

2.7. Evaluation of the ablation cell washout time and spatial resolution

In the case of continuous laser ablation analysis along the otolith, the resulting profile consists in a succession of elemental signals, each signal being produced by one laser shot. The spatial resolution obtained by the LA-ICPMS coupling is then governed by a combination of critical parameters such as the laser beam size, the repetition rate, the speed of the sample movement, the time needed to transport the aerosol ejected from the sample to the ICPMS, and the ICPMS acquisition speed. In our case, an excessive sample advancement velocity as well as an excessive washout time would irretrievably lead to the overlapping of the aragonite layers signature resulting in a bulk signal and not a specific one, degrading drastically the spatial resolution. Little has been discussed in the literature about such a bias in the field of otolith analysis. Washout time is easily estimated as the time between the end of the ablation and the blank signal recovery. This interval was evaluated for both low volume ablation cells based on ^{43}Ca signal, the most abundant element in carbonate matrices, in order to assess the greatest washout time.

In addition, the washout time does not really inform about the reactivity of the signal when a shift in elemental concentration occurs. In order to estimate the effective signal resulting from a concentration shift in the sampling material, continuous 1D scan and 2D scan were realised across grooves of $20\ \mu\text{m}$ width x $30\ \mu\text{m}$ depth and $40\ \mu\text{m}$ width x $30\ \mu\text{m}$ depth respectively (Fig. 3).

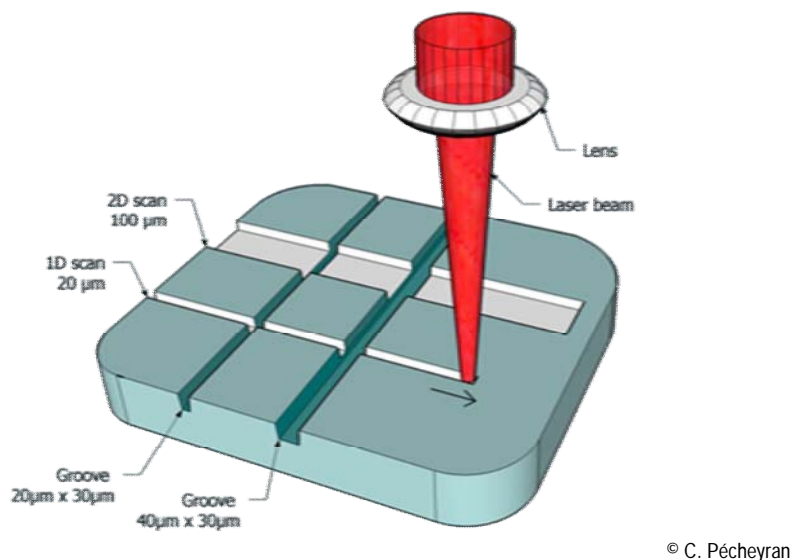


Figure 3. Ablation set up used to assess the signal intensity drop when the laser crosses $20 \times 30\ \mu\text{m}$ and $40 \times 30\ \mu\text{m}$ grooves engraved in the NIST 612 glass. The 1D and the 2D scans are represented.

These grooves simulate the concentration drift due to defocus of the laser beam. The strategy was tested on a certified glass NIST 612 due to its homogeneous elemental concentration and good surface state. Percentage of elemental signal loss when crossing these grooves was determined.

Finally, for a better understanding of the signal behaviour during a single and a succession of concentration shifts within the matrix, a third approach was tested. As it was impossible to reconstruct artificially a succession of aragonite striae with known elemental concentrations, we substituted the calcareous matrix by a Sr-enriched ink deposited by screen-printing on a glass blade in order to simulate a series of Sr-enriched striae. A succession of groove bands of 20 μm width and spaced of 20, 50 and 100 μm respectively, was first realized on a polyethylene terephthalate (mylar) film 13 μm thick (Goodfellow Cambridge Limited) using the IR femtosecond laser. The film was completely pierced by the laser impacts. The enriched Sr ink was prepared as follow: 50 mg of SrCO_3 isotopic standard NIST 987 (NIST, USA) were dissolved within 1 ml of 18.2 MOhm Milli-Q water acidified with 100 μl HNO_3 (Ultrax grade, J.T. Baker) for a final Sr concentration of 27 mg ml^{-1} . 70 μl of this solution were spiked to 2.329 g of black ink used for screen-printing (Electrodag® PF-407A, Acheson Colloids) and homogenised using 20 ml of acetone (Acetone Chromasolv®, Sigma-Aldrich). Excess of acetone was evaporated under a nitrogen stream until the initial ink mass (2.329 g) was recovered. The approximate Sr concentration in the ink was 2 mg g^{-1} . Screen printing was then operated after homogenizing the Sr-enriched ink before being laid on a glass blade through the mylar grooves. After the screen-printing, the mylar film was removed and the glass blade stained with the Sr enriched ink was dried 1h at 80°C. The Sr-enriched ink bands were then ablated in the two ablation cells according to the 1D and 2D scan trajectories described above.

3. Results and discussion

3.1. In depth penetration of the laser beam

Otoliths are complex calcareous structures consisting in the superposition of aragonite layers in three dimensions, basically like an onion structure (Fig. 4). It is then essential to take this structure into account in order to improve the accuracy of the sampling and avoid erroneous signal interpretation. Sampling depth is then of great importance and special care must be taken in order to prevent excessive drilling depth that would results in layers confusion. Laser penetration should not exceed the

width of the striae of interest. The depth of the striae depends on the nature of the striae: a penetration of around 15 μm is thought to provide a correct resolution for nucleus surrounding layers (Daverat, *pers. com.*), whereas seasonal striae are about 40 μm depth. Though of main importance, this parameter is scarcely considered in trace element otolith analysis by laser ablation.

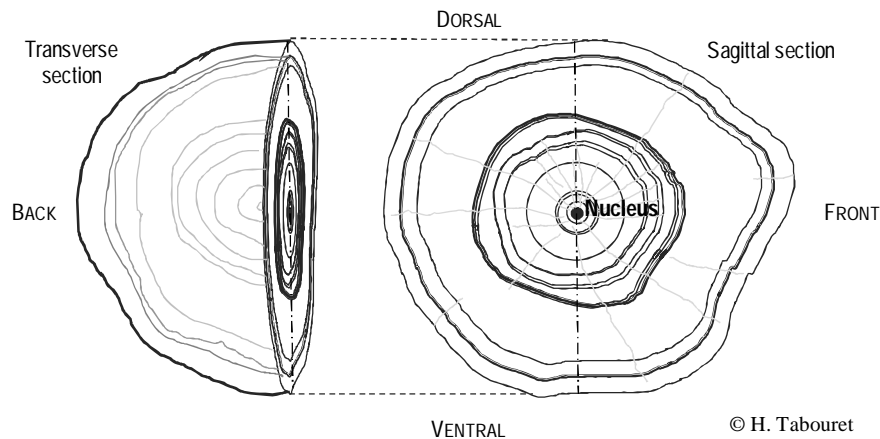


Figure 4. Three dimensional structure of a sagittal otolith

Under our ablation conditions, roughness results showed a 10 μm depth for the flash strategy. The crater depth and the 1D scan ablation depth were similar, around 15 μm , whereas the 2D scan ablation provided ablation depth 2 times deeper (Table 2). These low depth values are remarkable since they are lower than the thickness of the thinnest otolith layers surrounding the nucleus in case of flash, crater and 1D strategy. Even if the depth of the 2D strategy is deeper, it stays below the thickness of seasonal striae which has been evaluated to be around 40 μm on our samples. The femtosecond pulses have been demonstrated to provide very high in-depth resolution (typically 10-20 nm per pulse close to the ablation threshold) due to a very localized laser-material interaction (Pécheyrat *et al.*, 2005; Hergenroeder *et al.*, 2006; Pisonero *et al.*, 2006; Fernandez *et al.*, 2007). The femtosecond pulses clearly allow constraining the ablation process in shallow depth. This contrasts with nanosecond laser pulses used so far in the field of otolith analysis. References about three-dimensional characteristics of ablation craters on otoliths are however scarce in the literature. Jones and Chen (2003) highlighted such characteristics linked to travel speed, power, raster size, beam diameter, laser pulse and laser power. Using 266 nm nanosecond laser ablation sector field – ICPMS (SF-ICPMS) and different combinations of parameters (power, laser beam ...), crater depths were comprised between 10 and 500 μm , with a majority of combination leading to crater depth above 50 μm which might appear excessive in some cases.

Sinclair *et al.* (1999) has also shown according to their results from coral ablation that the smaller the crater, the higher the detection limits, the lower the precision of measured analytes. The signal sensitivity is directly governed by the amount of particles transported to the ICPMS. Hence the volume ablated and ablation depth affects the limits of detection. In order to highlight the best compromise, sensitivity of the four strategies and ablation cells used in this work were checked.

Table 2. Mean depth, volume and ablation rate for each ablation strategy. s: standard deviation (n=3). Volume were measured by surface profilometry, and converted in ablated mass considering a calcite density of 2.7 μm^3

	2D scan		1D scan		Crater		Flash	
	mean	σ	mean	σ	mean	σ	mean	σ
Depth (μm)	28	6	16	3	15	3	10	2
Ablation rate ($\mu\text{m}^3 \text{s}^{-1}$)	9 478	1 607	1 231	354	1 150	290	35 350	3 394
Aragonite ablation rate (ng s^{-1})	25.6	4.3	3.3	1.0	3.1	0.8	95.4	9.2

3.2. Signal sensitivity and accuracy

In order to obtain quantitative results, four standard pellets of multi elemental concentration ranging from 0.1 to 500 $\mu\text{g g}^{-1}$ were ablated in 3 replicates using each ablation strategies and ablation cells. A good linearity was obtained for all configurations and elements, with $r^2 > 0.994$. Table 3 reports the limits of detection (LOD) calculated based on the standard curve and three times standard deviation of the helium background outside ablation time. Helium background was considered as blank due to the significant trace element concentrations measured in the pure calcium carbonate sample that would hamper the proper instrumental LOD determination. Similar results were obtained for the 2 ablation cells when comparing the same ablation strategies. This indicates that the signal intensity is quite similar for both cells though a faster washout time was found for cell B (see below). However, considering the two ablation cells, the 1D scan and crater ablation strategies provided the higher limits of detection compared to the 2D scan and the flash ablation strategies.

Table 3. Limits of detection ($\mu\text{g g}^{-1}$) obtained for each ablation cell and strategy.

	Cell A				Cell B			
	Crater	1D scan	2D scan	Flash	Crater	1D scan	2D scan	Flash
^{24}Mg	2.648	2.685	0.261	0.168	3.853	3.324	0.275	0.083
^{55}Mn	1.969	1.904	0.187	0.129	1.098	4.051	0.168	0.085
^{66}Zn	8.994	9.29	0.676	0.421	4.008	9.086	0.928	0.274
^{86}Sr	7.141	7.066	0.767	0.492	4.177	8.256	0.857	0.332
^{95}Mo	0.336	0.578	0.039	0.019	0.198	0.71	0.046	0.011
^{138}Ba	0.227	0.338	0.032	0.015	0.165	0.427	0.032	0.012
^{120}Sn	3.446	8.372	0.583	0.317	3.321	7.88	0.583	0.215
^{111}Cd	0.508	0.805	0.069	0.029	0.302	1.462	0.059	0.024
^{208}Pb	0.252	0.393	0.036	0.021	0.237	0.798	0.032	0.015

Comparing the crater ablation with the flash ablation, limits of detection were roughly improved by a factor 15 with flash ablation, though these two approaches provided similar spatial resolution on the otolith ($20 \mu\text{m} \times 15 \mu\text{m}$). This is directly related to the ablation rate (volume ablated per time unit) provided by the respective ablation strategies. A typical trend of the limits of detection as a function of the ablation rate is presented (Fig. 5). This trend was observed for all the elements of interest and for both ablation cells. The exponential decay reveals that the atomisation/ionisation efficiency of the particles introduced into the plasma is likely influenced by the ablation rate. The alteration of the atomisation/ionisation efficiency into the ICPMS as a function of the ablation rate has already been reported in the literature (Koch *et al.*, 2006) when ablating glass. This was however not observed when ablating polyacrilamide gels (Claverie *et al.*, 2009b), which indicates that the physico-chemical properties of the particles introduced into the plasma plays an important role in the plasma atomisation/ionisation efficiency.

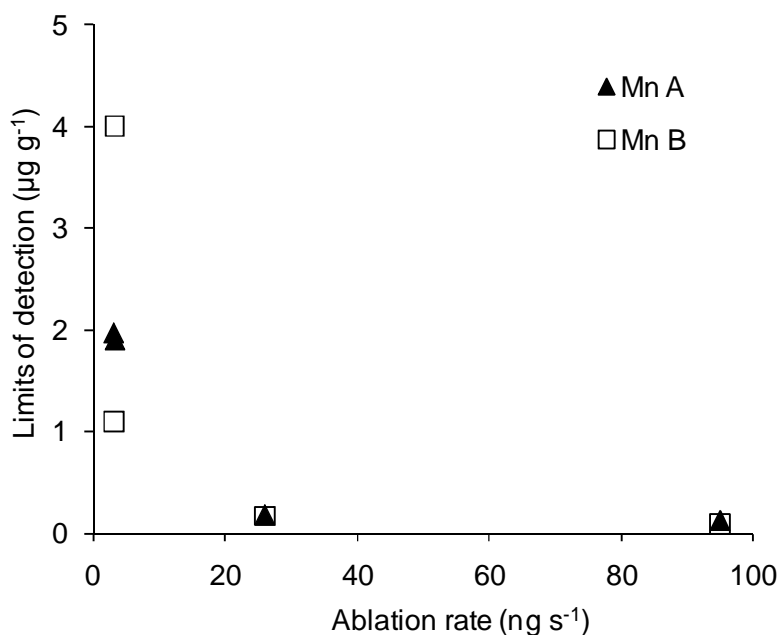


Figure 5. Typical trend of the limits of detection as a function of the ablation rate for both ablation cells, case of ⁵⁵Mn.

The major limitation of LA-ICPMS analysis is the lack of reference material certified for trace elements, especially for carbonate calcium matrix. Though femtosecond pulses have been demonstrated to provide very low elemental fractionation, and in this sense would likely present acceptable accuracy using non matrix match standards like certified glass standards, this approach was not investigated considering that matrix matching would always give better results. The calcite standard pellets used in this study were previously validated with nanosecond laser system based on the analyses of calcareous soil loam and argillaceous limestone certified material (Barats *et al.*, 2006). Despite similar chemical composition, calcite (standards) and aragonite (otoliths) depart slightly in terms of density, hardness and optical properties and then perfect matrix matching was not achieved in our study. However the reference material made of fish otolith, the fish otolith NIES22 (Yoshinaga *et al.*, 2000) was used to test the accuracy of the analytical method. The NIES22 pellet was ablated in three replicates for each ablation strategy and cell. The results are presented in Table 4. For all strategies the fraction of sample analysed is considerably low (< 4 order of magnitude) compared to the minimum sample mass recommended (100 mg) in the certificate of the CRM to ensure representative measurements. However, all the ablation strategies and cell configurations provided good accuracy for Mg, Sr, Ba, the mean values obtained being in good agreement with the certified and reference values.

Table 4. fs-LA-ICPMS analysis of fish otolith certified material NIES22. Elemental concentrations ($\mu\text{g g}^{-1}$) were obtained after calibration with the enriched calcium pellets.

	Cell A								Cell B								Certified values	
	Crater		1D scan		2D scan		Flash		Crater		1D scan		2D scan		Flash			
	mean	σ	mean	σ	mean	σ	mean	σ	mean	σ	mean	σ	mean	σ	mean	σ	mean	σ
^{24}Mg	19.62	6.83	21.37	0.42	19.8	0.99	21.6	2.27	27.14	7.18	22.78	1.05	19.28	1.25	19.11	0.69	21,00	1,00
^{55}Mn	-	-	-	-	-	-	0.3	<0.001	0.71	0.59	-	-	0.1	0.03	3.23	3.52	-	-
^{63}Cu	-	-	-	-	0.68	0.25	0.74	0.23	-	-	-	-	-	-	0.77	0.91	0.74*	-
^{66}Zn	-	-	-	-	-	-	1.1	0.02	-	-	-	-	-	-	-	-	0.47*	-
^{86}Sr	2355	100	2267	104	2370	13	2374	114	2348	420	2347	101	2368	74	2380	111	2360	50
^{138}Ba	2.98	0.06	3.11	0.14	2.77	0.04	2.87	1.17	4.42	1.01	3.75	0.24	3.03	0.18	3.16	0.32	2.89	0.08
^{120}Sn	1.89	0.04	0.79	0.21	0.23	0.01	0.54	0.06	0.94	0.44	0.92	0.36	0.12	0.08	0.18	0.03	-	-
^{111}Cd	1.02	0.14	-	-	-	-	0.083	<0.001	0.928	0.656	-	-	-	-	0.068	0.019	0.0028*	-
^{208}Pb	0.759	0.298	-	-	0.077	0.052	0.298	0.033	2.998	0.901	-	-	0.092	0.024	0.587	0.328	0.023*	-

Mass of ablated aragonite : crater: 6.2 ± 1.6 ng ; 1Dscan: 330 ± 100 ng ; 2Dscan: 2560 ± 860 ng ; Flash: 191 ± 18 ng.

* Reference value

Flash ablation also provides Cu values in good agreement with those attempted. According to the limits of detection, Cd and Pb were not detected with 2D and 1D scan strategies. Zn, Mn and Sn were only detected using flash ablation, though with signal close to the limit of detection naturally accompanied with high uncertainty. Concentrations measured on Mn and Sn are given as indicative values only, since no information was found about these elements in the NIES 22 certificate. It is worth noticing that Cu, Zn, Cd and Pb values given in the certificate came from a single laboratory and are therefore of limited reliability.

Among all the ablation approaches investigated here, crater ablation mode exhibited the highest signal variability as illustrated by standard deviation. This was attributed to the very low mass ablated which first generated a poor statistic counting on the ICPMS measurement and second, could not counterbalance the heterogeneity of the sample at the low micron scale. The reliability of the different types of femtosecond laser ablation strategy with regard to quantitative analyses using semi matrix-matched calibration (calcite pellets vs aragonite) was nonetheless demonstrated. This study indicates also that 2D scan ablation and particularly flash ablation should be preferred to analyse low elemental concentrations.

3.3. Washout time and temporal resolution

In the reconstitution of life history from biogenic calcareous samples, one of the main limitations in the surface sampling (and then the interpretation of continuous profiles) is the final temporal resolution. Two major factors have to be considered to estimate this temporal resolution: 1) the time-scale at which each element is precipitated within the calcium carbonate matrix, i.e. the time between the uptake from the environment to the incorporation within the otolith matrix, 2) the proper resolution time of the analytical method in relation with the spatial resolution of the micro sampling system. In the present case, the second factor is principally governed by the ablation strategy (beam size, repetition rate and trajectory) and washout time of the ablation cell. The ablation cells washout time was evaluated in a first step by recording the time required to get a ^{43}Ca signal drop of 90% and 99% after the laser stopped firing. As expected, the largest cell (A) showed the longest washout time, with a mean of 53 ± 7 s for a 99% loss of the initial signal, and 23 ± 2 s for a 90 % decrease (Fig. 6).

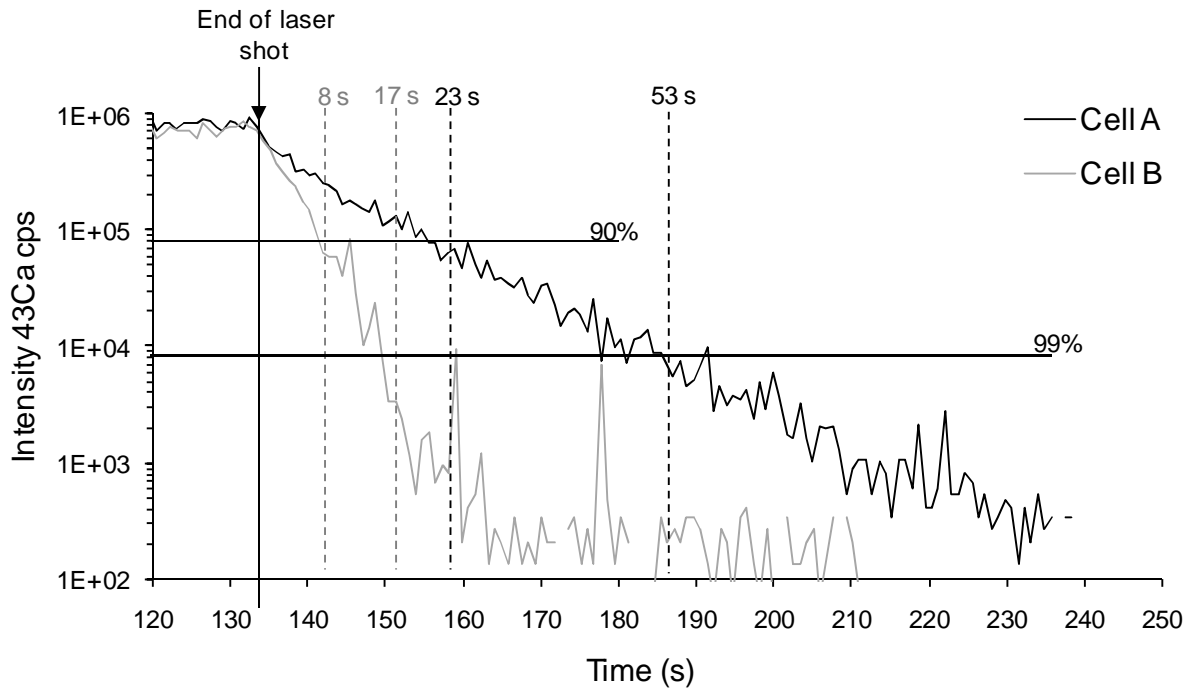


Figure 6. End of continuous profiles of ^{43}Ca (cps) resulting from 2D scan ablation in cell A and cell B showing the washout time (s) for a loss of 90% and 99%.

A significant improvement of the washout time was observed using the smallest ablation cell (B) providing mean washout time of 17 s and 8 s for a signal drop of 99% and 90% respectively (Fig. 6). It is worthwhile to note that 8 seconds correspond approximately to a width of 40 μm based on the continuous scan sampling speed of 5 μms^{-1} .

However, the strict washout time does not give accurate information in case of a concentration variation occurring during a continuous elemental profile. Results of signal drop were recorded for Ca, Sr and Ba, when the laser beam crossed very well defined grooves (20 μm wide and 40 μm wide respectively) previously laser-machined in a glass NIST 612. These grooves were machined in order to simulate a concentration drop as a result of a rapid defocusing of the laser beam. The widths of the grooves were selected in order to fit with the striae width generally observed in eel otolith. Results are presented in Table 5. First, the signal drop is more pronounced with 1D scan both in cell A and cell B than with 2D scan. The signal drop is however very limited (around 10 %) using the 2D scan in cell A except for the 40 μm wide groove (around 30 %). The signal dropped to 50% in cell B for the 2D scan ablation and up to 79% for 1D scan ablation when a 20 μm wide grooved was crossed. This was even more pronounced when a 40 μm was crossed (around 80 % for both grooves).

Table 5. Percentage of ablation signal loss (%) linked to a perturbation simulated by a groove of 20 μm or 40 μm width, for 2D scan and 1D scan ablation, and for both ablation cells (A and B). Results are given for ^{43}Ca , ^{86}Sr , ^{138}Ba based on the analysis of a certified glass NIST 612.

	Ablation	Groove width	^{43}Ca	^{86}Sr	^{138}Ba
Cell A	1D	20 μm	50	49	49
	2D	20 μm	11	13	7
	1D	40 μm	46	55	47
	2D	40 μm	36	33	29
Cell B	1D	20 μm	79	60	75
	2D	20 μm	49	49	49
	1D	40 μm	85	68	94
	2D	40 μm	79	76	79

The time duration corresponding to the signal drop was reduced by a factor 2 with cell B compared to cell A. The depleted signal period was found to be very close (6s and 8s for the 20 μm and the 40 μm groove respectively) to the time needed to cross the grooves at the sampling translation speed of 5 $\mu\text{m s}^{-1}$ (4s for a 20 μm wide groove; 8s for a 40 μm wide groove). This limited discrepancy is however attributed to non perfect laminar flow conditions taking place in the cells and the transfer line that likely enlarge the aerosol density distribution as a function of time. Similar results were obtained with the screen-printing method. The signal peak width corresponding to the ablation of the Sr-enriched-ink band was twice longer for cell A (35s for 1D and 2D scan) than cell B (17s for 1D and 2D scan). It was found that for a succession of 20 μm wide Sr-enriched bands, cell A was not able to discriminate bands separated by less than 50 μm (Fig. 7a) whereas cell B allowed to clearly distinguish three bands separated by 20 μm (Fig. 7b). It is worth to notice that in our case the ink printing on the glass blade didn't generate homogeneous staining which explain the poor signal intensity reproducibility obtained.

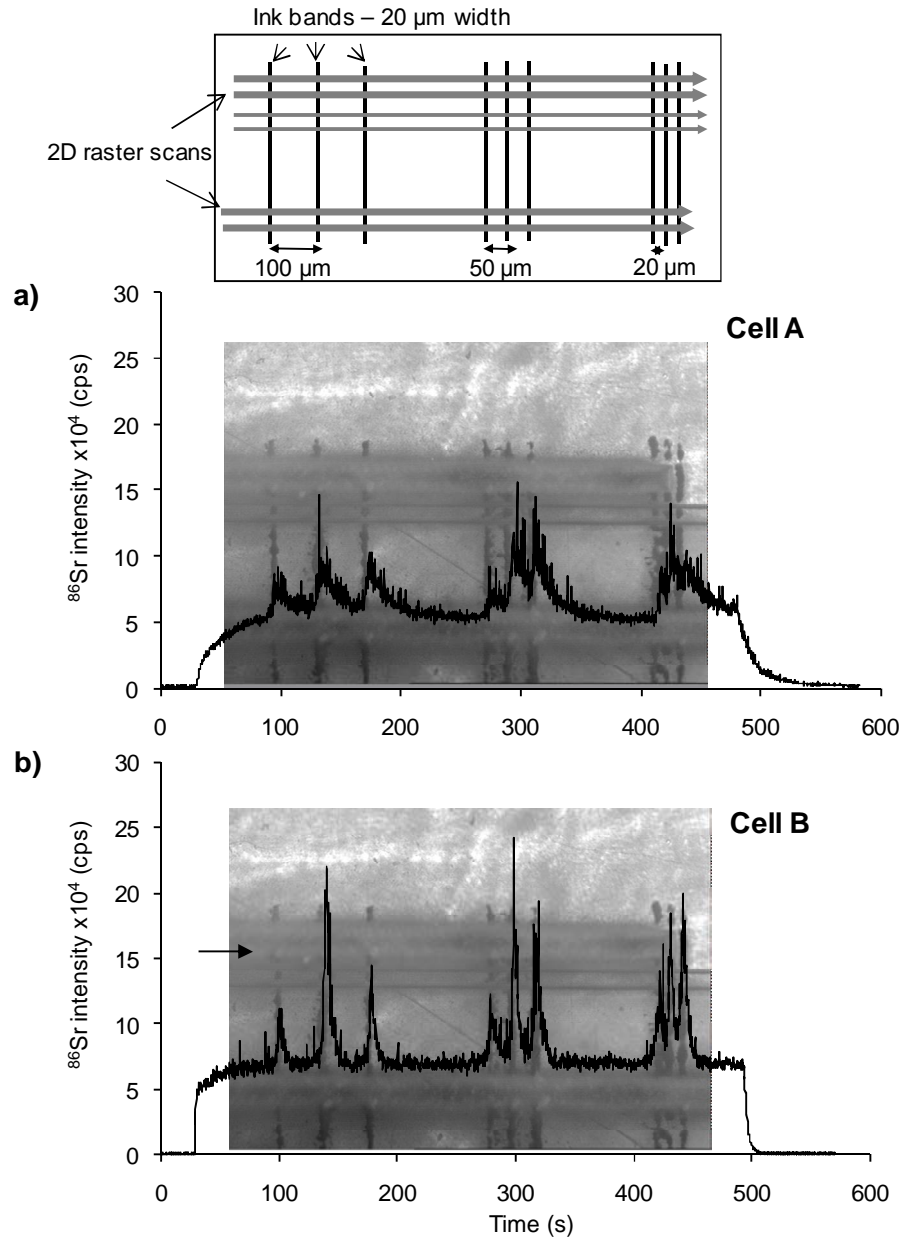


Figure 7. Sr continuous profiles resulting from the ablation of a succession of ink bands using 2D scan strategy in a) cell A and b) cell B. LS: Laser Shot.

These results demonstrate however that in our conditions, cell B provides spatial resolution at the surface of the sample better than 20 μm even for the 100 μm wide raster scans (2D scans). This is partly attributed to the low washout time. In addition, the original use of a very narrow laser beam (20 μm diameter) shooting the sample at high repetition rate according to a fast back and forth movement, results in the virtual increase of the size of the spot in one dimension only. In other words, in this approach the sample is virtually ablated using a 100 μm x 20 μm laser beam. This contrasts significantly to conventional laser conditions where a 100 μm wide raster would be obtained using a 100 μm diameter laser beam moved linearly at the surface of the sample. Considering the same sample

velocity advancement, the 100 µm diameter beam would impact a given area approximately 5 times longer than the 20 µm diameter beam used in this study. The use of narrow beam used in such conditions is then of particular interest when high spatial resolution is required. In these conditions, the 2D scan ablation strategy used here represents a new approach improving signal sensitivity while keeping an extreme spatial resolution of about 20 µm (surface) x 30 µm (depth).

Moreover, due to the small size of eel otolith and the ellipsoid shape of the growing striae, the raster width was limited to 100 µm in order to prevent mixing of two close consecutive striae. In the case of bigger otoliths from other species (mullet, sole...), wider rasters could be used without sacrificing the inherent spatial resolution of the laser ablation method developed here. Depending on the fish species, the otolith annual growth ring width can reach hundreds micrometers (Wright *et al.*, 2002). Important events in life history can occur over one week or more and are recorded in growth rings as small as 20 µm. The spatial resolution achieved here (20 µm surface x 30 µm depth) fits nicely with the requirements of fine otolith analysis. This corresponds to a similar temporal resolution than the resolution provided by Sinclair (1999) and Fallon *et al.* (1998) on coral with laser ablation/ICP-MS. It is also a better spatial resolution than those of 100 µm x 100 µm described by Fowler *et al.* (1995) and Thorrold *et al.* (1997) that lead to information about events occurring in a 20-40 days period in fast growing fish. If the scientific problematic focuses on a lower temporal scale (seasonal or daily scale), care must be taken for the choice of the laser ablation strategy engaged, and the smallest ablation cell must be favoured for the investigation of thinner calcareous layer and short events.

3.4. Monitoring the temporal variation of elements within the European eel (*Anguilla anguilla*) otolith

In order to illustrate the potential of high repetition rate fs-LA-ICP-MS to reconstruct life history of fish, especially European yellow eels (*Anguilla anguilla*), multi elemental profiles of otolith from yellow eels sampled in freshwater environment and in the Adour estuary (France) were examined with the 2D scan strategy developed, applied within the ablation cell A. Though better limits of detection and better resolution could be achieved with the flash ablation approach, the 2D scan was preferred over the flash ablation in order to improve the sample throughput. Designing trajectories following the shapes of the striae was found to be much more time consuming compared to the 2D scan ablation. Three main types of profile were distinguished for Strontium (Sr), all including a Sr peak from the core and out 150 µm

corresponding to the oceanic larval life stage. Outside larval zone, Sr showed three types of profile: i) a low Sr concentration with a mean of $700 \mu\text{g g}^{-1}$ without drastic shift (Fig. 8a), ii) a high Sr concentration with a mean of $2500 \mu\text{g g}^{-1}$ without drastic shift iii) low Sr concentration following by an increase of concentration (from 700 to $2500 \mu\text{g g}^{-1}$) two to four years after the estuarine arrival for the individuals examined (Fig. 8b). All Sr concentration profiles matched with Sr observation made in other aquatic ecosystems for *Anguilla anguilla* (Daverat *et al.*, 2005) and also for *Anguilla japonica* (Arai and Hirata, 2006). Moreover, Sr values and patterns correspond to those described by other authors as marker of freshwater residency (first profile described), estuarine residency (second profile), and migratory behaviour (third profile) (Daverat *et al.*, 2005 ; Tzeng *et al.*, 2003 ; Tsukamoto and Arai, 2001).

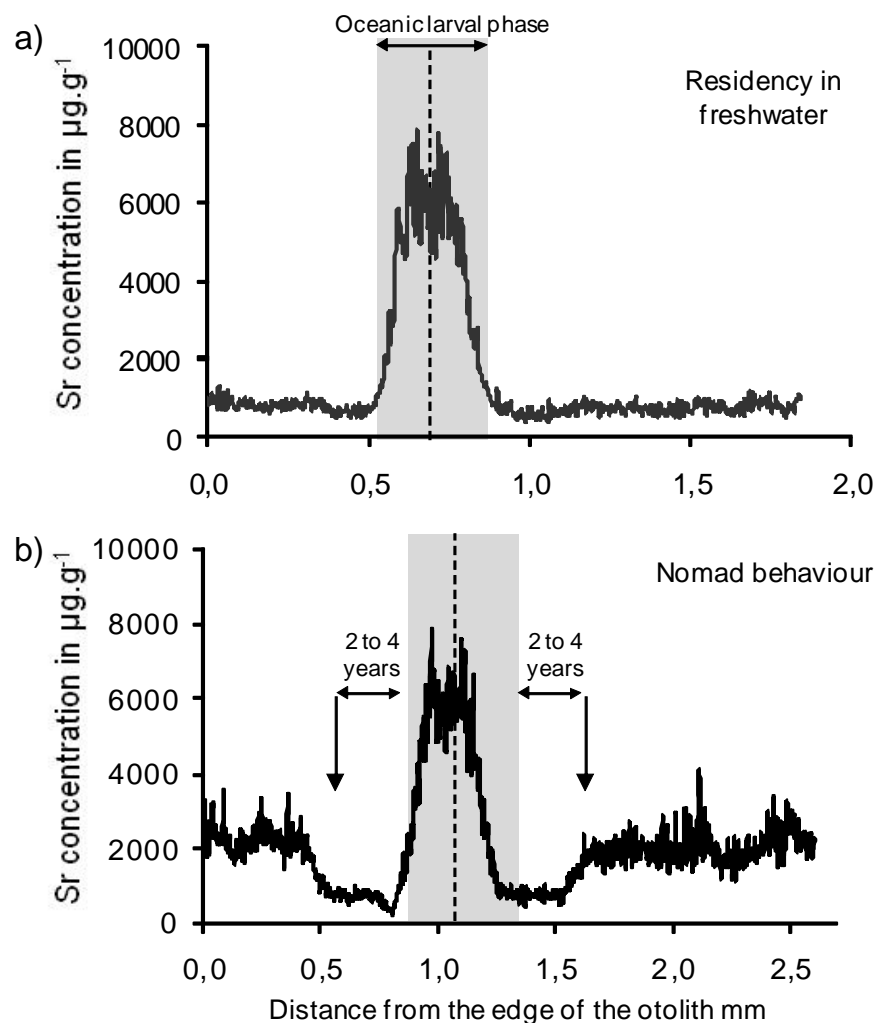


Figure 8. Example of Sr continuous profiles provided by a 2D scan ablation in cell A. a) Sr profile without drastic concentration shift observed on a freshwater resident yellow eel ; b) Sr profile with a drastic concentration shift during the life observed for a nomad yellow eel. Dotted line: otolith core; grey area: oceanic larval stage before estuarine arrival; black arrows: environmental shift during yellow eel phase.

Concomitantly to Sr variations, Barium also showed three types of pattern, therefore the Ba concentration behaviour was always the contrary of the Sr one. Among the other elements certified by the NIES22 analysis with 2D scan in cell A, Zn showed no significant variation from the elver mark to the sampling date. Zn concentrations (around $0.46 \mu\text{g g}^{-1}$) were similar to the NIES concentrations. Cu concentrations were below detection limits. For the other elements, Mg showed the most complex behaviour since large variation and peaks were observed without any regular pattern among the individuals of a same group and same age. The validation of Sr and Ba as markers of yellow eel habitats, and the explanation of the variation more or less complex of the otolith elemental records are beyond the scope of this paper and therefore will be discussed in detail in a dedicated publication.

4. Conclusion:

High repetition rate femtosecond laser ablation combined to fast beam scanning provides a new set of sampling approaches in order to improve signal sensitivity and spatial resolution in three dimensions (surface and depth of the otolith). Flash ablation trajectories allow trace element determination at a 10 ng.g^{-1} level within a single striae with high spatial resolution ($20 \mu\text{m}$). Continuous 2D ablation ($100\text{-}\mu\text{m}$ wide lane) still enhances signal sensitivity compared to a $20\text{-}\mu\text{m}$ wide linear scan (1D) performed at the same sample speed. This leads to a fast determination of trace element though with lower signal sensitivity and spatial resolution compared to flash ablation along a given striae. This is also supported by a parallel improvement of the ablation cell in term of volume providing a real improvement of the spatial resolution and signal response to concentration perturbations linked to short events. 2D scan ablation in large ablation cell allowed the determination of major events recorded within tens to one hundred μm width corresponding to an annual temporal resolution in European eel, whereas the same strategy carried out in smaller ablation cell leads to a spatial resolution of $20 - 40\mu\text{m}$ giving the possibility to investigate seasonal events. These analytical improvements constitute a great step in the otolith microchemistry that might lead to a better understanding of the elemental recording and in a further step a better understanding of fish ecology, migratory movements, environmental or physiological changes. This is of particular importance in the case of declining migratory species such as eels.

Acknowledgments:

This work was supported in the framework of the “Groupe de Recherche Adour” program sponsored by IFREMER, the University of Pau and Pays de l’Adour, and the CNRS. The “Equipe Physique et Chimie des Polymères” of IPREM is thanked for the loan of the LEICA microscope, and the Ecoles des Mines d’Ales for the optical surface profilometer Micromesure. H. Tabouret acknowledges the Aquitaine Region and IFREMER for her doctoral fellowship.

Partie 2. Utilisation simultanée des rapports Strontium:Calcium et Barium:Calcium dans les otolithes comme marqueurs des habitats : applications à l'anguille européenne (*Anguilla anguilla*) du bassin de l'Adour.

Simultaneous use of strontium:calcium and barium:calcium in otolith as markers of habitat: application to the European eel (*Anguilla anguilla*) in the Adour basin.

H. Tabouret¹, G. Bareille^{2*}, F. Claverie², C. Pécheyran², P. Prouzet¹, O.F.X. Donard².

¹ IFREMER Laboratoire des Ressources Halieutiques d'Aquitaine, UFR côte Basque, 1 Allée du Parc Montauray, 64600 Anglet

² Laboratoire de Chimie Analytique Bio-inorganique et Environnement, IPREM UMR CNRS - UPPA 5254, Hélioparc Pau Pyrénées, 64053 Pau Cedex 9.

Article en phase de soumission : *Marine Environmental Research*

Résumé : Les rapports Sr:Ca et Ba:Ca des eaux de l'estuaire de l'Adour montrent des relations évidentes avec la salinité en particulier pour des salinités inférieures à 20. Pour des salinités plus élevées, ces rapports sont pratiquement constants quelle que soit l'évolution de la salinité. Ces rapports élémentaires ont également été mesurés dans les otolithes d'anguilles européennes (*Anguilla anguilla* L.) par ablation laser femtoseconde couplée à un ICP-MS (fs-LA-ICP-MS). Une relation directe a été observée entre les rapports en Sr:Ca et Ba:Ca enregistrés par les otolithes d'anguilles prélevées en zones fluviale et marine, et ceux des milieux ambiants respectifs, suggérant que ces deux rapports élémentaires pouvaient être utilisés comme marqueurs des habitats colonisés par ces poissons. Des profils continus de Sr:Ca et Ba:Ca dans les otolithes ont alors permis de déterminer trois comportements : la résidence permanente en eaux douces, la résidence permanente en eaux salées et des individus migrants. Enfin, l'utilisation simultanée de ces deux rapports est proposée pour une meilleure compréhension des contingents migratoires et comme une méthode pertinente permettant d'éviter des erreurs d'interprétations liées à la présence de vaterite.

Abstract: Sr:Ca and Ba:Ca ratios in water from the Adour estuary show a clear relationship with the salinity of the surrounding water for salinities <20, while ratios are almost constant above this salinity. Positive relationship was observed for the Sr:Ca ratio, whereas it was inverse for the Ba:Ca ratio. These two elemental ratios were measured in otoliths of the European eels (*Anguilla anguilla* L.) using femtoseconde laser ablation ICP-MS (fs-LA-ICP-MS). There was a direct relationship between the elemental ratios recorded in eel otoliths and those found in waters from fresh and marine areas, suggesting that Sr:Ca and Ba:Ca ratios in eel otoliths can be used as markers of habitat in this estuary. Continuous profiles allowed the determination of three behaviours in term of habitat use: freshwater or estuary residency and migrant individuals. Finally, the above results support the simultaneous use of both ratios for a better understanding of the migratory contingents but also as a relevant method to avoid a misidentification of environmental migratory history due to the presence of vaterite crystal in otolith matrix.

1. Introduction

Recently, an increasing numbers of works have used the great potential of otoliths to permanently record environmental variations experienced by the fish over their entire lifespan (Campana, 1999; Campana and Thorrold, 2001; Panfili *et al.*, 2002). Otoliths are well known calcified structures, metabolically inert and continuously growing throughout the life, consisting in successive discrete layers of aragonite crystalline microstructure corresponding to daily growth increments (Campana and Thorrold, 2001) deposited on a protein matrix. These layers called annuli are able to trap minor and trace elements within the matrix during the calcification process. In combination with age data, otolith elemental composition have been used to reconstruct migratory environmental history of fishes (Elfman *et al.*, 2000; Halden *et al.*, 2000; Daverat *et al.*, 2005; Shiao *et al.*, 2006; Arai *et al.*, 2007). Among elements trapped in otoliths, strontium (Sr), especially the Sr:Ca ratio, is the most commonly tag used to describe migratory environmental history of diadromous and catadromous fishes (Limburg *et al.*, 2001; Milton *et al.*, 2008), especially European and Japanese eels (Tzeng *et al.*, 1997; Shiao *et al.*, 2006). But recent findings (McCulloch *et al.*, 2003; Elsdon and Gillanders 2005a; Hamer *et al.*, 2006) have highlighted the potential of Ba:Ca tag to also trace environmental histories of fish, due to the ability of Ba as for Sr to be incorporated into otoliths primarily in relation to ambient concentrations (Bath *et al.*, 2000; Milton and Chenery, 2001; Elsdon and Gillanders, 2004; de Vries *et al.*, 2005).

Nevertheless, before attempts are made to reconstruct migratory environmental history of eels or other fishes using elemental Sr:Ca and Ba:Ca ratios in estuarine environments, several assumptions must be checked (Elsdon *et al.*, 2008). Firstly, knowledge of variation in ambient chemistry between the water bodies of interest and over time need to be determined to demonstrate sufficient and consistent differences in ambient Sr:Ca and Ba:Ca levels through different environments. Secondly, it is necessary to check if the chemical signatures incorporated into otoliths of the species of interest really reflect the differences of the target element levels in the water bodies and are enough stable over time to assess the distinctiveness of chemical tags among occupied habitats. Finally, the accurate reconstitution of habitat histories depends upon the occurrence of vaterite inclusions, one of the three natural polymorphs of CaCO₃ (calcite, aragonite and vaterite). Indeed, vaterite was shown to trap much lesser amount of Sr and Ba than aragonite (Brown and Severin, 1999; Melancon *et al.*, 2005, Tzeng *et al.*, 2007), resulting in elemental ratio not related to the ambient water chemistry, that could conduct in misidentification of habitat use and historical migration (Tzeng *et al.*, 2007 ; Jessop *et al.*, 2008).

Our objectives in this study were to test whether the concomitant use of Sr:Ca and Ba:Ca ratios in otoliths of European eels (*Anguilla anguilla*) could provide a reliable tool to reconstruct eel movements in the Adour estuary. We initially compared ambient water chemistry among the freshwater and marine waters of this estuary to assess if concentration gradients exist for both Sr:Ca and Ba:Ca ratios in this region. Relation between otolith incorporation and water chemistry was then assessed by confronting Ba:Ca and Sr:Ca ratios determined from otoliths with water samples. Secondly, we tested the reliability of using both elemental ratios recorded into individual otolith to describe the life history of eels from the Adour estuary and the associated wetlands avoiding possible error inferred especially by the presence of vaterite inclusions in aragonite otoliths.

2. Materials and Methods

2.1. Fish sampling

Eel sampling was conducted at four sampling sites on the Adour basin (South West, France) selected to represent water masses of different influences, especially from the saline to the strict freshwater environment upstream (Fig. 1). The first one, sampled in July 2005 and July 2007, is situated near the estuary mouth (Redon) where the influence of marine waters is marked at the bottom with salinity comprised usually between 25 to 35, but around 10 - 20 only during specific tide and flow conditions. Two wetlands corresponding to floodplains and located closed to the upper limit of the saline intrusion were also sampled: one directly connected to the Adour river and submitted to the brackish waters influence only during spring tides and low flow (St Laurent de Gosse, SLG) and a second one connected to the Adour river by a tributary, showing brook characteristics (Termi) and never affected by saline water. Five sampling campaigns were conducted between October 2005 and July 2007 at these two sites by electrofishing. Finally, a couple of individuals were collected only once in the Gave de Pau river (Cauneille), one of the three major tributaries of the Adour estuary, outside the influence of the dynamic tide. Length (cm) and weight (g) were measured on the 81 yellow eels caught (Table 1).

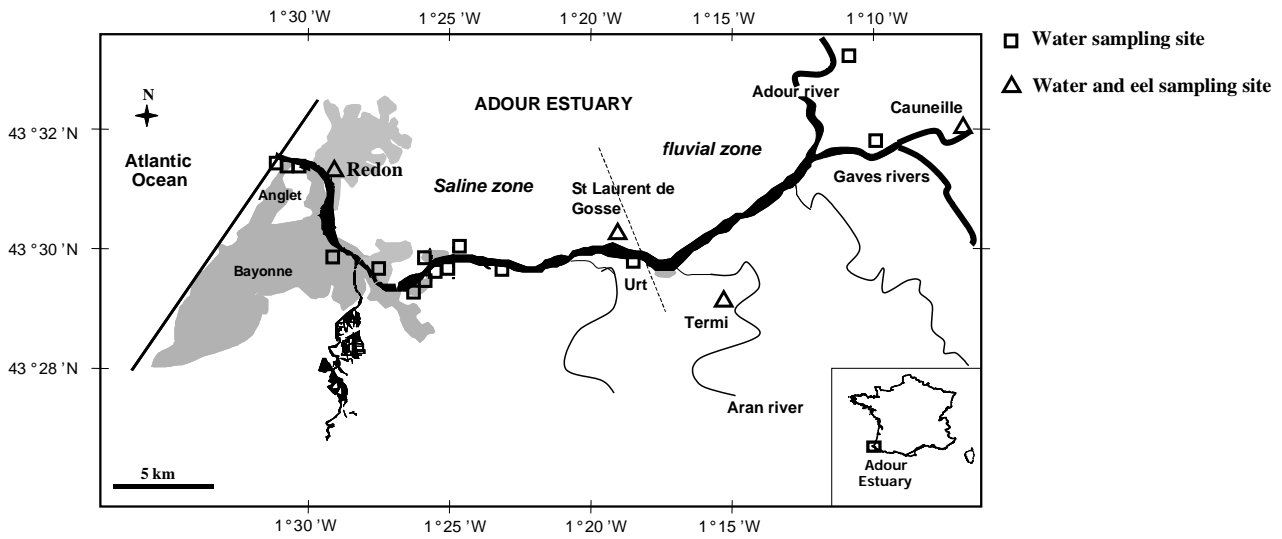


Figure 1. Map of the Adour basin showing the sampling sites for water (square) and yellow eels (star). Dotted line: Limit of the saline tide influence

Table 1. Characteristics of the sampling sites and yellow eels analysed

	Site characteristics	Number of fish	Mean length ± SD (cm)	Mean weight ± SD (g)	Mean age ± SD (year)
Estuary	Brackish water Channel directly connected to the estuary	14	43.7 ± 10.9	182.9 ± 145.4	6.5 ± 1.4
St Laurent de Gosse (SLG)	Freshwater - Influence of saline water when large tides occur	14	34.4 ± 13.2	109.3 ± 142.8	6.9 ± 1.7
Termi	Brook - Freshwater	49	30.7 ± 5.6	61.3 ± 41.4	7.6 ± 1.4
Cauneille	Freshwater - System with considerable metallic pressure	4	30.9 ± 5.7	46.5 ± 32.6	6.3 ± 1.5
Total		81			

2.2. Water chemistry

Spatial variability in water chemistry (Ca, Sr, Ba) was investigated across the mixing zone of the Adour estuary and within different freshwater tributaries and wetlands where eels were collected. Water samplings were collected twice at the wetland sampling sites (SLG and Termi, Fig. 1), on the 5th of September 2007 and the 26th of June 2008 during summer low flow conditions ($89 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$) and spring runoff ($272 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$), respectively. For the Gave de Pau River, a high frequency sampling strategy was conducted on a weekly basis from March to October 2007 to estimate how the water chemistry varies during an annual hydrological cycle. At this site, hydrological flow varied from $28 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ to $219 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ that included the low discharge period before runoff, the spring runoff, strong floods, as well as the summer low flow period. To assess the spatial variation of water chemistry in the Adour estuary, the entire salinity gradient was also sampled at the same date, September 2007 and June 2008. But, additional Ba water chemistry were also obtained either in the saline mixing zone as in the coastal zone using unpublished previous measurements (February 1998, $155 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ - winter low flow condition; July 1998, $150 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ - end of spring runoff) and new sampling campaigns (April 2007, $382 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ – flood and spring runoff ; June 2007, $334 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ – spring runoff). In 1998 and 2007, sampling were performed thank to an ultra trace Go Flo Teflon coated sampler (General Oceanic) on the French oceanographic vessels “Côte d’Aquitaine” and “Côte de la Manche” (CNRS/INSU).

Water samples were directly collected below the surface and processed using ultra-clean protocol as previously published in Point *et al.* (2007). Sr and Ba elemental concentrations were measured in freshwater and marine water samples using an X7 series CCT ICP-MS (Thermo Electron, Windsford, UK). Marine water samples were diluted to obtain less than 2 salinity prior to the analysis. Internal standard of Indium ($2 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) was used to correct for instrument drift. Ca was determined using ICP-AES (Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry - PANORAMA, Horiba Jobin Yvon). Blanks were regularly performed, using the same protocol as for samples, with $18.2 \text{ M}\Omega \text{ MQ}$ water (Millipore). The general performance of the procedure was checked using the certified reference freshwater SLRS-4 (NRCC, Canada) or the CASS-4 (NRCC, Canada), the latest being doped with Ba and Sr and appropriately diluted as the samples to 2 salinity. Mean Sr:Ca and Ba:Ca ratios were calculated for each sites. However, due to a lack of samples from the two wetland areas, a whole average was established for freshwater as for the marine waters (> 20) end-members.

2.3. Otolith preparation and Sr:Ca and Ba:Ca ratio determination by fs LA-ICP-MS analysis

Sagittal otolith pairs were removed from the fish, cleaned according Jones and Chen (2003) with H₂O₂ (ultrex), rinsed with 18.2 MΩ MQ water and dried. They were embedded in araldite resin (araldite DBF CH Escil, Chassieu, France), ground on a sagittal plan to expose their cores and polished with diamond paper of decreasing grain diameter (9, 3 and 0.1 μm) (Escil, Chassieu, France). Finally, otoliths were rinsed with 18.2 MΩ MQ water and dried prior to the laser ablation-ICP-MS analysis. Clean methods were applied throughout otolith extraction, preparation and analysis by using acid-washed instruments, wearing latex gloves and using 18.2 MΩ MQ water at all stages of the processes.

Otolith samples were analysed with an IR 1030nm femtosecond laser (Alfamet-Novalase, France) in conjunction with an Elan DRC II (Perkin Elmer). A linear raster scan ablation (width: 80μm) was made along the longest radius of the otolith, from one edge to the other edge and passing through the core (Fig. 2). This allows us to dispose of two independent transects that would help in the identification of possible perturbations resulting from the crossing of vaterite inclusions.

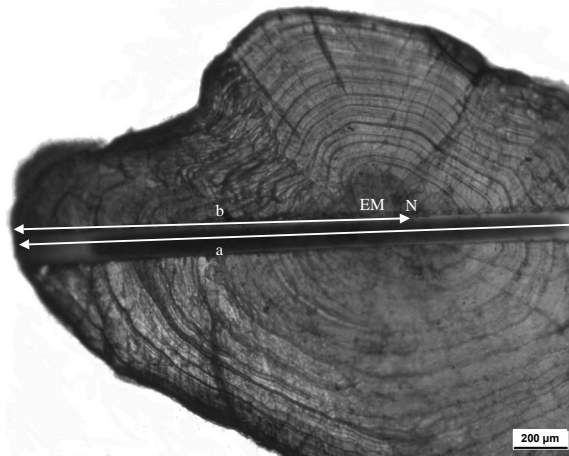


Figure 2. Otolith of yellow European eel (33.6cm total length, age 8 years) from freshwater site showing the entire continuous transect made by fs-LA-ICP-MS (a) from the edge to the other, and the section used for analysis (double arrows, b). EM: elver mark; N: nucleus.

Ultimately, one (or both) of the two transects was selected in order to determine chronological variation of ⁸⁶Sr and ¹³⁸Ba. A pre cleaning ablation, consisting in a very fast (50μm.s⁻¹) ablation, was

applied in order to avoid the contamination of the sample surface (Wyndham *et al.*, 2004). Table 2 gives the characteristics of the ablation and the coupling. Analytical accuracy was achieved with the fish otolith certified reference material n°22 (National Institute for Environmental Studies, Japan) (Yoshinaga *et al.*, 2000). ^{43}Ca was used as an internal standard for each ablation to check for variation in ablation yield. Strontium and barium were standardised to calcium (i.e. Sr:Ca and Ba:Ca) based on the stoichiometry of calcium carbonate ($400\,000\ \mu\text{g Ca g}^{-1}$ otolith), as these elements can substitute for calcium in the otolith matrix (Campana, 1999). Quantification of ^{86}Sr and ^{138}Ba concentration was allowed with the use of standard curve based on the analysis of calcite pellets (Barats *et al.*, 2007). The average detection limit based on three standard deviations (SD) of the blank gas was $767\ \text{ng.g}^{-1}$ for ^{86}Sr and $32\ \text{ng.g}^{-1}$ for ^{138}Ba .

Table 2. Operating conditions of the fs-LA-ICP-MS

Laser ablation

Instrumentation	Femtolaser (Alfamet – Novalase, France)
Wavelength	1030nm
Repetition rate	500 Hz
Energy	$31\ \mu\text{J.pulse}^{-1}$
Sampling strategies	Linear raster scan
Platine speed	$50\ \mu\text{m.s}^{-1}$ (pre-ablation), $5\ \mu\text{m.s}^{-1}$ (ablation)
Pre-ablation scan speed	$1000\ \mu\text{m.s}^{-1}$ (pre-ablation and ablation)

ICP-MS

Instrumentation	Elan DRC II (Perkin Elmer)
Dual sample introduction system	2 inlets – Internal injector diameter 1.5mm
Torch	Pneumatic concentric nebulizer 1ml.min^{-1}
Nebulizer	Cooled Impact bead (2°C)
Spray Chamber	
Coolant gas flow (Ar)	$15\ \text{L.min}^{-1}$
Auxiliary gas flow (Ar)	$0,8\ \text{L.min}^{-1}$
Nebulizer gas flow (He)	$0.6\ \text{L.min}^{-1}$
Isotopes and Dwell time (ms)	^{138}Ba , (25ms, 0.75amu) ^{86}Sr , ^{43}Ca (5ms, 0.3 amu)
Internal standard (m/z)	^{43}Ca

After the laser ablation, otoliths were decalcified with EDTA 5% (Ultra grade, Fluka). A first observation of the otoliths by stereomicroscopy (x50) (Optech, Sodipro, France) under reflected light was carried out in order to check the presence of vaterite inclusions that appear opaque within such conditions (Tzeng *et al.*, 2007). In a second step, otoliths were coloured with toluidine blue 5%

(Standard, Fluka). Finally, annual growth layers, and especially the annual growth stop mark, revealed by this coloration were observed by stereomicroscopy (x50) and counted in order to estimate individual age (Berg, 1985; Svedang *et al.*, 1998).

2.4. Relationships between water chemistry and otolith Sr:Ca and Ba:Ca ratios

In order to examine the relationship between otolith microchemistry and water chemistry, we compared background elemental ratios including most of fish otoliths and the averages of all water samples. Background otolith Sr:Ca and Ba:Ca values were calculated for each otolith using the portion of individual profile out of the elver mark from the proximal edge until the presence of a drastic shift in elemental concentration. The selected segment was primarily determined based on Sr:Ca profiles as this ratio has been widely used in the past and because less variations were observed compared to Ba:Ca especially in ambient chemistry of the freshwater environment. When no significant variation was encountered in Sr:Ca ratio from the outside edge to the elver mark, the whole profile was used to calculate the two elemental background ratios. Background ratio corresponds to an average value by omitting obvious high or low peaks greater than 3 times the standard deviation of the mean, being probably erratic.

Mean elemental ratio from water and otolith were also used to calculate partition coefficients for Sr (D_{Sr}) and Ba (D_{Ba}). They are defined as the otolith ratio divided by the water ratio (Morse and Bender, 1990) and allow the evaluation of elemental discrimination in otolith against the ambient water chemistry.

All elemental means given were expressed within a 95% confidence interval. Background level differences in water and otolith between sites were tested using non-parametric Kruskal Wallis test. Bravais Pearson tests were also performed to confirm the correlation between otolith and water data. The statistical data treatment was carried out using Xlstat-Pro 7.5.2 (Addinsoft, France).

2.5. Qualitative presence of vaterite inclusions as perturbation of continuous elemental profiles

Deficiency in both Sr:Ca and Ba:Ca elemental ratios in vaterite sections compared to aragonite (Brown and Severin, 1999 ; Melancon *et al.*, 2005; Tzeng *et al.*, 2007; Jessop *et al.*, 2008) was used to discriminate possible affected regions in otolith ablated sections. We first, compared the shape and the levels of Sr:Ca and Ba:Ca elemental ratios from the two transects performed on both sides of the nucleus. Furthermore, as vaterite crystal could be present across the whole ablated sections, background ratios calculated for our individual otoliths were also compared to previously published Sr:Ca and Ba:Ca ratios in vaterite crystal from European eels *Anguilla Anguilla* (Tzeng *et al.*, 2007). Vaterite inclusions appear darker than aragonite under reflected light after 5% EDTA etching (Tzeng *et al.*, 2007) and can be easily differentiated with an observation by optical microscopy. Finally, since otoliths were etched with 5% EDTA for the age estimation, we also visually checked for the presence of large vaterite inclusions along the otolith ablated profiles.

3. Results

3.1. Sr:Ca and Ba:Ca ratios in water bodies of the Adour estuary (freshwater, marine waters and salinity gradient)

Ca and Sr exhibit conservative behaviours across the salinity gradient of the Adour estuary, increasing linearly from land to the Basque coastal zone. On the other hand, a non conservative behavior and inverse trend was found for Ba, concentrations decreasing from a dissolved Ba plateau or peak maximum at low salinity to the sea. Regarding elemental ratio to calcium, the Sr:Ca ratio points to an exponential increasing trend between salinity 0‰ and around 20‰ (Fig. 3a) as Ba:Ca shows an exponential decreasing trend (Fig. 3b) for the same salinity interval ($r = -0.806$; $P < 0.0001$). These contrasted and opposite behaviours were temporally consistent whatever the flow conditions and result in a negative linear correlation (Fig. 3c) between the two elemental ratios along the 0 to 20‰ salinity range at least ($r = -0.933$; $P < 0.0001$). Beyond 20‰ salinity, both Sr:Ca and Ba:Ca ratios do not seem to vary according to the salinity. As expected, a very high Sr:Ca ratios ($19.7 \pm 3.2 \times 10^{-3}$) and relatively low Ba:Ca ($21 \pm 19 \times 10^{-6}$) were found at these high salinities (>20‰, Fig. 3a and b).

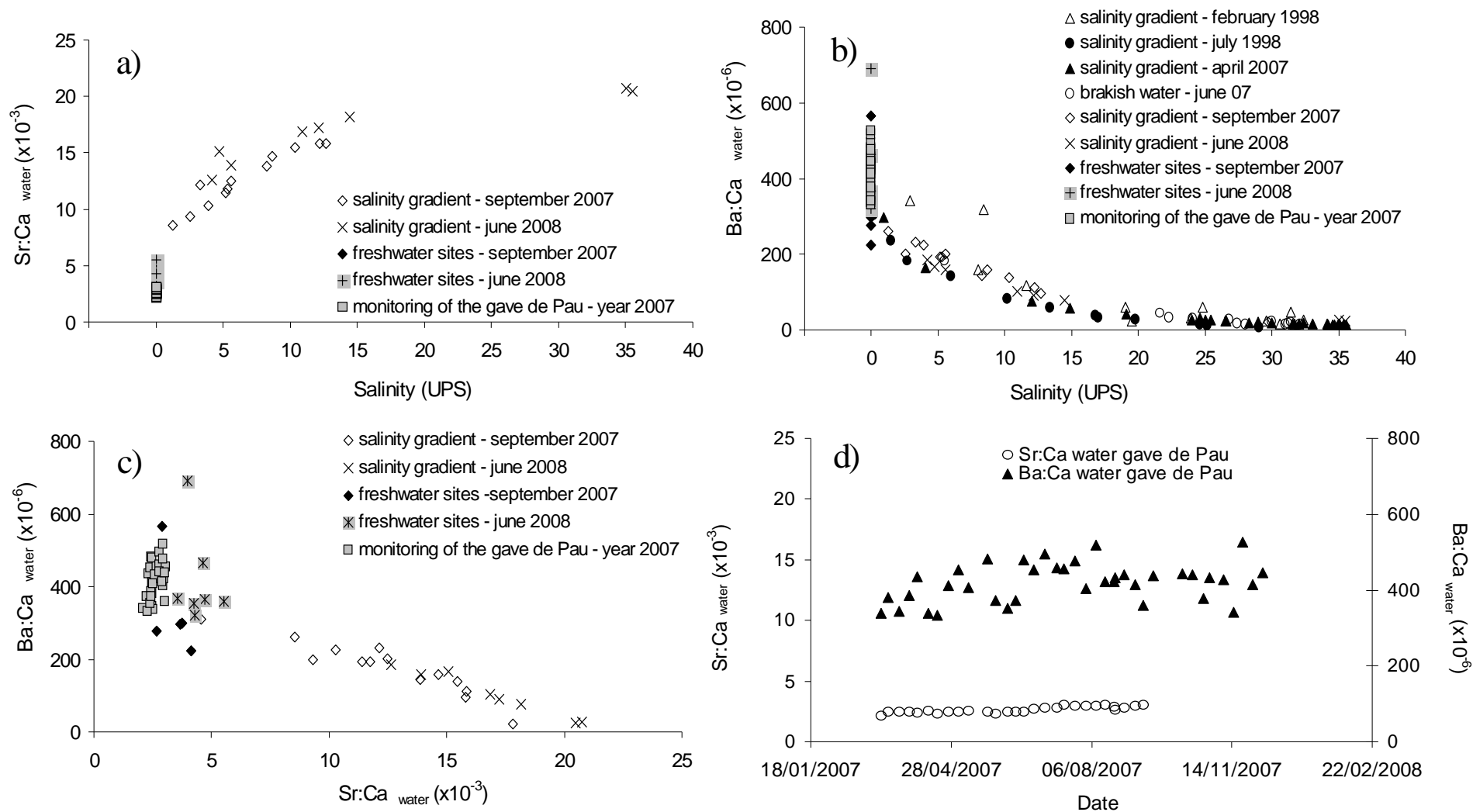


Figure 3. Relationship between Sr:Ca ratio in water and salinity (a), Ba:Ca ratio in water and salinity (b), Ba :Ca and Sr :Ca in water (c), and temporal evolution of Sr:Ca and Ba:Ca ratios along 2007 in the Gave de Pau river (d).

At the freshwater end-member, lowest Sr:Ca ratio values were encountered (Fig. 3a), varying from 2.08×10^{-3} to 4.64×10^{-3} and averaging $2.75 \pm 0.96 \times 10^{-3}$. On the contrary, highest Ba:Ca ratios were always found for the freshwater sites (Fig. 3b), ranging from 277×10^{-6} to 518×10^{-6} and averaging $408 \pm 117 \times 10^{-6}$. There were too low water samples among sites to investigate possible difference in elemental ratios within the freshwater tributaries. However, it could be noted, that both ratios raised in June 2008 compared to September 2007 at each of the sites, being more pronounced for Ba:Ca than Sr:Ca (Fig. 3c). Furthermore, the high frequency temporal variability recorded on the tributary Gave de Pau (Fig. 3d) across almost an entire hydrological cycle (March to October 2007), was found to encompass the overall dispersion of data including all freshwater sites (Fig. 3a, b).

Overall, the water chemistry results demonstrated that first, significant and opposite relationships exist between Sr:Ca and Ba:Ca and salinity in the Adour estuary and secondly, no overlapping was observed between fresh and marine water end-members for both elemental ratios.

3.2. Otolith background levels and water chemistry

Mean background levels of Ba:Ca of individual otoliths were plotted versus Sr:Ca in Figure 4 for all sampled areas. For the 67 eels caught in freshwater sites, background Sr:Ca ratios were consistently low varying from 0.94×10^{-3} to 2.57×10^{-3} with an average of 1.59×10^{-3} , while Ba:Ca ratios values were consistently high being comprised between 4.54×10^{-6} and 21.8×10^{-6} with an average of 12.1×10^{-6} . The reverse pattern was clearly consistent for eel otoliths collected in the lower estuary, although 7 of 14 eels from this area had variable elemental ratios that would indicate diverse pattern of life-history. Taking into account only the outer part of the ablated profiles, corresponding to high Sr:Ca values, for these 7 particular eels and the whole profile for the other 7 eels, Sr:Ca ratios varied between 4.78×10^{-3} to 7.91×10^{-3} with an average of 6.45×10^{-3} as Ba:Ca ratios varied between 0.51×10^{-6} and 4.42×10^{-6} with an average of 1.16×10^{-6} . The variability (standard deviation SD) around the background for each individual otolith was lower for Sr:Ca in each end-member (SD averaging 20%) compared to that observed for Ba:Ca (SD generally >30%). Mann-Whitney *U*-test confirmed a significant difference in Sr:Ca and Ba:Ca levels between strict estuary (salinity >20) and freshwater sites (*P* value of Sr:Ca < 0.007 and Ba:Ca < 0.005), and reflected the observed water chemistry differences (Fig. 5).

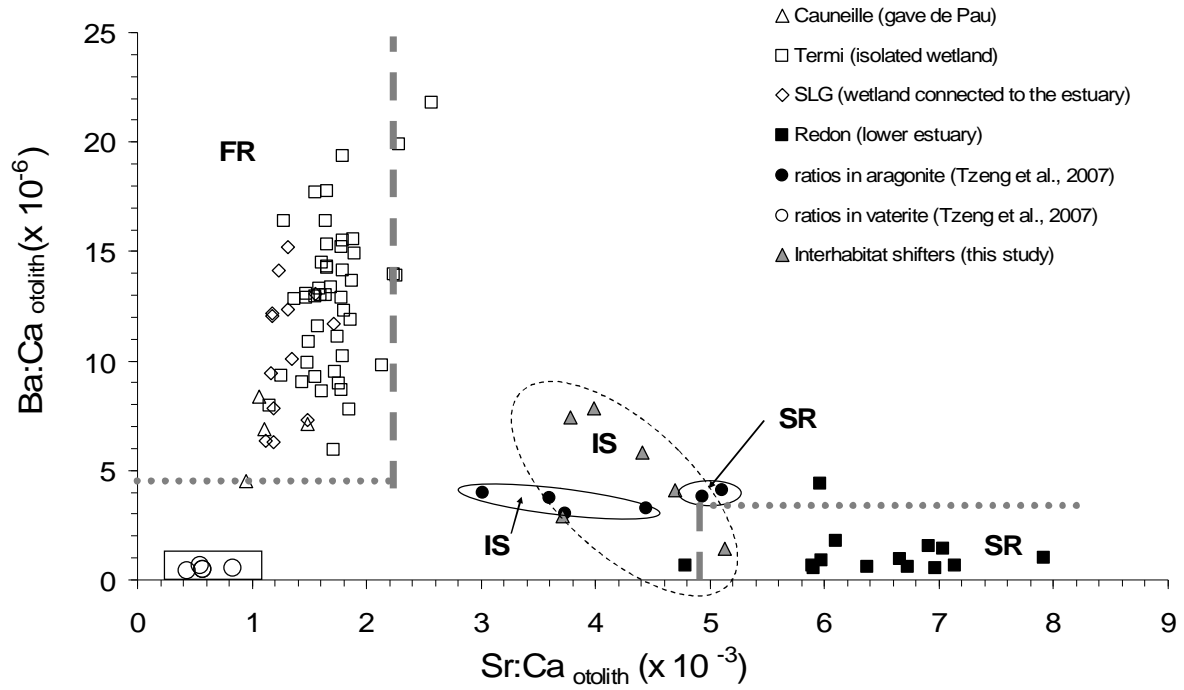


Figure 4. Relationship between Sr:Ca ratio and Ba:Ca in otolith of eel *Anguilla anguilla* from the Adour estuary for the two end-members, freshwater sites (Cauneille: triangle, SLG: lozenge, Termi: open square) and brackish (filled square). Ratios found in the same species by Tzeng *et al.*. (2007) in both aragonite (filled circle) and vaterite (open circle) otolith microstructures are also shown for comparison. FR: freshwater residency; SR: saltwater residency (>15); IS: interhabitat shifters. Dotted lines illustrate the elemental background ratios plus or minus 2 S.D. and give limits to determine the habitat use.

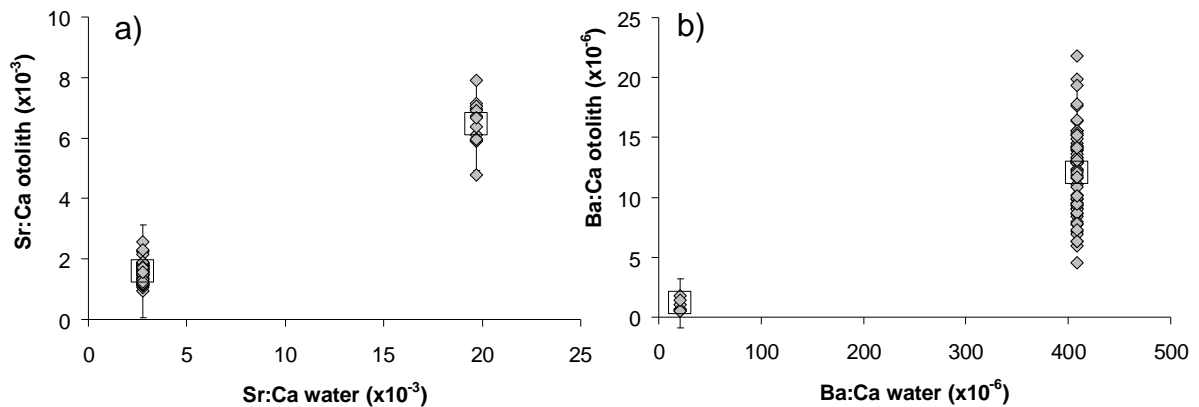


Figure 5. Relationship between Sr:Ca ratio in otolith and Sr:Ca in water (a), Ba:Ca ratio in otolith and Ba:Ca in water (b). Grey dots are individual otolith background data, open square are mean ratios with 95% CI illustrated by a double bar. FR: freshwater resident; SR: saltwater resident (>15).

Partition coefficients for Sr and Ba, namely D_{Sr} and D_{Ba} , characterised the relationship between otolith and the ambient water chemistry. Mean D_{Sr} and D_{Ba} differed slightly between whole freshwater and saltwater of the estuary, 0.49 ± 0.24 and 0.33 ± 0.08 for Sr and 0.036 ± 0.024 and 0.043 ± 0.04 for Ba respectively. Greater variability in D_{Ba} occurred as indicated by greater confidence intervals. Regarding the partition coefficient values for each sites, the Gave de Pau site showed the lowest D_{Ba} of freshwater sites (0.016 ± 0.04) whereas Termi site values were the highest (0.040 ± 0.011) contributing to the large variability observed for the whole freshwater site D_{Ba} average. Eels from St Laurent de Gosse showed a D_{Sr} (0.314 ± 0.042) similar to the estuary one, although eels from Termi and the Gave de Pau river showed significant highest values (0.549 ± 0.087 and 0.438 ± 0.089 respectively). Slightly higher D_{Sr} mean in freshwater could indicate a more active uptake of Sr:Ca at low ambient Sr levels, or other sources of Sr than water.

3.3. Check for possible vaterite disturbances in otolith ablated sections

For most of the ablated transects made from the core to the opposite edges of individual otolith, elemental ratios were generally closely similar in shape and levels suggesting that vaterite inclusions would be rather limited along the ablated sections. In addition, as illustrated on figure 4, when our otolith background Sr:Ca ratios do not really differ from values found in vaterite crystal sections of the same eel species (Tzeng *et al.*, 2007), then the Ba:Ca ratio is far from ratio encountered in vaterite. The reverse is also shown suggesting that our otoliths would have not suffered of large discontinuities that could be vaterite.

3.4. Sr:Ca and Ba:Ca continuous profiles in otoliths to reconstruct historical migrations

We attempted to reconstruct the history of eel habitat-use by the simultaneous use of both ratios in otoliths. Three assumptions were thus made based on observed ranges of Sr:Ca and Ba:Ca ratios into otoliths, that would permit to interpret residency in the salt waters (estuarine or coastal) or the freshwater environment of the Adour basin or migration between the two habitat for all eels irrespective of sampling location. The three assumptions are as follow:

(1) Background Sr:Ca ratios $<2.23 \times 10^{-3}$ (mean Sr:Ca background ratios of 67 eels caught in the freshwater catchment plus 2 S.D.) and Ba:Ca ratio $>4.84 \times 10^{-6}$ (mean Ba:Ca background ratios of 67 eels caught in the freshwater catchment minus 2 S.D) were considered as freshwater residency (FR, see Fig. 4).

(2) Background Sr:Ca ratios $>4.93 \times 10^{-3}$ (mean Sr:Ca background ratios of 14 eels caught in the lower estuary part minus 2 S.D.) and Ba:Ca ratio $<3.2 \times 10^{-6}$ (mean Ba:Ca background ratios of 14 eels caught in the lower estuary part plus 2 S.D.) were considered as salt water residency with salinity >20 (SR, see Fig. 4), either in the coastal zone as in the lower estuarine area.

(3) Otolith with Sr:Ca and Ba:Ca intermediate values, were regarded as a residence in the salinity gradient (2 – 20) or associated to interhabitat shifters (IS, see Fig. 4) moving from one environment to the other. In this latter case (IS), each end-member signature could be recorded the one after the other, if eel resides long enough in each environment for the elemental ratio to be imprinted in detectable levels.

For all otoliths, high Sr:Ca and Ba:Ca ratios (Sr:Ca = 10×10^{-3} ; Ba:Ca = 3.5×10^{-6}) were observed in the central region corresponding to the leptocephalus stage from the core and out $150 \mu\text{m}$. These ratios decrease after the elver mark is thought to be linked to the metamorphosis and the remobilization of element stock occurring during this event more than to the salinity (Otake *et al.*, 1997) (Fig. 6), and thus can not be used as habitat reconstitution.

Based on the three assumptions defined above, life-history scan of otolith, using simultaneous high resolution Sr:Ca and Ba:Ca ratios out of the elver mark, allowed to distinguish three types of profiles. The first one was observed for all the individuals caught at the freshwater sites, which showed consistently low Sr:Ca ratios and high Ba:Ca ratios kept all along the life (Fig. 6a). This pattern would suggest that eels collected in the freshwater area of the Adour estuary did not subsequently move between fresh and salt waters along their life, but rather continuously resided in freshwater until the silver eel age. The two other types of profiles were only found in eels caught within the lower part of the estuary. Half of yellow eels from this area showed consistently high Sr:Ca ratio and low Ba:Ca ratio after the elver mark (Fig. 6b). Inversely to the previous type, this simultaneous Sr:Ca and Ba:Ca trend illustrates a permanent residency in the estuary at salinity $>20\text{‰}$ without ever entering fresh water. For the second half of the individual eels within the estuary, one drastic and simultaneous change in Ba and Sr ratio occurred. Indeed, a period of low Sr:Ca and high Ba:Ca ratios appeared before a high Sr:Ca and low Ba:Ca (Fig. 6c).

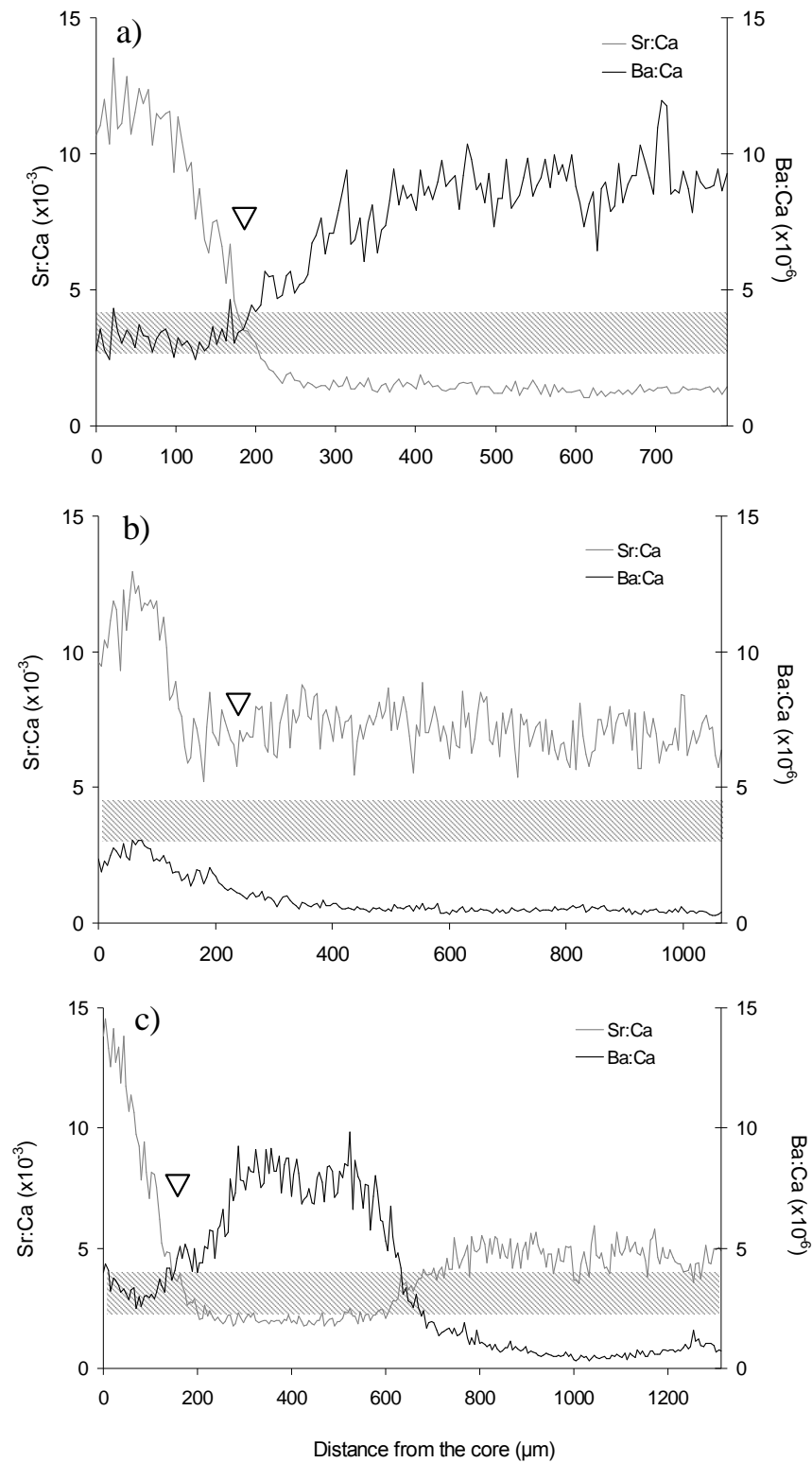


Figure 6. Continuous profiles showing the evolution of Sr:Ca (grey line) and Ba:Ca (black line) ratios in otoliths of a) a freshwater resident b) an estuary resident c) a downstream nomad or interhabitat shifter. Grey area delimits habitats and highlights behavior of strict residency in a single habitat (freshwater or marine water) when Sr:Ca and Ba:Ca ratios are situated in the opposite side of the grey area. ▽: elver mark. This may indicate that these particular eels had colonised freshwater at the elver stage for a period of 2 to 4 years, then migrated downstream to the lower part of the estuary where they stayed until the sampling. They are thus classified as interhabitat shifters (IS).

4. Discussion

4.1. Water and otolith chemistry

There is a growing literature that explores the otolith microchemistry especially to distinguish populations or stocks or to reconstruct migratory histories of fishes (Campana, 1999). Nevertheless, spatial differences in elemental concentrations were scarcely measured and often derived from predictable relationships with salinity. Such relationships were used for Sr despite the fact that some freshwater locations may have water with Sr:Ca ratio close to or greater than seawater (Limburg, 1995; Wells *et al.*, 2003; Kraus and Secor, 2004). In addition, limited emphasis has been placed on examining temporal variability (Elsdon *et al.*, 2008) although Ca, Sr and Ba are expected to regularly change in concentration within estuaries or coastal zones at different time-scales (day, week, month, season) (Elsdon and Gillanders, 2006) because of the interplay of several processes (tidal cycling, freshwater flow, flushing time ...). Indeed, the distribution of ambient Ba:Ca along estuarine gradients would be largely influenced by the release of Ba-enriched fluvial particles at low salinities in the upper estuary zone (Li and Chan, 1979; Coffey *et al.*, 1997), benthic–water column fluxes (Colbert and McManus 2005), mixing of fresh and salt waters (Coffey *et al.*, 1997; Elsdon and Gillanders, 2006) and uptake in association with biological activity (Guay and Falkner, 1998). In a recent review, Elsdon *et al.* (2008) insisted thus on the necessity of acquiring more knowledge on such variability as on factors influencing otolith chemistry, before elemental information recorded in otolith can be used to accurately describe life history events and fish movement patterns.

In this study, we investigated spatial and temporal variability of water chemistry on Sr:Ca and Ba:Ca ratios in the Adour estuary. The behavior of Sr and Ba was clearly related to the salinity in accordance with other studies (Coffey *et al.*, 1997; Guay and Falkner, 1998; Secor and Rooker, 2000; Howland *et al.*, 2001; Kraus and Secor, 2004; Colbert and McManus, 2005; Moore and Shaw, 2008), resulting in relationships between Sr:Ca and Ba:Ca ratios and salinity. Nevertheless, such relationships appeared to be valid only for a salinity below 20-25‰. Within this salinity interval, clear exponential relationships between Sr:Ca (positive) and Ba:Ca (negative) and salinity were defined whatever the flow regime (i.e. spring runoff and low flow periods). Exponential negative trend between Ba:Ca and salinity was previously observed by Elsdon and Gillanders (2005b) but only for salinity above the Ba peak concentration expected at low to mid salinity and depending on the river flow, the suspended load and how compressed the salinity gradient is along the estuary (Coffey *et al.*, 1997; Guay and Falkner, 1998;

McCulloch *et al.*, 2003; Moore and Shaw, 2008). The dissolved Ba peak maximum in the Adour estuary occurred at magnitude ($100 - 150 \text{ nmol L}^{-1}$) similar to the lower end-member found in the literature (Guay and Falkner, 1998), probably because of the weak particulate load generally encountered in this estuary. The limited release of Ba would not affect in a complex way the Ba:Ca ratio at low salinity in the Adour estuary as should be the case in estuaries with relatively large dissolved Ba peaks.

Beyond 20-25‰ salinity, both ratios did not vary according to the salinity. They remained almost constant as it was observed in other systems (Kraus and Secor, 2004; Elsdon and Gillanders, 2005b), at values similar to normal seawater for the Sr:Ca ($18-20 \text{ } \mu\text{g mg}^{-1}$) and to Atlantic surface water for the Ba:Ca (around $5-11 \text{ } \mu\text{g mg}^{-1}$) (Guay and Falkner, 1998). Among the two ratios, the water Ba:Ca ratio varied largely around the average ($\pm 80\%$) in relation either to isolated high peak concentrations of Ba or to more global higher levels of dissolved Ba in the salinities 20-25‰ for some dates which may reflect changes in particulate load or other factors not really well constrained yet. Nevertheless, the even large variability in Ba:Ca ratio encountered in the high salinity zone of the Adour estuary appeared to be very small compared to the observed gradient between the two end-members, so that it can be considered as low and constant for this end-member. Furthermore, it would imply that discriminating eels living in strict marine habitat (i.e., the coastal zone) from those living in the lower estuary (i.e., mixing zone corresponding to a salinity range between 20 - 30‰) would be more difficult with these two elemental ratios in the Adour estuary and Basque coast.

Concerning the freshwater end-member, relatively large variations were found apart from the average for both ratios. This variability can be related for the Ba:Ca ratio to the seasonal flow pattern and to weekly changes for which the cause is yet unclear, while they appear to be more largely driven by seasonal scale for the Sr:Ca ratio, as previously found by Elsdon and Gillanders (2006). Part of the variability can be associated to various underlying geology as well as processes influencing elemental concentrations in water (dilution, active binding to fluvial sediments, benthic-water fluxes...). Despite the unstable freshwater ratio signature, the Ba:Ca water ratio of this end-member is always towards values stronger than those obtained for low salinity zone, resulting in no overlap with the salt water signature.

This clearly highlights the potential of both ratios to trace freshwater and salt water environmental histories of eels and other fishes inhabiting this estuary. Similar trends in water and otolith ratios in our study were consistent with previous studies on other fish species confirming the growth evidence that incorporation of both Sr and Ba into otoliths is primarily driven by ambient concentrations (Bath *et al.*, 2000; Milton and Chenery, 2001; Elsdon and Gillanders, 2004; Lin *et al.*,

2007). Nevertheless, although freshwater display in average seven times less Sr:Ca and twenty times more Ba:Ca than saltwater, we found that freshwater otoliths display in average four times lesser Sr:Ca and twelve times higher Ba:Ca ratio than in the waters with salinity >20‰. This can be attributed to physiological regulations of elements at several biological interfaces (gills, intestine, inner ear membrane...) before they can be deposited into the crystallizing otolith (Campana, 1999). Several parameters can in fact affect elemental uptake through the gills (salinity, pH, dissolved oxygen concentrations, hardness, temperature ...). Furthermore, geochemical processes in carbonate mineral precipitation may further influence element incorporation through competition or facilitation between elements (de Vries *et al.*, 2005). Partition coefficients are subsequently used to describe the relationship between elemental concentrations in otolith and in the ambient water (Bath *et al.*, 2000; Elsdon and Gillanders, 2003; Martin *et al.*, 2004; Elsdon and Gillanders, 2005b). All partition coefficients in our study were below one, meaning that Sr:Ca and Ba:Ca ratios in otoliths were lower than the ambient. The overall D_{Sr} for freshwater (0.49 ± 0.24) was similar to those found by Wells *et al.* (2003) and De Vries *et al.* (2005). For saltwater, the overall D_{Sr} (0.33 ± 0.08) was also in the range of 0.28 observed by De Vries *et al.* (2005) and Elsdon and Gillanders (2005b), but slightly higher than that found ($D_{Sr} = 0.18$) by Kalish (1991) and Bath *et al.* (2000) on several marine fish species. We observed D_{Ba} of 0.036 ± 0.024 and 0.043 ± 0.04 , respectively in freshwater and saltwater, close to those cited for other species by Bath *et al.* (2000) in marine water and De Vries *et al.* (2005) and Wells *et al.* (2003) ($D_{Ba} = 0.04$) in freshwater. However these data were largely inferior to those found by Elsdon and Gillanders (2005b) ($D_{Ba} = 0.136 \pm 0.005$) in marine water for the black bream.

Alternatively, our D_{Sr} and D_{Ba} present relatively large standard deviations especially for freshwater. This could be due first to the inter freshwater site heterogeneity in the partition coefficient values, and supported by the wide variability we encountered in Ba:Ca and Sr:Ca ratios of otolith from the freshwater end-member (see Fig. 4). It is difficult to speculate the cause of this high variability as it can be linked to biological (sex, reproductive status, dietary sources, growth rates...) and kinetic effects. Bath *et al.* (2000), Elsdon and Gillanders (2005a) and De Vries *et al.* (2005), suggested an active incorporation of Sr and Ba at low ambient water ratios. It was proposed that changes in elemental discrimination would be linked to regulation of the amount of Sr and Ba transported until the endolymphatic fluid (Bath *et al.*, 2000; Elsdon and Gillanders, 2003). The role of available binding sites onto the calcite crystal surface was also suggested. At low ambient elemental concentrations, adsorption of elements may increase, while binding sites become saturated as elemental concentrations raised and equilibrium is reached among solution, interface and growing crystal surface (Watson, 1996). According Bath *et al.* (2000), Sr and Ba incorporation in fish otoliths were independent from growth rates

of individual fish. No significant effect of temperature was found on Ba uptake (Bath *et al.*, 2000; Elsdon and Gillanders, 2005a). Despite large seasonal temperature variations (from 6°C to 23°C), eels in our study came from habitats geographically close to each other and thus underwent similar temperature influence. As a result, this influence on otolith composition can be considered as negligible. A small proportion of elements probably originated from food sources (Limburg, 1995; Farrell and Campana, 1996; Gallahar and Kingsford, 1996). Walther and Thorrold (2006) recently highlighted the water as the major source of Sr and Ba with more than 83% and 95% respectively, in otoliths from juvenile mummichogs (*Fundulus heteroclitus*). Finally, we cannot exclude that some individual eels caught in the different freshwater areas did not move within several tributaries that could have significant water Ba:Ca and Sr:Ca ratios. However, this does not affect the ability to recover significant differences in otolith ratios between contrasted fresh and seawater end-members in the Adour estuary.

4.2. Simultaneous use of strontium and barium to avoid vaterite disturbance

Interpretations of chemical profiles along the otolith axis still rely also on the presence of vaterite inclusions that could lead to misinterpretation of migratory history (Brown and Severin, 1999; Tzeng *et al.*, 2007; Jessop *et al.*, 2008). The occurrence of such inclusions was clearly demonstrated in several fishes such as the European eel (Bowen Li *et al.*, 1999; Brown and Severin, 1999; Tomas and Geffen 2003 ; Tzeng *et al.*, 2007 ; Jessop *et al.*, 2008 ; Morat *et al.*, 2008). They potentially affect the chemical composition of otoliths as, in particular, less Sr:Ca and Ba:Ca ratios were measured in vaterite crystal than in aragonite of European and American eel otoliths (Jessop *et al.*, 2006 ; Tzeng *et al.*, 2007). The elemental differences between the two carbonate polymorphs can be attributed to the different coordination numbers of cations in substitution of Ca²⁺, limiting Sr, Ba ions entrance to the vaterite lattice while facilitating Mg and Mn entrance during crystallisation (Tzeng *et al.*, 2007), and resulting in systematically lower Sr:Ca and Ba:Ca concentration ratios in vaterite than in aragonite. Sr:Ca background ratios in otoliths of eels from our freshwater sites ($1.59 \pm 0.32 \cdot 10^{-3}$) could be confounded with average Sr:Ca ratio found within vaterite areas ($0.56 \times 10^{-3} - 1 \times 10^{-3}$) (Tzeng *et al.*, 2007 ; Jessop *et al.*, 2008). On the other, Ba:Ca ratios in vaterite crystal ($0.53 \pm 0.74 \times 10^{-6}$) (Tzeng *et al.*, 2007) did not really differ from ratios we found in otoliths from marine waters ($1.16 \pm 1.02 \times 10^{-6}$ – Fig. 4). Using only Sr:Ca ratio could lead to confound vaterite inclusions with freshwater habitat signature, while using Ba:Ca alone could conduct to interpret vaterite composition as marine water habitat. Our study was not focused on the specific structure of the otolith and the occurrence of vaterite crystal in the otolith matrix.

However, contrary to vaterite, the opposite behaviours we found in aragonite for Sr:Ca and Ba:Ca, which is furthermore expected to be observed in most estuaries, lead to contrasted elemental signatures in otoliths in each salinity end-member. Consequently, in the absence of vaterite when one ratio is low (close to ratio that can be confounded with vaterite) the other may be high and vice versa, permitting to definitively differentiate aragonite from vaterite signal.

In the Adour estuary, the screening of the analysed otoliths made by optical microscopy confirmed our chemical results, which are the low occurrence of such inclusions in this area. However, according Tzeng *et al.* (2007), the percentage of otoliths of European eel with vaterite inclusions can be very high. 48% of their 108 eels analysed showed this type of inclusions. Regardless of our results plotted on figure 4, the simultaneous use of Sr:Ca and Ba:Ca should provide a reliable tool to rapidly check for the presence of vaterite by using chemical signals and avoid misinterpretation.

4.3. Reconstruction of eel habitat-use.

Despite the potential difficulties highlight above, otolith Sr:Ca ratio has been widely used to determine habitat discrimination and the reconstruction of the movements between freshwater and marine habitats of catadromous fishes such as anguillids (Tsukamoto and Arai, 2001 ; Daverat *et al.*, 2005 ; Arai and Hirata, 2006 ; Shiao *et al.*, 2006). Inversely, Ba:Ca ratio has been largely unexplored whatever fish species (Arai and Hirata, 2006; Hamer *et al.*, 2006) in spite of its great promise (Bath *et al.*, 2000 ; de Vries *et al.*, 2005 ; Elsdon and Gillanders, 2005b; Gillanders, 2005). Our investigations on Sr:Ca and Ba:Ca profiles into eel otoliths of the Adour estuary, using laser ablation-ICP-MS, confirm the potential of both ratios to help at distinguishing the freshwater and seawater habitats of the eel and support the results obtained by Arai and Hirata (2006).

Previous studies (Feunteun *et al.*, 2003), and especially those using Sr:Ca otolith microchemistry permitted to highlight different habitat use behaviours or tactics within an eel population (Tsukamoto and Arai, 2001; Daverat *et al.*, 2005). Three major contingents were defined for several eel populations coming from different water systems around the world - Europe (Daverat *et al.*, 2005), Lithuanian and Baltic (Tzeng *et al.*, 2000; Shiao *et al.*, 2006), Asia (Tsukamoto and Arai, 2001; Tzeng *et al.*, 2002), America (Jessop *et al.*, 2002) or New Zealand (Arai *et al.*, 2004): a riverine resident group, an estuarine and marine resident groups, and a last one with eels called "migrants", "transients" or

“nomads” that moved from one compartment to another once or more during their growth phase. These three types of behavior were also found in our study by using only the Sr:Ca profiles provided by fs-LA-ICP-MS. However the same scheme and distribution of individual were obtained with the Ba:Ca profiles supporting the use of this ratio as a relevant marker for the discrimination of habitat use pattern on the Adour basin. Moreover, mean values of Sr:Ca ratios for each strategy were in agreement with those found for European eels from other French watersheds (Daverat *et al.*, 2005) and for *Anguilla japonica* (Tsukamoto and Arai, 2001 ; Tzeng *et al.*, 2003 ; Arai and Hirata, 2006). Our conclusion on the Ba:Ca ratio also supports the results of Elsdon and Gillanders (2005b) using the Ba to trace the freshwater environmental histories of black bream (*Acanthopagrus butcheri*).

The presence of migrant eels was observed in European eels as in the other eel species like *A. japonica* (Tsukamoto and Arai, 2001; Tzeng *et al.*, 2003), *A. diffenbachii* and *A. australis* (Arai *et al.*, 2004). In the sampling group from the Adour Basin used to test the methodology, only one pattern of migration was observed, a downstream migration with a single drastic shift of habitat. This shift occurs after 2 to 4 years spent in freshwater. Daverat *et al.* (2005) observed this phenomenon for 91% of the migrants before age class 5. In addition, Daverat *et al.* (2006) underlined the possibility of a size dependent migration for downstream nomads as the migration occurred in a similar range of age for all migrants. There was also evidence of upstream migration behavior, always with only one drastic change of habitat during the lifespan in the Gironde watershed (Daverat *et al.*, 2005) as in Lithuanian waters (Shiao *et al.*, 2006). For *A. japonica* (Tsukamoto and Arai, 2001) and *A. australis* in New Zealand (Arai *et al.*, 2004), migration behavior with two drastic changes of habitats were also observed. Even if the absence of upstream migration behavior could be due to the lack of individual sampling in coastal zones nearby the Adour estuary mouth, the plasticity of a group might be different according the species and the system considered. However, all the studies highlight the evidence of the semi catadromous life history of eel. Furthermore, a major part of the eels caught in the downstream part of the Gironde and Adour estuaries exhibits a resident behavior, 44% (Daverat and Tomas, 2006) and 50% (this study) respectively. In both studies, 100% of freshwater individuals were freshwater residents, illustrating also in the Adour Basin the decrease of migration behavior from the upstream river to marine environments. This was also observed in other systems for *A. rostrata* and *A. japonica* (Tsukamoto and Arai, 2001; Morrison and Secor, 2003).

In summary, a wide literature deals on the complexity of the otolith elemental signature interpretation, and on the care we must take on all the aspects of the links between environment and elemental composition, non biotic and biotic factors influencing elemental uptake and also variability of matrix structure. In this study, we illustrated the relevant use of Sr:Ca and Ba:Ca ratio chronology in otolith in order to reconstruct the migratory history of European eel avoiding misinterpretation due to a change in the otolith structure (vaterite inclusion). Based on rigorous environmental monitoring, this combination can be a powerful tool for a better understanding and management of the habitat of interests for this declining species.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to the National Water and Aquatic Environment Office (ONEMA) and MIGRADOOR for their help in the field logistic and fish sampling. Thanks to Pauline Pinel-Raffaitin for the saltwater Ba data. We would like to thank Aurélie Barats at the Chemical Institute, Nice University, for her help in water sampling and her suggestions that improved the quality of the paper. This work was supported in the framework of the "Groupe De Recherche Adour" program sponsored by IFREMER, the University de Pau et des Pays de l'Adour and the CNRS. Hélène Tabouret acknowledges the Aquitaine Region and IFREMER for her doctoral fellowship.

CHAPITRE IV

BILAN DE LA PRESSION CHIMIQUE S'EXERÇANT SUR L'ANGUILLE EUROPEENNE DANS LE BASSIN DE L'ADOUR

*« J'ai connu un temps où la principale pollution venait de ce que les gens secouaient leur
tapis par les fenêtres »*

Gilbert CESBRON

La plasticité comportementale des anguilles, illustrée par leurs profils élémentaires (Sr et Ba), leur permet de coloniser l'ensemble des habitats côtiers, estuariens et dulçaquicoles. La perte et la dégradation de ces habitats est une des causes supposées participer au déclin de l'espèce. Le développement et l'utilisation de descripteurs sont ainsi nécessaires à la détermination des sources de perturbations de la qualité de l'environnement et à une meilleure compréhension de l'influence qu'elles peuvent avoir sur les performances biologiques de l'espèce (croissance, succès reproducteur).

Afin d'évaluer la qualité chimique des habitats dans le bassin de l'Adour, les niveaux de concentrations des métaux lourds et des composés organochlorés ont été analysés dans les tissus mous de l'anguille jaune (muscle, foie, branchies) et confrontés aux données disponibles sur d'autres compartiments du milieu (sédiments, eaux, organisme filtreur). La **première partie** de ce chapitre expose donc un bilan de la pression chimique inorganique (métaux lourds) et organique (PCBs, organochlorés persistants) s'exerçant sur les anguilles jaunes dans le bas estuaire de l'Adour et dans les zones humides associées. Les possibles voies de contamination sont discutées pour les métaux au travers des concentrations retrouvées dans les trois organes examinés. La biomagnification des composés organiques et du mercure total sont aussi abordés sous l'angle de l'aspect sanitaire au regard des concentrations mesurées dans les muscles.

La bioconcentration des contaminants dans les tissus mous renseignent sur les niveaux d'exposition des organismes à ces polluants et sur le risque potentiel représenté par la consommation des tissus chargés en polluants par les prédateurs (oiseaux, mammifères) et l'homme. Cependant, elle ne renseigne pas directement sur le niveau de toxicité des métaux lourds puisque l'analyse ne tient pas compte de la forme physico-chimique de l'élément. Or, la toxicité des éléments dépend de leur forme physico-chimique, elle-même conditionnée par les conditions environnementales (température, salinité, matière en suspension, conditions redox...). Basée sur les données existantes sur le Hg dans l'estuaire de l'Adour (Stoichev *et al.*, 2004 ; Monperrus *et al.*, 2005), les travaux présentés en **deuxième partie** de ce chapitre se sont donc intéressés à la bioconcentration et à la spéciation du mercure chez les anguilles de l'estuaire et de la barthe de St Laurent de Gosse en relation avec la dynamique de ces espèces dans l'estuaire de l'Adour (Stoichev *et al.*, 2004).

La concentration des contaminants dans les tissus de l'anguille résulte de l'intégration de ces métaux ou composés sur une échelle de temps plus ou moins courte (quelques heures pour les branchies à quelques mois pour le foie) en fonction du taux d'activité métabolique et de renouvellement de ces tissus. Ainsi, lorsque des concentrations élevées sont observées dans les tissus il est souvent

trop tard pour prévenir les effets délétères sur les individus. L'un des objectifs de cette étude était aussi d'adapter et d'utiliser pour la première fois sur des anguilles du milieu naturel un descripteur précoce de la réponse du poisson au stress chimique : l'expression hépatique du gène CYP1A1 au niveau transcriptionnel. Ce descripteur a déjà fait ses preuves quant à la mise en évidence d'une réponse de l'organisme dès les premières heures suivant une exposition à des inducteurs du gène en conditions contrôlées (Aubry *et al.*, 2007 a et b). La **troisième partie** propose les résultats préliminaires de l'évaluation de l'expression hépatique du gène CYP1A1 au niveau transcriptionnel chez les anguilles des habitats dulçaquicoles (Termi et St Laurent de Gosse) par la technique récente et sensible de la RT-PCR en temps réel.

Partie 1. Evaluation de la pression chimique par les métaux lourds et les composés organochlorés s'exerçant sur l'anguille européenne (*Anguilla anguilla*) dans l'estuaire de l'Adour et les zones humides associées (France).

Heavy metals and organochlorinated compounds pressure on the European eel (*Anguilla anguilla*) in the Adour estuary and associated wetlands (France).

H. Tabouret^{1,2}, G. Bareille², A. Mestrot², A., N. Caill-Milly¹, H. Budzinski³, P. Prouzet¹, O.F.X. Donard².

¹ IFREMER Laboratoire des Ressources Halieutiques d'Aquitaine, UFR côte Basque, 1 Allée du Parc Montaury, 64600 Anglet

² Laboratoire de Chimie Analytique Bio-inorganique et Environnement, IPREM - UMR 5254 CNRS, Université de Pau et des Pays de l'Adour - Hélioparc Pau Pyrénées, 2, av. P. Angot, 64053 Pau Cedex 9.

³ Laboratoire de Physico-Toxico Chimie des systèmes naturels – UMR 5472 CNRS – Université de Bordeaux I, 351 cours de la Libération 33405 Talence Cedex

Article en phase de soumission : *Chemosphere*

Résumé : La pression chimique en métaux lourds et en composés organochlorés a été évaluée dans l'estuaire de l'Adour (Sud Ouest, France) et ses zones humides associées en utilisant l'anguille européenne (*Anguilla anguilla*) comme bioindicateur. Les métaux lourds (Cu, Cd, Zn, Pb et Ag) ont été déterminés dans les tissus mous (muscle, foie, branchies), tandis que les formes du mercure (mercure total et méthylmercure) et les composés organochlorés (PCBs, PBDEs, OCPs) ont été analysés seulement dans le muscle d'anguilles jaunes. L'analyse spatiale a montré que les individus de l'estuaire aval présentaient des niveaux plus élevés en mercure et PCBs comparés aux anguilles prélevées en eau douce. Des niveaux plus élevés en métaux lourds Cu, Zn et Ag ont été également trouvés dans les anguilles du bas estuaire, contrairement au Cd et au Pb. Les concentrations des contaminants présents dans les muscles de la zone d'étude sont conformes avec celles décrites dans des environnements modérément contaminés en Europe, et en dessous des normes fixées pour la consommation de l'anguille pour les métaux lourds et les PCBs. Dans la zone estuarienne aval, les valeurs observées pour les concentrations en mercure total sont proches des seuils fixés pour la consommation par l'union européenne (0,5 ng g⁻¹ poids frais), tandis que la somme des PCBs (Σ PCBs) retrouvées dans les muscles est largement au dessus de la valeur fixée (200 ng Σ PCBs g⁻¹ poids sur la base lipidique).

Abstract: Heavy metal and organochlorinated compounds pressure was investigated in the Adour estuary (South West, France) and associated wetlands by using the European eel (*Anguilla anguilla*) as a bioindicator. Heavy metals (Cu, Cd, Zn, Pb and Ag) were determined in soft tissues (muscle, liver, gills), whereas mercury compounds (Total Hg and MeHg) and organochlorinated compounds (PCBs, PBDEs, OCPs) were analyzed only in muscle tissue of yellow eels. Based on a spatial analysis, eel individuals from the lower estuary exhibited significant higher loads of mercury and PCBs in muscle compared to freshwater sites. Slightly higher levels of heavy metals Cu, Zn and Ag, were found in the liver of eels from the lower estuary unlike Cd and Pb. Muscle contaminant loads observed on the sampling area were in good agreement with other moderately contaminated environments in Europe and below the norms fixed for eel consumption for heavy metals and PCBs. In the downstream estuary zone, total mercury exhibited concentrations close to the thresholds fixed value by the European Community (0.5 ng g^{-1} wet weight) for this element, whereas the sum of PCBs ($\sum\text{PCBs}$) were found to be greatly above the fixed value ($200 \text{ ng } \sum\text{PCBs g}^{-1}$ wet weight on a lipid basis).

Key-Words

Heavy metals – Polychlorinated biphenyls – Pesticides - *Anguilla anguilla* – Adour estuary - Wetlands

1. Introduction

Heavy metals and organochlorinated compounds (Polychlorinated Compounds PCBs, PolyBrominated Diphenyl Ethers PBDEs, Organochlorine pesticides OCPs) are omnipresent in hydrosystems as a consequence of the daily anthropogenic activities and the persistence of some compounds used in the past, and as a result of input via three main routes: river inflow, direct discharge from land and atmospheric inputs. The detection and evaluation of the influence of hazardous chemicals is of growing concern today because of the potential threat they represent for wildlife and human health by inducing a wide range of adverse effects. In 2000, the European commission edited the Water Framework Directive aiming at the recovery to a good ecological state of aquatic systems in 2015 and leading the scientific research to evaluate the basal state of each system through the development and use of relevant indicators. Biological indicators as bivalves (oysters, mussels), crustacean or fish are commonly used to evaluate the chemical state of aquatic environments (Philipps, 1977; Van der Oost *et al.*, 1997; Rainbow, 2006).

Numbers of studies supported the use of eels as reliable bioindicators of environmental changes (Feunteun, 2002) and contaminant concentrations in eel tissues as suitable indicators reflecting the environmental exposure to pollutants (Van der Oost *et al.*, 1997; Maes *et al.*, 2005; Storelli *et al.*, 2007; Belpaire and Goemans, 2007). The choice of this indicator is based on the physiological and behavioural characteristics of eels and especially the yellow eel phase. First yellow eels are immature and studies could not be confounded by the influence of sexual maturation. Yellow eels are widely distributed in every kind of aquatic habitats (Moriarty, 1999; Baisez *et al.*, 2000; Daverat and Tomas, 2006). In addition, yellow eels are carnivorous, exhibit high lipid content (Tesch, 1977) and benthic behavior making this species prone to bioaccumulate a wide diversity of compounds including lipophilic and persistent ones (Van der Oost *et al.*, 1994; Roche *et al.*, 2002). Even if seasonal migrations and nomadic movements were highlighted (Feunteun *et al.*, 2003; Limburg *et al.*, 2003; Daverat and Tomas, 2006), they are relatively sedentary all along their growth phase period ranging from 3 to 18 years and more. Eels also show a resistance to physico chemical stress (Tesch, 1977) and a life-long accumulation and low depuration (Larsson *et al.*, 1991; Knights, 1997) giving them the ability to accumulate pollutants and reflect the environmental signature transmitted by water, sediment and preys.

In addition, eels also represent a vector of the exposure to heavy metals and persistent organochlorinated compounds to human population (Harrad and Smith, 1999). Heavy metals like Hg or Cd have been reported to produce human kidney injuries, hepatic disturbances, tumours, neurophysiological damages (Fawler *et al.*, 1983; Kang-Yum and Oranski, 1992; Nordberg, 1996) in chronic exposure. Lead showed detrimental effects on neural development, and long term deficits in cognitive function in children (Bjerregaard *et al.*, 2004). Disturbances are observed in case of exposure to high concentrations of essential elements like Cu and Zn leading to neurological and digestive disorders, hepatic lesions, anaemia or lethargy (Chuttani *et al.*, 1965; Holtzmann *et al.*, 1966; Walsh *et al.*, 1977; Suciú *et al.*, 1981). PCBs have been labeled probable human carcinogens by the EPA and are also suspected of eliciting developmental and learning disorders, impairing immune systems and causing growth reduction. Toxicity of organochlorinated compounds especially dioxin-like PCBs was illustrated especially in term of negatively influence on the organism growth, development of central nervous system, liver damages, carcinogenic potency or behavioral deficiencies (Tanabe *et al.*, 1987; Johnson *et al.*, 1999). Despite the great restriction of their use in open application in many countries since 1970s', their persistence and toxicity make them target compounds in studies of environmental quality.

Finally, the use of eels as bioindicator is concomitant with the evaluation of the contribution of chemical pressure on the high decline of this species since the 1980s' (Moriarty and Dekker, 1997; European Commission, 1998). Reports from the literature support the potential impacts of heavy metals on respiration, osmoregulation due to gill alteration by Hg for example, or kidney injuries, blood anemia, disturbances of carbohydrate metabolism by Cd. Heavy metal exposure could also lead to an increase susceptibility of eels to pathogenic organisms (Bruslé, 1990). In addition, Robinet and Feunteun (2002) exposed the impact of several compounds on lipid storage and silvering process determining the successful eel trans-oceanic migration and spawning.

In this article we present preliminary results on the bioaccumulation of heavy metals (Cu, Zn, Cd, Pb and Ag), mercury and organochlorinated compounds (PCBs, PBDE and DDTs) in soft tissues of the European yellow eels (*Anguilla anguilla*, L.) from a small macrotidal estuary, the Adour estuary (South West, France) and its associated wetlands. Eel has been shown to be one of the dominant fish species of the community that greatly participates to the local fishery and economy (Prouzet, *pers. comm.*) of this basin. This species, and especially the elver, is vital for the fishery since it represents 66% of the total catch value (Morandeau *et al.*, 2009).

Recent investigations described the Adour estuary as moderately contaminated (Point, 2004; Trut and Mayeur, 2004; Bareille *et al.*, 2005). We intend to evaluate metal and organochlorinated compounds (PCBs, PBDE and DDTs) pressure underwent by European yellow eels (*Anguilla anguilla*, L.) as proposed by Belpaire and Goemans (2007) on four sites selected to represent the downstream estuary, upstream wetlands and a major tributary. Finally potential sanitary risk of eel consumption was also examined.

2. Material and methods

2.1. Eel sampling sites and procedures

Eels were collected on four sites on the Adour basin (Fig. 1), one located within the urban and industrial zone of the downstream estuary (Redon), two on wetland areas (St Laurent de Gosse – SLG and Termi) situated at the maximum saline intrusion limit and one from a major tributary (Gave de Pau – GP). The sampling strategy was based on previous population dynamic studies performed by Ifremer-LRHA. Sampling periods were determined according to various phases characterizing the annual biological cycle of *A. anguilla* - colonization-sedentarisation-downstream migration - , and the specific period of agricultural practice such as corn plantation, irrigation and pesticide treatments. Three periods of sampling corresponding approximately to the months of April, July and October were selected.

The Redon site, downstream estuary, is located close to the estuary mouth, and under the influence of anthropogenic activities and physico-chemical processes linked to the mixing of freshwater and seawater. This site was only sampled twice, in July 2005 and July 2007, dates for which 15 and 5 specimens were respectively collected by eel pot. For the three freshwater sites individual, eels were caught by electrofishing. A total of 21 yellow eels were collected at St Laurent de Gosse (SLG) at three dates, October 2005, July 2006 and May 2007. This site corresponds to a canal situated on the right river bank within the fluvial tidal zone of the estuary and is directly connected to the Adour estuary by valves. As a result, its downstream part is largely influenced by mixed estuarine fluvial waters and limited agricultural activities especially corn cultures. In its upstream part, this canal crosses peat bogs and forest areas. The second wetland site (Termi) is a small canal on the left river bank, situated outside the tidal influence and shows brook characteristics.

At this site, 51 individuals were sampled during five sampling periods from April 2006 to July 2007. Finally, the more upstream site is located on one of the main tributary of the Adour estuary, the Gave de Pau river (GP) known to be submitted to a significant metallic pressure due to industrial, urban, and past mining activities. Only 6 eels were collected one time at this site in October 2006.

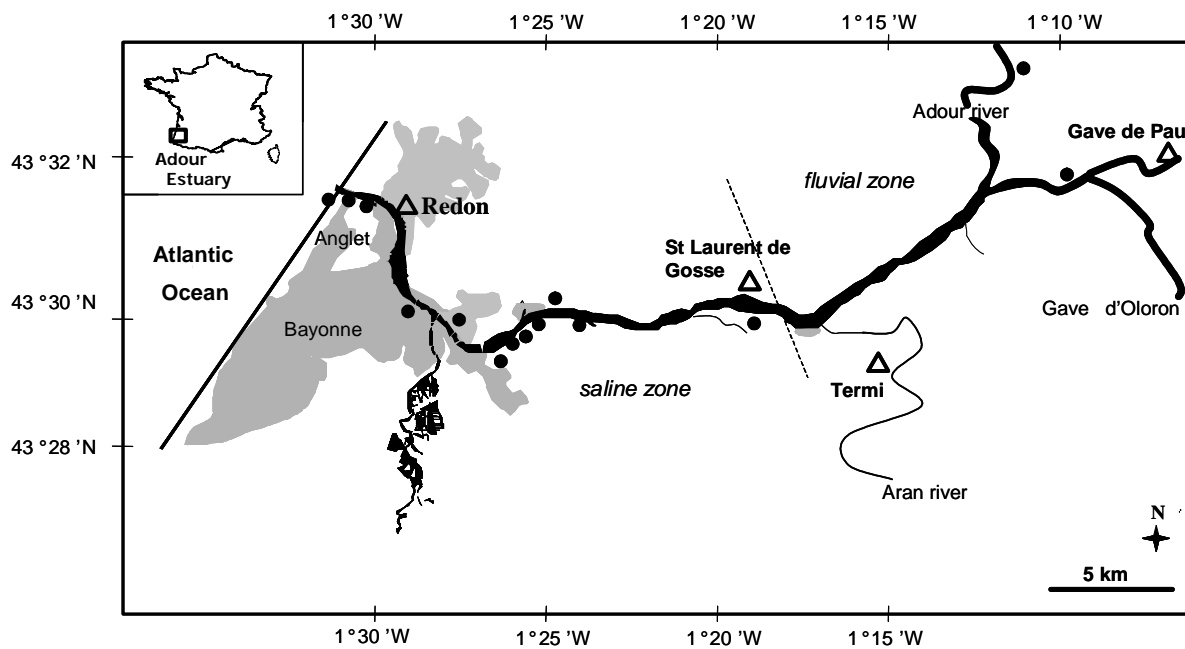


Figure 1. Map of the sampling site distribution on the Adour estuary. Black dots indicate water sampling and black triangles mark both yellow eels and water collection. Dotted line: Limit of the saline tide influence.

After collection and allometric measurements (length in cm, weight in g), individuals were immediately frozen and stored at -20°C in polyethylene bags until dissection and analyses. Liver, gills and muscle were removed from eel body and freeze-dried (48h, -45°C). They were then homogenized, finely ground in an agate mortar and split into several aliquots for the heavy metals, mercury compounds, PCBs, PBDE and OCPs analyses. Clean methods were applied throughout dissection, preparation and analysis by using acid-washed instruments, wearing latex gloves and using 18.2 M Ω M Ω water at all stages of the processes to minimize the possible exogenous contamination.

2.2 Chemical analysis of eel soft tissues

Tissue samples were analyzed for PCBs, several OCPs and 5 heavy metals (Cu, Zn, Cd, Pb and Ag) and mercury compounds (total and methylmercury). Organochlorinated compounds were analyzed at the Laboratoire de Physico-Toxico Chimie des systèmes naturels, University of Bordeaux I (France), whereas heavy metals and mercury compounds were analyzed at the Laboratoire de Chimie Analytique Bio-inorganique et Environnement, University of Pau (France). Heavy metals were investigated on almost all soft tissues samples, whereas only a couple of selected samples (Table 1) were measured for organic compounds and mercury speciation. PCBs and OCPs were determined on three sites, the downstream estuary and the two wetland areas. For mercury concentrations and speciation only two sites were investigated, the downstream estuary and one wetland area, SLG site. Procedures and results relative to mercury compounds were exposed elsewhere (Arleny *et al.*, 2007). Statistical treatment was performed by Xlstat-Pro 7.5.2 (Addinsoft, France) using non parametrical Kruskal-Wallis test and Mann-Whitney *U* test.

2.2.1. Determination of heavy metals

Around 200 mg of freeze-dried homogenized and finely ground powder of muscle, liver or gills were placed in a 50 ml vessel (Digiprep, SCP Sciences). 2 ml Instra pur HNO₃ (J.T. Baker) was then added and let react overnight. After 24h, 1 ml of H₂O₂ was added and the whole preparation was placed on a heating system (Digiprep, SCP Sciences) where the digestion occurred according specific temperature conditions, first an increase from 20°C to 80°C in 30 minutes, then 80°C for 120 minutes. The sample was then completely dried at 75°C for at least 30 minutes. Once cooled, 10 ml of 2% HNO₃ Ultrex (J.T. Baker) were added to completely dissolve the residue and then stocked in a 10 ml cleaned tube. The concentration of 5 elements (Cu, Zn, Cd, Pb, Ag) was analyzed by means of an Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometer (ICP-MS) Elan 6000 (Perkin Elmer). All measurements were carried out in duplicate and values were averaged. Two procedural blanks were processed within each series according to sample procedure. The Certified Reference Materials (CRM) DOLT-3 Dogfish liver (CNRC, Canada) and DORM-2 Dogfish muscle (CNRC, Canada) were used to check the accuracy of measurements. Concentrations are expressed in ng.g⁻¹ wet weight basis (ww). Limits of detection (LD) were Cu: 61 ng.g⁻¹; Zn: 1123 ng.g⁻¹; Ag: 0.5 ng.g⁻¹; Cd: 0.5 ng.g⁻¹; Pb: 0.5 ng.g⁻¹. Accepted recoveries of reference material ranged from 82% to 122%.

Table 1. Mean heavy metal concentrations, standard deviation (σ) and range (in ng.g⁻¹ wet weight) in yellow eel muscle from the Adour estuary, two associated watersheds (Termi, St Laurent de Gosse SLG) and the Gave de Pau River.

	Termi				St Laurent de Gosse				Gave de Pau				Downstream estuary				Norms or recom. limits
<i>Heavy metals</i>	N				21				6				20				
	mean	σ	max	min	mean	σ	max	min	mean	σ	max	min	mean	σ	max	min	
Age (year)	8	2	11	4	7	2	10	5	6	1	8	5	7	1	9	4	
Weight (g)	31,8	5,7	49,0	21,4	35,6	13,6	63,0	19,6	31,0	4,6	37,4	25,7	43	11	60	24	
Length (cm)	70,4	55,7	320,0	15,0	112,9	140,2	502,0	12,0	42,0	30,0	85,0	18,0	153	132	518	26	
Cu	263	147	664	7	359	156	695	100	213	143	454	100	198	59	351	110	10 000 ⁽²⁾
Zn	14279	6743	42175	648	15145	5882	29510	6192	12046	1547	14517	10892	12567	3445	21194	6537	35 000 ⁽²⁾
Ag	40	46	136	<LD	26	28	75	1	53	17	75	34	1	4	17	1	
Cd	4	3	14	<LD	4	2	7	<LD	2	<LD	2	2	1	1	5	<LD	100 ⁽¹⁾
Pb	10	9	49	1	14	10	52	7	24	4	28	19	4	5	17	<LD	500 ⁽¹⁾
Total Hg	-	-	-	-	179	119	236	43	-	-	-	-	307	158	476	95	500 ⁽¹⁾
MeHg	-	-	-	-	155	80	110	31	-	-	-	-	449	125	265	92	

(1) European Commission, 2006b

(2) Ricoux, C., Gasztwott B., 2005

2.2.2. Determination of PCBs, PBDEs and OCPs

The 7 congeners considered as indicator PCBs (28-50, 52, 101, 118, 153, 138, 180) were targeted. These 7 congeners are predominantly present in biotic and abiotic matrices and thus were recognized as compounds representatives for the whole group of PCBs (ATSDR, 2000). The sum of these seven indicator PCBs (Σ PCB) was also calculated as it is commonly used in national legislation to ensure food safety (Maes *et al.*, 2008). Lindane, 4 PBDEs (47, 119, 99, 53) and 13 persistent organochlorinated compounds (POCs: HCB, Heptachlor, Aldrin, Hepoxide, 2,4' DDE, Cis Chlordane, Trans Nonachlor, 4,4' DDE+Dieldrin, 2,4' DDD, 4,4'DDD, 2,4' DDT, 4,4' DDT and Mirex) were also researched.

0,5 g of homogenized freeze-dried sample were extracted for PCBs, PBDEs and OCPs compounds determination using accelerated solvent extraction with on-line acid purification and clean-up on an acidic silica gel column performed by the ASE 200 system (Dionex) (Tapie *et al.*, 2007). After extraction, the sample was collected and reconcentrated into 300 μ l of isooctane, using a RapidVap vacuum evaporation system from Labconco (Kansas City, MO, USA). A second purification of the extract was subsequently performed and the extract was put on an acidic silica gel column. The PCBs, PBDEs and OCPs compounds were eluted with 3x5 ml of a pentane-dichloromethane mixture (90:10 v/v). The extract was concentrated and transferred to isooctane. Analyses were carried out on an HP 5890 series II gas chromatograph from Hewlett-Packard (Avondale, CA, USA) coupled to a 63 Ni electron capture detector (ECD). PCBs, PBDEs and OCPs compounds were quantified relative to internal standards (CBs 30, 103, 155 and 198 and DDTd8) by means of syringe standard using octachloronaphtalene. Quality assurance consisted of the analysis of procedural blanks, reproducibility and repeatability tests, injection of standard solutions as unknowns, and analysis of certified reference material SRM 2262 (NIST, USA) for PCBs and WMF 01 for PBDEs. Details of procedures are given in Tapie *et al.* (2007). The lipid content was determined by gravimetric measurement from an aliquot of the extract.

2.2.3. Comparison to environmental contamination as assess by sediment, water and wild oysters

In the 2000s', investigations were conducted in order to estimate the chemical contamination of the urban and industrialized Adour estuary, especially by heavy metals, organometallic compounds (inorganic and methylmercury), PCBs and some other organochlorine compounds (DDTs).

Works were performed especially on sediment (Bareille *et al.*, 2005, 2006; Stoichev *et al.*, 2004; Budzinski, unpublished results) and water (Point, 2004; Point *et al.*, 2007; Budzinski, unpublished results) along the salinity mixing zone, as well as on wild oyster population (*Crassostrea gigas*) (Trut and Mayeur, 2004) in the lower estuary up to the entrance of the urban zone. As no sampling was done in the two wetlands and the Gave de Pau at that time, sediment and water were sampled in 2007 at these sites and analyzed but only for heavy metals according to procedures used during previous investigations (Point, 2004; Stoichev *et al.*, 2004; Bareille *et al.*, 2006). Results from the water and sediment analyses are given as a tool for the interpretation of global tendencies underlined by the bioaccumulation in the eel organs, since the monitoring of these compartments (water, sediment) is not sufficient to guarantee the good ecological state of the environment (Belpaire and Goemans, 2007). Differences between sites were checked thank to non parametrical Kruskal-Wallis tests and Mann-Whitney *U* tests (Xlstat-Pro 7.5.2, Addinsoft, France).

3. Results and discussion

This paper is mainly focused on the first description of heavy metals bioaccumulation in soft tissues of European eel from the Adour estuary, and on preliminary investigations on the contamination of eels by organochlorinated compounds. It is part of a multi-disciplinary approach initiated in 2003 by the IFREMER, the CNRS and the University of Pau to evaluate the impact of anthropogenic activities of the Adour basin and the Basque area on biota with eel as biological model.

The bioaccumulation of chemicals in aquatic organisms, resulting in higher concentration, than water and/or diet, is highly dependent on the net balance between uptake and elimination processes of chemicals. Chemicals are available to organisms in both the water catchments, through direct uptake from the water column across the gills or skin (Handy, 1992), and through uptake from diet (Pedlar and Klaverkamp, 2002) across the digestive tract. Their long-term storage in the body of organisms is also greatly related to their individual chemical properties that conditioned their ability to be metabolised, eliminated through metabolic processes that include respiration, egestion and growth dilution (Mackay and Fraser, 2000) or stored in specific organs.

As most of the heavy metals are not lipophilic contaminants, their concentrations are rather found higher in liver than in muscle of fish where they are relatively weakly accumulated (Durrieu *et al.*, 2005). Nevertheless, gills, liver and muscle were investigated in this study to evaluate different routes of uptake and storage of heavy metals. Conversely to heavy metals, organochlorinated compounds are

commonly found in muscle tissue of eels due to the lipophilic property of these compounds (Bruslé, 1991; Maes *et al.*, 2008) and the high fat content of eel muscle. These latter chemical products were thus preferentially investigated in muscle of eels from the Adour basin, but few liver samples were also checked for.

A total of 98 eels were sampled on the area of interest and analyzed for heavy metals (N=98), mercury compounds (N=22), PCBs, PBDEs and OCPs (N=15). For this group, allometric measures gave a mean length of 34.9 ± 9.9 cm and a mean weight of 95.1 ± 102.1 g. According to Pearson coefficient, no correlation was found between elemental concentrations and length or weight whatever the organ and site. Eel tissue concentrations (mean, standard deviation and range) of heavy metals, total and methylmercury, PCBs, PBDE47 and OCPs are presented in Table 1 and 2 for muscle. Results based on muscle, liver and gills analyses are illustrated in Figures 2, 3 and 4. As mercury levels (total and methylmercury) in eel muscle from the downstream estuary and SLG wetland were presented elsewhere (Arleny *et al.*, 2007) they will be not further detailed in this work. Total mercury (Table 1) levels were thus only used to assess class quality for this element.

3.1. Levels and distribution of heavy metals in eel soft tissues

3.1.1 Tissue distribution

All individual eels carried significant heavy metal levels in liver and gill tissues, whereas concentrations of metals Cd, Ag and Pb were not detected in some sample of muscle tissue. Notable differences were found in the tissue bioaccumulation between individual metals. Cu and Cd are essentially stored in liver (Fig. 2) where concentrations were up to 100 fold higher than in gills and muscle. This distribution is in concordance with those ever describe in eels and other fish species (Oliveira Ribeiro *et al.*, 2005 ; De Boeck *et al.*, 2004; Usero *et al.*, 2003 ; Avenant-Oldewage and Marx, 2000 ; Kalay and Canli, 2000 ; Linde *et al.*, 1999) and could be explained by the induction of low-molecular weight proteins in the liver, namely metallothionein (MT) that are involved in the sequestration of these two elements as well as Zn (Dallinger *et al.*, 1997).

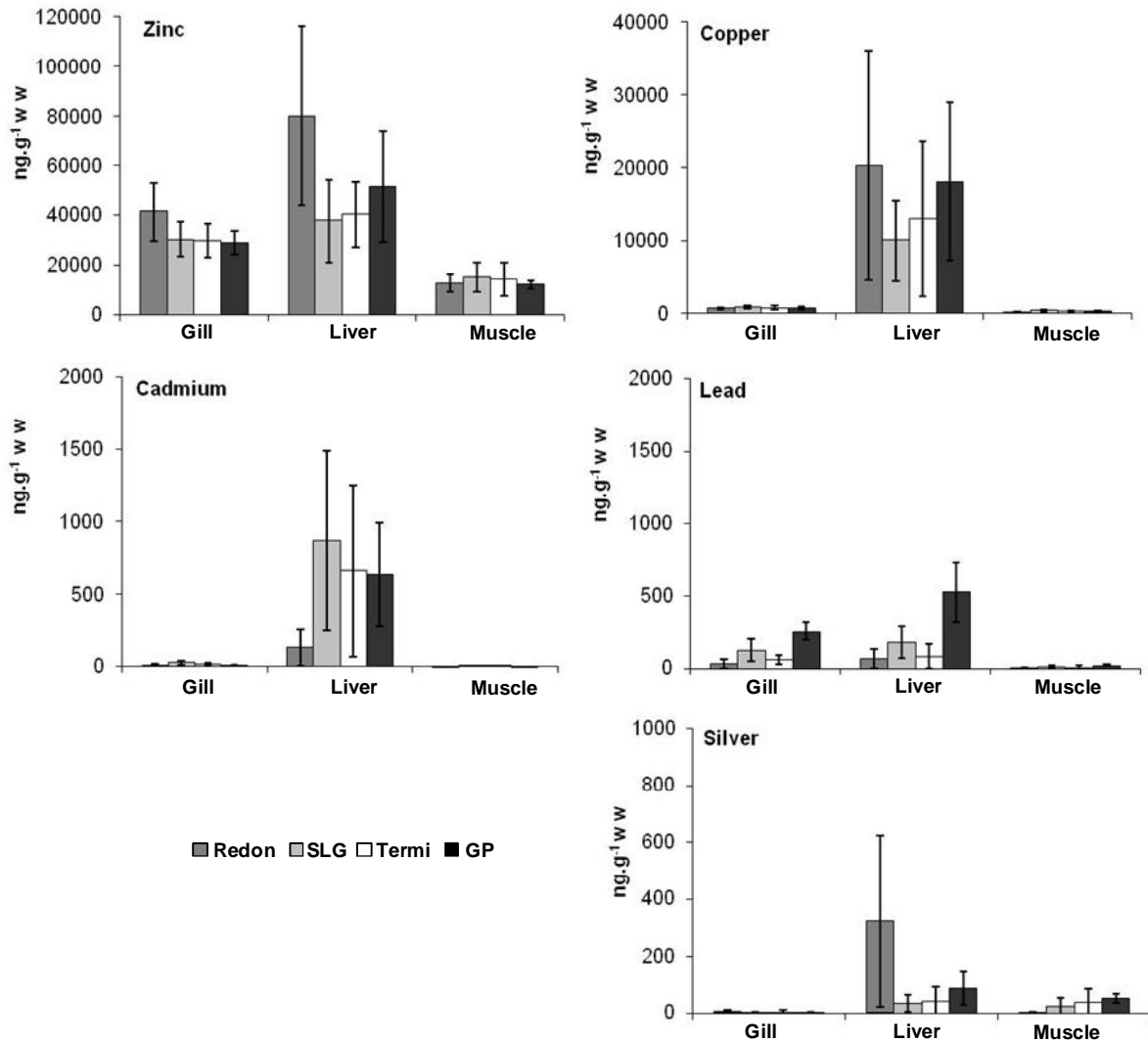


Figure 2. Mean concentrations (ng.g⁻¹) of Cu, Cd, Ag, Zn and Pb in gills, liver and muscle of yellow European eels from Termi, St Laurent de Gosse (SLG), the Adour downstream estuary (Redon) and the Gave de Pau river (GP). Standard deviations are illustrated by double bars.

Indeed, Cd was preferentially found in the soluble fraction of liver where it binds to MT (Bruslé, 1990). As expected, Zn and Pb concentrations were also significantly higher in liver than in gills and muscle ($P < 0.0001$), but gills exhibited elevated concentrations compared to muscle. This distribution shown in other previous studies (Yilmaz *et al.*, 2007; Oliveira Ribeiro *et al.*, 2005; Mormede and Davies, 2001; Kalay and Canli, 2000; Sun and Jeng, 1998), could illustrate a joint exposure both by the direct (water) and trophic ways (Pedlar and Klaverkamp, 2002). It probably also illustrates once more the role of MT also present in gills (Wepener *et al.*, 2001). However, given that Cu has a higher affinity than Zn for MT, elevated levels of Zn but not Cu in the gill would suggest that limited competition occurs between elements at the gill surface (Wepener *et al.*, 2001), supporting a rather restricted pressure exerted by these two metals in the Adour.

Bioconcentration of Zn within the gill tissue illustrates the role of gills as a first barrier regulating this element in eels from the Adour. According to the significant Pb levels found in sediments (Bareille *et al.*, 2006) and the benthic behavior of eels, the contribution of respiration through the skin in the metal uptake could be also suggested. Pierron *et al.* (2008) have recently highlighted the diet role in the uptake of Cd in eels from Gironde and Dordogne. Moreover, Cd was ever preferentially found in liver (Bruslé, 1990) especially in the soluble fraction where it binds to MT, supporting our results. Ag was found preferentially in liver, although levels in muscle were higher than those found in gills. This latter distribution can be the consequence of the diet or a fast transfer of the Ag element to the gastro intestinal tractus and the other organs through the blood circulation as it was observed in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Galvez *et al.*, 2002). The high hepatic storage found for all the elements analyzed, essential (Cu, Zn) or non-essential (Cd, Ag, Pb) elements, is not surprising as it is related to the major role played by the liver in terms of detoxification and storage of essential and non-essential elements.

Elemental concentrations in heavy metals Cu, Zn, Cd, Ag and Pb of eel muscle from the Adour estuary were relatively low, averaging 268, 13998, 3.2, 47.6 and 10.8 ng g⁻¹ wet weight respectively. Such concentrations are well below those found by Maes *et al.* (2008) for the same species in Flanders. In addition, Cd, Pb and Zn exposure found in the Adour was also less pronounced compared to the Loire estuary (Amiard *et al.*, 1982). Moreover, concentrations were consistent with those described in other European aquatic systems with a moderate chemical pressure as the Cadiz Bay, River Turia and Piguena River in Spain (Linde *et al.*, 1999; Usero *et al.*, 2003; Bordajandi *et al.*, 2003) or other French aquatic system, Camargues for the same species (Batty *et al.*, 1996). Levels in sampled eels were also in accordance with results obtained on macrobenthic organisms (Monperrus *et al.*, 2005) in this estuary supporting a moderately contaminated characteristic.

3.1.2. Spatial and temporal distribution

According to the elemental distribution in soft tissues, geographical and temporal comparisons were made based on concentrations found in liver. Eels from the estuary exhibited significant higher levels of Ag (319±309 ng.g⁻¹) than eels from each freshwater site (87 ng.g⁻¹ ww) (Mann Whitney, $P<0.05$) (Fig. 2). This can be explained by the input of sewage treatment plant in the downstream estuary (Bareille *et al.*, 2005) and the high affinity of Ag for organic compounds resulting in their accumulation in sediments receiving sewage. The Zn and Cu loads in liver appear to be of similar magnitude (Mann Whitney, $P=0.089$ and 0.946 respectively) for the estuary (77.7±35.4 and 20.8±16.1 µg.g⁻¹ ww, respectively for Zn and Cu) and Gave de Pau river (51.7±22.5 and 18.2±10.9 µg.g⁻¹ ww,

respectively for Zn and Cu), and are slightly higher than in eels from the two wetlands SLG and Termi (less than 40.3 ± 13.1 and $13.0 \pm 10.7 \mu\text{g.g}^{-1}$ ww, respectively for Zn and Cu). This is in agreement with the reported bioaccumulation of the two elements from three years monitoring using wild Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) providing evidences of slightly higher pressure of Cu and Zn downstream in the estuary (Trut and Mayeur, 2004).

Conversely to Ag, Cu and Zn, Cd bioaccumulation was five times higher on the freshwater sites (from 637 to 870 ng.g^{-1} ww) than in the estuary ($137 \pm 128 \text{ ng.g}^{-1}$ ww) ($P < 0.05$). The existence of a significant decrease in Cd concentrations from oligohaline zone to polyhaline zone was ever observed for most of the benthic, pelagic and ichthyofauna compartments (Gonzalez, 1999; Culshaw *et al.*, 2002; Dauvin, 2008). The speciation of Cd appears to be mostly controlled by marine inorganic ligands (Cl⁻). Concentrations in the suspended particulate matter (SPM) in the upstream part of the estuary decrease progressively against salinity in the 0 to 15 ‰ salinity span (Point, 2004). The Cd stock released from the SPM is then rapidly complexed by the inorganic anions ligands resulting in the formation of stable chlorocomplexes throughout the rest of the estuary. This formation of labile chlorocomplexes has been previously suggested by Kraepiel *et al.* (1997) and Garnier and Gieu (2003). Based on the benthic diet of eels and the Cd association to SPM in freshwater, diet might have a major role in such systems in Cd transfer to eels and explain the difference observed between estuary and upstream sites. Highest Pb liver levels were found for the Gave de Pau River ($529 \pm 205 \text{ ng.g}^{-1}$ ww) that would illustrate the observed increase in water and sediments of this river (Bareille, unpublished results). Lowest Pb loads were observed for the isolated wetland (Termi: $86 \pm 83 \text{ ng.g}^{-1}$ ww), while intermediate values were observed for the SLG wetland zone and the estuary (180 ± 111 and $171 \pm 70 \text{ ng.g}^{-1}$ ww, respectively).

In order to evaluate the temporal variability in inorganic pressure, elemental concentrations measured in eel liver and gills from Termi site during the three sampling campaigns of 2006 (April, July and October) were compared. Termi was the only site where eels could be found at each sampling date, covering all 2006. Chemical pressure was significantly higher in July for Pb, Cu, Cd, Zn and Ag ($P < 0.006$) (Fig. 3). However, concentrations were not significantly different between October and April ($P > 0.05$). The increase of metal bioaccumulation in fish organs during summer was ever observed in other environments (Köck *et al.*, 1996; Avenant-Oldewage and Marx, 2000; Farkas *et al.*, 2008). Even if several factors could contribute to seasonal variability of metal accumulation in fish (physiological changes, variability of metal concentration in environment or diet), authors highlighted the strong relation between this metal increase and the period of temperature rising during summer.

Results of Köck *et al.* (1996) showed only a minor role of annual cycles of pH, metal concentration in the water and metal level of the diet in the seasonal pattern of metal concentration in liver and kidney of Arctic char (*Salvelinus alpinus*).

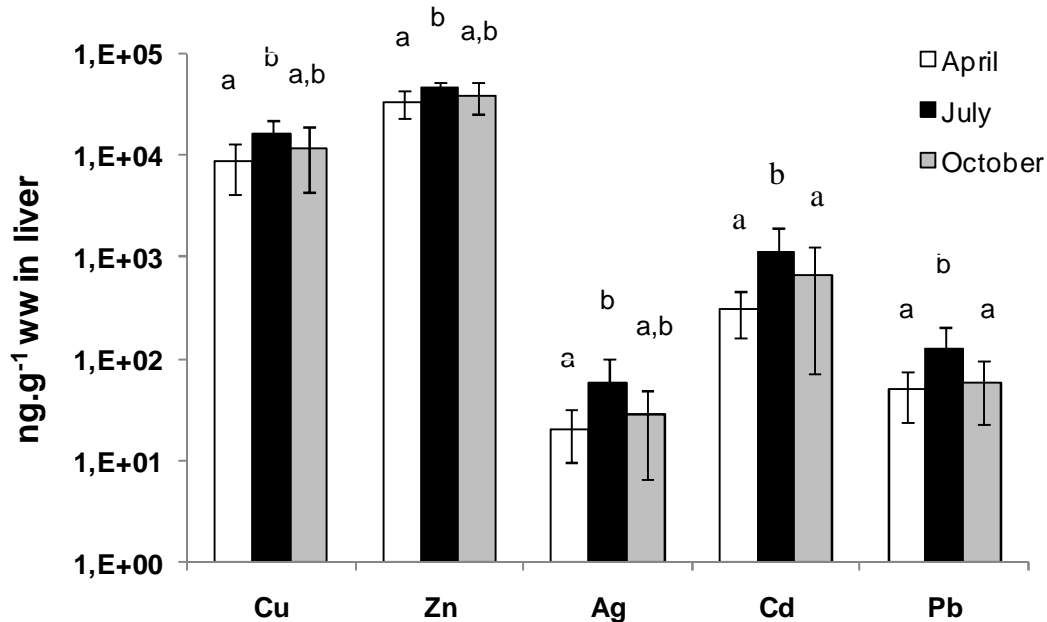


Figure 3. Average heavy metal concentrations in liver (ng.g⁻¹ ww) of yellow eels from Termi in April (*N*=15), July (*N*=9) and October 2006 (*N*=10). Standard deviations are illustrated by double bars.

In our study water temperatures on Termi site were 10 to 16°C higher in summer than in Autumn and Spring coinciding with the higher metal loads found in both organs (liver, gills) at this period. Temperature is a major factor controlling the metabolism in poikilothermic organisms (Bennett, 1978) influencing the rate of metabolic processes especially the uptake, metabolism and excretion of metals (Cairns *et al.*, 1975; Robinson *et al.*, 1983; Leaner and Mason, 2002; Tsui *et al.*, 2004). The increase of water temperature leads also to an increase of gill ventilation rates in response to decreasing oxygen concentration in water (Bennett, 1978) resulting in a higher volume of water passing through the gills. Thus, the increase of metabolic rates, during summer could lead to an enhancement of the metal uptake from the water. Furthermore, the temperature has also a strong influence on the properties of the metal by changing the equilibrium effect between molecular and ionized forms. Prosi *et al.* (1979) illustrate the example of Cu which ionized forms are preferentially produced with higher temperature leading to a greater toxicity to the fish. Finally, results obtained on liver and gills of eels from Termi are consistent with an increase of the metal uptake linked to the seasonal temperature variability.

As in other studies, liver elemental concentrations observed in eels from the Adour basin (but also muscle) rarely reflect heavy metals exposure as assessed through the sediment and water average load for each sites. Difference between fish tissue and environment levels probably reflects the major role of elemental bioavailability in the uptake, linked both to physical and chemical factors of the surrounding environment and physiological responses of the organisms (Zhang and Wang, 2007).

The observed discrepancy with the sediment load can be partly explained by the grain size variability within and across the studied sites as metals but also organic contaminants are often concentrated in fines particles due to their greater surface areas and amounts of organic carbon, clay, iron or aluminium (Santschi *et al.*, 2001). In addition, the strong longitudinal gradients found in the Adour estuary for physicochemical parameters such as salinity, pH, temperature, and ionic strength, are known to affect trace metals equilibrium, partitioning and reactivity (Millward and Turner, 1995) resulting in significant modifications in the behavior, bioavailability and phase transfer of metals in this estuary (Point, 2004). Finally, fish have adaptive capacity under conditions of sublethal chronic metal given by physiological changes that result ultimately in acclimation with increased biosynthetic processes (mitosis, enhanced metal binding proteins synthesis such as metallothionein which are assumed to act as detoxication and storage mechanisms) and up-regulation of others pathways to counteract or compete with the deleterious effects of the metal (ion regulation) (McGeers *et al.*, 2000a). As a consequence, the apparent independence of Zn and Cu concentrations from the levels observed in the environment is not surprising and ever described by Bruslé (1990). This is related to the ability of fish to regulate its essential trace metals (Cu, Zn). The synthesis of metal-binding proteins (metallothioneins or MT) in the liver of eels submitted to a metal exposure has been shown to bind non essential elements and essential elements (Noel-Lambot *et al.*, 1978). Furthermore, Langston *et al.* (2002) and Bird *et al.* (2008) highlighted a strong correlation between hepatic methallothionein levels and metal burdens especially Zn, Cu, Ag and Cd in eels from the Thames estuary. Such a process can support the independence of liver metal Zn, Cu, Cd and Ag concentrations from the Adour environment pressure in our study.

3.2. Organochlorinated compounds

Lipid content in muscle was determined for 12 of the 15 eels used for organochlorinated compounds analysis and represented overall 28 ± 17 % of the muscle weight, being 19 ± 6 % for estuarine eel (N=5) and 34 ± 20 % for freshwaters (N=7). PCBs, PBDEs and OCPs were found in eels of the three sampling sites, but some PBDEs and OCPs compounds were never or exceptionally found (Table 2). Among the four PBDEs analyzed, BDE 47 was the only one to be detected in soft tissues. 6 OCPs were also not detectable (Aldrin, Heptachore, Cis chlordane, 2,4' DDD, 4,4' DDT, mirex). Mean concentrations found in muscle are given in Table 2.

3.2.1. Polychlorobiphenyles (PCBs)

The sum of the 7 PCB congeners analyzed (Σ PCBs) ranged from 21 to 530 ng.g^{-1} wet weight (ww) in muscle with an overall average of 186.8 ± 169.1 ng.g^{-1} ww, i.e. 6 times less than concentrations measured in eels from Flanders Rivers (605.0 ± 1118.6 ng.g^{-1} ww, Maes *et al.*, 2008). However, a pronounced difference in Σ PCBs was observed between the freshwater sites and the downstream estuary, the latter (370 ± 99 ng.g^{-1} ww) exceeding almost by an order of magnitude those of the freshwater sites (48 ± 17 and 98 ± 73 ng.g^{-1} ww, respectively for Termi and SLG wetland). This trend was also found by expressing the Σ PCBs on a lipid-weight basis. The Σ PCBs from the Adour basin freshwater sites was moreover close to the results obtained in eels from some English Rivers (Mason, 1993), but generally lower than most of the river basins studied by Maes *et al.* (2008) in Flanders. Conversely, values found in the downstream Adour estuary fall in the upper range detected by these latter authors. Within the muscle, it can be noticed that among the various PCB congeners, CB153 and CB138 which are very recalcitrant compounds (Knights, 1997) represent more than 50% of the total PCB concentrations for all sampling sites (Fig. 4).

Table 2. Mean organochlorine compounds concentrations, standard deviation and range (in ng.g⁻¹ wet weight) in yellow eel muscle from the Adour estuary, two associated watershed (Termi, St Laurent de Gosse SLG) and the Gave de Pau River.

N	Termi				St Laurent de Gosse				Downstream estuary			
	7				3				6			
	mean	St.Dev.	max	min	mean	St.Dev.	max	min	mean	St.Dev.	max	min
Age (year)	8	1	10	6	8	2	10	7	7	2	9	5
Weight (g)	81.8	22.2	108.0	54.0	260.3	222.5	502.0	64.0	114.1	53.4	183.6	37.0
Length (cm)	33.2	2.0	35.6	30.3	47.9	12.9	59.0	33.8	41.2	10.3	57.0	30.0
Lindane	0.33	0.32	0.89	0.04	1.49	0.89	2.14	0.48	0.34	0.20	0.62	0.10
CB 50+28	3.86	1.87	6.18	0.56	5.66	2.03	7.46	3.46	5.05	1.29	6.93	2.97
CB 52	7.72	4.51	14.90	2.46	12.52	9.23	21.63	3.17	9.11	2.56	12.94	5.91
CB 101	3.04	1.28	4.30	0.68	3.67	3.41	7.42	0.73	9.38	5.57	19.95	5.24
CB 118	7.17	3.15	11.72	2.01	10.32	11.26	22.97	1.39	36.34	9.81	48.64	19.63
CB 153	14.70	4.45	19.20	8.20	32.71	25.51	60.95	11.32	162.78	41.24	230.88	108.78
CB 138	7.62	2.47	10.90	4.26	22.44	20.26	45.14	6.20	94.46	26.65	139.01	63.38
CB 180	4.33	3.31	10.40	0.97	10.23	8.48	19.97	4.54	52.67	18.37	82.10	31.79
∑ TOT PCB	48.43	16.52	64.33	20.54	97.54	72.84	175.26	30.82	369.79	98.55	530.07	238.49
∑ TOT PCB on lipid basis*	192.89	58.98	229.7	73.4	348.4	260.2	625.9	110.1	1320.7	352.0	1893.1	851.74
CB-TEQ (ng.kg ⁻¹)	1,712	0,329	2,04	1,23	3,04	1,89	5,13	1,46	12,67	3,05	17,71	8,67
BDE 47	0.95	0.54	1.68	0.39	2.69	3.57	6.77	0.14	12.02	4.81	19.59	6.06
HCB	<1	-	1.92	<1	-	-	9.12	<1	-	-	7.75	<1
Heptachlor	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Aldrin	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Hep.Hépo xide	1.18	0.90	2.45	0.40	nd	nd	nd	nd	0.60	0.29	0.94	0.24
2.4'DDE	0.48	0.21	0.84	0.27	0.57	0.24	0.84	0.37	0.43	0.07	0.48	<0.2
Cis Chlordane	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Trans Nonachlor	3.52	2.47	7.14	1.58	1.12	0.98	2.09	0.12	1.74	0.32	2.19	1.27
4.4'DDE+ Dieldrin	5.13	3.12	10.04	1.69	13.81	10.84	22.62	1.71	23.10	7.54	33.53	15.00
2.4'DDD	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
4.4'DDD	1.44	0.63	2.50	0.97	3.75	3.20	6.01	1.48	2.01	0.81	3.54	1.36
2.4'DDT	1.64	1.65	4.68	0.19	1.1	-	1.1	<1	0.78	0.41	1.54	0.42
4.4'DDT	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Mirex	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
∑ TOT POC	12.85	6.26	22.23	5.70	22.42	16.79	36.47	3.82	29.51	9.33	40.21	18.58
∑ TOT POC on lipid basis	45.88	22.34	79.40	20.36	80.06	59.97	130.25	13.65	105.39	33.32	143.62	66.36

* Recommended value: 200ng.g⁻¹ ww on lipid basis. European Commission EC N°199/2006 (2006b)

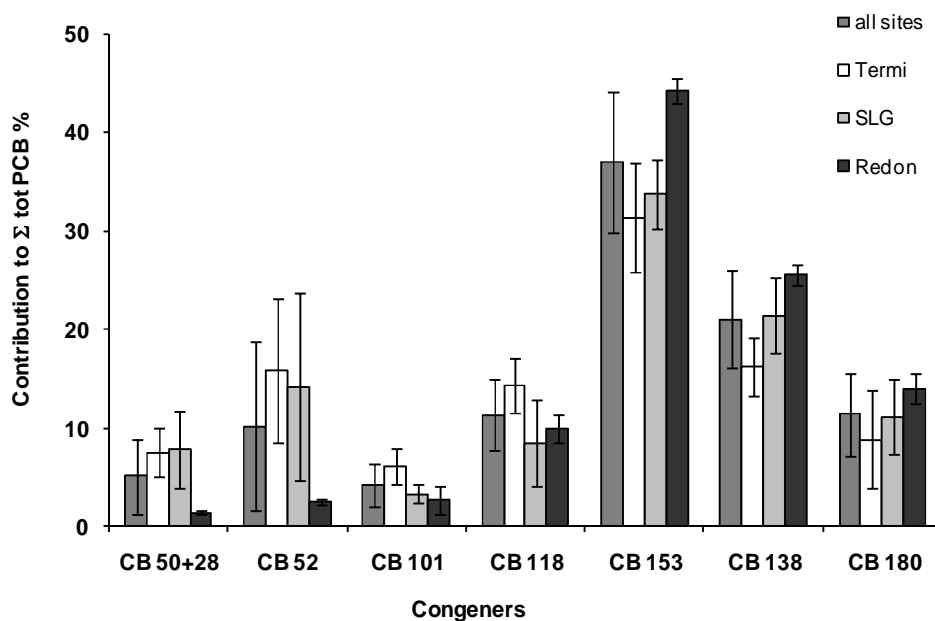


Figure 4. Contribution (%) of each PCB indicator congener in the sum of total PCBs in muscle of yellow eels from the Adour estuary (Redon) and the two watersheds (Termi, St Laurent de Gosse SLG).

Such a contribution was observed in previous studies (Bordajandi *et al.*, 2003; Storelli *et al.*, 2007; Maes *et al.*, 2008) and can be related to the physicochemical properties of these congeners, as they are apparently not metabolized by fish and easily transported bound to particles (Szlinder-Richert *et al.*, 2009). Despite the link between bioconcentration of PCBs in aquatic organisms and the degree of chlorination (Fox *et al.*, 1994), we found a significant contribution of low chlorinated compounds, until 15% for CB 50-28 and 37% for CB 52 for example in liver. Furthermore, it can be seen on Figure 4 that the less chlorinated PCBs, such as 28, 50 and 52, represent an abnormally low proportion of the Σ PCBs in the downstream estuary compared to freshwaters sites. As less chlorinated PCBs do not show any significant difference between the two environments (see Table 2), dissimilar Σ PCBs to Σ CB (28, 50, 52) ratios come from higher levels in the heavier congeners, i.e. CB 101, 118, 153, 138 and 180 in the lower estuary. Such a trend could be explained by the lesser persistence of lighter congeners compared to heavier ones (Szlinder-Richert *et al.*, 2009), but this would involve a differential behavior between the two environments separated geographically by only about thirty km. This could be also linked to difference in food web, diet available for eel within the freshwater and the saline water could have differently biomagnified heavier and lighter PCBs congeners. Finally, the input from an intra-estuarine source enriched in heavier PCBs congeners cannot be excluded. PCBs were analyzed in sediments, suspended particles (SPM) and wild oysters in the course of a three years survey in the Adour estuary. Gross flux would support that major PCBs input originate from the watershed (Bareille *et*

al., 2005), but oysters clearly recorded the input of additional sources of PCBs in the lower estuary part closed to industrial area (Trut and Mayeur, 2004). Moreover, industrial effluents largely loaded in PCBs were identified (Budzinski, unpublished result) in this area, some of them presenting high ratio \sum PCBs to \sum CB (28, 50, 52) (Table 3). Furthermore, ratios calculated in sediments and SPM show a similar trend as the ratio found in eel muscle with higher ratios in the low estuary compared to the upper estuary, although they never reach ratios as high as those found in eel muscles (Table 3). Even if little is known about the behavior of PCBs congeners across estuarine salinity gradient, one would suggest that the observed trend in the \sum PCBs/ \sum CB (28, 50, 52) would be partly induced by some sewage located in the industrial part of the lower estuary. It is not possible yet to evaluate how would be the spatial influence of this effluent.

Table 3. Comparison of the ratio between the \sum PCBs and the sum of compounds CB50, CB28 and CB52 in sediment, suspended particles (SPM) from the downstream estuary, the upper estuary, one industrial discharge point and eel liver from the freshwater and downstream estuary.

	Sum PCBs / [CB50+CB28+CB52]		
	N	mean	Std. Dev.
Sediment - upper estuary *	4	2,6	1,3
SPM - upper estuary *	3	3,6	0,5
Freshwater eels (muscle)	9	5,1	2,1
Freshwater eels (liver)	4	3,2	1,0
Sediment - lower estuary *	13	6,1	2,8
SPM - lower estuary *	6	5,2	2,6
Industrial discharge point - lower estuary *	3	14	6
Estuary eels (muscle)	6	26,2	2,9
Estuary eels (liver)	6	33,6	14,3

* Budzinski, unpublished results

3.2.2. Organochlorine and PBDEs compounds

The sum of the OCPs of interest in muscle was comprised between 4 and 40 ng.g⁻¹, with an overall average concentration of 21 ng.g⁻¹ ww. Among the compounds analyzed, the composite 4,4' DDE+dielrin had the highest contribution to the total OCPs in muscle with concentration reaching 33.5 ng.g⁻¹ ww and an average concentration of 13.5±10.4 ng.g⁻¹ ww. Studies reporting Dieldrin and p,p'DDE, suggest that the levels observed in the Adour are rather low compared to those observed in eels from Flanders rivers (77.4±142.9 ng.g⁻¹ ww muscle ; Maes *et al.*, 2008) and in eels from English rivers (range values from 10 to 210 ng.g⁻¹ ww whole fish ; Mason, 1993). Slightly higher concentrations are found in the lower estuary compared to the whole freshwater, although some high levels are found in the SLG wetland sometimes. Even if Maes *et al.* (2008) illustrated the decrease of dielrin in aquatic systems during the last decade, they also illustrated the persistence of this pesticide banned since 1974 as this compound was found in more than 90% of eels analyzed in their study. Among the sampling group from the Adour, even if care must be taken due to the small effectives, "dielrin + 4,4' DDE" was detected in all individuals.

Taking into account the three sites, lindane showed a maximum concentration of 2.14 ng.g⁻¹ ww and a minimum of 0.04 ng.g⁻¹ ww in muscle illustrating a generally low contamination by the biocide compared to other systems like Flanders ones where levels were ten times higher (27.9±131.68 ng.g⁻¹ ww ; Maes *et al.*, 2008). 13 of the 16 eels analyzed for organochlorinated pressure evaluation showed HCB concentration below 1 ng.g⁻¹ ww. Finally, PBDE47 was shown to vary between 0.1 to 19.6 ng.g⁻¹ ww, averaging 1±0.5 ng.g⁻¹ ww at Termi, 2.7±3.6 ng.g⁻¹ ww at SLG and 12±5 ng.g⁻¹ ww at the downstream estuary, highlighting higher levels in the estuary.

To sum up, in the estuary eel muscle OCPs showed significant higher levels than the freshwater sites, 4 to 7 times higher for PCBs and 4 to 12 for PBDE47, which could be probably attributed to local sources input in the lower part of the estuary. Such a tendency is less clear for the sum of OCPs.

3.2. Quality class and human exposure

In the context of the Water Framework Directive (European Commission 2006a) introduced by the European Community to protect aquatic life and human health, Maes *et al.* (2008) outlined the strong need to develop databases that serve as a baseline against which future policy results may be evaluated. These authors proposed eel as a suitable bioindicator species for monitoring a variety of priority substances in order to evaluate the chemical status of aquatic waters. Belpaire and Goemans (2007) built in that way a useful quality class framework based on an intensive eel muscle database for heavy metals, PCBs and OCPs in Flanders. This allows the determination of the chemical status of aquatic environments occupied by eel. As PCBs still remain problematic, they further proposed an action value of 460 ng.g⁻¹ ww and a target threshold value of 183 ng.g⁻¹ ww for Σ PCBs which consist in a limit which never may be exceeded and the objective to attain within a planned time frame, respectively.

Class boundary of Belpaire and Goemans (2007) defined four quality classes representing clean or lowly polluted environments (*Not deviating* class), moderately polluted sites (*Slightly deviating* class), polluted sites (*Deviating* class) and finally highly polluted environments (*Strongly deviating* class). This classification was applied in the present study to individual eel muscle levels for total mercury, heavy metals (copper, zinc, cadmium and lead) and Σ PCBs. Results are shown in Table 4 and Figure 5.

A good chemical status of the overall freshwater sites was deduced from this approach whatever the contaminants (heavy metals or PCBs) and the sites, as 100% of individuals were assigned to either the not deviating or slightly deviating classes. This is however not the case for the downstream estuary, especially for mercury and Σ PCBs, for which this site can be classified as mainly polluted with 100% of individuals classified as deviating or strongly deviating classes (60% of deviating eels for mercury and 82% deviating eels for Σ PCBs). A large part of the total mercury burden was found to be methylmercury, the more toxic form of mercury, 86% in the samples from the estuary and 65% in those from the freshwater SLG (Arleny *et al.*, 2007).

Table 4. Percentage of eel from the Adour basin classified according to the four quality classes of Belpaire and Goemans (2007) for Cu, Zn, Cd, Pb and total mercury (T Hg) in muscle. Quality classes were developed based on quantitative distribution of PCBs, OCPs and heavy metals. *Not deviating class*: unpolluted or low polluted sites; *Slightly deviating class*: slightly and moderately polluted sites; *Deviating class* and *Strongly deviating class*: sites with the more pronounced contamination. SLG: St Laurent de Gosse; GP: Gave de Pau river.

		Cu	Zn	Cd	Pb	T Hg*
Termi (N=51)	not deviating	98%	98%	78%	96%	
	slightly deviating	2%	2%	20%	4%	
	deviating	0%	0%	2%	0%	
SLG (N=21)	not deviating	95%	100%	62%	95%	0%
	slightly deviating	5%	0%	38%	5%	100%
GP (N=6)	not deviating	100%	100%	100%	67%	
	slightly deviating	0%	0%	0%	33%	
Whole freshwater (N=78)	not deviating	97%	99%	76%	94%	
	slightly deviating	3%	1%	23%	6%	
	deviating	0%	0%	1%	0%	
Estuary (N=20)	not deviating	100%	100%	100%	100%	0%
	slightly deviating	0%	0%	0%	0%	40%
	deviating	0%	0%	0%	0%	60%

Cu: *not deviating* (<600 n/g wet weight); Cu: *slightly deviating* (600 - <1600 ng/g wet weight)

Zn: *not deviating* (<35000 n/g wet weight); Cu: *slightly deviating* (35000 - <88000 ng/g wet weight)

Cd: *not deviating* (<5 n/g wet weight); Cu: *slightly deviating* (5 - <12,6 ng/g wet weight); Cd *deviating* (12,6 - <31,7 ng/g wet weight)

Pb: *not deviating* (<25 n/g wet weight); Cu: *slightly deviating* (25 - <63 ng/g wet weight)

T Hg (*based on Arleny *et al.*, 2007): *not deviating* (<100 n/g wet weight); T Hg: *slightly deviating* (100 - <252 ng/g wet weight); THg *deviating* (252 - <634ng/g wet weight)

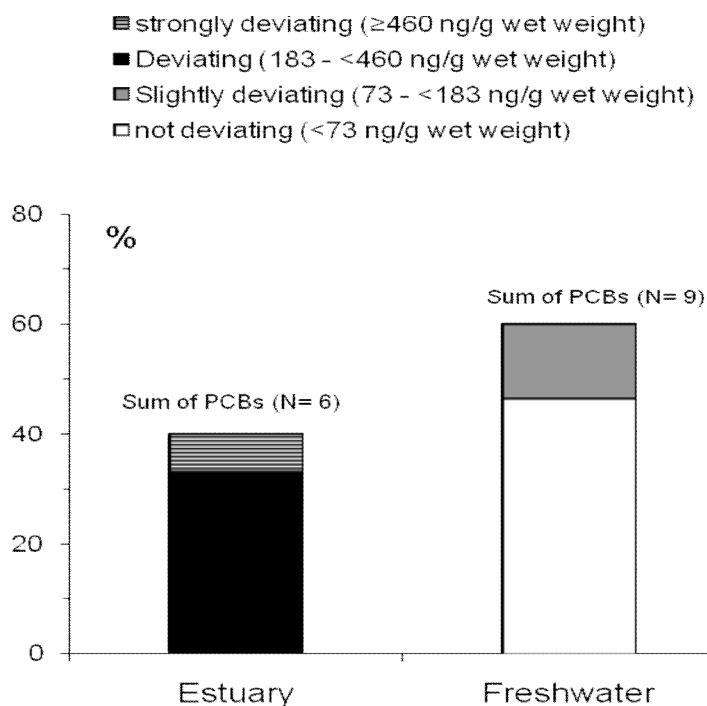


Figure 5. Percentage of eel from the estuary and freshwater sites classified according to the four quality classes of Belpaire and Goemans (2007) for the sum of the seven indicators PCBs in muscle. Quality classes were developed based on quantitative distribution of PCBs, OCPs and heavy metals. *Not deviating class*: sites unpolluted or low polluted; *Slightly deviating class*: slightly and moderately polluted sites; *Deviating class* and *Strongly deviating class*: sites with the more pronounced contamination.

This is not only explained by the high methylation potential of the sediments enhanced under anaerobic conditions in this estuary (Rodriguez *et al.*, 2004) but also by the direct anthropogenic inputs of MeHg from specific discharge points (Stoichev *et al.*, 2004). Finally, in agreement with these results, the MeHg analysis in three different trophic groups (suspension feeders, predators and deposit feeders) from different sampling sites of the downstream Adour estuary showed that MeHg is also subject to biomagnification in the trophic foodchain in this ecosystem (Monperrus *et al.*, 2005). As suggest above, the high \sum PCBs load found in eel muscle of the lower estuary would originate from the direct anthropogenic inputs in the restricted industrial area as well as probable biomagnification in the trophic foodchain as was observed elsewhere (Belpaire and Goemans, 2007), eel being ultimately the more heavily contaminated species with PCBs.

Because most of the chemicals can pose great health risks to biota and humans, European and national legislative have established a framework on admissible residue and contaminant levels in food, feed of plant and animal that must not be exceed for foodstuffs. We compared our data to these limits for total mercury, heavy metals (Cu, Zn, Cd, Pb), \sum PCBs and \sum DDTs.

For total mercury, concentrations in eel muscle of the Adour basin were always below, although close in the downstream estuary, to the $0.5 \mu\text{g Hg g}^{-1}$ which is the maximum level set by the European Union for total Hg in foodstuffs (European Commission, 2006b) and the admitted value set by the World Health Organisation for human consumption (International Program on Chemical Safety, Environmental Health Criteria No. 1, Mercury). For Zn, Cu, Cd and Pb average concentrations were also largely below the European norms of consumption as well as the recommended values given by Ricoux and Gasztwott (2005) (Table 1), Canada (Cu: $100\,000 \text{ ng.g}^{-1} \text{ ww}$; Zn: $100\,000 \text{ ng.g}^{-1} \text{ ww}$), Hungary (Cu: $60\,000 \text{ ng.g}^{-1} \text{ ww}$; Zn : $80\,000 \text{ ng.g}^{-1} \text{ ww}$) and Australia (Cu: $60\mu\text{g.g}^{-1} \text{ ww}$; Zn : $150\mu\text{g.g}^{-1} \text{ ww}$) (Storelli *et al.*, 2007).

The directive 1996/33/CE (European Commission, 1996) given by the European Union sets a maximum content of 200 ng.g^{-1} PCBs lipid basis, calculated as the sum of the 7 "target" congeners (PCB 28, 52, 101, 118, 138, 153, 180) in meat, poultry and derived. However, no recommendation was edited for fish. Our results expressed on lipid basis for the three sites ranged from $193\pm 59 \text{ ng.g}^{-1}$ for Termi site to $1321\pm 352 \text{ ng.g}^{-1}$ for the estuary with an intermediate level for SLG ($348\pm 260 \text{ ng.g}^{-1}$). Thus, data were close or above the threshold established for food especially in the downstream estuary. Additionally, the European Commission established in 2006 (European Commission, 2006b) a maximum level for the sum of dioxins, furans and dioxin-like PCBs ($12 \text{ ngWHO-PCDD/F-PCB-TEQ kg}^{-1}$) in the muscle meat of eel. Although the most toxic dioxin-like PCBs, dioxins and furans were not monitored in our study, we alternatively used the empirical relationship between the concentrations of the PCB congener 153 in ng.g^{-1} wet weight and the $\text{ng PCB TEQ kg}^{-1}$ fresh weight demonstrated by De Boer *et al.* (1993) to evaluate the risk of eel consumption in the Adour estuary. With an average concentration of 163 ng.g^{-1} wet weight, the PCB congener 153 corresponds to $12.7 \text{ ng PCB TEQ kg}^{-1}$ wet weight in the muscle of eel from the lower estuary. As this calculation does not take into account for the presence of dioxins and furans, it can be stated that muscle meat exceed the maximum admissible value.

As for PCB, no maximum residue limit (MRL) was provided yet for DDT and its metabolites in fishes. However, the European Union fixed a tolerance limit of $1000 \text{ ng.g}^{-1} \text{ ww}$ on lipid basis for some food products of animal origin as milk, meat or eggs, based on the sum of p,p'-DDT, p,p'-DDE, p,p'-DDD and o,p'-DDD (Directives 86/362/CEE and 97/41/CE) (European Commission, 1996). These data were calculated for our samples and were below the given limit ($46\pm 22 \text{ ng.g}^{-1}$ on lipid basis, $80\pm 60 \text{ ng.g}^{-1}$ on lipid basis, $105\pm 33 \text{ ng.g}^{-1}$ on lipid basis for Termi, SLG and estuary sampling sites, respectively) supporting the moderate contaminated characteristic of the focused area for OCPs contaminants.

4. Conclusion

Data exposed in this study are in good agreement with other European aquatic environments under moderate chemical pressure both in terms of environment characterisation and eel quality, especially for contaminants such as heavy metals and organochlorine compounds. The occasional consumption of eels caught on the Basin does not seem to present a risk for human for these contaminants. However, care must be taken on eels from the downstream estuary which exhibit high MeHg and PCBs compounds loads that could represent a potential risk for top predators such as birds and perhaps human. Nevertheless, this study must be taken as preliminary as only few individual eels which were analyzed came from the downstream estuary and particularly the restricted zone closed to potential contaminated sewages. It is too early to generalize this risk to the entire estuary zone. Further investigations will be necessary to better constrain the extent of the contaminated zone by mercury and PCBs. Finally, even if eel contamination supports the other European temporal studies showing a decrease of organochlorinated compounds levels, it also illustrated the large persistence of them in organisms, especially in eels where they are concentrated to a large extent (Belpaire and Goemans, 2007) compared to other aquatic organisms due to the species trophic status (carnivorous). Knowing that 75% of stored lipids could be remobilized during the trans-oceanic migration (Boëtius and Boëtius, 1980), and 18% directly allocated to gonad development, and given the complexity of natural environment (geochemical cycles, interaction between pollutants), studies are still needed to know if the sublethal concentrations observed are worrying or not for the complet fulfilment of the biological cycle of this species.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the European Community (IFOP), the IFREMER and the CNRS. The authors are grateful to the National Water and Aquatic Environment Office (ONEMA) and MIGRADOUR for their help in the field logistic and fish sampling. Thanks to Paco Bustamante, La Rochelle University (France) for his suggestions that greatly improved the quality of the paper. Hélène Tabouret acknowledges IFREMER and the Aquitaine Region for her doctoral fellowship.

Partie 2. Bioconcentration du méthylmercure dans le muscle de l'anguille européenne (*Anguilla anguilla*) de l'estuaire de l'Adour (Golfe de Gascogne, France).

Methylmercury bioconcentration in muscle tissue of the European eel (*Anguilla anguilla*) from the Adour estuary (Bay of Biscay, France).

I. Arleny^{1,2}, H. Tabouret^{1,3}, P. Rodriguez-Gonzalez¹, G. Bareille², O.F.X. Donard¹, D. Amouroux¹.

¹ *Laboratoire de Chimie Analytique Bio-inorganique et Environnement, IPREM - UMR 5254 CNRS, Université de Pau et des Pays de l'Adour - Hélioparc Pau Pyrénées, 2, av. P. Angot, 64053 Pau Cedex 9.*

² *Provinciam Health Laboratory of Central Kalimantan, Jl Let. Jend. Soeprato Nol Palangka Raya 73112, Kalimantan Tengah, Indonesia.*

³ *IFREMER Laboratoire des Ressources Halieutiques d'Aquitaine, UFR côte Basque, 1 Allée du Parc Montaury, 64600 Anglet*

³ *Laboratoire de Physico-Toxico Chimie des systèmes naturels – UMR 5472 CNRS – Université de Bordeaux I, 351 cours de la Libération 33405 Talence Cedex*

Article publié : *Marine Pollution Bulletin* **54** :1031-1036

Available online at www.sciencedirect.com

Marine Pollution Bulletin 54 (2007) 1031–1071

MARINE
POLLUTION
BULLETINwww.elsevier.com/locate/marpolbul

Baseline

Edited by Bruce J. Richardson

The objective of BASELINE is to publish short communications on different aspects of pollution of the marine environment. Only those papers which clearly identify the quality of the data will be considered for publication. Contributors to Baseline should refer to 'Baseline—The New Format and Content' (*Mar. Pollut. Bull.* **42**, 703–704).

Methylmercury bioconcentration in muscle tissue of the European eel (*Anguilla anguilla*) from the Adour estuary (Bay of Biscay, France)

Ina Arleny ^{a,b}, Hélène Tabouret ^c, Pablo Rodriguez-Gonzalez ^a, Gilles Bareille ^a,
Olivier F.X. Donard ^a, David Amouroux ^{a,*}

^a Laboratoire de Chimie Analytique Bio-Inorganique et Environnement, IPREM CNRS UMR 5254, Université de Pau et des Pays de l'Adour, Hélioparc, F-64053 Pau, France

^b Provincial Health Laboratory of Central Kalimantan, Jl Let. Soeprato No1 Palangka Raya 73112, Kalimantan Tengah, Indonesia
^c IFREMER, Laboratoire des Ressources Halieutiques d'Aquitaine, Technopôle Izarbel, 64210 Bidart, France

The life history of the European eel (*Anguilla anguilla*) begins in the Sargasso Sea in the Atlantic Ocean where *Leptocephalus* larvae drift with the gulf stream in order to reach European coastal waters. After their metamorphosis into transparent juveniles ("glass" eels) and an acclimatising phase in estuaries, they migrate upstream into rivers to become yellow eels (the sub-adult stage). The yellow eels spend between 2 and 20 years of their lifetime in freshwater until they change into silver eels (the adult stage) and finally migrate back to the Atlantic Ocean for spawning (Gomez-Mourelo, 2005). *A. anguilla* is thus an organism able to tolerate a wide range of environmental conditions, including variations in oxygen availability, different ranges of salinities and exposure to a variety of anthropogenic compounds. In addition, it is a migratory, benthic and benthivorous species at the top of the food chain and is characterised by a high fat content (>30%). For all these reasons *A. anguilla* can bioaccumulate a wide range of contaminants and it has been widely employed as a bioindicator of pollution caused by metals (Batty et al., 1996; Has-Schön et al., 2006) and organic contaminants (Storelli et al., 2007; Yamaguchi et al., 2003).

The environmental and toxicological impact of Hg bioaccumulation in fish is related to the methylation of inor-

ganic mercury to form the more toxic methylmercury (MeHg) species. Fish tend to concentrate MeHg in their tissues by a factor of 10^5 – 10^7 , leading to dangerous levels even in areas with tolerable Hg concentrations (Mason et al., 1996). It has been reported that about 98% of the Hg present in aquatic systems is immobilised in sediments (Stein et al., 1996) and that most of the MeHg is produced at the sediment water interface as a result of biotic or abiotic transformations caused by specific redox gradients and bacterial activity (Gilmour and Henry, 1991). Accordingly, *A. anguilla* may be an effective biomagnifier and bioaccumulator of Hg due to its longevity during the continental development phase in freshwaters (where it forages and lives upwards of 15 years) and its position at the top of the food chain as a carnivorous species feeding on benthic fauna (Mancini et al., 2005).

The River Adour (located at the South West of France) has a length of 335 km, enters the Atlantic Ocean at 43°30' North latitude 1°32' West longitude and drains a large agricultural area of 17,000 km². The Adour estuary is affected by a dynamic macrotidal range (up to 70 km upstream) and it is under strong anthropogenic pressure due to urban, agricultural and industrial activities including tourism, fisheries or recreational boating (Brunet and Astin, 1999). In the upstream estuarine zone, the river presents large, flat man-made modified floodplains (known locally as the "Barthes") that constitute an area of 15 km², lying up to 2 km on both sides of the river. The

* Corresponding author. Tel.: +33 559 407 756; fax: +33 509 407 781.
E-mail address: david.amouroux@univ-pau.fr (D. Amouroux).

Barthes are flooded twice a year and play a significant hydraulic and hydrological role owing their high storage capacity. Such capacity, together with the existence of man-made dykes, affords flood protection to the region and allows a significant dilution of point discharges in the area (Brunet and Astin, 2000). The Barthes is a natural habitat for *A. Anguilla* (Gomez-Mourelou, 2005) and its exploitation constitutes the basis of the economy of the local professional fishermen and hence plays an important economic role in this region. However, *A. Anguilla* stock has been reported to be in dangerous decline in all its geographic life areas (Dekker, 2000; Feunteun, 2002).

Mercury speciation analyses in surface sediments of macrotidal estuaries and coastal systems from the River Adour have shown a moderate contamination of MeHg and inorganic mercury (Stoichev et al., 2004). Moreover, bioaccumulation and biomagnification of MeHg in the trophic network of benthic macrofauna from the Adour estuary and its adjacent coastal zone has been recently observed (Monperrus et al., 2005). Thus, speciation analysis of mercury in *A. Anguilla* from the River Adour appears to be necessary in order to ascertain the risk of transfer (generated by mercury biomagnification) to the higher levels of the food web, including human beings. *A. anguilla* has been used as a biomarker for the study of mercury contamination in many aquatic ecosystems (Batty et al., 1996; Burger et al., 2001; Edwards et al., 1999; Linde et al., 1999; Maes et al., 2005; Ribeiro et al., 2005). However, there has been only one study providing information about the MeHg levels in eels, particularly in long-finned eels *Anguilla dieffenbachii* from New Zealand (Redmayne et al., 2000).

Therefore, this is the first environmental study reporting Hg speciation data from European eels. The aim of the present work was the determination of inorganic mercury and MeHg levels in muscle tissues of *A. anguilla* from two different aquatic ecosystems of the Adour estuary.

This study is part of a research program, “Groupement de Recherche Adour” (GDR Adour), involving several laboratories that investigate possible effects of contaminants on dynamic eel populations. During this program, the sampling strategy was defined by the LRHA (Laboratoire de Ressources Halieutique d’Aquitaine) – IFREMER (Institut Français pour l’Exploration de la Mer) according to, first, various phases characterizing the annual biological cycle of *A. anguilla* (colonization–sedentarisation–downstream migration) and second, the specific period of agricultural practice such as maize plantation, irrigation and pesticide treatment. According to this, three periods of sampling corresponding approximately to the months of April, July and October were selected.

The mercury speciation data reported in the present study are derived from eels caught from two sampling sites (Fig. 1): the downstream estuarine zone (Redon site) and a canal located upstream in the floodplains (Barthes) at Saint Laurent de Gosse, sampled in July and October 2005, respectively. The Redon site is located in the mixing zone of the Adour estuary and, therefore, is under the influence of urban and industrial activities as well as physicochemical processes caused by the mixing of river water and seawater. The sampling site located at Saint Laurent de Gosse is in the freshwater tidal zone of the estuary and mostly subject to agricultural activities developed within the Barthes

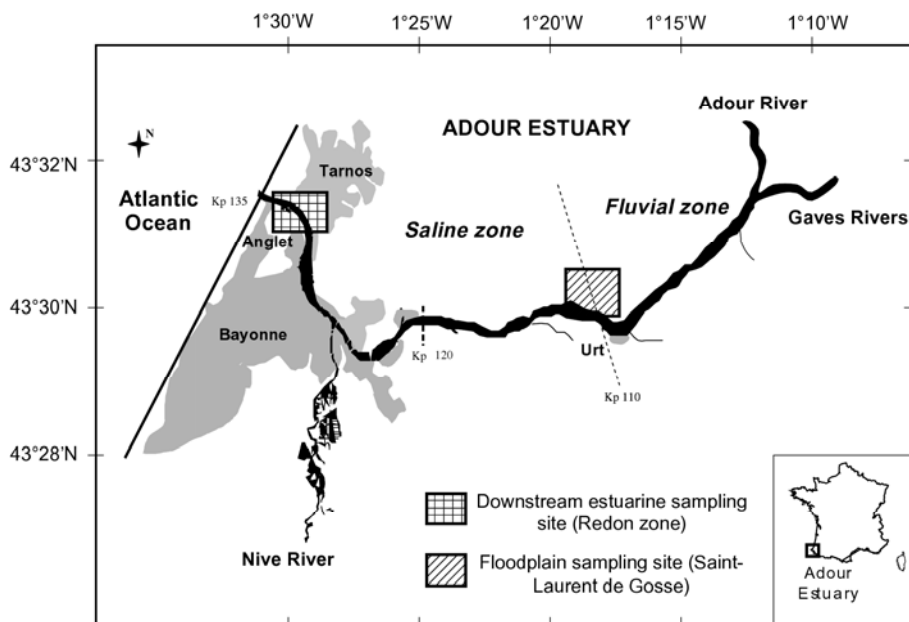


Fig. 1. Location of sampling areas in the lower estuary and upper estuary floodplain (Adour River, France).

catchments. It is also linked to the estuary only by valves, permitting at some point the input of fluvial water.

A total of 22 yellow eel samples were analysed for Hg speciation. Fifteen samples were collected from the downstream estuarine zone (Redon site) and the rest from the upstream wetland of Barthes (Saint Laurent de Gosse). The individual length of the eels ranged from 23.9 to 65 cm (mean: 43.2 ± 12.2), and the weight ranged from 22 to 607 g (mean: 180.1 ± 163.8). The eels were transported to the laboratory in cool boxes and then dissected to remove their organs. The muscle tissues of the eels were lyophilised and homogenised before analysis. A sample of 0.1 g of the lyophilised muscle tissue was digested with 4 ml of 25% tetra methyl ammonium hydroxide (TMAH) by using a microwave assisted extraction at 70 °C for 4 min. Then, 0.4 mL of the extract was adjusted to pH 4 with an acetic acid/sodium acetate buffer solution. Mercury species were derivatised using NaBPr₄ after the addition of ethyl mercury as an internal standard and after 5 min of mechanical shaking they were extracted into isoctane for GC-ICP-MS (gas chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry) or GC-MIP-AED (gas chromatography-microwave induced plasma atomic-emission detection) analysis. The analytical methodology has been optimised (see previous publications; Tseng et al., 1997; Moreno et al., 2006) and was validated by the analysis of the certified reference material DORM 2 (dogfish muscle tissue from the National Research Council of Canada). The results obtained in the validation of the methodology were in agreement using both detection techniques and are shown in Table 1.

The concentrations of the mercury species in muscle tissues of *A. anguilla* collected from the two sampling sites are summarized in Table 2. The average concentration of total Hg was found to be 0.31 ± 0.10 and $0.18 \pm 0.04 \mu\text{g Hg g}^{-1}$ (expressed as wet weight) for the estuary and the floodplains, respectively. These concentrations were always

below $0.5 \mu\text{g Hg g}^{-1}$, which is the maximum set by the European Union for total Hg in foodstuffs (Commission Regulation No. 78/2005) and the admitted value set by the World Health Organisation for human consumption (International Programme on Chemical Safety, Environmental Health Criteria No. 1, Mercury).

Higher MeHg values were encountered in the downstream estuary (mean: $0.27 \pm 0.09 \mu\text{g Hg g}^{-1}$ wet weight) compared to the floodplains, which averaged $0.11 \pm 0.03 \mu\text{g Hg g}^{-1}$. As a result, most of the total mercury found in the samples is present as MeHg (Table 2). Indeed, the average percentage of MeHg from the total mercury burden was found to be 86% in the samples from the estuary and 65% in those from the floodplains. These numbers indicate the need for applying specific speciation protocols to investigate the environmental and toxicological impact of metallic contaminants.

Table 3 compares the results obtained in this work with those collected from previous publications reporting total mercury and MeHg levels in eels from different parts of the world. The results obtained for total mercury in the River Adour are of the same order of magnitude as other published studies. However, MeHg can be only compared with a single study reporting MeHg concentrations in eels from New Zealand (*A. dieffenbachii*). Similar values are obtained in both studies in terms of concentration and percentage of MeHg in the samples.

In contrast to the values from the estuary, MeHg concentrations in the muscle tissues from the floodplains did not change drastically in relation to the individual lengths of the eels but nonetheless showed a significant correlation (Fig. 2). Within the scatter observed for estuarine MeHg values, some eels showed MeHg concentrations close to those found in the floodplains. This may be the consequence of eel life history, as they are able to migrate from estuaries to either river or coastal habitats. Indeed, in a recent study in the Gironde estuary, Fablet et al. (2007) have shown, according to Sr:Ca profiles in otoliths, that 72% of the eels sampled changed their habitats once or more. Thus, we cannot exclude the possibility that some of eels caught in the Adour estuary had recently come from the adjacent coastal or floodplain areas. Alternatively, the large spatial variability in the MeHg content in both sediment and benthic food may also explain these results.

If the percentages of methyl mercury (normalised to the total mercury content) are considered, there is a clear linear regression between the length of the eels and MeHg relative concentrations, whatever the origin of eels (*p* value <0.01,

Table 1
Results obtained for the analysis of certified reference material DORM 2 (dogfish mussel tissue)

Analytical technique	Concentrations in ng Hg g ⁻¹ (dry weight)		
	MeHg	Hg(II)	HgT
GC-ICP-MS	4319 ± 87	70 ± 18	4389 ± 92
GC-MIP-AES	4096 ± 402	Not determined	Not determined
Certified values	4470 ± 320	Not certified	4640 ± 260

Uncertainty of the results is expressed as 1s standard deviation.

Table 2
Mean values of methyl mercury, inorganic mercury and total mercury concentrations ($\mu\text{g Hg g}^{-1}$ wet weight) in the muscle tissues of *A. anguilla* collected from the two sampling sites of the Adour estuary (uncertainty of the values is expressed as 1s standard deviation)

Sites	n	MeHg ($\mu\text{g Hg g}^{-1}$)		Hg(II) ($\mu\text{g Hg g}^{-1}$)		HgT ($\mu\text{g Hg g}^{-1}$)	
		Mean ± SD	Range	Mean ± SD	Range	Mean ± SD	Range
Estuary	15	0.27 ± 0.09	0.12–0.45	0.04 ± 0.03	0.003–0.13	0.31 ± 0.10	0.16–0.48
Floodplains	7	0.11 ± 0.03	0.08–0.16	0.07 ± 0.05	0.004–0.16	0.18 ± 0.04	0.12–0.24

Table 3
Comparison of total mercury and methyl mercury concentrations in eels obtained in similar studies ($\mu\text{g Hg g}^{-1}$ wet weight)

Species	Location	Type	Total Hg	MeHg	Sample	Refs.
<i>A. Anguilla</i>	Vaccares (France)	Pond	0.22 (n = 15)		Liver	Batty et al. (1996)
<i>A. Anguilla</i>	Berre (France)	Pond	0.23 (n = 15)		Liver	Batty et al. (1996)
<i>A. Anguilla</i>	East Anglia (UK)	River estuary	0.26 (n = 51)		Muscle	Edwards (1997)
<i>A. Anguilla</i>	East Anglia (UK)	River broadening	0.10 (n = 51)		Muscle	Edwards (1997)
<i>A. dieffenbachii</i>	Leith (New Zealand)	River	0.12 (n = 1)	0.08 (n = 27)	Muscle	Redmayne et al. (2000)
<i>A. dieffenbachii</i>	Flemming (New Zealand)	River	0.31 (n = 1)	0.48 (n = 34)	Muscle	Redmayne et al. (2000)
<i>A. dieffenbachii</i>	Kyeburne (New Zealand)	River	0.65 (n = 1)	0.50 (n = 23)	Muscle	Redmayne et al. (2000)
<i>A. rostrata</i>	Savannah River (USA)	River	0.15 (n = 24)		Muscle	Burger et al. (2001)
<i>A. Anguilla</i>	Thames River (UK)	River	0.15 (n = 2)		Muscle	Yamaguchi et al. (2003)
<i>A. Anguilla</i>	La Capelière (France)	Pond	0.03 (n = 9)		Muscle	Ribeiro et al. (2005)
<i>A. Anguilla</i>	La Capelière (France)	Pond	0.06 (n = 10)		Liver	Ribeiro et al. (2005)
<i>A. Anguilla</i>	Fumemorte (France)	Pond	0.09 (n = 9)		Muscle	Ribeiro et al. (2005)
<i>A. Anguilla</i>	Fumemorte (France)	Pond	0.08 (n = 9)		Liver	Ribeiro et al. (2005)
<i>A. Anguilla</i>	Mornèse (France)	Pond	0.12 (n = 8)		Muscle	Ribeiro et al. (2005)
<i>A. Anguilla</i>	Mornèse (France)	Pond	0.15 (n = 8)		Liver	Ribeiro et al. (2005)
<i>A. Anguilla</i>	Yser (Belgium)	River	0.15 (n = 8)		Muscle	Maes et al. (2005)
<i>A. Anguilla</i>	Meuse (Belgium)	River	0.17 (n = 20)		Muscle	Maes et al. (2005)
<i>A. Anguilla</i>	Scheldt (Belgium)	River	0.09 (n = 33)		Muscle	Maes et al. (2005)
<i>A. Anguilla</i>	Tiber River (Italy)	River	0.23 (n = 8)		Muscle	Mancini et al. (2005)
<i>A. Anguilla</i>	Lesina (Italy)	Lagoon	0.18 (n = 2)		Muscle	Storelli et al. (2007)
<i>A. Anguilla</i>	Adour River (France)	River estuary	0.31 (n = 15)	0.27 (n = 15)	Muscle	This work
<i>A. Anguilla</i>	Adour River(France)	River floodplain	0.18 (n = 7)	0.11 (n = 7)	Muscle	This work

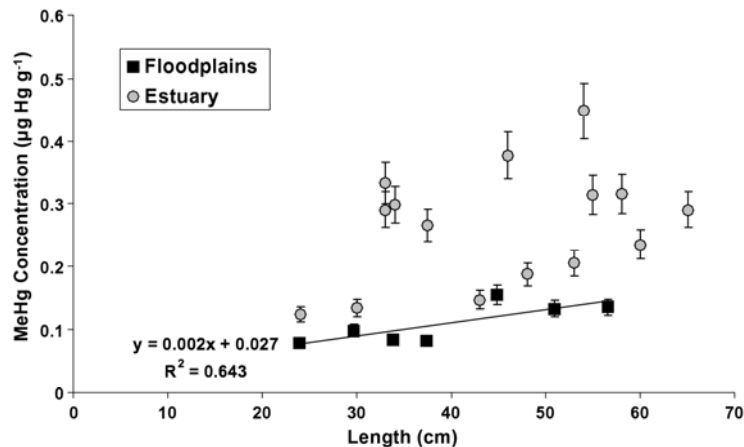


Fig. 2. Concentration of MeHg ($\mu\text{g Hg g}^{-1}$ wet weight) according to the length of eels from the downstream urban estuary and from the floodplains of the Adour River.

Fig. 3). The correlation was higher in the floodplains. It is worth noticing that the lower MeHg concentrations obtained for small eels in the floodplains indicates a lower initial exposure to MeHg. The higher slope indicates a higher biomagnification rate versus the length of the fish than that obtained in the downstream estuary. Nevertheless, both ecosystems show the same overall biomagnification factor in the largest eels. These results can be explained with regard to the different physical characteristics of both environmental compartments (i.e. salinity, food availability) and/or individual physiological characteristics such as growth rate.

Although there are still no data regarding contamination levels and the reactivity of Hg in the “Barthes”, previ-

ous work in the Adour estuary has shown that mercury species (particularly MeHg) were encountered in urban-related effluents at significantly higher levels compared to the rivers draining upstream watersheds (Point, 2004). Moreover, Stoichev et al. (2006) reported that MeHg levels in surface waters from the Adour estuary were characterised by longitudinal variations, with highest concentrations (in both dissolved and particulate fractions) occurring within the downstream, urban estuarine area. This has been explained not only by the high methylation potential of the sediments, but also by direct anthropogenic inputs of MeHg from specific discharge points. Such methylation potential has been found to be enhanced under anaerobic conditions in sediments from the Adour River (Rodriguez

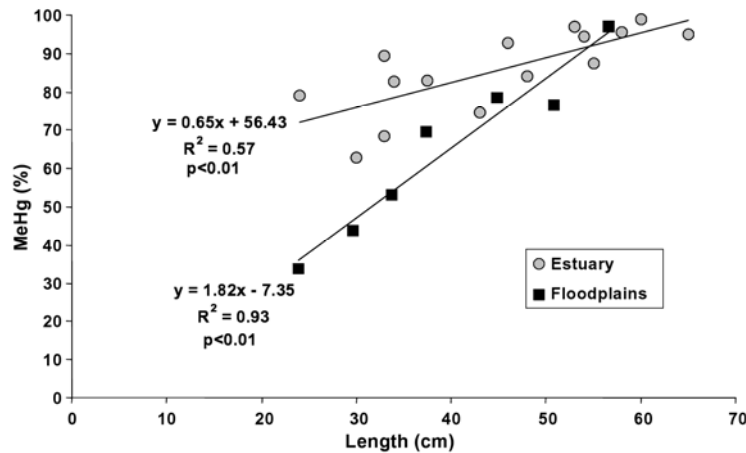


Fig. 3. Percentage of MeHg according to the length of the eels from the downstream urban estuary and from the floodplains of the Adour River.

Martin-Doimeadios et al., 2004). On the other hand, mercury species concentrations in coastal sediments from the Adour were found to be high enough to assess the impact of estuarine inputs on the nearby coastal area (Stoichev et al., 2004). Finally, in agreement with these results, MeHg analysis in three different trophic groups (suspension feeders, predators and deposit feeders) from different sampling sites of the downstream Adour estuary showed that MeHg is also subject to biomagnification in the benthic food chains (Monperrus et al., 2005).

Taking into account these results, the high correlations obtained for eels from the floodplains in (Figs. 2 and 3) can be explained by the population type and the exposure mode. Concerning the eels from the “Barthes”, which is a relatively closed ecosystem, it can be assumed that exposure is mostly based on identical trophic routes provided by specific local food chains. On the other hand, because the downstream estuary receives an additional MeHg contribution from anthropogenic sources, various mercury accumulation routes related to different trophic chains can be assumed.

Our research suggests a basis for large scale of studies in the Adour estuary and provides, for the first time, preliminary data on MeHg burdens, variability and composition of mercury species in muscle tissues of European eels (*A. Anguilla*). In addition *A. anguilla* appears to be an effective bioaccumulator of MeHg, even in aquatic environments moderately contaminated by mercury, demonstrating the usefulness of this species as a bioindicator of the impacts of mercury pollution in different aquatic ecosystems.

Acknowledgements

This work is a contribution to the “Groupement de Recherche Adour” sponsored by the IFREMER, the University de Pau et des Pays de l’Adour and the CNRS. I. Arleny acknowledges the French Ministry of Foreign Affairs for her fellowship, H. Tabouret acknowledges

IFREMER and the Aquitaine Region for her Ph.D. grant and P. Rodriguez-Gonzalez acknowledges the “Secretaria de Estado de Universidades e Investigacion” of the Spanish Ministry of Education and Science for his postdoctoral research fellowship. The authors are also grateful to N. Caill-Milly and P. Prouzet (LHA, IFREMER), the Conseil Supérieur de la Pêche and MIGRADOIR for their help in the field logistic and fish sampling.

References

Batty, J., Pain, D., Caurant, F., 1996. Metal concentrations in eels *Anguilla anguilla* from the Camargue region of France. *Biological Conservation* 76, 17–23.

Brunet, R.C., Astin, K.B., 1999. Spatio-temporal variation in some physical and chemical parameters over a 25-year period in the catchment of the River Adour. *Journal of Hydrology* 220, 209–221.

Brunet, R.C., Astin, K.B., 2000. A 12-month sediment and nutrient budget in a floodplain reach of the River Adour, Southwest France. *Regulated Rivers: Research & Management* 16, 267–277.

Burger, J., Gaines, K.F., Boring, C.S., Stephens, W.L., Snodgrass, J., Gochfeld, M., 2001. Mercury and selenium in fish from the Savannah River: species, trophic level, and locational differences. *Environmental Research Section A* 87, 108–118.

Dekker, W., 2000. A procrustean assessment of the European eel stock. *ICES Journal of Marine Science* 57, 938–947.

Edwards, S.C., MacLeod, C.L., Lester, J.N., 1999. Mercury contamination of the eel (*Anguilla Anguilla*) and roach (*Rutilus Rutilus*) in East Anglia, UK. *Environmental Monitoring and Assessment* 55, 371–387.

Fablet, R., Daverat, F., De Pontual, H., 2007. Unsupervised Bayesian reconstruction of individual life histories from otolith signatures: case study of Sr:Ca transects of eel (*Anguilla anguilla*) otoliths. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 64, 152–165.

Feunteun, E., 2002. Management and restoration of European eel population (*Anguilla anguilla*): an impossible bargain. *Ecological Engineering* 18, 575–591.

Gilmour, C.C., Henry, E.A., 1991. Mercury methylation in Aquatic systems affected by acid deposition. *Environmental Pollution* 71, 131–169.

Gomez-Mourelo, P., 2005. A model for the upstream motion of elvers in the Adour River. *C. R. Biologies* 328, 367–378.

Has-Schön, E., Bogut, I., Strelec, I., 2006. Heavy metal profile in five species included in human diet, domiciled in the end flow of River

- Neretva (Croatia). Archives of Environmental Contamination and Toxicology 50, 545–551.
- Linde, A.R., Sánchez-Galán, S., Klein, D., García-Vázquez, E., Sumner, K.H., 1999. Metallothionein and heavy metals in Brown Trout (*Salmo trutta*) and European eel (*Anguilla anguilla*): a comparative study. Ecotoxicology and Environmental Safety 44, 168–173.
- Maes, G.E., Raeymaekers, J.A.M., Pampoulie, C., Seynaeve, A., Goemans, G., Belpaire, C., Volckaert, F.A.M., 2005. The Catadromous European eel *Anguilla Anguilla* (L.) as a model for freshwater evolutionary ecotoxicology: relationship between heavy metal bioaccumulation, condition and genetic variability. Aquatic Toxicology 73, 99–114.
- Mancini, L., Caimi, S., Ciardullo, S., Zeiner, M., Bottoni, P., Tancioni, L., Cautadella, S., Carola, S., 2005. A pilot study of the contents of selected pollutants in fish from the River Tiber (Rome). Microchemical Journal 79, 171–175.
- Mason, R.P., Reinfelder, J.R., Morel, F.M., 1996. Uptake, toxicity, and trophic transfer of mercury in a coastal diatom. Environmental Science and Toxicology 30, 1835–1845.
- Monperrus, M., Point, D., Grall, J., Chauvaud, L., Amouroux, D., Bareille, G., Donard, O., 2005. Determination of metal and organo-metal trophic bioaccumulation in the Benthic Macrofauna of the Adour estuary coastal zone (SW France, Bay of Biscay). Journal of Environmental Monitoring 7, 693–700.
- Moreno, M.J., Pacheco-Arjona, J., Rodríguez-González, P., Preud'homme, H., Amouroux, D., Donard, O.F.X., 2006. Simultaneous determination of monomethylmercury, monobutyltin, dibutyltin and tributyltin in environmental samples by multi-elemental species-specific isotope dilution analysis using electron ionisation GC–MS. Journal of Mass Spectrometry 41, 1491–1497.
- Point, D., 2004. Spéciation et Biogéochimie des éléments traces métalliques dans l'estuaire de l'Adour. Ph.D. Thesis, Université de Pau et des Pays de l'Adour, pp. 218.
- Redmayne, A.C., Kim, J.P., Closs, G.P., Hunter, K.A., 2000. Methyl mercury bioaccumulation in long-finned eels, *Anguilla dieffenbachia*, from the three rivers in Otago, New Zealand. The Science of the Total Environment 262, 37–47.
- Ribeiro, C.A.O., Vollaie, Y., Sanchez-Chardi, A., Roche, H., 2005. Bioaccumulation and the effects of organochlorine pesticides, PAH and heavy metals in the eels (*Anguilla anguilla*) at the Camargue nature reserve, France. Aquatic Toxicology 74, 5–69.
- Rodríguez Martín-Doimeadios, R.C., Tessier, E., Amouroux, D., Guyonnaud, R., Duran, R., Caumette, P., Donard, O.F.X., 2004. Mercury methylation/demethylation and volatilization pathways in estuarine sediment slurries using species-specific enriched stable isotopes. Marine Chemistry 90, 107–123.
- Stein, E.D., Chen, Y., Winer, A.M., 1996. Environmental distribution and transformation of mercury compounds. Critical Review in Environmental Science and Technology 26, 1–43.
- Stoichev, T., Amouroux, D., Wasserman, J.C., Point, D., de Diego, A., Bareille, G., Donard, O.F.X., 2004. Dynamics of mercury species in surface sediments of a macrotidal estuarine-coastal system (Adour River, Bay of Biscay). Estuarine, Coastal and Shelf Science 59, 511–521.
- Stoichev, T., Amouroux, D., Monperrus, M., Point, D., Tessier, E., Bareille, G., Donard, O.F.X., 2006. Mercury in surface waters of a macrotidal urban estuary (River Adour, South-West France). Chemistry and Ecology 22, 137–148.
- Storelli, M.M., Barone, G., Garofalo, R., Marcotrigiano, G.O., 2007. Metals and organochlorine compounds in eel (*Anguilla Anguilla*) from the Lesina lagoon, Adriatic Sea (Italy). Food Chemistry 100, 1337–1341.
- Tseng, C.M., De Diego, A., Martin, F.M., Amouroux, D., Donard, O.F.X., 1997. Rapid determination of inorganic mercury and methylmercury in biological reference materials by hydride generation, cryofocusing, atomic absorption spectrometry after open focused microwave-assisted alkaline digestion. Journal of Analytical Atomic Spectrometry 12, 743–750.
- Yamaguchi, N., Gazzard, D., Scholey, G., Macdonald, D.W., 2003. Concentrations and hazard assessment of PCBs, organochlorine pesticides and mercury in fish species from the upper Thames: River pollution and its potential effects on top predators. Chemosphere 50, 265–273.

Partie 3. Résultats préliminaires de l’expression hépatique de *CYP1A1* chez l’anguille jaune (*Anguilla anguilla*) du bassin de l’Adour.

Preliminary results of hepatic *CYP1A1* expression in European yellow eel (*Anguilla anguilla*) of the Adour basin.

H. Tabouret^{1,2}, C. Cagnon², E. Aubry^{1,2}, C. Mouches^{2,3}.

¹ IFREMER Laboratoire des Ressources Halieutiques d’Aquitaine, UFR côte Basque, 1 Allée du Parc Montaury, 64600 Anglet, France.

² Equipe Environnement et Microbiologie, IPREM UMR CNRS 5254, IBEAS, BP 1155, 64013 Pau cedex, France.

³ Département Ecologie, Université de Pau et des pays de l’Adour, UFR Côte Basque, 1 Allée du Parc Montaury, 64600 Anglet, France.

Article en préparation

Résumé : L'anguille jaune européenne (*Anguilla anguilla*) des zones humides de l'Adour a été analysée en vue de l'évaluation du stress chimique potentiel que cette espèce subit en milieu naturel. Les recherches se sont focalisées sur l'évaluation de l'expression hépatique de l'ARNm *CYP1A1* par la méthode sensible RT-PCR en temps réel. Dans cette étude préliminaire, l'expression de l'ARNm *CYP1A1* montre des niveaux basaux, stables dans le temps et conformes aux données existantes sur la pression chimique des zones humides. L'absence de corrélation entre les caractéristiques biométriques et l'expression de *CYP1A1* et la capacité de produire des données à partir d'une faible quantité de tissu supportent l'utilisation de la RT-PCR en temps réel pour les études de terrain pluridisciplinaires. La longueur, le poids, l'âge, le contenu en lipides et en composés organochlorés des tissus mous ne semblent pas pouvoir expliquer la grande variabilité de l'expression hépatique de l'ARNm *CYP1A1* observée. Ces premiers résultats ouvrent sur de futures recherches sur la réponse précoce des anguilles au stress chimique en milieu naturel en particulier dans des environnements plus contaminés comme la zone estuarienne aval de l'Adour, mais aussi sur d'autres approches intégrées prenant en compte la qualité de l'environnement, la contamination de l'organisme et son comportement.

Abstract: European yellow eels (*Anguilla anguilla* L.) from the Adour river wetlands were analysed for the evaluation of the chemical stress undergone by this species in wild habitats. Investigations focused on the hepatic *CYP1A1* mRNA expression using the sensitive real-time RT-PCR (reverse transcription – polymerase chain reaction) method. In this preliminary study, the *CYP1A1* mRNA expression levels were found basal, stable over time and concomitant with the knowledge of the wetlands chemical pressure. The absence of significant correlation between biometric characteristics and *CYP1A1* mRNA levels and the ability to produce data from few amount of tissue support the relevance of the real-time RT-PCR methodology for multidisciplinary field studies. Length, weight, age, lipid and organochlorinated compound concentrations in soft tissue could not explain the large variability of the hepatic *CYP1A1* expression observed. These first results open on further investigations on the eel early response to chemical stress in wild conditions especially in environments more contaminated as the Adour downstream estuary, but also on integrated studies taking into account the environment quality, the organism contamination and behavior.

Key words *CYP1A1* mRNA, real-time RT-PCR, *Anguilla anguilla*, Adour basin.

1. Introduction

In the aquatic system, organisms are submitted to a wide range of stress linked to natural condition changes (temperature, salinity, turbidity...) and/or to the exposure to contaminants (PCBs, HAPs, heavy metals...). The uptake of hazardous compounds is able to produce a cascade of protecting reactions from the organism at each organization levels. If the complexity or level of exposure is too high to be covered by this defense ability it could lead to secondary deleterious biological effects (DNA adducts, decrease of growth rate or reproductive success...) more and more perceptible from the cellular to the ecosystem level (Burgeot *et al.*, 1999). However, it is essential to detect the perturbation at an earlier stage to suggest preventive action. In order to evaluate the biological response, biomarkers of exposure are more and more developed. Lagadic *et al.* (1997) define a biomarker as an observable change at a molecular, biochemical, cellular, physiological or behavioural level revealing the past or present exposure of an individual to one or more chemical substances with pollutant characteristics. Biomarkers allow the impact evaluation for several stresses acting on organism and physiological state before the apparition of pathologies and mortality, in case of a single exposure to high pollutant concentrations or an exposure to chronicle low levels.

When the exposure to harmful organic compounds is targeted, the investigations are focused on the enzymatic activities making these compounds more hydrophilic and easier to be excreted by kidney, bile or gills. Among enzymes catalyzing the series of detoxification processes for exogenous organic compounds, cytochrome P450 enzymes are widely studied due to their ability to be induced by their substrate (Nebert, 1991). The investigations focused on catalytic activities of CYP1A in fish highlighted the differential induction depending of the inducer of aryle hydrocarbon hydroxylase (AHH), 7-ethoxyresorufin *O*-deethylase (EROD) and 7-ethoxycoumarin *O*-de-ethylase (ECOD) activities (Erickson *et al.*, 1988; Leaver *et al.*, 1988 ; Celander and Förlin, 1991). EROD (ethoxyresorfin-*O*-deethylase) is commonly used as biomarker (Whyte *et al.*, 2000). Nevertheless, the enzymatic activities are sometimes inhibited by abiotic factors especially by the presence of other xenobiotic compounds and elements as metallic divalent ions (Bozcaarmutlu and Arinç, 2004). Such disturbances have been observed with cadmium and organotins (Fent and Bucheli, 1995; Fent *et al.*, 1998). These interactions may induce bias in the interpretation of results especially those obtained from wild environments chemically complex. Evaluation of the individual response, before enzyme synthesis, at a transcriptional level, must avoid such a bias.

CYP1A1 enzyme is known to be induced by exposure to polycyclic aromatic molecules as PAHs (polycyclic aromatic hydrocarbons), PCBs (polychlorinated biphenyls), PCDDs (polychlorinated dibenzodioxins) and PCDFs (polychlorinated dibenzofurans) (Stegeman and Hahn, 1994). The evaluation of the *CYP1A1* gene induction at a transcriptional level is a solution to problems of EROD enzymatic activity inhibition by other compounds present in the surrounding environment. The use of the *CYP1A1* mRNA quantification as a biomarker is based on the observation in several fish species of a significant *CYP1A1* mRNA level increase previous to an increase of protein levels in response to a chemical exposure (Van der Oost *et al.*, 2003; Aubry *et al.*, 2007 a, b). Moreover, the *CYP1A1* gene induction was shown to be dependant on the inducer concentrations (Courtenay *et al.*, 1993; Miller *et al.*, 1999; Stagg *et al.*, 2000; Røling *et al.*, 2004; Aubry *et al.*, 2007 a, b) and time of exposure, with high persistent expression after a long time.

Eels have been described as good bio indicators of the environmental contamination (Feunteun, 2002). Due to their high lipid content, their benthic and predator behavior, resistance to physico-chemical stress, the long period spent in a specific habitat during the growth phase, this fish species is known to be prone to bioaccumulate chemical and especially organic compounds (Tesch, 1977; Van der Oost *et al.*, 1994; Roche *et al.*, 2003). In addition to their relevant biological model status, European eels (*Anguilla Anguilla* L.) as the other eel species population suffered from a decline since the 1980s' leading the species to be outside safe biological limits (European commission, 1998). The understanding of the pollutant influence on this decline and the early detection of the exposure is of growing concern especially in the context of population recovering program (European Commission, 2007).

Recently, first investigations of the *CYP1A1* gene induction in European eel using real time RT-PCR (reverse transcription polymerase chain reaction), in controlled environments, revealed a significant response to β -naphthoflavone (synthetic inducer) and a complex PAH mixture with a great analytical sensitivity (Aubry, 2007 a,b). These studies highlighted the dependence of the induction to the pollutant concentrations but also to the time of exposure. As described in other fish species (Hektoen *et al.*, 1990; Hahn and Stegemann, 1994; Celander and Förlin, 1995), the expression was persistent several days after the exposure supporting the use of *CYP1A1* gene expression as a relevant biomarker of gene inducer exposure even in the case of a transient contamination.

In the context of a French multi disciplinary approach, the “Groupement de Recherche Adour”, based on European eel as a biological model to highlight the anthropogenic activities influence on the Adour basin (South West, France), the opportunity was given to evaluate the eel response to the chemical stress analyzing hepatic *CYP1A1* mRNA levels by real time RT-PCR. The exposure of eels from the Adour estuary and associated wetlands to heavy metals, especially cadmium (Cd), and organochlorinated compounds (Trut and Mayeur, 2004; Monperrus *et al.*, 2005; Tabouret *et al.*, submitted a) supported the choice of this methodology. Moreover, this technique has a great sensitivity even with small amount of soft tissue that was a limiting factor in this study as a single specimen was used for several analyses (evaluation of the organic and heavy metal pressure, mercury speciation). Finally, this work aims to expose the preliminary results of the *CYP1A1* mRNA quantification by real time RT-PCR in European yellow eels (*Anguilla Anguilla*) from two wetlands of the Adour basin.

2. Material and methods

Yellow eels were collected by electrofishing on two sites on the Adour basin (Fig. 1), one directly connected to the Adour river and another indirectly connected to the Adour river. The first site is a small tributary (Termi) on the left river bank. This brook is outside the tidal influence and is connected to the Adour through a tributary, the Aran River. On the other river bank, a canal within the Barthes of St Laurent de Gosse (SLG) was selected. This canal is situated in the freshwater tidal zone and directly connected to the Adour estuary by valves. In its upstream part, this canal crosses peat bogs and forest areas whereas in its downstream it is influenced by agricultural activities especially corn cultures. Sampling periods were determined according to the specific period of agricultural practice such as corn plantation (March to September), irrigation (June to August) and pesticide treatments (February to August). Spring (April – May) and summer (July) of 2006 and 2007 were chosen. A total of 40 yellow eels were caught on Termi site. On SLG site, specimens with sufficient length (up to 15cm) to cover all analyses (*CYP1A1* mRNA analysis, chemical evaluation in soft tissues) were found in a very small effective during the sampling periods leading to a sampling of only 6 individuals.

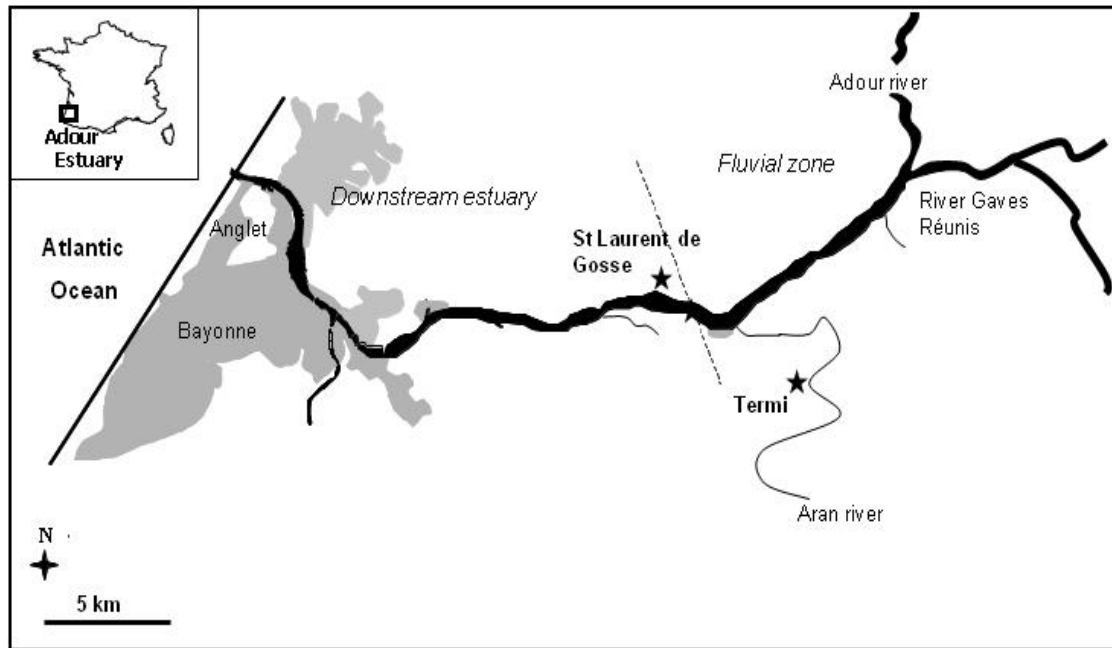


Figure 1. Sites of European yellow eel sampling (black star) on the Adour basin (South West, France). Dotted line: Limit of the saline tide influence.

On field, yellow eel length (cm) and weight (g) were measured. Eels were sacrificed by beheading. The liver was removed and immediately placed in dry ice until lab storage at -80°C . In the lab 50 mg of frozen liver were ground with one stainless steel balls of 5mm diameter in a MM 300 Mixer Mill (Qiagen) by four cycles of 30 s at 30 Hz at 4°C . The frozen grounds were homogenized in 0.5 ml of TRIzol reagent (Invitrogen). Total RNA was then extracted according to the manufacturers' instructions. The integrity of total RNA extracted was checked by electrophoresis gel based on the integrity of 28S and 18S bands and the total RNA amount evaluated by fluorimetry (MxPro3005, Stratagene) using the RiboGreen RNA quantitation kit (Invitrogen). A standard curve and the total RNA quantification were realized based on a RNA standard solution and the manufacturers' instructions. The evaluation of *CYP1A1* expression by real time RT-PCR requires at least 2 ng of total RNA per sample. Despite a great sensitivity of the methodology, this amount lead to the elimination of samples resulting in a final effective of 31 for Termi brook and 3 specimens for the SLG canal. Table 1 gives the characteristics of these individuals.

Table 1. Characteristics of yellow eels caught on Termi and St Laurent de Gosse.

Site	Date	N	Length (cm)	Weight (g)	Age (yr)
Termi	April 2006	11	31.4	92.0	7.2
			(16.4 - 47.5)	(6.0 - 320.0)	(4 - 11)
	July 2006	7	34.0	75.4	8.7
			(26.0 - 49.0)	(23.4 - 223.1)	(7 - 10)
May 2007	6	28.0	56.8	7.3	
		(20.8 - 37.5)	(17.0 - 133.0)	(6 - 10)	
July 2007	7	32.1	79.0	7.9	
			(21.4 - 39.2)	(17.0 - 145.0)	(5 - 9)
St Laurent de Gosse	July 2006/May 2007	3	42.2	306.4	8.7
			(22.5 - 63.0)	(13.9 - 502.0)	(8 - 10)
Total		34	33.0	98.6	7.8
			(16.4 - 63.0)	(6.0 - 502.0)	(4 - 11)

Total RNA were treated with Dnase I using the DNA free kit (Ambion) before reverse transcriptions. Two reverse transcriptions were carried out for each RNA sample with the iScript cDNA Synthesis kit (BioRad) according to instructions. The cytoskeletal β -actine gene was chosen as a housekeeping gene in order to normalize the *CYP1A1* expression level. The primers used for the real time PCR were adapted from those designed by Aubry *et al.* (2007a). Real time PCR was performed in a final volume of 25 μ l containing the cDNA, each primer (10 μ M) and 2X SYBR Green Mix (Stratagene). PCR cycles were realized using a MxPro3005 thermocycler (Stratagene) as follows: 95°C for 10 min and 40 cycles of amplification (95°C for 30 s, 60°C for 45 s, 72°C for 30 s). The forward primer 5'-CATGGGCTGTTGTGTACCTG-3' and the reverse primer 5'- AGGGCAGGAAGGAAGAATGT-3' allowed the specific amplification of a 171 bp fragment of the *CYP1A1* transcript from the European eel. The forward primer 5'- TTCCTGGGTATGGAGTCCTG-3' and the reverse one 5'- TGGGGCAATGATCTTGATTT-3' were used to amplify a 200 bp portion of the cytoskeletal β -actine from *Anguilla anguilla*. Relative gene expressions were calculated based on the Pfaffl equation (Pfaffl, 2001).

In addition, age of eels was estimated using otoliths. Sagittal otolith pairs were removed from the fish, cleaned according Jones and Chen (2003) with H₂O₂ (ultrex), rinsed with 18.2 MΩ MQ water and dried. They were embedded in araldite resin (araldite DBF CH Escil, Chassieu, France), ground on a sagittal plan to expose their cores and polished with diamond paper of decreasing grain diameter (9, 3 and 0.1 μm) (Escil, Chassieu, France). Otoliths were coloured with toluidine blue 5% (Standard, Fluka). Finally, annual growth layers, and especially the annual growth stop mark, revealed by this coloration were observed by stereomicroscopy (x50) and counted in order to estimate individual age (Berg 1985; Svedang *et al.* 1998).

In a previous study (Tabouret *et al.*, submitted a), lipid content and organochlorinated compounds concentrations were determined in muscle of five eels also used for the *CYP1A1* expression analyses. Results from this study were used to test for correlation with *CYP1A1* hepatic expression. Data statistical treatment, especially Kruskal-Wallis tests for comparison and Pearson tests for correlation, were performed using Xlstat 7.2.1 Software (Addinsoft, France).

3. Results and discussion

The expression levels of *CYP1A1* gene in samples from both sites (Termi, SLG) are below 1.5 U.A. (Fig.2). These results are similar to the levels exhibited by controls in the experimental studies made in controlled conditions on the *CYP1A1* induction by β-naphtoflavone (β-NF) and a diesel water soluble fraction (Aubry, 2007 a, b). Unfortunately, the lack of individuals available on SLG site makes a strict comparison of the two sites inappropriate. However, the 3 specimens of this site exhibit basal expression levels similar to those observed in the Termi brook (Fig. 2). The expression of *CYP1A1* on Termi did not vary between spring and summer, and between the two years 2006-2007 (test Kruskal Wallis, $P > 0.05$) suggesting a homogeneous exposure to *CYP1A1* inducers according site, even care must be taken based on the low effective on SLG site, and a yearly timescale. However, the homogeneous exposure to *CYP1A1* inducers was ever brought up by Aubry (2006) based on the EROD activity monitoring in eels from different brooks and aquatic systems on the Adour basin.

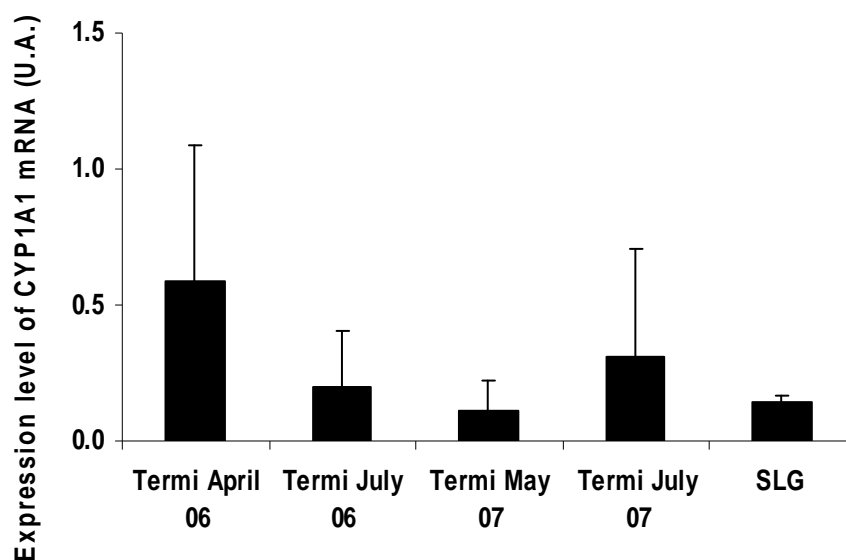


Figure 2. Mean hepatic expression level of *CYP1A1* according sampling site and date. Standard deviation is illustrated by double bars. SLG: St Laurent de Gosse.

The pressure of the *CYP1A1* gene inducers seems to be moderate and not sufficient to induce the expression. A preliminary evaluation of eel exposure to *CYP1A1* inducers conducted on several sites on the Adour basin using EROD hepatic activity (Aubry, 2006) showed a lower pressure on the Adour basin than other European systems like the Ortello lagoon in Italy (Gorbi and Regoli, 2004) and some estuaries in the United Kingdom (Doyotte *et al.*, 2001). Moreover, the analysis of organochlorinated compounds, potential inducers of the *CYP1A1* gene (Monod, 1997, Courtenay *et al.*, 1999, Yeung *et al.*, 2003), in eels from Termi and SLG sites showed a moderate pressure (Tabouret *et al.*, submitted a) in comparison with Flanders (Maes *et al.*, 2008) and some English rivers (Mason, 1993), supporting both the study based on EROD activity (Aubry, 2006) and our own results.

Despite low expression levels and their temporal stability, a large inter individual variability was observed (Fig. 2). The widest range of values was observed on Termi in April 2006 with a maximum expression level of 1.39 and a minimum of 0.03. No significant relationship between hepatic *CYP1A1* gene expression levels, length (N=34, $r=-0.233$, $P=0.193$), weight (N=34, $r=-0.241$, $P=0.176$), and age (N=34, $r=-0.324$, $P=0.066$) was observed. This independence of the expression levels from the biometric characteristics does not explain the inter individual variability. However it supports the use of *CYP1A1* gene expression as marker of chemical stress and especially for comparison of heterogeneous populations as wild ones.

Within the framework of the organochlorinated compound pressure evaluation, PCBs (polychlorinated biphenyls), DDT (dichlorodiphenyltrichloroethane), its metabolites (grouped as persistent organochlorinated compounds or POCs) and lipid contents of individuals coming from Termi, SLG and the downstream estuary were determined (Tabouret *et al.*, submitted a). Five of the individuals from Termi were used both for these analyses and the evaluation of the *CYP1A1* expression levels. Table 2 gives the biometric characteristics, the lipid content and the concentration of organochlorinated compounds observed in these five specimens. No correlation was found between the hepatic gene expression and the other characteristics suggesting that the variability is governed by other factors. The interanimal variability was also reported in the investigations of the chemical pressure exerted on yellow eels in the Adour basin (Tabouret *et al.*, submitted a). Yellow eel is often described as sedentary growing phase of the species. However, nomadic movements have been highlighted in several eel populations (Feunteun *et al.*, 2003; Daverat *et al.*, 2005).

Table 2. Correlation (Pearson coefficient *r*) between hepatic expression level of *CYP1A1* and biometric characteristics (length, weight, age), lipid content in muscle (% of body weight), sum of PCBs or POCs (ng.g⁻¹ muscle wet weight) based on 5 yellow eels from Termi.

	mean	Std. Dev.	r	P
Expression level <i>CYP1A1</i>	30,8	41,3		
Age	8,8	1,2	-0.307	0.615
Length (cm)	38,9	10,2	-0.119	0.849
Weight (g)			-0.136	0.827
Lipid content (% of body weight)	38,6	18,6	-0.619	0.265
ΣPCBs* (ng.g ⁻¹ ww)	58,8	16,1	0.217	0.726
ΣPOCs* (ng.g ⁻¹ ww)	18,4	6,3	-0.397	0.508

ΣPCBs* : sum of the 7 PCBs indicators (CB50+28, 52, 101, 118, 153, 138, 180) (Tabouret *et al.*, submitted a)

ΣPOCs* : sum of persistent organochlorinated compounds (Tabouret

However, a parallel study based on the otolith microchemistry, especially Sr:Ca and Ba:Ca composition, revealed that individuals caught on freshwater sites (Termi and SLG) in the Adour basin did not present evidence of migration between freshwater systems, moderately contaminated, and the downstream estuary with a more pronounced chemical pressure (Tabouret *et al.*, submitted b). The inter-individual variability was also highlighted for individuals coming from a homogeneous population reared in controlled conditions in aquarium and submitted to *CYP1A1* inducers (Aubry *et al.*, 2007a). Some authors (Dixon *et al.*, 2002; Georges *et al.*, 2004) suggested that this variability could be linked to the genetic variability more than environmental or behavioural factors. Considering this variability, it is essential for further field investigations to have a larger sample number.

Finally, no induction of *CYP1A1* mRNA was found in eels from the two sampling sites suggesting that these habitats may constitute privileged habitats where eels may not suffer from deleterious effects, like lipogenesis decrease or endocrinian disturbances, due to *CYP1A1* inducers. This limited study opens a wide range of further investigations in terms of ecotoxicological biomonitoring on the Adour Basin. If the upper part of the estuary does not seem to be under high chemical pressure, the evaluation of the organochlorinated compound and heavy metal pressure in the downstream estuary (Stoichev *et al.*, 2004; Tabouret *et al.*, submitted a) showed that this part is under higher pressure. The next step could lead to focalize on the *CYP1A1* gene expression level of eels from the strict estuary based on the potential of the real-time PCR in order to support the use of this expression as biomarker in field studies and for a better understanding of the response of eels to a complex environment.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the European Community (IFOP), the IFREMER and the CNRS. The authors are grateful to the National Water and Aquatic Environment Office (ONEMA) and MIGRADOIR for their help in the field logistic and fish sampling. We would like to thank E. Aubry for her help for the analyses and her suggestions that improved the quality of the paper. We would also like to thank the IFREMER and the Aquitaine Region for their financial support of H. Tabouret PhD grant.

CHAPITRE V

Des descripteurs vers l'évaluation de la qualité et de la fréquentation des habitats

1. Introduction

Dans le contexte de déclin de l'anguille européenne (*Anguilla anguilla*) et des programmes visant à la restauration de ses stocks, deux points sont au centre des préoccupations : la libre circulation des migrateurs et la sauvegarde des zones humides, habitats majeurs pour la colonisation et la croissance de l'espèce dans les différents bassins versants colonisés par cette espèce. Afin de mettre en place des plans de gestion raisonnés à l'échelle de l'Europe (Commission Européenne, 2007) pour la restauration de cette ressource, il est nécessaire de mieux comprendre le fonctionnement de l'écosystème, de mieux définir la pression chimique subie par l'espèce au sein des divers habitats fréquentés.

Un écosystème est un complexe dynamique constitué de biotopes et de biocénoses dont la population représente l'unité fonctionnelle (Arnaud et Emig, 1986). Le biotope est l'espace de vie dans lequel il y a une potentialité d'existence d'une biocénose déterminée (Picar, 1985). La biocénose est un groupement d'êtres vivants correspondant par sa composition, par le nombre de ses espèces et des individus à des conditions moyennes de milieu et qui sont liés par une dépendance réciproque et se maintiennent en se reproduisant dans un certain endroit de façon permanente (Möbius, 1877).

Afin de comprendre et prévoir l'évolution des écosystèmes ou d'une population, deux approches peuvent être envisagées. La première vise à étudier les différents éléments du système et les liens qui existent entre ses différents constituants. La seconde est une analyse plus globale considérant un système comme un tout soumis à des contraintes qui le font évoluer vers une direction qui n'est pas forcément prédestinée. Celle-ci représente une adaptation liée aux capacités de résilience de l'écosystème ou de la population considérée.

Dans le cadre de ce travail, c'est la seconde approche qui a été choisie. Elle est cohérente avec celle développée au sein du projet européen INDICANG (<http://www.ifremer.fr/indicang/>) qui propose la définition d'un certain nombre de descripteurs au sein d'un Guide Méthodologique (Adam *et al.*, 2008). Ceux-ci sont définis comme des éléments qualitatifs ou quantitatifs, observés, mesurés ou calculés, participant à la présentation d'un objet, d'un individu, d'un système (<http://www.ifremer.fr/indicang/documentation/pdf/lettre3-fr.pdf>). L'élaboration de ces descripteurs vise à repérer d'éventuels dysfonctionnements dans le déroulement de la phase continentale du cycle de l'espèce, à identifier les stades biologiques et les zones de colonisation concernées. Dans le cas du stade « anguille jaune », ils ciblent essentiellement le comportement des individus (sédentarité, déplacement, relations tailles/habitats) et la nature des milieux colonisés pouvant avoir une influence

sur la dynamique locale de l'espèce (Rigaud *et al.*, 2008 ; Laffaille *et al.*, 2008 ; Feunteun *et al.*, 2008). L'objectif final est d'établir des indicateurs capables de renseigner sur les contextes de colonisation (prélèvements d'eau, barrages, pêches...) et de croissance de la population à l'échelle de chaque bassin versant. Ceux-ci représentent des informations élaborées permettant de traduire de manière synthétique l'état d'un système ou son évolution par rapport à des objectifs précis (Adam *et al.*, 2008). Ils constituent de réels éléments de diagnostic.

De ce fait, nous avons mis au point au sein du GDR Adour¹ et en liaison avec les parties prenantes, des descripteurs de la pression chimique exercée sur le milieu et sur l'espèce qui viennent compléter ceux définis par le Guide Méthodologique d'INDICANG (Adam *et al.*, 2008). Notre approche a pour objectif la définition et la mise en œuvre de marqueurs chimiques et moléculaires de l'exposition aux contaminants, ainsi que de la durée de fréquentation des divers des habitats colonisés par microchimie de l'otolithes. La partie développée ci-dessous tente de rapprocher ces descripteurs des données biologiques individuelles, ceci afin d'établir un premier bilan de la qualité chimique de l'habitat et de son impact sur les individus de cette espèce.

2. Matériel et Méthodes : définition des descripteurs.

On se reportera au chapitre II pour tout ce qui concerne les processus d'échantillonnage des milieux observés et des stocks d'anguilles qui les peuplent. Il convient de considérer que les processus d'échantillonnage ont été plutôt opportunistes et ne peuvent permettre, la plupart du temps, de faire des inférences à l'échelle de la population en place dans les différents milieux considérés.

2.1 Descripteurs de la pression chimique et du comportement de l'anguille:

2.1.1. Descripteurs de la pression chimique dans le milieu et les individus :

La recherche d'altérations chimiques des habitats de l'anguille sur le Bas-Adour utilise le statut de bio-indicateur de cette espèce (chapitre IV) et l'analyse des niveaux de concentrations des métaux lourds (Cd, Pb, Zn, Hg...), organométalliques (cas du MeHg) et des composés organochlorés dans les tissus mous (branchies, foie, muscle) (chapitre IV).

¹ <http://wwz.ifremer.fr/lha/content/download/33309/277941/file/GDRAdourapevalII-1.pdf>

Si ces analyses renseignent sur la pression chimique globale s'exerçant sur l'anguille, elles ne constituent pas des marqueurs directs des effets de cette pression et de la réponse de l'organisme. Par ailleurs, la comparaison des niveaux observés dans les tissus mous par rapport aux normes fixées pour la consommation n'informe pas, pour autant, des effets pouvant apparaître à des échelles d'intégration plus fines comme l'échelle moléculaire. Ainsi, la réponse précoce au stress chimique chez les individus recueillis sur les sites de Termini et de St Laurent de Gosse a été étudiée grâce à un descripteur précoce de l'exposition à des xénobiotiques : l'expression hépatique du gène *CYP1A1* (chapitre IV, partie 3). Ce gène est connu pour être induit par un certain nombre de xénobiotiques comme les HAPs et les PCBs (Stegemann et Hahn, 1994). L'étude de cette expression au niveau transcriptionnel permet de s'affranchir des problèmes d'inhibition des activités enzymatiques (EROD) observés en présence, notamment, de certains ions métalliques divalents comme le cadmium ou encore par les organoétains (Fent et Bucheli, 1995 ; Fent *et al.*, 1998 ; Bozcaarmutlu et Arinç, 2004). Par ailleurs, l'induction du gène *CYP1A1* chez l'anguille européenne (*Anguilla anguilla*) a été démontrée comme étant dépendante du temps d'exposition et de la concentration de l'inducteur (Aubry *et al.* 2007a,b). Enfin, la persistance de l'expression du gène au niveau transcriptionnel permet de déceler un stress chimique plusieurs jours après l'exposition à des inducteurs de *CYP1A1* (Aubry *et al.*, 2007 a,b). L'évaluation de l'expression hépatique du gène *CYP1A1* chez les anguilles jaunes du Termini et de St Laurent de Gosse a pu être effectuée grâce à l'utilisation d'une technique récente et sensible : la RT-PCR en temps réel (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction) (chapitre IV, partie 3).

2.1.2. Descripteur du comportement migratoire :

La lourdeur logistique des suivis par télémétrie des mouvements et de l'utilisation des habitats des poissons a conduit à la recherche et au développement d'outils complémentaires permettant d'obtenir, en continu, à partir des pièces calcifiées, des informations sur une échelle de temps de plusieurs années (Panfili *et al.*, 2001). L'otolithe des poissons a la capacité d'intégrer et de conserver des signatures élémentaires liées aux conditions environnementales que connaît le poisson au cours de sa vie (Elfman *et al.*, 2000 ; Halden *et al.*, 2000 ; Panfili *et al.*, 2001 ; Daverat *et al.*, 2005 ; Shiao *et al.*, 2006 ; Arai *et al.*, 2007). Chez l'anguille européenne (*Anguilla anguilla*), le rapport Sr/Ca a montré son potentiel quant au suivi de l'utilisation des habitats et des mouvements réalisés par l'anguille dans sa zone de croissance (Tzeng *et al.*, 1997 ; Daverat *et al.*, 2006 ; Shiao *et al.*, 2006).

Dans la présente étude, nous avons cherché à définir des descripteurs de l’utilisation des habitats grâce au développement d’une méthodologie permettant l’analyse multi-élémentaire rapide, sensible et précise des otolithes d’anguilles jaunes. Ainsi, le Strontium (Sr) et le Barium (Ba) ont été analysés dans les otolithes d’individus provenant des quatre sites d’étude (Gave de Pau, Termi, St Laurent de Gosse, bas estuaire). Ces analyses ont été réalisées grâce au couplage d’une ablation laser femtoseconde, assurée par une plateforme innovante permettant la réalisation de diverses stratégies de microéchantillonnage de surface (Novalase –Alfamet, France), et d’un spectromètre de masse à plasma induit (Perkin Elmer DRCII, France). La démarche employée pour l’analyse et la validation du Sr et du Ba comme marqueurs des habitats a été précédemment développée dans le chapitre III.

2.2 Taux de croissance en longueur et coefficient de condition

2.2.1. Taux de croissance en longueur

Considérant que la qualité de l’habitat d’une espèce conditionne sa croissance, inversement les performances de croissance de celle-ci, dans son milieu, sont susceptibles de renseigner sur la qualité de l’habitat (Van der Veer *et al.*, 2001 ; Amara, 2003). Chez l’anguille européenne (*Anguilla anguilla*), la très grande majorité des suivis révèle, sur un site donné, une croissance moyenne quasi linéaire sur au moins les 6-7 premières années de vie continentale (Panfili et Ximénès, 1994 ; Rigaud *et al.*, 2008). Une approximation du taux de croissance chez l’anguille peut alors être faite simplement par la formule suivante :

$$G_f = (L_c - L_{civelle}) / t$$

où G_f est le taux de croissance du poisson en cm.an^{-1} , L_c sa longueur (cm) au moment de la capture, $L_{civelle}$ la longueur moyenne des civelles (valeur sur le bassin de l’Adour : $L_{civelle} = 7,66\text{cm}$; De Casamajor *et al.*, 2006), t l’âge continental à la capture estimé en comptant les marques d’arrêt de croissance annuelles après la marque de métamorphose (chapitre II, partie 4.3 – Estimation de l’âge). Le taux de croissance a été estimé sur les anguilles jaunes en fonction des quatre sites d’études (Gave de Pau, Termi, St Laurent de Gosse et estuaire aval) et selon les grands comportements d’utilisation de l’habitat définis grâce aux résultats de microchimie de l’otolithe (chapitre III, partie 2).

2.2.2. Indice de condition et relations allométriques

L'indice de condition de Fulton (1904) est un indice morphométrique simple connu pour être un bon indicateur de l'état de santé de certaines espèces de poissons et un intégrateur des conditions environnementales (Bromley, 1971 ; Lambert et Dutil, 1997). Cet indice est basé sur l'hypothèse que pour une taille donnée, une masse plus importante que la normale, donnée par l'isométrie en la longueur et le poids du poisson, illustre un meilleur statut énergétique et est calculé selon la relation suivante :

$$K = 100 \times W / L_s^3$$

où K est l'indice de Fulton (en g.cm⁻³), W la masse fraîche de l'individu (en g) et L_s la longueur de l'individu en cm. L'indice de condition est variable en fonction de l'état physiologique du poisson au cours de son cycle de vie. Il est notamment plus faible après la reproduction. Dans le cadre de notre étude nous nous intéressons aux anguilles jaunes, l'indice de condition est donc totalement soustrait à l'influence de la reproduction. Cependant, l'indice de Fulton repose sur l'hypothèse d'un coefficient b égal à 3 dans la relation d'allométrie de type $W = a \times L_s^b$. Cette relation de type puissance dont la forme après transformation logarithmique des variables est $\log W = b \log L_s + \log a$ permet selon Teissier (1960) de définir la croissance relative d'un organe par rapport à la croissance corporelle ou celle d'un autre organe. Teissier parle d'isométrie lorsqu'il y a une croissance proportionnelle de l'ensemble des parties du corps, notamment quand le poids varie de façon proportionnelle à la taille. Dans ce cas, le coefficient b est non significativement différent de 3. Cependant, ce facteur b peut varier selon les hydrosystèmes étudiés (Neveu, 1981 ; Mounaix, 1992 ; Melia *et al.*, 2006 ; Svedang, 1999 ; Rigaud *et al.*, 2008). Si b est différent de 3 on parle alors d'allométrie, c'est-à-dire que la croissance en poids n'est plus proportionnelle à la croissance en longueur. S'il est inférieur à 3 on parle d'allométrie minorante. S'il est supérieur à 3 on parle alors d'allométrie majorante. Afin d'étudier les relations allométriques et de valider l'utilisation de l'indice de condition de Fulton, les droites des équations poids-taille ont été définies selon les méthodes proposées par de Casamajor *et al.*, 2000. Elles reposent sur une analyse de variance-covariance après transformation logarithmique des variables (Prouzet, *com.pers.*). La relation d'isométrie est testée en se basant sur l'hypothèse nulle décrivant une croissance en poids proportionnelle à la croissance en taille avec un coefficient b de 3. Pour cela un test de Student est réalisé sur les valeurs b obtenues sur chaque site étudié.

3. Résultats :

3.1. Bilan de la pression chimique sur le bas Adour

Les résultats faisant état de la pression chimique dans les différents sites d'études et chez les anguilles prélevés sur ces sites sont exposés en détail dans le chapitre IV. L'analyse des concentrations en éléments traces métalliques (ETM) et des composés organochlorés dans les tissus mous (muscle, foie, branchies) des anguilles ont montré le caractère anthropisé, mais moyennement contaminé, des habitats étudiés (chapitre IV, partie 1). Toutefois, les anguilles de l'estuaire et du Gave de Pau présentent des concentrations plus importantes que les anguilles prélevées sur les sites d'eau douce illustrant une hétérogénéité spatiale de l'exposition. De même, la pression chimique des composés organochlorés (Polychlorobiphényles PCBs, Polybromodiphénylséthers PBDEs, Pesticides Organochlorés OCPs) et du mercure (Hg), dominé par le méthylmercure (MeHg) dans les muscles des anguilles, est plus prononcée au sein de l'estuaire aval. Seul le Cd ne suit pas cette tendance, avec des concentrations dans les anguilles des sites dulçaquicoles cinq fois plus élevées que celles mesurées chez les individus estuariens (chapitre IV, partie 1).

Si les concentrations observées dans les tissus mous des anguilles jaunes tendent à définir les habitats étudiés comme étant modérément contaminés, ces niveaux, en particulier ceux des composés organochlorés, constituent-ils un stress pour l'anguille ? Les PCBs, PBDEs et certains OCPs sont des inducteurs potentiels de l'expression du gène *CYP1A1*. L'évaluation du taux d'expression hépatique du gène *CYP1A1* au niveau transcriptionnel par RT-PCR en temps réel n'a pas permis de mettre en évidence des changements significatifs de l'expression du gène quel que soit le site (Termi ou SLG) et le mois de prélèvement (chapitre IV, partie 3). Les données suggèrent une exposition faible et homogène aux inducteurs du gène *CYP1A1* sur les sites étudiés. Cependant, les données des concentrations en contaminants organiques et inorganiques provenant de l'analyse des tissus mous supportent une hétérogénéité spatiale de la pression chimique subie par l'anguille dans le bassin de l'Adour.

3.2. Relation poids-taille et étude des allométries

La relation taille-poids pour les individus de chaque site est illustrée par la figure 1. Selon l'étude des paramètres des droites de régression du poids en fonction de la taille (Tableau 1), aucune différence significative des coefficients b par rapport à la valeur théorique 3 n'a été observée, excepté pour les individus prélevés dans le ruisseau du Termi. Ainsi l'isométrie est validée sur les sites du Gave de Pau, St Laurent de Gosse et dans l'estuaire aval. Sur le site de Termi, les résultats suggèrent une allométrie majorante c'est-à-dire que la croissance en poids est plus importante que la croissance en taille. Les individus sur ce site ont un embonpoint plus marqué que dans le cas d'une isométrie. Par ailleurs, la valeur F pour la comparaison entre les pentes est de 2,55 pour 3 et 104 degrés de liberté. Elle est inférieure à la valeur critique ($F_{crit} = 2,72$ au seuil de 5%) indiquant que les coefficients de la droite de régression ne sont pas significativement différents en fonction du site d'étude.

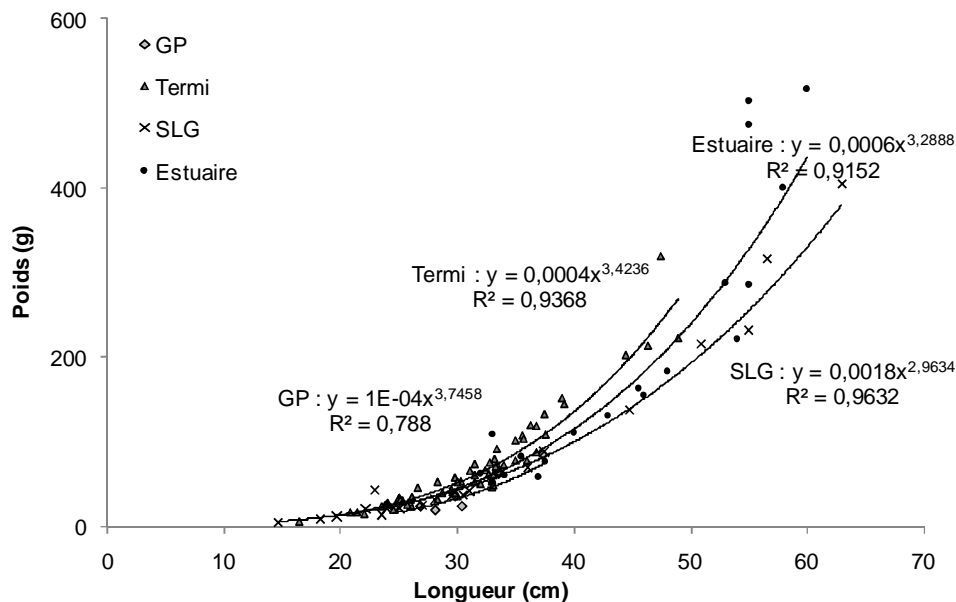


Figure 1. Relation taille-poids observée chez les anguilles jaunes prélevées en eau douce (Termi, St Laurent de Gosse SLG, Gave de Pau GP) et dans l'estuaire aval.

Tableau 1. Paramètres des droites de régression du poids en fonction de la taille après transformation logarithmique des variables.

Site	Nombre de couples	Pentes (b)	Ecart type (b)	Origines de Y en X	r	t student b≠ 3
Gave de Pau	6	3,74	0,971	-4,0211	0,89	0,767
Termi	64	3,42	0,113	-3,357	0,97	3,749
St Laurent de Gosse	22	2,96	0,129	-2,7518	0,98	0,282
Estuaire aval	20	3,28	0,236	-3,209	0,96	1,224

3.3. Indices de condition et contenu lipidique

3.3.1 Variations spatiales

L'isométrie ayant été validée sur trois des quatre sites d'étude et les coefficients de la droite de régression n'étant pas significativement différents en fonction du site, l'indice de condition a été calculé selon la formule de Fulton. Comme illustré par la figure 2, les indices de condition confirment des conditions moins favorables pour les anguilles du Gave de Pau par rapport aux autres sites (Mann-Whitney, $P=0,004$). Les individus provenant de l'estuaire aval présentent un indice de condition statistiquement non différent de celui des anguilles du Gave de Pau (Mann-Whitney, $P=0,017$), inférieur à celui observé sur le site de Termi (Mann-Whitney, $P=0,019$). L'indice de condition suggère par ailleurs des conditions favorables aux anguilles occupant le ruisseau du Termi comparé aux autres sites (Mann-Whitney, $P<0,0001$). Cette observation est renforcée par la valeur du coefficient b dans la relation taille-poids, qui sur le ruisseau du Termi était significativement supérieure à 3, témoignant d'un embonpoint supérieur des anguilles du ruisseau du Termi par rapport aux anguilles des autres sites.

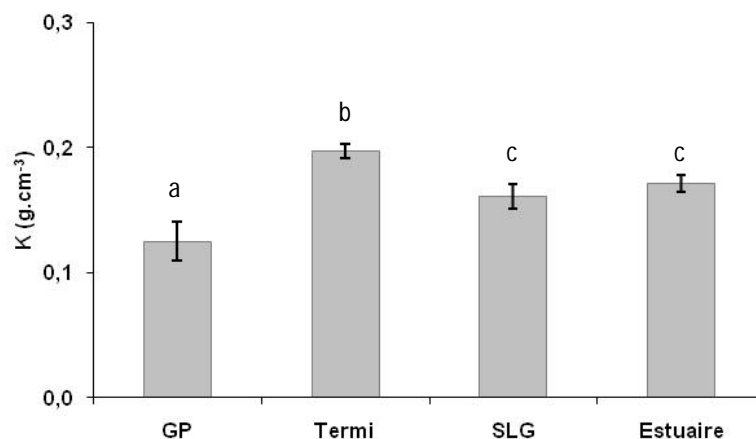


Figure 2 . Indice de condition de Fulton des anguilles jaunes prélevées sur les sites du Gave de Pau (GP ; N=6), du Termi (N=53), de St Laurent de Gosse (N=23) et de l'estuaire aval de l'Adour (N=21).

Parallèlement à l'évaluation des niveaux de composés organochlorés dans le muscle, le contenu lipidique avait été déterminé sur quelques individus du Termi et de l'estuaire. Les résultats préliminaires ont montré que les individus du Termi présentaient un contenu lipidique moyen ($34\pm 20\%$ du poids du muscle ; N=7) plus important que ceux de l'estuaire ($19\pm 6\%$ du poids du muscle ; N=5) malgré une grande variabilité. Ces résultats viennent donc conforter les résultats précédents attestant d'un embonpoint plus important des individus sur le ruisseau du Termi.

3.3.2 Variations temporelles

Les données résultant du suivi temporel des concentrations en ETM pour les anguilles jaunes du ruisseau de Termi ont mis en évidence une variabilité temporelle dans l'accumulation de ces éléments (chapitre IV, partie 1). En effet, une augmentation significative des concentrations a été observée au mois de juillet 2006 comparée au mois d'avril et d'octobre de la même année. Ces niveaux plus élevés d'ETM sont simultanés à une augmentation importante de température dans le ruisseau au mois de juillet, de 10 à 16°C plus élevée que les mois d'octobre et avril. Les indices de condition de Fulton calculés pour chaque campagne et site d'échantillonnage rendent compte également d'une variation marquée des conditions environnementales de l'anguille à l'été 2006 par rapport au reste de l'année et par rapport à l'année 2007 (Fig. 3) sur le site du Termi. L'augmentation des concentrations en ETM dans les tissus mous et la diminution de l'indice de condition ont également été observées sur le site de St Laurent de Gosse entre le mois d'octobre 2005 et le mois de juillet 2006 (Fig. 3). Ces observations sont concomitantes avec une variation de température de l'eau de plus de 12°C entre le mois d'octobre 2005 et le mois de juillet 2006.

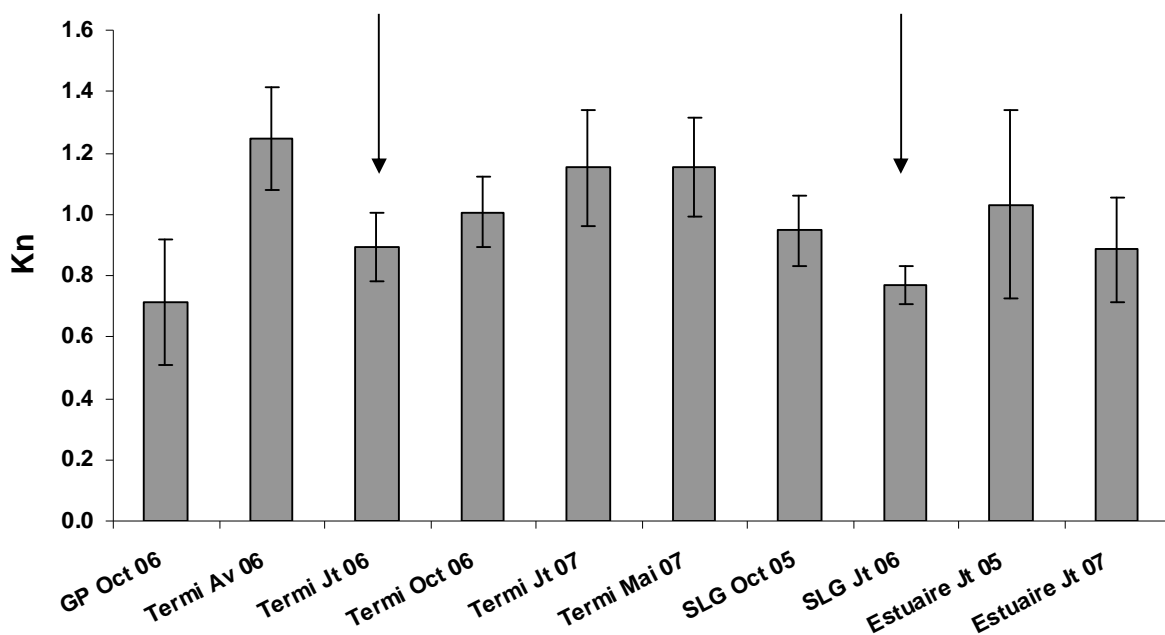


Figure 3. Indice de condition de Fulton (g.cm^{-3}) des anguilles jaunes en fonction des dates et des sites de prélèvement (GP : Gave de Pau ; SLG : St Laurent de Gosse). Les flèches noires indiquent la variation significative observée en juillet 2006 sur Termi et SLG.

3.4. Des usages des habitats aux performances de croissance :

3.4.1 Comportements des anguilles du bas Adour :

L'étude des signatures élémentaires continues en Sr et Ba des otolithes par ablation laser-femto seconde – ICP-MS a permis de mettre en évidence trois types de comportement d'utilisation des habitats d'eau douce et saumâtre. Cette détermination a été possible grâce à la validation de la relation entre les concentrations en Sr et Ba dans l'eau et dans les otolithes. L'utilisation simultanée des deux éléments, aux comportements opposés, s'est montrée un outil simple et efficace pour s'affranchir des biais d'interprétation des signatures élémentaires liées à des modifications aléatoires de la matrice calcaire (présence de vaterite) (chapitre III, partie 2). Sur l'ensemble des anguilles analysées, trois grands comportements d'utilisation des habitats ont été caractérisés :

- **un comportement de résidence en milieu dulçaquicole**, marqué par de forts ratios Ba :Ca et de faibles ratios Sr :Ca sur l'ensemble de la période allant de la métamorphose en civelle jusqu'à la capture de l'individu (Fig. 4a)
- **un comportement de résidence en milieu saumâtre à salin**, marqué par de forts ratios en Sr :Ca et faibles ratios en Ba :Ca sur la totalité de la période de croissance continentale observée (Fig. 4b)
- **un comportement dit « nomade »** caractérisé par un changement important des ratios Sr :Ca et Ba :Ca dans les 2 à 5 ans suivant l'entrée dans l'estuaire. La première période de vie continentale (2 à 5 ans) est marquée par de forts ratios en Ba :Ca et faibles ratios en Sr :Ca similaires à ceux observés dans le cas de la résidence en eau douce. La seconde période est illustrée par de forts ratios en Sr :Ca et faibles ratios Ba :Ca identiques à ceux obtenus pour la résidence en estuaire (Fig. 4c).

La totalité des anguilles prélevées sur les sites d'eau douce (Gave de Pau, Termi et St Laurent de Gosse), dont les âges sont compris entre 4 et 11 ans, présentait des signatures élémentaires correspondant à une résidence en habitat dulçaquicole. Parmi les anguilles pêchées en estuaire (âge variant de 4 à 8 ans), 43% présentaient un profil élémentaire attestant d'un passage d'un habitat dulçaquicole à un habitat de type saumâtre (comportement nomade), tandis que 57% avaient un profil élémentaire suggérant une résidence en estuaire ou à proximité.

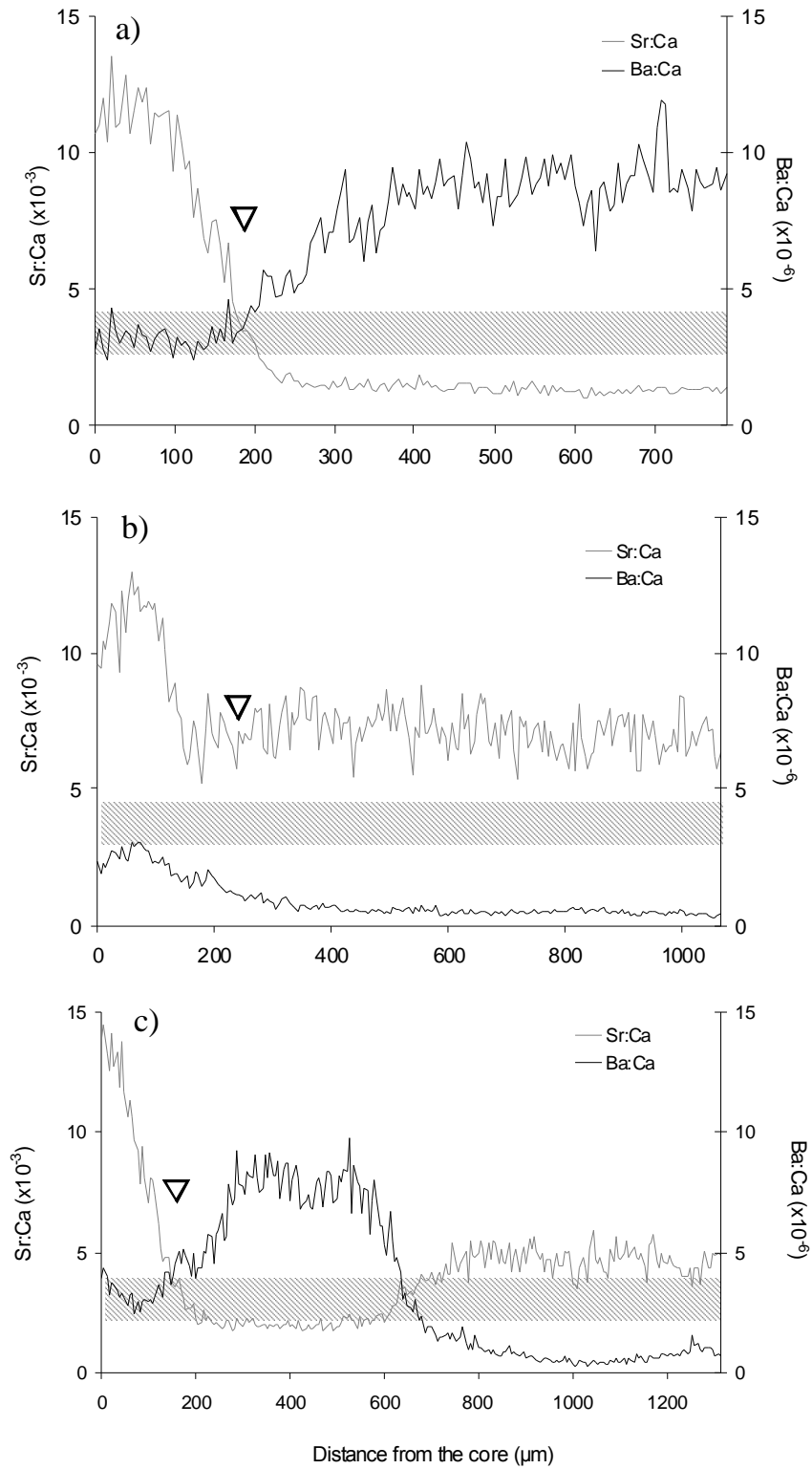


Figure 4. Profils continus illustrant l'évolution conjointe du Sr :Ca et du Ba :Ca dans l'otolithe (a) d'une anguille résidant en eau douce, (b) d'une anguille résidant en milieu estuarien ou côtier, (c) d'une anguille ayant résidé en eau douce avant de rejoindre l'estuaire ou la zone côtière. Le triangle marque le premier annulus.

Cependant, parmi les anguilles classées en résidence estuarienne, deux individus présentaient des variations des concentrations élémentaires. Si ces variations sont inférieures au changement observé pour les nomades, elles n'en sont pas moins significatives, les valeurs de Sr :Ca variant de 5 et 9×10^{-3} avec une cyclicité marquée (Fig. 5). Les variations observées, pour les trois autres profils décrits précédemment, ne montrent pas une telle cyclicité. Bien que le nombre d'individus suivant ce schéma soit très restreint, un quatrième comportement d'utilisation des habitats par l'anguille, correspondant à des mouvements saisonniers, peut être évoqué au niveau de l'estuaire de l'Adour.

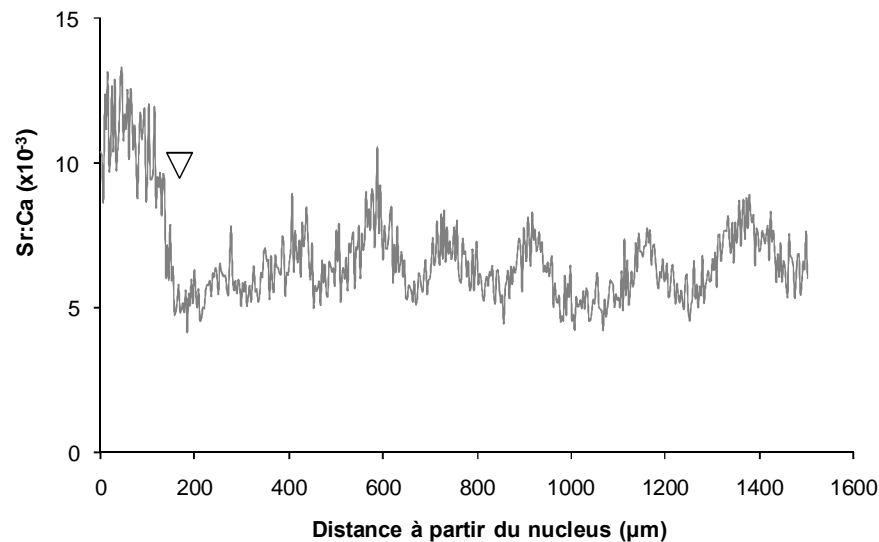


Figure 5. Profil continu illustrant l'évolution du Sr :Ca dans l'otolithe d'une anguille jaune (âge : 7 ans) pêchée dans l'estuaire de l'Adour. Le triangle marque le premier annulus.

3.4.2 Taux de croissance

Nous avons vu auparavant que le Bas Adour présentait des habitats variés (estuaire, Barthes, ruisseaux) colonisés par l'anguille. Pour tenter d'apporter des informations quant à l'intérêt d'utilisation d'un habitat par rapport à un autre, nous nous sommes donc intéressés aux performances de croissance dans chaque habitat et pour chacun des trois comportements majeurs d'utilisation des habitats observés dans cette étude. La figure 6 illustre les résultats obtenus. Le taux de croissance en zone saumâtre est significativement plus important que dans la zone dulçaquicole (Fig. 6a). Cependant, les anguilles nomades ont une croissance identique à celles des résidentes en estuaire (Fig. 6b).

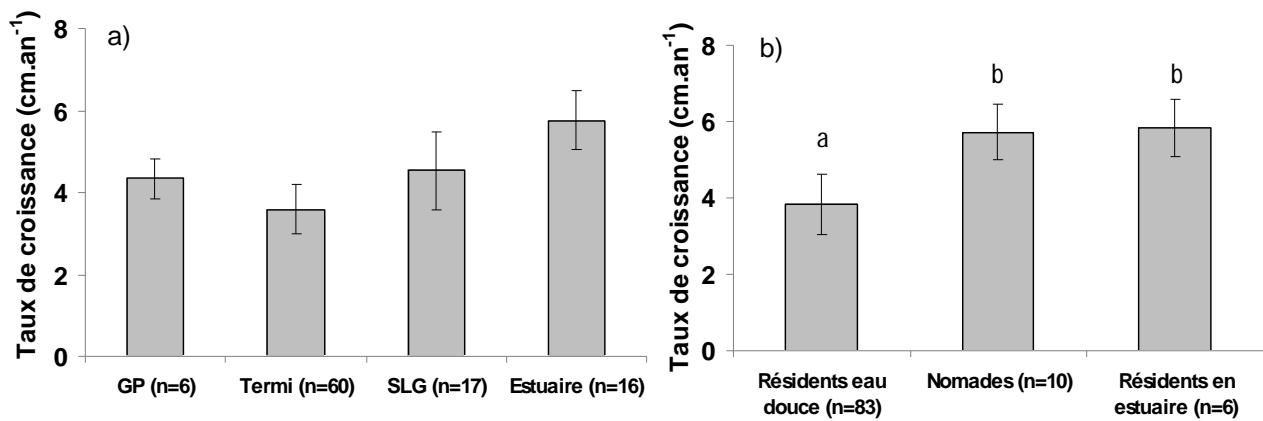


Figure 6. Taux de croissance en longueur moyen (cm.an⁻¹) de l'anguille en fonction des sites d'étude [Gave de Pau (GP), du Termi, St Laurent de Gosse (SLG), bas estuaire] (a), et du comportement d'utilisation des habitats. L'écart type est illustré par la double barre.

4. Discussion : Entre performances de croissance, qualité du milieu et utilisation de l'habitat : quels compromis ?

4.1 Qualité chimique des différents habitats

Les niveaux en ETM observés chez les individus des trois sites sont conformes, aux résultats obtenus sur les sédiments et l'eau (Trut et Mayeur, 2004 ; Stoichev *et al.*, 2004), sur le macrobenthos de l'estuaire de l'Adour (Trut et Mayeur, 2004 ; Monperrus *et al.*, 2005). Ces concentrations sont analogues aux données existantes sur la même espèce dans d'autres systèmes européens moyennement contaminés en France (Cosson, 1979 ; Batty *et al.*, 1996) et dans d'autres pays européens (Linde *et al.*, 1999 ; Usero *et al.*, 2003 ; Bordajandi *et al.*, 2003).

La qualité chimique du site de Termi semble confortée par l'ensemble des résultats obtenus tant sur la pression chimique s'exerçant sur les individus (concentrations des contaminants organiques et inorganiques dans les tissus mous) et leurs réponses au stress chimique (expression du gène *CYP1A1*), que sur les données de recensements piscicoles réalisés par l'ONEMA conjointement aux prélèvements d'anguilles. En effet, les données de ce suivi montrent que le ruisseau du Termi présente toutes les qualités requises et favorables au développement de nombreuses espèces piscicoles. Il

accueille notamment des espèces caractéristiques des eaux salmonicoles comme la truite fario (*Salmo trutta*), le vairon (*Phoxinus phoxinus*), le saumon atlantique (*Salmo salar*), mais encore des espèces d'intérêt écologique comme le goujon (*Gobio gobio*), l'ablette (*Alburnus alburnus*) ou encore la loche franche (*Nemacheilus barbatula*) (Caill-Milly *et al.*, 2008).

Un contenu lipidique plus important et un coefficient de la droite de régression taille-poids significativement supérieur à 3 ont été observés chez les anguilles de Termi par rapport aux autres sites. Cette différence d'embonpoint est probablement liée à la colonisation d'un milieu plus calme, à pression chimique faible dans le cas du ruisseau du Termi permettant de limiter les dépenses d'énergie, en opposition au milieu estuarien qui est un milieu soumis à la marée et à la pression chimique liée à la présence de composés organochlorés en concentrations importantes. En effet, selon les résultats obtenus sur les tissus mous (chimie, biologie moléculaire), le Gave de Pau et l'estuaire sont des environnements à pressions chimiques inorganique et organique plus importantes que sur les autres sites. Les résultats préliminaires font état de niveaux élevés dans l'estuaire (chapitre IV), en particulier pour les PCBs et le MeHg. Néanmoins, bien que la pression chimique soit supérieure dans l'estuaire aval, l'indice de condition est supérieur à celui de St Laurent de Gosse (Mann-Whitney, $P < 0,0001$). Ce résultat permet de supposer que le stress chimique subi par les anguilles au moment de cette étude n'était pas en soit un facteur prépondérant influençant la condition des anguilles jaunes dans la zone d'intérêt.

Chaque descripteur ne peut à lui seul définir la qualité du milieu et la source d'une quelconque altération. En prenant en compte les résultats des concentrations de contaminants dans les tissus mous, la réponse au stress chimique, les indices de condition, les relations allométriques, le contenu lipidique, la diversité spécifique et la stabilité des peuplements en place (Caill-Milly *et al.*, 2008), le ruisseau du Termi s'avère être un milieu de bonne qualité chimique et favorable à la constitution de réserves lipidiques chez l'anguille. Cependant, le croisement des différents paramètres obtenus sur Termi a permis de mettre en évidence une diminution de la qualité des conditions environnementales pendant l'été 2006, probablement plus en relation avec l'augmentation de température qu'avec l'introduction spécifique de contaminants. En effet, l'augmentation des concentrations en ETM dans les tissus mous et la diminution des indices de condition sont conjointes à une augmentation de température de l'eau en juillet 2006 sur le site du Termi, mais également sur le site de St Laurent de Gosse. L'influence de la température sur l'assimilation des métaux par les anguilles est discutée dans le chapitre IV-partie 1. L'augmentation de la température de l'eau induit une augmentation de la ventilation branchiale en réponse à une diminution de la concentration en oxygène dans l'eau (Bennett, 1978).

Une diminution de la concentration en oxygène dans l’eau du ruisseau du Termi en juillet 2006 est supportée par l’absence de salmonidés à cette période (données ONEMA, Caill-Milly, 2008). La diminution de l’indice de condition des anguilles en juillet 2006 pourrait donc être liée à l’augmentation de la température et à l’augmentation de la dépense énergétique allouée une augmentation de la ventilation permettant de pallier à la diminution de la concentration en oxygène dans l’eau.

Les différents habitats de l’anguille étudiés lors de ces travaux de recherche présentent ainsi des caractéristiques différentes de qualité physico-chimique et de pression exercée sur la ressource anguille. Cependant, la description de cette qualité physico-chimique ne suffit pas à conclure sur les qualités de l’habitat en termes d’intérêt pour l’espèce. Trois questions se posent alors :

- **Comment l’espèce utilise t-elle ses différents habitats ?**
- **Quel intérêt cet habitat présente-il pour l’espèce ? Correspond-il à un site de colonisation temporaire ou permanent et pour quels stades biologiques ?**
- **Quelle est l’influence de la qualité chimique des habitats dans le choix de l’habitat ? Quelles conséquences pour la ressource ?**

4.2 Fréquentation des habitats

4.2.1 Plasticité comportementale de l’anguille sur le bassin de l’Adour

Dans notre étude, trois comportements majeurs de fréquentation des habitats ont été illustrés. L’échantillonnage ne visait pas l’ensemble de la population mais cherchait à établir un premier bilan de la fréquentation des habitats du Bas-Adour par l’anguille européenne (*Anguilla anguilla*). Du fait des faibles effectifs analysés, certains comportements plus marginaux ont pu ne pas être bien représentés dans l’analyse. L’observation de deux individus avec des profils atypiques (variations de concentrations en Sr dans l’otolithe tout au long de la vie de l’individu), ainsi que l’observation de comportements marginaux également chez l’anguille européenne dans le bassin de la Gironde (Daverat et Tomas, 2006) supportent cette idée.

Le premier comportement majoritaire décrit dans cette étude a été observé chez les anguilles provenant des habitats dulçaquicoles et correspond à un comportement de résidence. De nombreuses études décrivent le comportement de résidence des anguilles dans un habitat donné, en particulier dulçaquicole, et ce pour différentes espèces (Beumer, 1979 ; Oliveira, 1997 ; Arai *et al.*, 2003). L'étude de Guillouët *et al.* (2000) sur le Frémur a montré ainsi que 95% des individus marqués avaient été recapturés dans un périmètre restreint (100m) autour du point de capture initial. Daverat et Tomas (2006), suite à l'analyse du Sr :Ca dans les otolithes, ont également observé ce comportement pour 97% des individus prélevés en eau douce en Gironde. Nos résultats sont donc en accord avec d'autres systèmes.

Le second comportement observé parmi les individus prélevés dans l'estuaire de l'Adour est également un comportement de résidence, cette fois-ci en milieu saumâtre ou salin. La mise en évidence du comportement de résidence en zones côtière et estuarienne est de plus en plus décrite dans la littérature depuis quelques années que ce soit pour l'anguille européenne *Anguilla anguilla* (Daverat et Tomas, 2006 ; Feunteun *et al.*, 2003) ou d'autres espèces comme l'anguille japonaise *Anguilla japonica* (Tsukamoto et Arai, 2001). Le cas a été particulièrement exposé en mer Baltique (Tzeng *et al.*, 2000).

De même, différentes études viennent conforter l'existence de changements rapides d'habitat au cours de la phase de croissance chez certaines anguilles jaunes comme observé dans le cadre de cette étude. Dans l'étude de Daverat et Tomas (2006), la contribution des individus nomades à l'ensemble des individus collectés dans l'estuaire de la Gironde s'élevait à 41%. La majorité de ces individus (27%) montraient un déplacement des zones amont dulçaquicoles vers les zones aval saumâtres. Seulement 2% des individus estuariens avaient effectués un déplacement de la zone côtière vers la partie amont de l'estuaire et 12% semblaient avoir effectué des mouvements saisonniers. Parmi les individus nomades prélevés dans la partie aval de l'estuaire de l'Adour, excepté les deux individus présentant des mouvements saisonniers, la totalité effectue leur changement du milieu dulçaquicole au milieu estuarien avant l'âge de 5 ans. Cette fenêtre temporelle est la même que celle observée chez l'anguille européenne *Anguilla anguilla* sur le bassin de la Gironde (Daverat et Tomas, 2006), chez l'anguille japonaise *Anguilla japonica* (Tzeng *et al.*, 2002), et chez l'anguille américaine *Anguilla rostrata* (Morrisson *et al.*, 2003).

Les résultats obtenus sur l'analyse des anguilles du bassin de l'Adour confirment la plasticité comportementale observée sur d'autres bassins et systèmes aquatiques européens. L'origine et les mécanismes de ces diverses utilisations des habitats sont encore mal connus. Trois hypothèses sont émises quant à l'origine du comportement nomade. La première serait une origine intrinsèque non encore démontrée mais très probablement liée à la territorialité comme observé chez les salmonidés (Prouzet, 2006). La seconde, supportée par certaines publications (Glova, 1998 ; Baisez 2001 ; Feunteun *et al.*, 2003), suggère un changement d'habitat lié à la taille. Enfin la troisième propose une influence majeure des conditions environnementales, notamment la température, les conditions hydrologiques ou encore les altérations du milieu lié aux activités anthropiques (Parker, 1995 ; Lamothe *et al.*, 2000).

4.2.2 Mécanismes et intérêt de la plasticité comportementale de l'anguille ?

La présence de différents comportements d'utilisation des habitats a déjà été observée chez des espèces anadromes comme les salmonidés avec des sous-populations effectuant des mouvements entre la mer et la zone de reproduction dulçaquicole et des sous-populations résidentes près du site de reproduction (Secor *et al.*, 2001 ; Thierault et Dodson, 2003). Cependant, chez les espèces anadromes les différentes stratégies d'utilisation des habitats sont fortement liées à la reproduction (Limburg *et al.*, 2001). Chez l'anguille, les migrations trans-océaniques liées à la reproduction sont de bien plus grande envergure que les mouvements observés entre les zones dulçaquicoles et les zones estuariennes des bassins hydrographiques. Les stratégies d'utilisation des habitats par l'anguille seraient en revanche liées aux performances de croissance, comme illustré chez les anguilles de la Gironde (Daverat et Tomas, 2006). Par ailleurs, comme chez beaucoup de populations marines et dulçaquicoles, il existe, en plus des zones de reproduction, des zones d'hivernage et des zones d'engraissement (Feunteun *et al.*, 2003). Ces différentes zones occupées au cours de l'année et durant le cycle de vie des individus sont reliées grâce à des migrations trophiques ou génésiques (Prouzet, 2006).

Dans l'étude présentée, la zone d'intérêt peut être découpée en deux compartiments majeurs : la zone estuarienne aval et la zone dulçaquicole regroupant les sites de Termi et du Gave de Pau. Le site de St Laurent de Gosse se situe à la limite de ces deux zones. Chacune de ses zones accueille des anguilles sédentaires suggérant que chaque milieu correspond un préférendum pour certains individus.

- Résidence en zone estuarienne

Les estuaires sont des environnements à fortes densités d'anguilles, mais ils présentent des caractéristiques physico-chimiques variables du fait du cycle de la marée et des variations du régime hydrologique. Dans l'estuaire de l'Adour, l'adaptation à la variation de la salinité et à la réponse à la pression chimique marquée (métaux lourds, composés organochlorés) mise en évidence dans cette étude pourraient engendrer une augmentation des dépenses énergétiques allouées à ces processus (osmorégulation, détoxification) au dépend de la croissance. Ainsi, les indices de condition devraient être moins importants dans cette zone. Hors dans notre étude les indices de condition et le taux de croissance, plus important que dans les zones dulçaquicoles, ne semblent pas être affectés par les qualités chimiques de l'estuaire.

Il est important de noter que chez l'anguille, le taux de croissance est variable en fonction du sexe. Les mâles ont un taux de croissance plus important que les femelles (Holmgren *et al.*, 1997). Par ailleurs, le sexe ratio est différent entre l'aval et l'amont des systèmes fluviaux. En effet, les mâles sont en général principalement retrouvés en estuaire dans la partie aval des bassins versants et dans les marais côtiers tandis que les femelles sont plutôt observées en amont, dans les zones profondes et les zones à faible densité (Rigaud *et al.*, 2008). Ainsi, le sexe pourrait expliquer les différences de taux de croissance observées entre les sites dulçaquicoles et le site estuarien. Néanmoins, le caractère favorable de l'estuaire pour la croissance des espèces piscicoles et notamment l'anguille a déjà été relaté précédemment (Tzeng *et al.*, 2003 ; Daverat et Tomas, 2006). Les estuaires sont connus pour être des zones particulièrement productives (Haedrich et Hall, 1976) et de ce fait plus riches en ressources trophiques que les zones dulçaquicoles (Gross *et al.*, 1988 ; Jonsson et Jonsson, 1993). Par ailleurs, comparés à des environnements comme le ruisseau du Termi dont la température peut varier de façon importante saisonnièrement (Termi : variation de 10°C entre avril et juillet) en particulier du fait de la très faible épaisseur de la colonne d'eau pendant les mois d'été, les estuaires représentent des environnements plus stables thermiquement. Certaines études relatent l'influence de la température sur le rythme d'activité des anguilles jaunes. A des températures inférieures à 12-13°C ou des températures estivales trop élevées souvent accompagnées en milieu naturel par des chutes nocturnes du taux d'oxygène, les anguilles jaunes sont peu actives (Baras *et al.*, 1998 ; Baisez, 2001).

Le caractère saumâtre de l'estuaire aval pourrait également expliquer le taux de croissance des anguilles. Selon Edeline et Elie (2004), la salinité aurait un rôle majeur sur le comportement d'alimentation de l'anguille. Les anguilles en milieu saumâtre ont montré une activité alimentaire plus

importante que les anguilles élevées en eau douce, ce qui pourrait expliquer le taux de croissance supérieur en eau saumâtre (Edeline et Elie, 2004). Cependant, si les estuaires sont des milieux favorables, pourquoi certains individus ont un comportement nomade et d'autres un comportement de résidence en zone dulçaquicole ?

- Résidence en milieu dulçaquicole

Dans notre étude, la totalité des individus prélevés en eau douce (Gave de Pau, Termi, St Laurent de Gosse) était des individus résidents. Nous avons pu mettre en évidence la qualité chimique (métaux lourds, composés organochlorés) des habitats en amont de l'estuaire. De plus, ces milieux semblent constituer des environnements stables d'un point de vue physico-chimique comparé au milieu estuarien malgré des variations de température marquées. D'autre part, si les environnements dulçaquicoles de l'amont sont moins productifs que les estuaires, la densité de population y est moindre. En effet, une diminution de la densité des anguilles de l'aval vers l'amont des systèmes fluviaux a été observée notamment dans le Rhône ou encore l'Arguenon (Côtes d'Armor) (Feunteun *et al.*, 2003). Cette densité importante en estuaire pourrait entraîner des phénomènes de compétition intraspécifique, mais également des comportements de cannibalisme (de Nie, 1987 ; Knights, 1987) engendrant une pression de prédation intraspécifique sur les jeunes anguilles. L'existence de compétition intraspécifique a déjà été décrite chez les salmonidés et serait due à l'acquisition et à la défense d'un territoire pour l'utilisation d'une ressource alimentaire limitée (Gueguen et Prouzet 1994, Prouzet, 2006). Deux statuts sont alors observés : le statut « dominant » correspondant à l'individu possesseur du territoire et de la part principale de nourriture, le statut « dominé » de l'individu ne pouvant prétendre à la ressource alimentaire et contraint à terme de migrer vers un autre habitat vacant ou à densité moindre (Prouzet, 2006). Ainsi, la colonisation des habitats dulçaquicoles pourrait constituer un compromis entre les conditions environnementales et les phénomènes de compétition intraspécifique dans les territoires estuariens à forte densité.

- Comportement nomade

L'estuaire et les zones amont représentent des zones de croissance distinctes pour le stade anguille jaune. Cependant, les zones dulçaquicoles peuvent également être des zones de transition pour l'espèce. En effet, comme illustré par les profils Sr:Ca et Ba :Ca dans les otolithes de 50% des anguilles prélevées dans l'estuaire de l'Adour, certains jeunes individus rejoignent les eaux douces pendant une période de deux à quatre ans avant de repartir vers les estuaires où ils s'installent. La préférence de certains individus pour la résidence en milieu dulçaquicole les premières années de leur phase continentale pourrait également être liée à la densité. Chez les salmonidés de la rivière Greåna (Suède), la majorité des individus migrants provenait d'une zone aval où la densité d'individus juvéniles était importante et le taux de croissance spécifique faible, tandis que les individus ne migraient pas à partir de zones amont où la densité de juvéniles était faible et le taux de croissance spécifique important (Olsson et Greenberg, 2004). La migration opportuniste des jeunes anguilles vers l'amont pourrait ainsi permettre à l'espèce de coloniser des habitats libres ou de faible densité, à taux de mortalité moindre, mais également pour certains individus d'atteindre une taille suffisante au bout de 2-3 ans pour pouvoir retrouver les zones estuariennes plus productives et faire face à la compétition intraspécifique s'y déroulant.

Selon les résultats obtenus dans le cadre de ces recherches, la stratégie nomade ne semble pas avoir d'influence sur le taux de croissance moyen des anguilles par rapport à celui des résidents en estuaire. L'absence de différence de taux de croissance entre individus migrants et résidents prélevés en estuaire a été décrite chez les anguilles de l'estuaire de l'Hudson (Morrisson *et al.*, 2003) et chez les femelles argentées de l'espèce *Anguilla japonica* pour laquelle des tailles identiques avaient été observées quelle que soit la tactique d'utilisation des habitats de l'estuaire (Kotake *et al.* 2005).

Malgré un taux de croissance moyen identique des individus nomades et des individus résidents dans l'estuaire de l'Adour, des études de croissance basées sur le rétrocalcul seraient nécessaires afin de déterminer si cette observation est valable sur l'ensemble de la vie de l'individu ou non et en fonction du sexe. En l'occurrence, le taux de croissance chez l'anguille est variable. Il est notamment plus important chez les jeunes individus (Panfili et Ximénés, 1993). Daverat et Tomas (2006) ont observé des longueurs plus importantes chez les individus nomades par rapport aux individus résidents en estuaire pour des âges inférieurs à 5 ans. Rappelons que l'âge de 4-5 ans correspond à la fenêtre de migration chez les individus nomades (cette étude ; Daverat et Tomas, 2006). Ainsi, les individus nomades effectueraient leur migration au moment où leur taille est supérieure à celle des résidents estuariens de même âge, confirmant le caractère opportuniste de la migration. Cette taille seuil a été

estimée chez l’anguille européenne à 30 cm pour un âge moyen inférieur à trois ans de vie continentale (Daverat et Tomas, 2006). La confirmation d’une telle observation par rétrocalcul sur les anguilles de l’Adour pourrait venir conforter l’hypothèse d’une migration liée à la taille et à la compétition intraspécifique. Les travaux de Lafaille *et al.* (2004) sur les déplacements des anguilles occupant un marais endigué sur la côte atlantique ont montré un changement de comportement alimentaire et exploratoire à partir de la taille de 30 cm. A partir de cette taille seuil, également observée chez *A. australis* (Glova *et al.*, 1998), les anguilles deviennent piscivores et leur comportement exploratoire augmente avec la recherche d’habitats plus profonds. Ces derniers ont été montrés comme étant des sites préférentiels d’alimentation et de repos pour les grandes anguilles (Glova, 1988 ; Baisez, 2001). Le rôle des conditions trophiques du milieu pourrait donc être un facteur prépondérant dans le comportement nomade observé chez les anguilles de l’Adour par rapport à la qualité chimique du milieu.

La résidence des jeunes anguilles jaunes en eau douce souligne l’importance des habitats dulçaquicoles amont comme le ruisseau du Termi, mais également les zones à proximité de la limite de l’influence de la marée dynamique, comme les Barthes, permettant d’offrir aux jeunes individus des zones de résidence transitoire avant de migrer pour certains habitats plus en amont. Cette idée est supportée par l’observation du phénomène de recolonisation du canal de St Laurent de Gosse suite à un curage en avril 2006. En effet, ce canal soumis à des phénomènes d’envasement est régulièrement curé. En juillet 2006, un nombre conséquent d’individus de taille inférieure à 15cm a été observé tandis que les individus de taille supérieure étaient totalement absents. Par la suite peu ou pas d’individus de grande taille ont été observés (données ONEMA). Ce canal, situé dans les Barthes, influencé par la marée saline et les caractéristiques chimiques de l’estuaire, pourrait ainsi servir de zone de transition pour les jeunes anguilles effectuant leur migration de la zone estuarienne vers les zones amont dulçaquicoles. Le canal récemment curé représente un espace vacant libre pour les jeunes individus (<15 cm) qui dans l’estuaire ont un statut de « dominés ». Ces jeunes anguilles ont donc accès à un habitat pas ou peu soumis à la compétition intraspécifique leur permettant d’atteindre, à terme, une taille suffisante pour entamer une étape de diffusion active vers les zones plus amont. Cela montre tout l’intérêt pour l’espèce de ces zones de résidences temporaires comme « plateforme » de départ pour coloniser les zones de l’amont.

5. Conclusion et perspectives

Sur le bassin de l'Adour, la croissance des anguilles semble favorisée au niveau de l'estuaire. Cependant, du fait de cette croissance et de la pression chimique mise en évidence, en particulier pour les PCBs et le mercure, la résidence dans cette zone pourrait représenter un risque pour le succès reproducteur de ces anguilles. Certains de ces composés peuvent porter atteinte à la lipogénèse (Robinet et Feunteun, 2002) et de ce fait, empêcher la constitution des réserves lipidiques nécessaires à la migration et la reproduction (Larsson *et al.*, 1990) ou encore altérer le succès reproducteur et la survie des futures larves (Miller, 1993 ; Johnson *et al.*, 1998 ; Robinet et Feunteun, 2002 ; Paltra *et al.*, 2006).

Le taux lipidique nécessaire à la migration et à la reproduction reste sujet à discussion. Certaines recherches tendent à prouver qu'un taux lipidique de 28% est indispensable pour la réalisation de ces étapes (Belpaire *et al.*, 2008), d'autres l'estiment à 20% (Boëtius et Boëtius, 1980) ou encore 13,5% (Palstra *et al.*, 2007). Mais l'ensemble des travaux semble illustrer une diminution du taux lipidique des populations d'anguilles européennes (Belpaire *et al.*, 2008). La question de l'impact des contaminants sur la constitution des réserves lipidiques chez les anguilles estuariennes est donc un point essentiel à élucider.

Compte tenu des résultats préliminaires faisant état de niveaux élevés dans l'estuaire aval (chapitre IV), un intérêt particulier doit ainsi être apporté aux PCBs tant en termes d'impact potentiel pour les consommateurs (homme, oiseaux, mammifères) que pour les performances des futurs géniteurs (migration transocéanique, succès reproducteur). Les valeurs de Hg total dans les muscles s'approchant des normes fixées pour la consommation humaine et la contribution du MeHg étant majoritaire dans les muscles des individus estuariens (chapitre IV, partie 2), le problème du Hg suggère la mise en place d'une étude plus approfondie des sources de contamination par les PCBs et le mercure ainsi que de la contamination des anguilles.

Certains habitats dulçaquicoles sur le bassin de l'Adour, comme le ruisseau du Termi, semblent être moins favorables à la croissance, par rapport au milieu estuarien. Cependant, du fait de la faible densité de population s'y tenant, de caractéristiques physiques (présence de nombreux abris disponibles : pierres, racines, trous d'eau) et chimique (pression chimique faible) favorables, ces habitats sont des lieux de résidence privilégiés pour l'anguille *Anguilla anguilla*. Par ailleurs, dans ces habitats, la constitution de réserves lipidiques semble favorisée par rapport à la croissance comme

illustrée par l’embonpoint des anguilles du ruisseau de Termi. Ces habitats constituent donc un intérêt majeur si la croissance est suffisante pour assurer les réserves lipidiques nécessaires à la migration transocéanique et à la reproduction.

D’autre part, ces habitats, ainsi que ceux en limite d’influence de la marée comme les Barthes et l’ensemble des annexes hydrauliques de l’estuaire représentent des zones de transition pour des jeunes stades ne pouvant se maintenir dans des environnements, notamment les estuaires, où des comportements agonistiques (défense du territoire, compétition dominant/dominé) prennent place. De tels habitats de transition sont donc des maillons essentiels dans le mécanisme de colonisation active de l’ensemble des habitats, et dans le maintien des populations. Il convient donc de les protéger et de les conserver en vue de restaurer l’espèce.

La plasticité comportementale observée chez les anguilles prélevées sur le bassin de l’Adour, en termes d’utilisation des différents habitats, semble couvrir la large gamme de compromis à disposition de l’espèce entre la qualité chimique du milieu, la capacité d’accueil des habitats, la disponibilité des ressources trophiques ou encore les conditions environnementales (température, salinité, abris, habitats envasés ou non). Cette plasticité comportementale et physiologique de l’anguille lui confèrent une bonne capacité de colonisation de l’ensemble des habitats (eaux douces, saumâtres, salées), pour peu qu’ils soient accessibles, en relation avec les performances de croissance et le maintien de sa population. Afin de mieux comprendre l’évolution de la croissance et le lien avec l’utilisation des habitats au cours de la vie d’un individu, une analyse de la croissance des individus par l’utilisation de la méthode du rétrocalcul à partir des otolithes est à envisager.

CHAPITRE VI

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

RAPPELS DES OBJECTIFS INITIAUX

Les principaux objectifs de cette thèse pluridisciplinaire étaient de :

- mettre en place des descripteurs de la fréquentation des habitats par l'anguille européenne (*Anguilla anguilla*) dans l'estuaire de l'Adour et ses zones humides associées en se basant sur l'analyse multi élémentaire des otolithes par ablation laser femtoseconde couplée à la spectrométrie de masse (fs-LA-ICP-MS)
- caractériser la pression chimique inorganique et organique s'exerçant sur ces mêmes anguilles en s'appuyant sur l'analyse des tissus mous (branchies, muscle, foie)
- évaluer la réponse précoce des anguilles au stress chimique en se basant sur l'évaluation de l'expression au niveau transcriptionnel du gène *CYP1A1* par RT-PCR en temps réel
- relier les différents descripteurs mis en place et utilisés afin d'évaluer la qualité des habitats et de la ressource anguille sur le bas Adour.

BILAN METHODOLOGIQUE ET PERSPECTIVES

➤ Mise en place de descripteurs de l'utilisation des habitats par fs-LA-ICP-MS

Les travaux menés au LCABIE ont abouti à la mise au point du couplage ablation laser femtoseconde-ICP-MS pour l'analyse et la quantification de la composition élémentaire des otolithes en particulier des otolithes d'anguilles jaunes européennes. L'utilisation du prototype de station laser innovante et performante développée au sein du laboratoire (1030nm, Alfamet – Novalase) (Claverie, 2009) a permis de mettre en place et tester quatre stratégies de micro échantillonnage de surface. Ces stratégies d'ablation testées ont permis de mettre en évidence le compromis essentiel entre la sensibilité de l'analyse liée à la quantité de matière ablatée et analysée et la résolution spatiale. Les stratégies complexes «scan 2D» (ablation continu le long de l'otolithe et selon deux axes, 100µm de largeur) et flash (ablation fine de 20µm de large et rapide 250µm.s⁻¹) sont les stratégies permettant d'obtenir les meilleures performances en termes de sensibilité et reproductibilité comparées aux stratégies cratère (cratère de 20µm de diamètre) et « scan 1D » (ablation continue de 20µm de large)

souvent employées. Ces deux premières stratégies (2D scan et flash) permettent d'accéder à la quantification de plusieurs éléments dont le Sr, le Ba, le Mn, le Mg, et le Zn. La stratégie « scan 2D » présente l'avantage de pouvoir réaliser rapidement un profil continu multi-élémentaire. Cependant, les travaux et les échanges scientifiques ayant eu lieu autour de la problématique de l'analyse microchimique des otolithes ont soulevé le problème de la résolution spatiale effective de la méthodologie employée. Le volume de la chambre d'ablation utilisée s'est révélé être un facteur majeur dans l'estimation de cette résolution spatiale. Ainsi, la mise au point d'une chambre d'ablation de faible volume a permis de passer d'une résolution spatiale de 100 μ m avec une chambre classique (volume important) à 40 μ m avec la nouvelle chambre (petit volume). Considérant que 100 μ m correspondent à environ une année de vie chez l'anguille, l'amélioration de la résolution spatiale aboutit à une amélioration de l'interprétation des signatures élémentaires observée en fonction du temps chez cette espèce. Enfin, **l'utilisation de la stratégie « scan 2D » a mis en évidence trois grands types de profils de Sr et de Ba chez l'anguille du bas Adour validant l'utilisation de la méthodologie fs-LA-ICP-MS et de la stratégie « scan 2D » pour la mise en évidence rapide pour un grand nombre d'échantillons des grands traits d'histoire de vie chez cette espèce (chapitre III, partie 1).**

Les profils continus de Sr et Ba obtenus par fs-LA-ICP-MS ont permis de classer l'ensemble des anguilles prélevées en estuaire et sur les sites d'eau douce en trois grands types de variation de la composition élémentaire au cours de la vie des individus :

- 1) un profil comportant de faibles concentrations en Sr et de fortes concentrations en Ba sur l'ensemble de la phase de croissance continentale
- 2) un profil comportant de fortes concentrations en Sr et de faibles concentrations en Ba sur la même période
- 3) un profil comportant un changement drastique des concentrations avec une première période de 2 à 4ans correspondant au premier profil décrit puis un passage au deuxième type de profil décrit.

L'analyse des concentrations, et plus particulièrement des ratios Sr :Ca et Ba :Ca dans l'eau du bas Adour le long du gradient salin, a permis de valider l'utilisation de ces éléments comme marqueur des habitats sur le bassin de l'Adour (chapitre III, partie 2). Les fortes concentrations en Sr et les faibles valeurs de Ba attestant d'un habitat saumâtre à marin, et le comportement inverse de ces deux éléments illustrant un habitat dulçaquicole. La description dans la littérature d'un biais potentiel d'interprétation des profils de Sr lié à la présence de vaterite, un polymorphe du carbonate de calcium présentant des concentrations anormalement faibles de Sr même chez des individus provenant de milieux marins, m'a amené à faire de l'utilisation simultanée du Sr et du Ba un seul et même outil

innovant permettant de s'affranchir de ce genre de problème. **Le comportement antagoniste du Ba et Sr n'étant observé que dans le cas de l'aragonite, un comportement identique des deux éléments à un instant t permet d'identifier rapidement, sur un profil continu, la vaterite et le biais d'interprétation potentiel lié à une telle inclusion dans la matrice otolithique (chapitre III, partie 2).**

Perspectives

D'un point de vue méthodologique, le développement tardif de la petite chambre d'ablation et la nécessité de produire rapidement des résultats en réponse aux programmes GDR Adour et au projet Zones Humides, m'a conduit à utiliser la grande chambre d'ablation. De ce fait, la résolution temporelle des profils élémentaires était d'environ 100µm soit une échelle annuelle disponible pour l'interprétation des résultats. L'utilisation de la petite chambre d'ablation au sein du laboratoire pour des projets en cours (MNHN, Cemagref, INRA) et futurs représente une amélioration de taille et est largement conseillée pour la mise en évidence d'événements sur une plus courte échelle de temps. Trois types de profils (Sr, Ba) ont été mis en évidence sur l'ensemble des individus prélevés. Cependant, compte tenu des résultats observés par Daverat (2005) sur l'estuaire de la Gironde, et compte tenu des faibles effectifs prélevés en estuaire, il est possible d'imaginer que d'autres profils plus marginaux puissent être découverts dans des études futures. L'observation de profils montrant des variations régulières des ratios Sr :Ca tout au long de la vie de l'individu chez deux individus de l'estuaire conforte cette idée. Par ailleurs, un échantillonnage plus en amont du système, sur l'Adour, les Gaves de Pau et d'Oloron pourraient permettre d'identifier des habitats avec des signatures élémentaires distinctes et pouvant aboutir à la mise en évidence de mouvements au sein même de l'environnement dulçaquicole.

➤ **Evaluation de la réponse moléculaire au stress chimique**

Si l'utilisation de l'expression hépatique du gène *CYP1A1* au niveau transcriptionnel comme marqueur du stress chimique a été validée chez l'anguille européenne en conditions contrôlées (Aubry *et al.*, 2007 a et b), elle n'avait encore jamais été testée directement sur les anguilles soumises à la pression chimique du milieu naturel. **Le protocole décrit par Aubry *et al.* (2007 a et b) a donc été adapté et utilisé pour la première fois sur des échantillons de foie provenant des anguilles des sites dulçaquicoles choisis pour ces travaux de thèse (chapitre 4, partie 3).**

Perspectives

La limite de la méthodologie employée résulte essentiellement dans l'absence d'individu « contrôle » à savoir un individu n'ayant subi aucun stress chimique. Les données obtenues sont relatives et non comparables avec des individus provenant d'autres environnements naturels. Dans les investigations futures, des individus élevés en aquarium sans stress chimique pourront être utilisés comme individus « contrôle ».

APPORTS SUR L'ÉCOLOGIE DE L'ANGUILLE DE L'ADOUR ET PERSPECTIVES➤ **Différents comportement d'utilisation des habitats décrits par le couple Sr-Ba**

Basé sur l'utilisation et la validation de ce nouvel outil, les trois grands types de profils élémentaires observés ont pu être reliés à trois grands comportements d'utilisation des habitats par l'anguille :

- 1) le premier profil décrit ci-dessus correspond à une résidence des individus en milieu dulçaquicole
- 2) le deuxième profil décrit correspond à une résidence des anguilles en milieu saumâtre ou marin
- 3) le troisième profil décrit un comportement nomade avec un changement unique d'un habitat dulçaquicole vers un habitat saumâtre ou marin vers la 3^e ou 4^e année de vie continentale.

La totalité des individus prélevés en eau douce se sont révélés être des résidents. Environ la moitié des individus de l'estuaire présentait un comportement de résidence, l'autre moitié montrant un comportement nomade illustré en grande majorité par un seul mouvement des eaux douces vers les eaux saumâtres se déroulant vers l'âge de trois ans (chapitre 3, partie 2). **L'observation de cette mosaïque de comportements illustre la plasticité comportementale des anguilles du bassin de l'Adour et leurs capacités à coloniser l'ensemble des habitats dulçaquicoles et saumâtres.**

Perspectives

L'utilisation future du modèle mathématique développé par Fablet *et al.* (2007), basé sur les profils élémentaires du Sr (Fablet *et al.*, 2006) et plus récemment sur le couple Sr-Ba (Daverat, *comm. pers.*), devrait permettre d'affiner voire de discriminer d'autres comportements migratoires comme se fût le cas chez les anguilles de la Gironde (Fablet *et al.*, 2007).

➤ **Evaluation de la pression chimique s'exerçant sur l'anguille et réponse moléculaire**

L'analyse des contaminants dans les tissus mous est une méthode classique largement employée pour l'évaluation de la pression chimique exercée sur les organismes aquatiques. Dans cette étude, le potentiel de l'anguille comme bon bioindicateur des conditions environnementales a été utilisé pour mettre en évidence la qualité chimique des différents habitats (chapitre 4, partie 1). **En outre, les analyses ont montré une contamination modérée de l'ensemble du système avec une qualité chimique décroissante de l'amont vers l'aval à l'exception de l'Hg et des PCBs.** Une source locale dont l'influence géographique n'est pas quantifiable avec nos données peut être supposée. La concentration seule d'un élément ne suffit pas à traduire le risque toxique de cet élément, la toxicité dépendant aussi de la forme physico-chimique de l'élément. Compte tenu de la capacité des anguilles à accumuler les contaminants lipophiles et des données existantes sur le Hg dans l'estuaire (Stoichev *et al.*, 2004 ; Monperrus *et al.*, 2005), mais des rares données existantes sur l'anguille, la bioconcentration et la spéciation du mercure a été évaluée. **Les résultats ont montré notamment une contribution majoritaire du MeHg, forme la plus toxique du Hg, dans les échantillons, avec une pression plus marquée dans l'estuaire que dans les Barthes (chapitre 4, partie 2).**

Les résultats préliminaires relatifs à la réponse précoce des anguilles au stress chimique ont également montré que les sites dulçaquicoles étudiés subissent une pression chimique faible. **En effet, l'évaluation de l'expression du gène *CYP1A1* n'a pas permis de mettre en évidence une réponse significative pouvant traduire l'exposition marquée des anguilles aux inducteurs du gène (chapitre III, partie 3).**

Perspectives

Compte tenu des concentrations importantes en PCBs et en MeHg chez les anguilles de l'estuaire, de la capacité des anguilles à accumuler ces polluants et des effets potentiels sur le succès reproducteur des anguilles et sur les consommateurs (oiseaux, mammifères, hommes), un intérêt particulier doit être apporté à cette pression chimique. Peu d'individus provenant de l'estuaire ont pu être analysés en termes de composés organochlorés, une campagne d'échantillonnage plus importante est à envisager pour confirmer ou infirmer ce risque chimique. Il serait également intéressant de coupler ces analyses chimiques des individus de l'estuaire avec une analyse de l'expression du gène *CYP1A1* au niveau transcriptionnel, en prenant garde à réaliser un échantillonnage n'induisant pas de stress et donc de biais dans l'interprétation des résultats.

Enfin, compte tenu du contexte de déclin de l'espèce, les recherches futures devraient se tourner vers la validation de l'utilisation de l'expression du gène *CYP1A1* dans des tissus dont le prélèvement ne serait pas létal pour l'individu (morceau de nageoire par exemple).

➤ **Confrontation des descripteurs : apport de l'approche systémique**

La confrontation des différents descripteurs développés, adaptés et utilisés a permis de mettre en évidence la complexité des interactions existant entre la ressource anguille, l'utilisation des habitats, les performances de croissance et la qualité des habitats colonisés sur le bassin de l'Adour (chapitre V). L'augmentation des descripteurs utilisés permet d'accéder à une meilleure compréhension de la place de l'anguille dans l'écosystème, des impacts possibles des différents paramètres environnementaux sur ses capacités d'adaptation, ses performances de croissance et son futur succès reproducteur et une estimation des habitats d'intérêt. **En réalité, dans cette étude nous avons pu suggérer que la plasticité comportementale des anguilles permettait à chaque groupe (migrant, résident) de réaliser un compromis entre ses performances de croissance et la qualité de l'habitat, ce compromis semblant beaucoup plus lié à la capacité d'accueil des habitats, à la stabilité des conditions environnementales, et des ressources trophiques, qu'à la pression chimique.**

Perspectives

Il apparaît important de surveiller et de trouver des moyens de réduire la pression chimique exercée dans les habitats colonisés où les anguilles ont une croissance importante comme l'estuaire. Il est également essentiel de veiller à l'accessibilité des zones amont accueillant les individus de grandes tailles et, d'après les résultats préliminaires évoqués, présentant des contenus lipidiques plus importants que ceux de l'estuaire malgré une croissance moindre. Les futures études sur le bassin de l'Adour devraient par ailleurs s'attacher à confirmer ou infirmer cette différence de contenu lipidique. Ces mesures visent à améliorer la qualité de la ressource, son succès reproducteur et la survie des futures larves. Enfin, si la qualité chimique des habitats est un facteur important à prendre en compte, l'influence d'autres paramètres comme le parasitisme par *Anguillicola crassus* et son impact sur la croissance, le comportement d'utilisation des habitats et la sensibilité des anguilles aux polluants est un sujet à développer plus amplement.

CHAPITRE VII

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

-A-

- Aas, A., Beyer, J., Goksoyr, A., 2000.** Fixed fluorescence (FF) of bile as a monitoring tool for polyaromatic hydrocarbon exposure in fish: an evaluation of compound specificity inner filter effect and signal interpretation. *Biomarkers* 5: 9-23.
- Adam, G., Feunteun, E., Prouzet, P., Rigaud, C., 2008.** L'anguille européenne – Indicateurs d'abondance et de colonisation. QUAE Ed. 400p.
- Agradi E., Baga R., Cillo F., Ceradini S., Heltai D., 2000.** Environmental contaminants and biochemical response in eel exposed to Po river water. *Chemosphere* 41: 1555-1562.
- Alibert, C., Kinsley, L., Fallon, S.J., McCulloch, M.T., Berkelmans, R., McAllister, F., 2003.** Source of trace element variability in Great Barrier Reef corals affected by the Burdekin flood plumes. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 67: 231-246.
- Alzieu, 1989.** L'étain et les organoétains en milieu marin. *Biogéochimie et écotoxicologie. Rapports scientifiques et techniques de l'Ifremer*, 17, 93p.
- Amara R., Paul C., 2003.** Seasonal patterns in the fish and epibenthic crustaceans community of an intertidal zone with particular reference to the population dynamics of plaice and brown shrimp. *Estuarine, Coastal and Shelf Sciences* 56: 807-818.
- Amiard, J.C., Amiard-Triquet, C., Metayer, C., 1982.** Distribution de quelques métaux (Cd, Pb, Cu, Zn) chez les organismes vivants de l'estuaire de la Loire et des zones côtières adjacentes. *Bulletin de la Société des Sciences Naturelles de l'Ouest de la France* 4: 153-168.
- Amiard-Triquet C., Amiard J.C., Andersen A.C., Elie P., Metayer C., 1987.** The eel (*Anguilla anguilla*) as a bioindicator of metal pollution: factor limiting its use. *Water Science and Technology* 19: 1229-1232.
- Anonyme, 2002.** Report of the ICES/EIFAC Working Group on Eels. ICES C.M. 2002/ACFM:03.
- Aoki, J., Ikatura, T., Kato, H., Sato, H., 1999.** Isolation and sequence analysis of the eel cytochrome P450 CYP1A1 gene. *Marine Biotechnology* 1: 371-375.
- Aoyama, J., Nishida, M, Tsukamoto, K., 2001.** Molecular phylogeny and evolution of the freshwater eel, genus *Anguilla*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 20:450-459.
- Aprahamian, M.W., 1988.** Age, structure of the eel population (*Anguilla anguilla*) in the rivers Severn (England) and Dee (Wales). *Aquaculture and Fisheries Management*. 19: 365-376.
- Arai, T., Otake, T., Jellyman, D.J., Tsukamoto, K., 1999.** Differences in the early life history of the Australasian shortfinned eel *Anguilla australis* from Australia and New Zealand, as revealed by otolith microstructure and microchemistry. *Marine Biology* 135: 381-389.

- Arai, T., Otake, T., Tsukamoto, K., 2000.** Timing of metamorphosis and larval segregation of the Atlantic eels *Anguilla rostrata* and *Anguilla anguilla* as revealed by otolith microstructure and microchemistry. *Marine Biology* 137: 39-45.
- Arai, T., Kotake, A., Lokman, P.K., Tsukamoto, K., 2003.** Migratory history and habitat use by New Zealand freshwater eels *Anguilla dieffenbachii* and *A. australis*, as revealed by otolith microchemistry. *Ichthyological Research* 50(2): 190-194.
- Arai, T., Kotake, A., Miller, M.J., Tsukamoto, K., Miyazaki, N., 2003.** Occurrence of sea eels of *Anguilla japonica* along the Sanriku Coast of Japan. *Ichthyological Research* 50: 78-81.
- Arai, T., Kotake, A., Lokman, P. M., Miller, M. J. and Tsukamoto, K., 2004.** Evidence of different habitat use by New Zealand freshwater eels *Anguilla australis* and *A. dieffenbachii*, as revealed by otolith microchemistry. *Marine Ecology Progress Series* 266: 213-225.
- Arai, T., and Hirata, T., 2006.** Differences in the trace element deposition in otoliths between marine- and freshwater-resident Japanese eels, *Anguilla japonica*, as determined by laser ablation ICPMS. *Environmental Biology of Fishes* 75: 173-182.
- Arai, T., Hirata, T. and Takagi, Y., 2007.** Application of laser ablation ICPMS to trace the environmental history of chum salmon *Oncorhynchus keta*. *Marine Environmental Research* 63(1): 55-66.
- Arleny, I., Tabouret, H., Rodriguez-Gonzales, P., Bareille, G., Donard, O. F. X., Amouroux, D., 2007.** Methylmercury bioconcentration in muscle tissue of the European eel (*Anguilla anguilla*) from the Adour estuary (Bay of Biscay, France). *Marine Pollution Bulletin* 54(7): 1031-1036.
- Armynot du Châtelet, E., Debenay, J.P., Soulard, R., 2004.** Foraminiferal proxies for pollution monitoring in moderately polluted harbors. *Environmental Pollution* 127: 27-40.
- Arnaud, P.M., Emig, C.C., 1986.** La population unite fonctionnelle de la biocénose. Actes du Colloque Biologie des Populations, Lyon 4-6 septembre 1986, 69-72.
- Arslan Z. and Secor D.H., 2005.** Analysis of Trace Transition Elements and Heavy Metals in Fish Otoliths as Tracers of Habitat Use by American Eels in the Hudson Estuary. *Estuaries* 28(3): 382-393.
- ATSDR, 2000.** Toxicological Profiles for Polychlorinated Biphenyls (Update). Agency for Toxic Substances and Disease Registry, US Public Health Service, Atlanta, GA, USA.
- Aubry, E. 2006.** Etude de l'expression du gène CYP1A1 et d'un gène ABC chez l'anguille européenne *Anguilla anguilla* en conditions expérimentales. Thèse de l'Université de Pau et des Pays de l'Adour, spécialité sciences de la vie, 125p.
- Aubry, E., Cagnon, C., Lalanne, Y., Mouchès, C., 2007 (a).** Assessment of young yellow European eel *Anguilla anguilla* L. exposure to a CYP1A1 inducer by the quantification of increase in hepatic CYP1A1 mRNA using real-time RT-PCR. *Journal of Fish Biology* 71: 1-8.

- Aubry, E., Cagnon, C., Lalanne, Y., Mouchès, C., 2007 (b).** Quantification of increase in hepatic CYP1A1 mRNA by real-time RT-PCR after exposure of the European eel (*Anguilla anguilla*) to a diesel oil water soluble fraction. *Environmental Bioindicators* 2: 47-51.
- Avenant-Oldewage, A., and Marx, H.M., 2000.** Bioaccumulation of chromium, copper and iron in the organs and tissues of *Clarias gariepinus* in the Olifants River, Kruger National Park Water SA 26(4): 569-582.

-B-

- Bagenal, T.B., 1974.** The Ageing of Fish. Old Working, UK: Unwin Brothers Ltd, 234p.
- Baisez, A., Rigaud, C., Feunteun, E., 2000.** Hétérogénéité de répartition de l'anguille européenne (*Anguilla anguilla*) observée par pêche électrique dans un marais endigué de la côte atlantique française (marais breton). *Cybiurn* 24(3) suppl.: 23-32.
- Baisez, A., 2001.** Optimisation des suivis des indices d'abondances et des structures de taille de l'anguille européenne (*Anguilla Anguilla* L.) dans un marais endigué de la côte Atlantique : relations espèce – habitat. Thèse de Doctorat en Ecologie Aquatique, Université de Toulouse III, 396p.
- Ballihaut, G., Claverie, F., Pécheyran, C., Mounicou, S., Grimaud, R., Lobinski, R., 2007.** Sensitive detection of selenoproteins in gel electrophoresis by high repetition rate femtosecond laser ablation-inductively coupled plasma mass spectrometry. *Analytical Chemistry* 79(17): 6874-6880.
- Baras, E., Jeandrain, D., Serouge, B., Philippart, J.C., 1998.** Seasonal variations in time and space utilization by radio-tagged yellow eels (*A. Anguilla*) in a small stream. *Hydrobiologia* 371/372: 187-198.
- Barats, A., 2006.** Micro analyse quantitative des éléments traces dans la calcite de la coquille Saint Jacques (*Pecten maximus*) par Ablation Laser ICP-MS : une archive journalière de la biogéochimie des environnements côtiers tempérés. Thèse de l'Université de Pau et des Pays de l'Adour, spécialité environnement et matériaux, soutenue le 28 novembre 2006 à Pau, 301p.
- Barats, A., Pécheyran, C., Amouroux, D., Dubascoux, S., Chauvaud, L. and Donard, O. F. X., 2007.** Matrix-matched quantitative analysis of trace-elements in calcium carbonate shells by laser-ablation ICP-MS: Application to the determination of daily scale profiles in scallop shell (*Pecten maximus*). *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 387(3): 1131-1140.
- Barats, A., Amouroux, D., Chauvaud, L., Pécheyran, C., Lorrain, A., Thébaud J., Church, T., Donard, O.F.X., 2008.** High frequency Barium profiles in shells of the Great Scallop *Pecten*

- maximus*: a methodical long-term and multi-site survey in Western Europe. *Biogeosciences Discuss.* 5: 1-34.
- Bareille G., Amouroux D., Lespes G., Potin-Gautier M. and Donard OFX, 2005.** Rivières pyrénéennes du piémont atlantique : de l'érosion des sols à la pollution chimique et microbienne : caractérisation de la contamination et du fonctionnement de l'estuaire de l'Adour. ECOBAG Programme de recherche - Cahier technique n°1/4 – Agence de l'Eau Adour-Garonne, 11-18.
- Bareille, G., Point, D., Amouroux, D., Monperrus, M., Etcheber, H., Donard, O.F.X., 2006.** Geochemistry of trace metals of bed and suspended sediments from the urban Adour estuary. International Symposium on Oceanography of the Bay of Biscay, April 19-21 2006, Vigo-Spain 1-4.
- Bath, G. E., Thorrold, S. R., Jones, C. M., Campana, S. E., McLaren, J. W. and Lam, J. W. H., 2000.** Strontium and barium uptake in aragonitic otoliths of marine fish. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 64(10): 1705-1714.
- Batty, J., Pain, D., Caurant, F., 1996.** Metal Concentrations in Eels *Anguilla anguilla* from the Camargue Region of France. *Biological Conservation* 76: 17-23.
- Béguinet, B., Regnacq, P., 2005.** Atlas de l'Eau du Bassin de l'Adour. Observatoire de l'Eau et des Pays de l'Adour, 207p.
- Bellamy, W.T., 1996.** P-glycoproteins and multidrug resistance. *Pharmacology and Toxicology* 36: 161-183.
- Belloto, V. R., Miekeley, N., 2000.** Improvements in calibration procedures for the quantitative determination of trace elements in carbonate material (mussel shells) by laser ablation ICP-MS. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 367: 635-640.
- Belpaire, C., and Goemans, G., 2007.** The European eel *Anguilla anguilla*, a rapporteur of the chemical status for the Water Framework Directive? *Life and Environment* 57(4): 235-252.
- Belpaire, C.G.J., Goemans, G., Geeraerts, C., Quataert, P., Parmentier, K., Hagel, P., De Boer, J., 2008.** Decreasing eel stocks: survival of the fattest? *Ecology of Freshwater Fish* 2:115-143.
- Bennett, A. F., 1978.** Activity metabolism of the lower invertebrates. *Annual Review of Physiology* 400: 447-469.
- Berg, R., 1985.** Age determination of eels, *Anguilla anguilla* (L.): comparison of field data with otolith ring patterns. *Journal of Fish Biology* 26: 537-554.
- Bergenius M.A.J., Mapstone B.D., Begg G.A., Murchie C.D., 2005.** The use of otolith chemistry to determine stock structure of three epinepheline serranid coral reef fishes on the Great Barrier Reef, Australia. *Fisheries Research* 72: 253-270.

- Bergersen, R., Klemetsen, A., 1988.** Freshwater eel *Anguilla anguilla* (L.) from the North Norway with emphasis on occurrence, food, age and downstream migration. *Nordic Journal Freshwater Research* 64: 54-66.
- Bertin, L., 1951.** Les anguilles. Variation, croissance, euryhalinité, toxicité, hermaphrodisme, juvénile et sexualité, migrations, métamorphoses. Payot, Paris, 188p.
- Beumer, J.P., 1979.** Feeding and movement of *Anguilla australis* and *A. reinhardtii* in Macleods Morass, Victoria, Australia. *Journal Fish Biology* 14:573-592.
- Bian, Q., Garcia, C.C., Koch, J., Niemax, K., 2006.** Non-matrix matched calibration of major and minor concentrations of Zn and Cu in brass, aluminium and silicate glass using NIR femtosecond laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 21: 181-191.
- Bird, D.J., Rotchell, J.M., Hesp, S.A., Newton, L.C., Hall, N.G., Potter, I.C., 2008.** To what extent are hepatic concentrations of heavy metal in *Anguilla anguilla* at a site in a contaminated estuary related to body size and age and reflected in the metallothionein concentrations? *Environmental Pollution* 151: 641-651.
- Bjerregaard, P., Johansen, P., Mulvad, G., Pedersen, H.S., Hansen, J.C., 2004.** Lead sources in human diet in Greenland. *Environmental Health Perspectives* 112: 1496-1498.
- Bleiner, D. and Günther, D., 2001.** Theoretical description and experimental observation of aerosol transport processes in laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 16, 449-456.
- Boëtius, I., and Boëtius, J., 1980.** Experimental maturation of female silver eels, *Anguilla anguilla*, estimates of fecundity and energy reserves for migration and spawning. *Dana* 1:1-28.
- Bolger, T., and Connolly, P.L., 1989.** The selection of suitable indices for the measurement and analysis of fish condition. *Journal of Fish Biology* 34:171-182.
- Bonacci, S., Corsi, I., Chiea, R., Regoli, F., Focardi, S., 2003.** Induction of EROD activity in European eel (*Anguilla anguilla*) experimentally exposed to benzo[a]pyrene and 1-naphtoflavone. *Environment International* 29: 467-473.
- Bordajandi, L.R., Gómez, G., Fernández, M.A., Abad, E., Rivera, J., González, M.J., 2003.** Study on PCBs, PCDD/Fs, organochlorine pesticides, heavy metals and arsenic content in freshwater fish species from the River Turia (Spain). *Chemosphere* 53: 163-171.
- Boudou, A., and Ribeyre, F., 1989 (a).** Fish as « Biological Model » for experimental studies in ecotoxicology. *In Aquatic Ecotoxicology: Fundamental concepts and Methodologies* volume II. Boudou A., Ribeyre F. Eds. (1989), CRC Press, 314 p.

- Boudou, A., and Ribeyre, F., 1989 (b).** Interactive Ecotoxicological Models: Trophic Chains and Experimental Ecosystems: Study of Bioaccumulation. *In Aquatic Ecotoxicology : Fundamental concepts and Methodologies* volume II. Boudou A., Ribeyre F. Eds. (1989), CRC Press, 314 p.
- Boutier B., Chiffolleau, J.F., Auger, D., Truquet, I., 1993.** Influence of the Loire River on dissolved lead and cadmium concentrations in coastal waters of Brittany. *Estuarine Coastal Shelf Sciences* 36:133-145.
- Bouvet, J.-C., Prouzet, P., Bru, N., 2006.** Quantification de la biomasse saisonnière de civelles (*Anguilla anguilla*) dans l'estuaire de l'Adour et estimation du taux d'exploitation saisonnier de la pêche professionnelle au tamis poussé. Rapport IFREMER-UPPA-ADERA- document INDICANG, 39p. Disponible sur <http://www.ifremer.fr/indicang>
- Bowen li, C. A., Bronte, C. R., Argyle, R. L., Adams, J. V. and Johnson, J. E., 1999.** Vateritic sagitta in wild and stocked lake trout: Applicability to stock origin. *Transactions of the American Fisheries Society* 128(5): 929-938.
- Bozcaarmutlu, A., and Arinc, E., 2004.** Inhibitory effects of divalent metal ions on liver microsomal 7-ethoxyresorufin O-deethylase (EROD) activity of leaping mullet. *Marine Environmental Research* 58(2-5): 521-524.
- Bromley, P.J., 1971.** Relationships between the wet weight condition factor and nitrogen energy content in the common sole (*Solea solea*, L.). *Journal du Conseil International pour l'Exploration de la Mer* 34: 131-135.
- Brophy, D., Jeffries, T.E., Danilowicz, B.S., 2004.** Elevated manganese concentrations at the cores of clupeid otoliths: an environmental, physiological or structural signal? *Marine Biology* 144(4): 779-786.
- Brown, J., Colling, A., Park, D., Phillips, J., Rothery, D., Wright, J., 1989.** Seawater: its composition, properties and behavior. Prepared by and Open Univesrity Course Team. Gerry Bearman (Ed.), Pergamon press, 165p.
- Brown, R. and Severin, K. P., 1999.** Elemental distribution within polymorphic inconnu (*Stenodus leucichthys*) otoliths is affected by crystal structure. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 56(10): 1898-1903.
- Brunet, R.C., and Astin, K.B., 1999.** Spatio-temporal variation in some physical and chemical parameters over a 25-year period in the catchment of the River Adour. *Journal of Hydrology* 220(3-4): 209-221.
- Brunet, R.C., and Astin, K.B., 2000.** A 12-month sediment and nutrient budget in a floodplain reach of the River Adour, Southwest France. *Regulated Rivers: Research and Management*. 16: 267-277.

- Bruslé, J., 1990.** Effects of heavy metals on eels, *Anguilla* sp. Aquatic Living Resources 3: 131-141.
- Bruslé, J., 1991.** The eel (*Anguilla* sp) and organic chemical pollutants. Science of the Total Environment 102: 1-19.
- Bruslé, J., 1994.** L'anguille européenne *Anguilla anguilla*, un poisson sensible aux stress environnementaux et vulnérable à diverses atteintes pathogènes. Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture 335: 237-260.
- Budzinski, H., Mazéas, O., Tronczynski, J., Désaunay, Y., Bocquené, G., Claireaux, G., 2004.** Link between exposure of fish (*Solea solea*) to pAHs and metabolites: Application to the « Erika » oil spill. Aquatic Living Resources 17: 329-334.
- Burgeot T., Minier C., Bocquené G., Vincent F., Cachot J., Loizeau V., Jaouen A., Miramand P., Guyot T., Lesueur P., Rochard E., Boet P., 1999.** Des organismes sous stress. Programme scientifique Seine Aval, Ifremer, 36p.
- Burger, J., Gaines, K.F., Boring C.S., Stephens, W.L., Snodgrass J., Gochfeld, M., 2001.** Mercury and selenium in fish from the Savannah River: species, trophic level, and locational differences. Environmental Research Section A 87: 108-118.
- Burke M.D., and Mayer R.T., 1974.** Ethoxyresorufin: direct fluorimetric assay of microsomal O-dealkylation which is preferentially inducible by 3-methylcholanthrene. Drug Metabolism and Disposition 2: 583-588.
- Burke, J.S., Peters, D.S., Hanson, P.J., 1993.** Morphological indices and otolith microstructure of Atlantic croaker, *Micropogonias undulatus*, as indicators of habitat quality along an estuarine pollution gradient. Environmental Biology of Fishes 36: 25-33.
- Butcher, S.S., Charlson, R.J., Orians, G.H., Wolfe, G.V., 1992.** Global Biogeochemical Cycles. Academic Press, San Diego, 379p.

-C-

- Cailliet, G. M., Andrews, A. H., Burton, E. J., Watters, D. L., Kline, D. E., Ferry-Graham, L. A., 2001.** Age determination and validation studies of marine fishes: do deep-dwellers live longer? Experimental Gerontology 36(4-6): 739-764.
- Caill-Milly, N. [COORD.], 2008.** Etude de l'impact des activités anthropiques sur l'habitat de l'anguille européenne (*Anguilla anguilla*) sur le bassin de l'Adour dans les zones humides du bas Adour – Synthèse. IFREMER, 1-59.
- Cairns, J., Health, A.G., and Parker, B.C. 1975.** Temperature influence on chemical toxicity to aquatic organisms. Journal of the Water Pollution Control Federation 47: 267-280.

- Cairns, D.K., Shiao, J.C., Iizuka, Y., Tzeng, W.N., MacPherson, C.D., 2004.** Movement patterns of American eels in an impounded watercourse, as indicated by otolith microchemistry. *North American Journal of Fisheries Management* 24: 452-458.
- Campana, S.E., and Neilson, J.D., 1985.** Microstructure of fish otoliths. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 42: 1014-1032.
- Campana, S.E., and Casselman, J.M., 1993.** Stock discrimination using otolith shape analysis. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 50: 1062-1083.
- Campana, S. E., Fowler, A. J. and Jones, C. M., 1994.** Otolith elemental fingerprinting for stock identification of Atlantic cod (*Gadus morhua*) using laser ablation ICPMS. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 51, 1942-1950.
- Campana, S.E., Thorrold, S.R., Jones, C.M., Günther, D., Tubrett, M., Longerich, H., Jackson, S., Halden, N.M., Kalish, J.M., Piccoli, P., de Pontual, H., Troadec, H., Panfili, J., Secor, D.H., Severin, K.P., Sie, S.H., Thresher, R., Teesdale, W.J., and Campbell, J.L., 1997.** Comparison of accuracy, precision, and sensitivity in elemental assays of fish otoliths using the electron microprobe, proton induced X-ray emission, and laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry. *Canadian Journal of Fisheries and Aquaculture Sciences* 54: 2068-2079.
- Campana, S. E., 1999.** Chemistry and composition of fish otoliths: pathways, mechanisms and applications. *Marine Ecology Progress Series* 188: 263-297.
- Campana, S.E., Chouinard, G.A., Hanson, J.M., Fréchet, A., Bratley, J., 2000.** Otolith elemental fingerprints as biological tracers of fish stocks. *Fisheries Research* 46: 343-357.
- Campana, S. E. and Thorrold, S. R., 2001.** Otoliths, increments, and elements: keys to a comprehensive understanding of fish populations? *Canadian Journal of Fisheries and Aquaculture Sciences* 58(30-38).
- Campana, S.E., 2005.** Otolith science entering the 21st century. *Marine and Freshwater* 56: 485-495.
- Campbell, P. M. & Devlin, R. H., 1996.** Expression of *CYP1A1* in livers and gonads of Pacific salmon: quantitation of mRNA levels by RT-cPCR. *Aquatic Toxicology* 34: 47-69.
- Cardinal, D., Hamelin, B., Bard, E., Patzold, J., 2001.** Sr/Ca, U/Ca and $\delta^{18}\text{O}$ records in recent massive corals from Bermuda: relationships with sea surface temperature. *Chemical geology* 176: 213-233.
- Carpene, E., Vasak, M., 1989.** hepatic Metallothionein from Goldfish (*Carassius auratus*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 92B:463-468.
- Carré, M., Ilhem, Bentaleb I., Blamart, D., Ogle, N., Cardenas, F., Zevallos, S., Kalin, R.M., Ortlieb, L., Fontugne, M., 2005.** Stable isotopes and sclerochronology of the bivalve *Mesodesma*

- donacium*: Potential application to Peruvian paleoceanographic reconstructions. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 228(1-2): 4-25.
- Castelnaud, G., Guérault, D., Desaunay, Y., Elie, P., 1994.** Production et abondance de la civelle en France au début des années 90. *Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture* 335: 263-287.
- Castonguay, m., Hodson, P.V., Moriarty, C., Drinkwater, K.F., Jessop, B.M., 1994.** Is there a role of ocean environment in American and European eeldecline. *Fisheries Oceanography* 3: 197-203.
- Celander, M., Förlin, L., 1991.** Catalytic activity and immunochemical quantification of hepatic cytochrome P-450 in β -naphthoflavone and isosafrole treated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Physiology and Biochemistry* 9: 189-197.
- Celander, M., Förlin, L., 1995.** Decrease responsiveness of the hepatic cytochrome P450 1A1 system in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after prolonged exposure to PCB. *Aquatic Toxicology* 33: 141-153.
- Chang, C. W., Lizuka, Y., Tzeng, W.N., 2004.** Migratory environmental history of the grey mullet *Mugil cephalus* as revealed by otolith Sr:Ca otolith. *Marine Ecology Progress Series* 269: 277-288.
- Changeux, T., 2002.** L'effort de pêche ciblant l'anguille dans les eaux libres françaises en 2000. Rapport Conseil Supérieur de la Pêche, 8p.
- Chung-Davidson, Y. W., Rees, C. B., Wu, H., Yun, S. S. & Li, W., 2004.** B-naphthoflavone induction of CYP1A in brain of juvenile lake trout (*Salvelinus namaycush* Walbaum). *Journal of Experimental Biology* 207: 1533–1542.
- Chuttani, H.K., Gupta, P.S., Gulati, S., 1965.** Acute copper sulphate poisoning. *American Journal of Medicine* 39: 849-854.
- Claisse D., Burgeot T., Chiffolleau J.F., Michel P., Giboire L., Le Paul C., 1994.** Surveillance du milieu marin : Travaux du Réseau National d'Observation de la Qualité du Milieu Marin, Edition 1994. Ifremer Environnement, 35p.
- Claverie, F., 2009.** Développement et applications d'un système laser femtoseconde infra-rouge basse énergie haute cadence de tir, pour l'analyse d'éléments trace dans les solides par couplage ablation laser / ICPMS. Thèse de l'Université de Pau et des Pays de l'Adour, spécialité environnement et matériaux, 288p.
- Claverie, F., Fernández, B., Pécheyran, C., Alexis, J., Donard, O.F.X., 2009 (a).** Elemental fractionation effects in high repetition rate IR femtosecond laser ablation ICP-MS analysis of glasses. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 24:891-902.

- Claverie, F., Pécheyran, C., Mounicou, S., Ballihaut, G., Fernández, B., Alexis, J., Lobinski, R., Donard, O.F.X., 2009 (b).** Characterization of the aerosol produced by infrared femtosecond laser ablation of polyacrylamide gels for the sensitive inductively coupled plasma mass spectrometry detection of selenoproteins. *Spectrochimica Acta Part B* 64:649-658.
- Coffey, M., Dehairs, F., Collette, O., Luther, G., Church, T. and Jickells, T., 1997.** The behavior of dissolved barium in estuaries. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 45(1): 113-121.
- Colbert, D. and McManus, J., 2005.** Importance of seasonal variability and coastal processes on estuarine manganese and barium cycling in a Pacific Northwest estuary. *Continental Shelf Research* 25(11): 1395-1414.
- Commission Européenne, 2007.** Règlement (CE) N° 1100/2007 du Conseil du 18 septembre 2007 instituant des mesures de reconstitution du stock d'anguilles européennes. *Journal Officiel de l'Union Européenne*, 1-7.
- Corchero, J., Pimprale, S., Kimura, S., Gonzalez, F.J., 2001.** Organization of the CYP1A cluster on human chromosome 15: implication for gene regulation. *Pharmacogenetics* 11: 1-6.
- Costa, J.L., Assis, C.A., Almeida, P.r., Moreira, F.M., Costa, M.J., 1992.** On the food of the european eel, *Anguilla anguilla* (L.), in the upper zone of the Tagus estuary, Portugal. *Journal of Fish Biology* 41: 841-850.
- Courtenay, S., Grunwald, C., Kreamer, G. L., Alexander, R., Wirgin, I., 1993.** Induction and clearance of cytochrome P4501A mRNA in Atlantic tomcod caged in bleached kraft mill effluent in the Miramichi River. *Aquatic Toxicology* 27: 225-244.
- Courtenay, S.C., Grunwald, C.M., Kreamer, G.L., Fairchild, W.L., Arsenault, J.T., Ikononou, M., Wirgin, I.I., 1999.** A comparison of the dose and time response of CYP1A1 mRNA in chemically treated Atlantic tomcod from two populations. *Aquatic Toxicology* 47: 43-69.
- Cucherousset, J., Paillisson, J.-M., Carpentier, A., Thoby, V., Damien, J.-P., Eybert, M.-C., Feunteun, E., Robinet, T., 2007.** Freshwater protected areas: an effective measure to reconcile conservation and exploitation of the threatened European eels (*Anguilla anguilla*)? *Ecology of Freshwater Fish* 16(4): 528-538.
- Culshaw, C., Newton, L.C., Weis, I., Bird, D.J., 2002.** Concentrations of Cd, Zn and Cu in sediments and brown shrimps (*Crangon crangon* L.) from the Severn estuary and Bristol Channel, UK. *Marine Environmental Research* 54: 331–334.

-D-

- Dallinger, R., Egg, M., Köck, G., Hofer, R., 1997.** The role of metallothionein in cadmium accumulation of Arctic char (*Salvelinus alpinus*) from high alpine lakes. *Aquatic Toxicology* 38(1-3): 47-66.
- Dannewitz J., Maes G.E., Johansson L., Wikström H., Volckaert A.M., Järvi T., 2005.** Panmixia in the European eel: a matter of time. *Proceedings of the Royal Society* 272: 1129-1137.
- Dauvin, J.-C., 2008.** Effects of heavy metal contamination on the macrobenthic fauna in estuaries: The case of the Seine estuary. *Marine Pollution Bulletin* 57: 160-169.
- Daverat, F., Tomas, J., Lahaye, M., Palmer, M. and Elie, P., 2005.** Tracking continental habitats shifts of eels using otolith Sr/Ca ratios: validation and application to the coastal, estuarine and riverine eels of the Gironde-Garonne-Dordogne watershed. *Marine and Freshwater Research* 56: 619-627.
- Daverat, F., and Tomas, J., 2006.** Tactics and demographic attributes in the European eel *Anguilla anguilla* in the Gironde watershed, SW France. *Marine Ecology Progress Series* 307: 247-257.
- De Boeck, G., Meeus, W., De Coen, W., Blust, R., 2004.** Tissue-specific Cu bioaccumulation patterns and differences in sensitivity to waterborne Cu in three freshwater fish: rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), common carp (*Cyprinus carpio*), and gibel carp (*Carassius auratus gibelio*). *Aquatic Toxicology* 70: 179-188.
- De Boer J, Stronck J, Traag WA, Van der Meer J, 1993.** Non-ortho and mono-ortho substituted chlorobiphenyls and chlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans in marine and freshwater fish and shellfish from the Netherlands. *Chemosphere* 26: 1823-1842.
- De Casamajor, M.-N., Bru, N., Prouzet, P., 1999.** Influence de la luminosité nocturne et de la turbidité sur le comportement vertical de migration de la civelle d'anguille (*Anguilla anguilla*) dans l'estuaire de l'Adour. *Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture* 355: 327-347.
- De Casamajor, M.N., Lecomte-Finiger, R., Prouzet, P., 2001.** Passé larvaire des civelles, *Anguilla anguilla* (Linné, 1758) en migration en zones côtière et estuarienne (Adour, golfe de Gascogne) à partir de l'examen des otolithes. *CR Academie des Sciences Paris* 324: 1011-1019.
- De Casamajor, M.N., Lecomte-Finiger, R., Prouzet, P., 2006.** Passé marin des civelles d'*Anguilla anguilla* en migration dans l'estuaire de l'Adour. *Vie et Milieu* 56(1): 1-8.
- De Nie, H.W., 1987.** Food, feeding periodicity and consumption of the eel (*A. anguilla*) in the shallow eutrophic Tjeukemeer (the Netherlands). *Archiv für Hydrobiologie* 109: 421-443.
- De Pontual, H., Lagardère, F., Troadec, H., Batel, A., Désaunay, Y., Koutsikopoulos C., 2000.** Otoliths imprinting of sole (*Solea solea*) from the Bay of Biscay: a tool to discriminate individuals from nursery origins? *Oceanologica Acta* 23(4): 497-513.
- De Pontual, H., Geffen, A.J., 2002.** Microchimie de l'otolithe. In : Manuel de Sclérochronologie des poissons. Panfili, J., De Pontual, H., Troadec, H., Wright, P.J. (eds). IFREMER-IRD, 245-303.

- De Vries, M. C., Gillanders, B. M. and Elsdon, T. S., 2005.** Facilitation of barium uptake into fish otoliths: Influence of strontium concentration and salinity. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 69(16): 4061-4072.
- Dekker, W., 1998.** Long-term trends in the glass eels immigrating at Den Oever, The Netherlands. *Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture* 349: 199-214.
- Dekker, W., 2000.** A procrustean assessment of the European eel stock. *ICES Journal of Marine Sciences* 57, 938-947.
- Dekker, W., 2003.** On the distribution of the European eel and its fisheries. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 60:787-799.
- Dekker, W., 2004.** What caused the decline of the Lake IJsselmeer eel stock after 1960? *ICES Journal of Marine Sciences* 61: 394-404.
- Desaunay Y., Guéroult D., 1997.** Seasonal and long-term changes between recruitment variation and North Atlantic ecosystems productivity. *Journal of Fish Biology* 51: 317-339.
- Devereux, I., 1967.** Temperature measurements from oxygen isotopes ratios of fish otoliths. *Science* 155: 1684-1685.
- Dias, M., Salvado, J.C., Monperrus, M., Caumette, P., Amouroux, D., Duran, R., Guyoneaud, R., 2008.** Characterization of *Desulfomicrobium salsuginis* sp. nov. and *Desulfomicrobium aestuarii* sp. nov., two new sulfate-reducing bacteria isolated from the Adour estuary (French Atlantic coast) with specific mercury methylation potentials. *Systematic and Applied Microbiology* 31(1): 30-37.
- Dixon, T.J., Taggart, J.B., Georges, S.G., 2002.** Application of real time PCR determination to assess interanimal variabilities in CYP1A induction in the European flounder *Platichthys flesus*. *Marine Environmental Research* 54: 267-270.
- Donard, O., Latouche, C., Bourg, A., Vernet, J.P., 1983.** Occurrence and behavior of mercury and cadmium in the sediments of an estuarine system: The Gironde. In : 4th International Conference on Heavy metals in the Environment, vol. 2 (Müller G. ed.) CEP Consultants, Edinburgh, pp. 960-963.
- Doyotte A., Mitchelmore C.L., Ronisz D., McEvoy J., Livingstone D.R., and Peters L.D., 2001.** Hepatic 7-ethoxyresorufin *O*-deethylase activity in eel (*Anguilla anguilla*) from the Thames estuary and comparisons with other United Kingdom estuaries. *Marine Pollution Bulletin* 42: 1313-1322.
- Durrieu, G., Maury-Brachet, R., Girardin, M., Rochard, E., Boudou, A., 2005.** Contamination by heavy metals (Cd, Zn, Cu, and Hg) of eight fish species in the Gironde estuary (France). *Estuaries* 28 (4): 581-591.

Durif, C., 2003. La migration d'avalaison de l'anguille européenne *Anguilla anguilla* : caractérisation des fractions dévalantes, phenomena de migration et franchissement d'obstacles. Thèse de doctorat soutenue le 9 janvier 2003, Université de Toulouse III, 350p.

-E-

Edeline, E., Dufour, S., Briand, C., Fatin, D., Elie, P., 2004. Thyroid status related to migratory behavior in *Anguilla anguilla* glass eels. Marine Ecological Progress Series 282: 261-270.

Edeline, E., Elie, P., 2004. Is salinity choice related to growth in juvenile eel *Anguilla anguilla* ? *Cybium* 28(1): 1-6.

Edwards, S.C., MacLeod, C.L., Lester J.N., 1997. Mercury contamination of the eel (*Anguilla anguilla*) and roach (*Rutilus rutilus*) in East Anglia, UK. Environmental Monitoring and Assessment 55: 371-387.

Eggins, S., De Deckker, P., Marshall, J., 2003. Mg/Ca variation in planktonic foraminifera tests: implications for reconstructing palaeo-seawater temperature and habitat migration. Earth and Planetary Science Letters 212(3-4): 291-306.

Eggins, S., Grun, R., Pike, A. W. G, Shelley, M., Taylor, L, 2003. ²³⁸U, ²³²Th profiling and U-series isotope analysis of fossil teeth by laser ablation-ICPMS. Quaternary Science Reviews 22: 1373-1382.

Elbaz-Poulichet, F., Garnier, J.M., Guan, D.M., Martin, J.M., Thomas, A.J., 1993. The behavior of trace metals (Cd, Cu, Ni, and Pb) and As in the surface plume of stratified estuaries : example of the Rhone river (France). Estuarine Coastal Shelf Sciences 42:289-310.

Elfman, M., Limburg, K. E., Kristiansson, P., Malmqvist, K., Pallon, J., 1999. Application of micro-PIXE to fish life history analyses: trace element analysis of otoliths. Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms, 150: 272-276.

Elfman, M., Limburg, K. E., Kristiansson, P., Svedäng, H., Westin, L., Wickström, H., Malmqvist, K. and Pallon J., 2000. Complex life histories of fishes revealed through natural information storage devices: case studies of diadromous events as recorded by otoliths. Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms B 161-163: 877-881.

Elie, P., Lecomte-Finiger, R., Cantrelle, I., Charlon, N., 1982. Définition des limites des différents stades pigmentaires durant la phase civelle d'anguille *Anguilla sp.* (pioisson téléostéen anguilliforme). Vie et Milieu 32(3) : 149-157.

- Elsdon, T. S. and Gillanders, B. M., 2003.** Reconstructing migratory patterns of fish based on environmental influences on otolith chemistry. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 13(3): 219-235.
- Elsdon, T. S. and Gillanders, B. M., 2004.** Fish otolith chemistry influenced by exposure to multiple environmental variables. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 313(2): 269-284.
- Elsdon, T. S., and Gillanders, B. M., 2005 (a).** Alternative life-history patterns of estuarine fish: Barium in otoliths elucidates freshwater residency. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 62(5): 1143-1152.
- Elsdon, T. S. and Gillanders, B. M., 2005 (b).** Consistency of patterns between laboratory experiments and field collected fish in otolith chemistry: An example and applications for salinity reconstructions. *Marine and Freshwater Research* 56(5): 609-617.
- Elsdon, T. S., and Gillanders, B. M., 2006.** Temporal variability in strontium, calcium, barium, and manganese in estuaries: Implications for reconstructing environmental histories of fish from chemicals in calcified structures. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 66(1-2): 147-156.
- Elsdon, T. S., Wells, B.K., Campana, S.E., Gillanders B.M., Jones, C.M., Limburg, K.E., Secor, D.H., Thorrold, S.R., Walther, B.D., 2008.** Otolith chemistry to describe movements and life-history parameters of fishes: hypotheses, assumptions, limitations and inferences. *Oceanography and Marine Biology: An Annual Review* 46: 297-330.
- Erickson, D.A., Goodrich, M.S., Lech, J.J., 1988.** The effect of piperonyl butoxide on hepatic cytochrome P-450-dependent monooxygenase activities in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Toxicological Applied Pharmacology* 94: 1-10.
- Esslemont, G., R. A. Russell, and W. A. Maher. 2004.** Coral record of harbour dredging: Townsville, Australia. *Journal of Marine Systems* 52: 51-64.
- European Commission, 1996.** Council directive 96/33/EC of 21 May 1996 amending the Annexes to Directives 86/362/EEC and 86/363/EEC on the fixing of maximum levels for pesticide residues in and on cereals and foodstuffs of animal origin respectively. *Official Journal of the European Communities* 18.06.1996.
- European Commission, 1998.** Statement from the European eel industry farmers, traders, processors and institutions meeting with the European Commission DG XIV Brussels 27 October 1998, 11p.
- European Commission, 2006 (a).** Proposal for a Directive of the European Parliament and of the Council on Environmental Quality Standards in the Field of Water Policy and Amending Directive 2000/60/EC (presented by the Commission) {COM(2006) 398 final}{SEC(2006) 947}.

Commission of the European Communities, Brussels. 17.7.2006 COM(2006) 397 final 2006/0129 (COD).

European Commission, 2006 (b). Commission Regulation (EC) No. 199/2006 of 3 February 2006 amending Regulation (EC) No. 466/2001 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards dioxins and dioxin-like PCBs. Official Journal of the European Union L32, 34-46.

European Commission, 2007. Council Regulation (EC) No 1100/2007 of 18 September 2007 establishing measures for the recovery of the stock of European eel. Official Journal of the European Communities 22.09.2007.

-F-

Fablet R., and Le Josse N., 2005. Automated fish age estimation from otolith images using statistical learning. Fisheries Research 72: 279-290.

Fablet, R., Daverat, F., De Pontual, H., 2007. Unsupervised Bayesian reconstruction of individual life histories from otolith signatures : case study of Sr:Ca transects of eel (*Anguilla anguilla*) otoliths. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 64(1): 152-165.

Fallon, S.J., McCulloch, M.T., Sinclair, D.J., 1998. Coral growth: trace elements reveal intra-annual variation in growth rate from a Porites coral, Shirigai Bay, Japan. P 91-98. In J.G. Greenwood and N.J. Hall. [Eds] Proceedings of the Australian Coral Reef Society, 75th Anniversary Conference, Heron Island October 1997. School of Marine Science, University of Queensland, Brisbane.

Fallon, S. J., Mc Culloch, M. T., Van Woesik, R., Sinclair, D. J, 1999. Corals at their latitudinal limits: laser ablation trace element systematics in Porites from Shirigan Bay, Japan. Earth and Planetary Science Letters 172: 221-238.

Fallon, S. J., White, J.C., McCulloch, M.T., 2002. Porites corals as recorders of mining and environmental impacts: Misima Island, Papua New Guinea. Geochimica et Cosmochimica Acta 66(1): 45-62.

Farkas, A., Salánki, J., Varanka, I., 2008. Heavy metal concentrations in fish of Lake Balaton. Lakes & Reservoirs: Research & Management 5(4): 271-279.

- Farrell, J., and Campana, S.E., 1996.** Regulation of Calcium and Strontium Deposition on the Otoliths of Juvenile Tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 115A(2): 103-109.
- Farrugio, H., Peyrille, D., Cabos, O., 2006.** Mesure de l'efficacité de la réglementation française de la pêche à l'anguille en Méditerranée dans la lagune de Bages-Sigean. Document interne, Projet PIMHA – DEMOSTEM, 9p.
- Fawler R.F., DeRibaupierre, Y., Guillemin, M., 1983.** Measurement of hand tremor induced by industrial exposure to metallic mercury. *British Journal of Industrial Medicine* **40**: 204-208.
- Fent K. and Bucheli T.D., 1995.** Inhibition of Hepatic Microsomal Mono-oxygenase System by Organotins in Fish. *Marine Environmental Research*, 39(1-4): 351-352.
- Fent, K., Woodin, Bruce R., Stegeman, John J., 1998.** Effects of triphenyltin and other organotins on hepatic monooxygenase system in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology* 121(1-3): 277-288.
- Fernandez, B., Claverie, F., Pecheyran, C., O.F.X. Donard, 2007.** Direct analysis of solid samples by fs-LA-ICP-MS. *Trends in Analytical Chemistry* 26(10): 951-966.
- Fernandez, B., Claverie, F., Pecheyran, C., Alexis, J., O.F.X. Donard, 2008 (a).** Direct determination of trace elements in powdered samples by in-cell isotope dilution femtosecond laser ablation ICPMS. *Analytical Chemistry* 80(18): 6981-6994.
- Fernandez, B., Claverie, F., Pecheyran, C., Donard, O.F.X., 2008 (b).** Solid-spiking isotope dilution laser ablation ICP-MS for the direct and simultaneous determination of trace elements in soils and sediments. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 23(3): 367-377.
- Feunteun, E., Marion, L., 1994.** Assessment of Grey Heron predation on fish communities: the case of the largest European colony; *Hydrobiologia* 279/280: 327-3474.
- Feunteun, E., Rigaud, C., Elie, P., Lefevre, J.C., 1999.** Les peuplements piscicoles des marais littoraux de l'ouest de la France : un patrimoine à gérer. *Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture* 352: 63-79.
- Feunteun, E., Acou, A., Lafaille, P., Legault, A., 2000.** European eel (*A. anguilla*): prediction of spawner escapement from continental population parameters. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 57: 1627-1635.
- Feunteun E., 2002.** Management and restoration of European eel population (*Anguilla anguilla*): An impossible bargain. *Ecological Engineering* 18: 575-591.
- Feunteun E., Laffaille P., Robinet T., Briand C., Baisez A., Olivier J.-M., Acou, A., 2003.** A review of upstream migration and movements in inland waters by anguillid eels: toward a general

- theory. In : Aida K., Tsukamoto K., Yamauchi K., Eds. *Advances in eel biology*. Tokyo, Springer – Verlag, 191-213.
- Feunteun, E., Robinet, T., Lobon-Cervia, J., Boury, P., Boisneau, P., Acou, A., 2008.** Indicateurs d'échappement des géniteurs potentiels. In : *L'anguille européenne – Indicateurs d'abondance et de colonisation*. Adam, G., Feunteun, E., Prouzet, P., Rigaud, C. (Eds.), 331-355.
- Fisher, J.M., Wu, L., Denison, M.S., Whitlock, J.P.Jr., 1990.** Organization and function of a dioxin-responsive enhancer. *Journal of Biological Chemistry* 265: 9676-9681.
- Fisher, P., 2005.** Otolith microstructure during the pelagic, settlement and benthic phases in turbot. *Journal of Fish Biology* 54(6): 1231-1243.
- Fontaine, Y.A., Dufour, S., fontaine, M., 1985.** L'immersion prolongée en profondeur stimule la fonction hypophysaire gonadotrope de l'anguille européenne (*Anguilla anguilla* L.) femelle. *CR de l'Académie des Sciences de Paris* 300(Serie III): 83-87.
- Fontaine, Y.A., 1994.** L'argenture de l'anguille : métamorphose, anticipation, adaptation. *Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture* 335: 171-185.
- Fontenelle, G., 1997.** Observations on the glass eel fishery in 1997. In: Moriarty, C., Dekker, W. Eds. *Management of European eel fisheries*. *Irish Fisheries Bulletin* 15: 108-109.
- Forbes, V.E., Forbes, T.L., Rivières, J.L., 1997.** *ECOTOXICOLOGIE. Théorie et applications*. INRA (Ed.), 256p.
- Fox, K., Zauke, Gerd, P., Butte, W., 1994.** Kinetics of bioconcentration and clearance of 28 polychlorinated biphenyls congeners in zebrafish (*Brachydanio rerio*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 28: 99-109.
- Fowler, A.J., S.E. Campana, C.M. Jones and S.E. Thorrold, 1995.** Experimental assessment of the effect of temperature and salinity on elemental composition of otoliths using laser ablation ICPMS. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 52: 1431-1441.
- Fricke, H., and Kaese, R., 1995.** Tracking of artificially matured eels (*Anguilla anguilla*) in the Sargasso Sea and the problem of the Eel's spawning Site. *Naturwissenschaften* 82: 32-36.
- Fulton, TW. 1904.** The rate of growth of fishes. *Fish Board of Scotland Annual Report* 22:141–241.

-G-

- Gallahar, N. K. and Kingsford, M. J., 1996.** Factors influencing Sr/Ca ratios in otoliths of *Girella elevata*: An experimental investigation. *Journal of Fish Biology* 48(2): 174-186.

- Galvez, F., Mayer, G. D., Wood, C.M., Hogstrand, C., 2002.** The distribution kinetics of waterborne silver-110m in juvenile rainbow trout. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 131(3): 367-378.
- Gao, Y.W., and Beamish, R.J., 1999.** Isotopic composition of otoliths as a chemical tracer in population identification of sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 56: 2062-2068.
- Gao, Y.W., Joner, S.H., Bargmann, G.G., 2001.** Stable isotopic composition of otoliths in identification of spawning stocks of Pacific herring (*Clupea pallasii*) in Puget Sound. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 58: 2113-2120.
- Garnier, J.M., and Gieu, C., 2003.** Release of cadmium in the Danube estuary: contribution of physical and chemical processes as determined by an experimental approach. *Marine Environmental Research* 55: 5-25.
- Garrick, R.A., woodin, B.R., Stegemann, J.J., 2005.** Cytochrome p4501a induced differentially in endothelial cells cultured from different organs of *Anguilla rostrata*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Animal* 41: 57-63.
- Gauldie, R.W., Thacker, CE., Merrett, N.R., 1994.** Oxygen and carbon isotope variations in the otoliths of *Beryx splendens* and *Coryphaenoides profundicolus*. *Comparative Biochemistry and physiology* 108A: 153-159.
- Geffen A.J., Pearce N.J.G., Perkins W.T., 1998.** Metal concentrations in fish otoliths in relation to body composition after laboratory exposure to mercury and lead. *Marine Ecology Progress Series* 165: 235-245.
- Geffen A.J., De Pontual H., Wright P.J., Mosegaard H., 2002.** Différents types de pièces calcifiées : Evènements marquants de l'histoire individuelle. *In Manuel de sclérochronologie des poissons.* Panfili J., De Pontual H., Troadec H., Wright P.J. (Eds.), Ifremer-IRD : 99-104.
- Geffen A.J., Jarvis K., Thorpe J.P., Leah R.T., Nash R.D.M., 2003.** Spatial differences in the trace element concentrations of Irish Sea plaice *Pleuronectes platessa* and whiting *Merlangius merlangus* otoliths. *Journal of Sea Research* 50: 245-254.
- George S., Gubbins M., MacIntosh A., Reynolds W., Sabine V., Scott A., Thain J., 2004.** A comparison of pollutant biomarker responses with transcriptional responses in European flounder (*Platichthys flesus*) subjected to estuarine pollution. *Marine Environmental Research* 58(2-5): 571-575.
- Gibbs, P.E., Pascoe, P.L., Bryan, G.W., 1991.** Tributyltin-induced imposex in stenoglossan gastropods: pathological effects on the female reproductive system. *Comparative Biochemistry and Physiology* 100: 231-235.

- Gibson-Reinemer, D.K., Johnson, B.M., Martinez, P.J., Martinez, D.L., Winkelman, D.L., Koenig, A.E., Woodhead, J.D., 2009.** Elemental signatures in otoliths of hatchery rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): distinctiveness and utility for detecting origins and movement. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 66(4):513-524.
- Gillanders B.M., 2002.** Temporal and spatial variability in elemental composition of otoliths: implications for determining stock identity and connectivity of populations. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 59: 669-679.
- Gillanders, B. M., 2005.** Otolith chemistry to determine movements of diadromous and freshwater fish. *Aquatic Living Resources* 18(3): 291-300.
- Gillikin, D. P., Dehairs, F., Baeyens, W., Navez, J., Lorrain, A., Andre, L., 2005.** Inter- and intra-annual variations of Pb/Ca ratios in clam shells (*Mercenaria mercenaria*): A record of anthropogenic lead pollution? *Marine Pollution Bulletin* 50(12): 1530-1540.
- Gillikin, D. P., Lorrain, A., Navez, J., Taylor, J.W., André, L., Keppens, E., Baeyens, W., Dehairs, F., 2005.** Strong biological controls on Sr/Ca ratios in aragonitic marine bivalve shells. *Geochemistry, Geophysics, Geosystems* 6.
- Gillikin, D. P., Dehairs, F., Lorrain, A., Steenmans, D., Baeyens, W., Andre, L., 2006.** Barium uptake into the shells of the common mussel (*Mytilus edulis*) and the potential for estuarine paleo-chemistry reconstruction. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 70(2): 395-407.
- Gilmour, C.C., and Henry, E.A., 1991.** Mercury methylation in Aquatic systems affected by acid deposition. *Environmental Pollution* 71: 131-169.
- Giusti, L., Williamson, A. C., Mistry, A., 1999.** Biologically available trace metals in *Mytilus edulis* from the coast of Northeast England. *Environment International* 25: 969-981.
- Glova, G.J., 1988.** Fish density variations in the braided Ashley River Canterbury, New-Zealand. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* 22: 9-15.
- Glova, G. J., Jellyman, D. J., and Bonnet, M. L., 1998.** Factors associated with the distribution and habitat of eels (*Anguilla* spp.) in three New Zealand lowland streams. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* 32:255–269.
- Goksoyr, A., and Förlin, L., 1992.** The cytochrome *P-450* in fish, aquatic toxicology and environmental monitoring. *Aquatic Toxicology* 22: 287-312.
- Gollock M.J., Kennedy C.R., Quabius E.S., Brown J.A., 2004.** The effect of parasitism of European eels with the nematode, *Anguillicola crassus* on the impact of netting and aerial exposure. *Aquaculture* 233: 45-54.
- Gomez-Mourelo, P., 2005.** A model for the upstream motion of elvers in the Adour River. *C. R. Biologies* 328: 367-378.

- Gonzalez, J.-L., (Coord.) 1999.** Le Cadmium : comportement d'un contaminant métallique en estuaire. Programme Scientifique Seine Aval, fascicule 10. Editions IFREMER, 31p.
- González, J., Liu, C., Mao, X., Russo, R.E., 2004.** UV-femtosecond laser ablation ICP-MS for analysis of alloy samples. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 19: 1165-1168.
- Gorbi, S., and Regoli, F., 2004.** Induction of cytochrome P4501A and biliary PAH metabolites in European eel *Anguilla anguilla*: seasonal, dose- and time-response variability in field and laboratory conditions. *Marine Environmental Research* 58(2-5): 511-515.
- Gosset, C., Travade, F., Durif, C., Rives, J., Garaicoechea, C., 2000.** Etude des dispositifs de dévalaison pour l'anguille argentée : Test de deux exutoires de dévalaison à la centrale hydroélectrique de Halsou (Nive-64). Rapport de contrat INRA/EDF, 35p.
- Gray, J.S., 2002.** Biomagnification in marine systems: the perspective of an ecologist. *Marine Pollution Bulletin* 45: 46-52.
- Gross, M.R., Coleman, R.M., McDowall, R.M., 1988.** Aquatic productivity and the evolution of diadromous fish migration. *Science* 239: 1291-1293.
- Guay, C. K. and Falkner, K. K., 1998.** A survey of dissolved barium in the estuaries of major Arctic rivers and adjacent seas. *Continental Shelf Research* 18(8): 859-882.
- Gueguen, J., and Prouzet, P., 1994.** Le Saumon Atlantique. *Publication IFREMER*, 330p.
- Guillong, M., Horn, I., Günther, D., 2003.** A comparison of 266 nm, 213 nm and 193 nm produced from a single solid state Nd:YAG laser for Laser Ablation ICP-MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 18:1224-1230.
- Guillouët, J., Acou, A., Mounaix, B., Legault, A., Feunteun, E., 2000.** Etude de la restauration de la population d'anguille sur le Frémur : synthèse du suivi de 1995 à 1999. Report Fish-Pass, Fédération APPMA, vol. 35, Université de Rennes I, France, 104p.
- Günther, D., Horn, I., Hattendorf, B., 2000.** Recent trends and developments in laser ablation-ICP-mass spectrometry. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 368: 4-14.
- Günther, D., Jackson, S.E., Longerich, H.P., 1999.** Laser ablation and arc/spark solid sample introduction into inductively coupled plasma spectrometers. *Spectrochimica Acta Part B* 54: 381-409.
- Günther, D., and Hattendorf, B., 2005.** Solid sample analysis using laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry. *Trends in Analytical Chemistry* 24(3): 255-265.

-H-

Haedrich, R.L., and Hall, C.A.S., 1976. Fishes and estuaries. *Oceanus* 19(5): 55– 63.

- Hahn, M.E., and Stegeman, J.J., 1994.** Regulation of cytochrome P4501A1 in teleosts: sustained induction of CYP1A1 mRNA, protein, and catalytic activity by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzofuran in the marine fish *Stenotomus chrysops*. *Toxicology and Applied Pharmacology* 127: 187-198.
- Halden, N.M., Babaluk, J.A., Campbell, J.L., Teesdale, W.J., 1995.** Scanning proton microprobe analysis of strontium in an Arctic charr, *Salvelinus alpinus*, otolith: implications for the interpretation of anadromy. *Environmental biology of Fishes* 43: 333-339.
- Halden, N. M., Mejia, S. R., Babaluk, J. A., Reist, J. D., Kristofferson, A. H., Campbell, J. L. and Teesdale, W. J., 2000.** Oscillatory zinc distribution in Arctic char (*Salvelinus alpinus*) otoliths: The result of biology or environment? *Fisheries Research* 46(1-3): 289-298.
- Hamer, P. A., Jenkins, G. P. and Coutin, P., 2006.** Barium variation in *Pagrus auratus* (Sparidae) otoliths: A potential indicator of migration between an embayment and ocean waters in south-eastern Australia. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 68(3-4): 686-702.
- Handy, R.D., 1992.** The assessment of episodic metal pollution I: uses and limitations of tissue contaminant analysis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after short waterborne exposure to cadmium or copper. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 22: 74–81.
- Hanson, P.J., and Zdanowicz, V.S., 1999.** Elemental composition of otoliths from Atlantic croaker along an estuarine pollution gradient. *Journal of Fish Biology* 54: 656-668.
- Harrad, S., and Smith, D., 1999.** Eel consumption as a pathway of human exposure to PCBs. *International Journal of Environmental Health Research* 9: 31-37.
- Hart, S. R., and Cohen, A.L., 1996.** An ion probe study of annual cycles of Sr/Ca and other trace elements in corals. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 60(16): 3075-3084.
- Has-Schön, E., Bogut, I., Strelec, I., 2006.** Heavy metal profile in five species included in human diet, domiciled in the end flow of River Neretva (Croatia). *Archive of Environmental Contamination and Toxicology*. 50: 545-551.
- Heilmann, L.J., Sheen, Y.Y., Bigelow, S.W., Nebert, D.W., 1988.** Trout P-450IA1: cDNA and deduced protein sequence, expression in liver, and evolutionary significance. *DNA* 7: 379-387.
- Hellebrand, E., Snow, J.E., Mostefaoui, S., Hoppe, P., 2005.** Trace element distribution between orthopyroxene and clinopyroxene in peridotites from the Gakkel Ridge: a SIMS and NanoSIMS study. *Contribution to Mineralogy and Petrology* 150(5): 486-504.
- Henderiks, J., Bollmann, J., 2003.** The Gephyrocapsa sea surface palaeothermometer put to the test: comparison with alkenone and foraminifera proxies off NW Africa. *Marine Micropaleontology* 948: 1-24.
- Henderson, G. M. 2002.** New oceanic proxies for paleoclimate. *Earth and Planetary Science Letters* 203: 1-13.

- Hergenroeder, R., Samek, O., Hommes, V., 2006.** Femtosecond laser ablation elemental mass spectrometry. *Mass Spectrometry Review* 25: 551-572.
- Herrmann, A.M., Ritz, K., Nunan, N., Clode, P.L., Pett-Ridge, J., Kilburn, M.R., Murphy, D.V., O'Donnell, A.G., Stockdale, E.A., 2007.** Nano-scale secondary ion mass spectrometry – A new analytical tool in biogeochemistry and soil ecology: A review article. *Soil Biology and Biochemistry* 39(8): 1835-1850.
- Hetkoen, H., Bernhoft, A., Ingebrigsten, K., Skaare, J.U., Goksoyr, A., 1994.** Response of hepatic xenobiotic metabolizing enzymes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and cod (*Gadus morhua*) to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (2,3,7,8-TCDD). *Aquatic Toxicology* 28: 97-106.
- Hintz, C. J., Shaw, T. J., Bernhard, J. M., Chandler, G. T., Mccorkle, D. C., Blanks, J. K., 2006 (a).** Trace/minor element:calcium ratios in cultured benthic foraminifera. Part II: Ontogenetic variation. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 70: 1964-1976.
- Hintz, C. J., Shaw, T. J., Bernhard, J. M., Chandler, G. T., Mccorkle, D. C., Blanks, J. K., 2006 (b).** Trace/minor element:calcium ratios in cultured benthic foraminifera. Part I: Inter-species and inter-individual variability. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 70(8): 1952-1963.
- Hodson, P.V., 1988.** The effect of metal metabolism on uptake disposition and toxicity in fish. *Aquatic Toxicology* 11: 3-18.
- Holtzmann, N.A., Elliott, D.A, Heller, R.H., 1966.** Copper intoxication. Report of a case with observations on ceruloplasmin. *New England Journal of Medicine* 275(7): 347-352.
- Holmgren, K., Wickström, H., Clevestam, S., 1997.** Sex related growth of European eel, *Anguilla Anguilla*, with focus on median silvage age. *Canadian Journal of fisheries and Aquaculture Sciences* 52 (12): 2775-2781.
- Hoppe, P., 2006.** NanoSIMS: A new tool in cosmochemistry. *Applied Surface Science* 252(19): 7102-7106.
- Howland, K. L., Tonn, W. M., Babaluk, J. A. and Tallman, R. F., 2001.** Identification of freshwater and anadromous inconnu in the Mackenzie River system by analysis of otolith strontium. *Transactions of the American Fisheries Society* 130(5): 725-741.

-I-

Iacumin, P., Bianucci, G., Longinelli, A., 1992. Oxygen and carbon isotopic composition of fish otoliths. *Marine Biology* 113:537-542.

Ireland, T., 1999. Isotope geochemistry: new tools for isotopic analysis. *Science* 286: 2289-2290.

-J-

- Jessop, B. M., Shiao, J. C., Iizuka, Y. and Tzeng, W. N., 2002.** Migratory behavior and habitat use by American eels *Anguilla rostrata* as revealed by otolith microchemistry. *Marine Ecology Progress Series* 233: 217-229.
- Jessop, B. M., Shiao, J. C., Iizuka, Y. and Tzeng, W. N., 2006.** Migration of juvenile American eels *Anguilla rostrata* between freshwater and estuary, as revealed by otolith microchemistry. *Marine Ecology Progress Series* 310: 219-233.
- Jessop, B. M., Shiao, J. C., Iizuka, Y., Tzeng, W. N., 2008.** Prevalence and intensity of occurrence of vaterite inclusion in aragonite otoliths of American eels *Anguilla rostrata*. *Aquatic Biology* 2(171-178).
- Johnson, L.L., Misitano, D., Sol, S.Y., Nelson, G.M., French, B., Ylitalo, G.M., Hom, T., 1998.** Contaminants effects on ovarian development and spawning success in rock sole from Puget Sound, Washington. *Transaction of the American Fisheries Society* 127(3): 375-392.
- Johnson, B.L., Hicks, H.E., Cibulas, W., Faroon, O., Ashizawa, A.E., De Rosa, C.T., Cogliano, V.J., Clark, M., 1999.** Public health implications of exposure to polychlorinated biphenyls (PCBs). Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Online at <http://www.atsdr.cdc.gov/DT/pcb007.html>
- Jonsson, B., Jonsson, N., 1993.** Partial migration: niche shift vs. sexual maturation in fishes. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 3: 348-365.
- Jones, C. and Chen, Z., 2003.** New techniques for sampling larval and juvenile fish otoliths for trace-element analysis with laser-ablation sector-field inductively-coupled-plasma mass spectrometry (SF-ICP-MS). *The Big Fish Bang* 431-443.

-K-

- Kalay, M., and Canli, M., 2000.** Elimination of Essential (Cu, Zn,) and Non-Essential (Cd, Pb) Metals from Tissues of Freshwater Fish *Tilapia zilli*. *Turkish Journal of Zoology* 24: 429-436.
- Kalish, J.M., 1989.** Otolith microchemistry: validation of the effects of physiology, age and environment on otolith composition. *Journal of Experimental marine Biology and Ecology* 132:151-178.
- Kalish, J.M., 1990.** Use of otolith microchemistry to distinguish the progeny of sympatric anadromous and non-anadromous salmonids. *Fishery Bulletin* 88: 657-666.

- Kalish, J. M., 1991.** Determinants of otolith chemistry: seasonal variation in the composition of blood plasma, endolymph and otoliths of bearded rock cod *Pseudophycis barbatus*. *Marine Ecology Progress Series* 74(2-3): 137-159.
- Kalish, J.M., Beamish, R.J., Brothers, E.B., Casselman, J.M., Francis, C., Mosegaard, H., Panfili, J., Prince, E.D., Thresher, R.E., Wilson, C.A., Wright, P.J., 1995.** Glossary. *In* Recent developments in fish otolith research. Secor, D.H., Dean, J.M., Campana, S.E. (Eds.). University of south Carolina Press, 723-729.
- Kang-Yum, E., and Oransky, S.H., 1992.** Chinese patent medicine as a potential source of mercury poisoning. *Veterinary and Human Toxicology* 34(3): 235-238.
- Kennedy B.P., Blum J.D., Folt C.L., Nislow K.H., 2000.** Using natural strontium isotopic signatures as fish markers: methodology and application. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 57: 2280-2292.
- Kettle, A.J., and Haines, K., 2006.** How does the European eel (*Anguilla anguilla*) retain its population structure during its larval migration across the North Atlantic Ocean? *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 63(1):90-106.
- Kime, D.E., 1995.** The effects of pollution on reproduction in fish. *Reviews of Fish Biology Fisheries* 5: 52-96.
- Kimura, S., Gonzalez, F.J., Nebert, D.W., 1984.** The murine Ah locus. Comparison of the complete cytochrome p1-450 and P3-450 cDNA nucleotide and amino acid sequences. *Journal of Biological Chemistry* 259: 10705-10713.
- Kimura, S., Gonzalez, F.J., Nebert, D.W., 1986.** Tissue-specific expression of the mouse dioxin-inducible P(1)450 and P(3)450 genes: differential transcriptional activation and mRNA stability in liver and extrahepatic tissues. *Molecular Cellular Biology* 6: 1471-1477.
- Kleckner, R.C., McCleave, J.D., Wippelhauser, G.S., 1983.** Spawning of American eel, *Anguilla rostrata*, relative to thermal fronts in the Sargasso Sea. *Environmental Biology of Fishes* 9(3/4): 289-293.
- Kleckner, R.C., and McCleave, J.D., 1985.** Spatial and temporal distribution of American eel larvae in relation to North Atlantic Ocean current system. *Dana* 4: 64-92.
- Klein, R.T., Lohmann, K.C., Thayer, C.W., 1996.** Bivalve skeletons record sea-surface temperature and $\delta^{18}\text{O}$ via Mg/Ca and $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ ratios. *Geology* 24: 415–418.
- Klevezal, G. A., 1996.** Recording Structures of Mammals: Determination of Age and Reconstruction of Life History. Rotterdam, Brookfield, 274p.
- Knights, B., 1987.** Agonistic behavior and growth in the European eel, *A. anguilla* L., in relation to warm-water aquaculture. *Journal of Fish Biology* 31: 265-276.

- Knights B., 1997.** Risk assessment and management of contamination of eels (*Anguilla spp.*) by persistent xenobiotic organochlorine compounds. *Chemistry and Ecology* 13: 171-212.
- Koch, J., Wälle, M., Pisonero, J., Günther, D., 2006.** Performance characteristics of ultra-violet femtosecond laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry at ~265 and ~200 nm. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 21: 932-940.
- Koch, J. and Günther, D., 2007.** Femtosecond laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry: Achievements and remaining problems. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 387(1): 149-153.
- Koch, J., Wälle, M., Dietiker, R., Günther, D., 2008.** Analysis of Laser-Produced Aerosols by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry: Transport Phenomena and Elemental Fractionation. *Analytical Chemistry* 80(4): 915-921.
- Köck, G., Triendl, M., Hofer, R., 1995.** Seasonal patterns of metal accumulation in Arctic char (*Salvelinus alpinus*) from an oligotrophic Alpine lake related to temperature. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 53: 780-786.
- Kotake, A., Arai, T., Ozawa, T., Nojima, S., Miller, M.J., Tsukamoto, K., 2003.** Variation in migratory history of Japanese eels, *Anguilla japonica*, collected in coastal waters of the Amakusa Islands, Japan, inferred from otolith Sr/Ca ratios. *Marine Biology* 142: 849-854.
- Kotake, A., Okamura, A., Yamada, Y., Utoh, T., Arai, T., Miller, M.J., Oka, H., Tsukamoto, K., 2005.** Seasonal variation in the migratory history of the Japanese eel *Anguilla japonica* in Mikawa Bay, Japan. *Marine Ecology Progress Series* 293: 213-225.
- Kraepiel, A. M. L., Chiffoleau, J.F., Martin, J.-M., Morel, F. M. M., 1997.** Geochemistry of trace metals in the Gironde estuary. *Geochimica Cosmochimica Acta* 61(7): 1421 – 1436.
- Kraus, R. T. and Secor, D. H., 2004.** Incorporation of strontium into otoliths of an estuarine fish. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 302(1): 85-106.
- Kubota, M., Sogawa, K., Kaizu, Y., Sawaya, T., Watanabe, J., Kawajiri, K., Gotoh, O., Fuji-Kuriyama, Y., 1991.** Xenobiotic responsive element in the 5'-upstream region of the human P-450c gene. *Journal of Biochemistry* 110: 232-236.
- Kuhn, H.R. and Günther, D., 2003.** Investigation on laser-induced brass aerosol and elemental fractionation during LA-ICP-MS. *Analytical Chemistry* 75:747-753.

- Labonne, M., Ben Othman, D., Luck, J.-M., 1998.** Recent and past anthropogenic impact on a Mediterranean lagoon: Lead isotope constraints from mussel shells. *Applied Geochemistry* 13(7): 885-892.
- Laffaille, P., Feunteun, E., Acou, A., Lefeuvre, J.-C., 2000.** Role of the European eel (*Anguilla anguilla* L.) in the transfer of organic matter between marine and freshwater systems. *Verhandlungen der Internationalen Vereinigung für Theoretische und Angewandte Limnologie* 27: 616-619.
- Laffaille, P., Feunteun, E., Baisez, A., Robinet, T., Acou, A., Legault, A., Lek, S., 2003.** Spatial organisation of European eel (*Anguilla anguilla* L.) in a small catchment. *Ecology of Freshwater Fish* 12:254-264.
- Laffaille, P., Baisez, A., Feunteun, E., Rigault, C., 2004.** Habitat preferences of different European eel size classes in a reclaimed marsh: a contribution to species and ecosystem conservation. *Wetlands* 24: 642-651.
- Laffaille, P., Rigaud, C., 2008.** Indicateurs de colonisation et de sédentarisation. *In* L'anguille européenne – Indicateurs d'abondance et de colonisation. Adam, G., Feunteun, E., Prouzet, P., Rigaud, C. (Eds.), 275-330.
- Lagadic L., Caquet T., Amiard J.C., 1997.** Biomarqueur en Ecotoxicologie : Principes et définitions. *In* Lagadic L., Caquet T., Amiard J.C. et Ramade F. (Eds.). *Biomarqueurs en Ecotoxicologie : Aspects fondamentaux*. Masson, Paris, 1-9.
- Lambert Y, Dutil, J-D ,1997.** Can simple condition indices be used to monitor and quantify seasonal changes in the energy reserves of cod (*Gadus morhua*)? *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 54: 104-112
- Lambert, P., Rigaud, C., 1999.** Recherche d'éléments de gestion de la population d'anguille sur la base de données produite par la RHP. Rapport final. Convention d'étude CSP-Cemagref n° 97 420, n°49, 63p.
- Lamothe, P.J., Gallagher, M., Chivers, D.P., Moring, J.R., 2000.** Homing and movement of yellow-phase American eels in freshwater ponds. *Environmental Biology of Fishes* 58: 393-399.
- Langon, M., Dartiguelongue, J., 1997.** La dévalaison des anguilles (*Anguilla anguilla*) argentées. Test de deux exutoires de dévalaison à la centrale électrique E.D.F. d'Halsou (Nive-64). Rapport SCEAA, Toulouse, 100p.

- Langston, W. J., Chesman, B. S., Burt, G. R., Pope, N. D., McEvoy, J., 2002.** Metallothionein in liver of eels *Anguilla anguilla* from the Thames Estuary: An indicator of environmental quality? *Marine Environmental Research* 53: 263–293.
- Larinier, M., Dartiguelongue, J., 1989.** La circulation des poissons migrateurs : le transit à travers les turbines des installations hydroélectriques. *Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture* 312/313: 1-90.
- Larsson, P., Hamrin, S., Okla, L., 1990.** Fat content as a factor inducing migratory behavior in the eel (*Anguilla anguilla* L.) to the Sargasso Sea. *Naturwissenschaften* 77: 488-490.
- Larsson, P., Hamrin, S., Okla, L., 1991.** Factors determining the uptake of persistent pollutants in an eel population (*Anguilla anguilla* L.). *Environmental Pollution* 69: 39-50.
- Lazareth, C. E., Van Der Putten, E., André, L., Dehairs, F., 2003.** High-resolution trace element profiles in shells of the mangrove bivalves *Isognomon ehippium*: a record of environmental spatio-temporal variations. *Estuarine, Coastal and Shell Science* 57: 1103-1114.
- Lea, D. W., Shen, G. T., Boyle, E. A., 1989.** Coralline barium records temporal variability in equatorial Pacific upwelling. *Nature* 340: 373-376.
- Leaner, J.J., Mason, R.P., 2002.** Methylmercury accumulation and fluxes across the intestine of channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology – C – Toxicology and Pharmacology* 132(2):247-259.
- Léauté, J.-P., Caill-Milly, N., 2003.** Caractéristiques des petites pêches côtières et estuariennes de la Côte atlantique du Sud de l'Europe. Synthèse du Programme Pecosude. Ifremer, Bilans et prospectives, 66p.
- Leaver, M.J., Burke, M.D., George, S.G., Davis, J.M., Raffaelli, D., 1988.** Induction of cytochrome P-450 monooxygenase activities in plaice by 'model' inducers and drilling muds. *Marine Environment* 24: 27-30.
- Lecomte-Finiger, R., Yahyaoui, A., 1989.** La microstructure de l'otolithe au service de la connaissance et du développement larvaire de l'anguille européenne *Anguilla anguilla*. *CR de l'Académie des Sciences Paris* 308: 1-7.
- Lecomte-Finiger, R., 1992.** Situation actuelle des méthodes d'évaluation de l'âge de l'anguille, *Anguilla anguilla*. Tissus durs et âge des vertébrés. J. L. Baglinière, Castanet, J., Conand, F., Meunier, F.J. Paris, ORSTOM, INRA: 103-108.
- Lecomte-Finiger, R., 1992.** Growth history and age at recruitment of European glass eels (*Anguilla anguilla*) as revealed by otolith microstructure. *Marine Biology* 114: 205-210.

- Lecomte-Finiger, R., 1994.** Contribution de l'otolithométrie à l'étude de la dynamique de la migration larvaire de l'anguille européenne *Anguilla anguilla*. Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture 335: 17-31.
- Lesca, P., Pineau, T., 1999.** Toxicité de la dioxine : rôles des protéines PAS. Médecine/Sciences 15 : 1379-1387.
- Li, Y. H. and Chan, L. H., 1979.** Desorption of Ba and ²²⁶Ra from river-borne sediments in the Hudson estuary. Earth and Planetary Science Letters 43(343-350).
- Libes, S.M., 1992.** An introduction to marine biogeochemistry. John Wiley and Sons (Eds), 752p.
- Limburg, K. E., 1995.** Otolith strontium traces environmental history of subyearling American shad *Alosa sapidissima*. Marine Ecology Progress Series 119(1-3): 25-36.
- Limburg, K. E., Landergren, P., Westin, L., Elfman, M. and Kristiansson, P., 2001.** Flexible modes of anadromy in Baltic sea trout: Making the most of marginal spawning streams. Journal of Fish Biology 59(3): 682-695.
- Limburg, K. E., Wickström, H., Svedäng, H., Elfman, M., Kristiansson, P., 2003.** Do Stocked Freshwater Eels Migrate? Evidence from the Baltic Suggests "Yes". American Fisheries Society Symposium 33: 275-284.
- Lin, S.-H., Chang, C.-W., Iizuka, Y. and Tzeng, W.-N., 2007.** Salinities, not diets, affect strontium/calcium ratios in otoliths of *Anguilla japonica*. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 341(2): 254-26
- Linde A.R., Arribas P., Sanchez-Galan S., Garcia-Vasquez E., 1996.** Eel (*Anguilla anguilla*) and brown trout (*Salmo trutta*) target species to assess the biological impact of trace metal pollution in freshwater ecosystems. Archives of Environmental Contamination and Toxicology 31: 297-302.
- Linde, A.R., Sánchez-Galán, S., Klein, D., Garcia-Vázquez, E., Summer, K.H., 1999.** Metallothionein and Heavy Metals in Brown Trout (*Salmo trutta*) and European Eel (*Anguilla anguilla*): A Comparative Study. Ecotoxicology and Environmental Safety 44: 168-173.
- Liu, H., Mao, X.L., Mao, S.S., Zeng, X., Greif, R., Russo, R.E., 2004.** Nanosecond and Femtosecond Laser Ablation of Brass : Particulate and ICPMS Measurements. Analytical Chemistry 76: 379-383.
- Lochner, F., Appleton, J., Keenan, F., Cooke, M., 1999.** Multi-element profiling of human deciduous teeth by laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry. Analytica Chimica Acta 401: 299-306.

Lorrain, A., Gillikin, D.P., Paulet, Y.-M., Chauvaud, L., Le Mercier, A., Navez, J., André, L., 2005. Strong kinetic effects on Sr/Ca ratios in the calcitic bivalve *Pecten maximus*. *Geology* 33: 965-968.

-M-

Mackay, D, and Fraser, A, 2000. Bioaccumulation of persistent organic chemicals: mechanisms and models. *Environmental Pollution* 110: 375-391.

MacLeave, J.D., Brikley, P.J, O'Brien, K.M., Kistner, D.A., Wong, M.W., Gallagher, M., Watson, S.M., 1998. Do leptocephali of the European eel swim to reach continental waters ? Status of the question. *Journal of the Marine Biological Association of the UK* 78: 285-306.

Maes, G.E., Raeymaekers, J.A.M., Pampoulie, C., Seynaeve, A., Goemans, G., Belpaire, C., Volckaert, F.A.M., 2005. The Catadromous European Eel *Anguilla Anguilla* (L.) as a Model for Freshwater Evolutionary Ecotoxicology: Relationship between Heavy Metal Bioaccumulation, Condition and Genetic Variability. *Aquatic Toxicology* 73: 99-114.

Maes, G.E., Belpaire, C., Goemans, G., 2008. Spatial variations and temporal trends between 1994 and 2005 in polychlorinated biphenyls, organochlorine pesticides and heavy metals in European eel (*Anguilla anguilla* L.) in Flanders, Belgium. *Environmental Pollution* 153(1): 223-237.

Maguire, R.J., Sibley, P.K., Solomon, K.R., Delorme, P., 2001. Menaces pour les sources d'eau potable et les écosystèmes aquatiques au Canada. Rapport d'évaluation scientifique de l'INRE 1 :1-100.

Mahata, S.C., Mitsuo, R., Aoki, J.Y., Kato, H., Itakura, T., 2003. Two forms of cytochrome P450 cDNA from 3-methylcholanthrene-treated European eel *Anguilla anguilla*. *Fish Science* 69: 615-624.

Mancini, L., Caimi, S., Ciardullo, S., Zeiner, M., Bottoni, P., Tancioni L., Cautadella, S., Carola, S., 2005. A pilot study of the contents of selected pollutants in fish from the River Tiber (Rome). *Microchemical Journal* 79: 171-175.

Margetic, V., Niemax, K., Hergenröder, R., 2003. Application of femtosecond laser ablation time-of-flight mass spectrometry to in-depth multilayer analysis. *Analytical Chemistry* 75:3435-3439.

Maria, V.L., Correia, A.C., Santos, M.A., 2002. *Anguilla anguilla* L. Biochemical and Genotoxic Responses to Benzo[a]pyrene. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 53: 86-92.

Martin, G. B., Thorrold, S. R. and Jones, C. M., 2004. Temperature and salinity effects on strontium incorporation in otoliths of larval spot (*Leiostomus xanthurus*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 61(1): 34-42.

- Marty, S., 2005.** Rapport d'étape – Réseau ANGUILE 2004. Convention de collaboration technique et financière. Institution Adour – MIGRADOIR, 87p.
- Mason, C.P., 1993.** Organochlorine pesticide residues and PCBs in eels *Anguilla anguilla* from the British reedbeds. *Chemosphere* 26: 2289-2292.
- Mason, R.P., Reinfelder, J.R., Morel, F.M., 1996.** Uptake, Toxicity, and Trophic Transfer of Mercury in a Coastal Diatom. *Environmental Science and Toxicology* 30: 1835-1845.
- Masse, J., and Rigaud, C., 1998.** Anguille et marais littoraux atlantiques. « Marais maritimes et aquaculture. Exploitation durable des zones humides littorales », Collection Ifremer-Actes de colloque 19: 141-153.
- Masson, M., Blanc, G., Schäfer, J., 2006.** Geochemical signals and source contributions to heavy metal (Cd, Zn, Pb, Cu) fluxes into the Gironde Estuary via its major tributaries. *Science of the Total Environment* 370: 133-146.
- McCleave, J.D., 1993.** Physical and behavioural control on the oceanic distribution and migration of leptocephali. *Journal of Fish Biology* 43: 243-273.
- McCleave, J.D., 2008.** Contrasts between spawning times of *Anguilla* species estimated from larval sampling at sea and from otolith analysis of recruiting glass eels. *Marine Biology* 155(3)249-262.
- McCulloch, M., Mortimer, G., Esat, T., Xianhua, L., Pillans, B., Chappell, J., 1996.** High resolution windows into early Holocene climate: Sr/Ca coral records from the Huon Peninsula. *Earth and Planetary Science Letters* 138(1-4): 169-178.
- McCulloch, M., Fallon, S., Wyndham, T., Hendy, E., Lough, J. and Barnes, D., 2003.** Coral record of increased sediment flux to the inner Great Barrier Reef since European settlement. *Nature* 421(6924): 727-730.
- McGeer, J.C., Szebedinszky, C., McDonald, D.G., Wood, C.M., 2000 (a).** Effects of chronic sublethal exposure to waterborne Cu, Cd or Zn in rainbow trout 1: Iono-regulatory disturbance and metabolic costs. *Aquatic Toxicology* 50: 231-243.
- McGeer, J.C., Szebedinszky, C., McDonald, D.G., Wood, C.M., 2000 (b).** Effects of chronic sublethal exposure to waterborne Cu, Cd or Zn in rainbow trout 2: tissue specific metal accumulation. *Aquatic Toxicology* 50: 245-256.
- Melancon, S., Fryer, B. J., Ludsin, S. A., Gagnon, J. E. and Yang, Z., 2005.** Effects of crystal structure on the uptake of metals by lake trout (*Salvelinus namaycush*) otoliths. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 62(11): 2609-2619.
- Melia, P., Bevacqua, D., Crivelli, A.J., de Leo, G.A., Panfili, J., Gatto, M., 2006.** Age and growth of *Anguilla anguilla* in the Camargue lagoons. *Journal of Fish Biology* 68:876-890.

- MIGADO, 2007.** Plan de gestion anguille de la France – Application du règlement R(CE) n° 1/2007 du 18 septembre 2007. Volet local de l'unité de gestion Adour. 1-36.
- Miller, M.A., 1993.** Maternal transfert of organochlorine compounds in salmonides to their eggs. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 50:1405-1413.
- Miller, H.C., Mills, G.N., Bembo, D.G., MacDonald, J.A., Evans, C.W., 1999.** Induction of cytochrome P4501A (CYP1A) in *Trematomus bernacchii* as an indicator of environmental pollution in Antarctica: assessment by quantitative RT-PCR. Aquatic Toxicology 44: 183-193.
- Millero, F.J., 2006.** Chemical Oceanography, Third Edition. CRC Press, Taylor and Francis, 496p.
- Millward, G.E., Turner, A., 1995.** Trace elements in estuaries. In Trace Metals in natural waters. Salbu, B., and Steinnes, E. (Eds). CRC Press, Boca Raton. pp 223-245.
- Milton, D. A., and Chenery, S.R., 2001.** Sources and uptake of trace metals in otoliths of juvenile barramundi (*Lates calcarifer*). Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 264(1): 47-65.
- Milton, D. A., and Chenery, S.R., 2005.** Movement patterns of barramundi *Lates calcarifer*, inferred from ⁸⁷Sr/⁸⁶Sr and Sr/Ca ratios in otoliths, indicate non-participation in spawning. Marine Ecology Progress Series 301: 279-291.
- Milton, D., Halliday, I., Sellin, M., Marsh, R., Staunton-Smith, J. and Woodhead, J., 2008.** The effect of habitat and environmental history on otolith chemistry of barramundi *Lates calcarifer* in estuarine populations of a regulated tropical river. Estuarine, Coastal and Shelf Science 78(2): 301-315.
- Möbius, K., 1877 (cité par Arnaud et Emig, 1986).** Die Auster und die Austerwirtschaft. Berlin, Wiegandt, Hempel et Parey, 126p.
- Monod, G., 1997.** L'induction du cytochrome P4501A1. In Biomarqueurs en écotoxicologie. Masson (eds), Paris, 33-51.
- Monperrus, M., Point, D., Grall, J., Chauvaud, L., Amouroux, D., Bareille, G., Donard O., 2005.** Determination of metal and organometal trophic bioaccumulation in the benthic macrofauna of the Adour estuary coastal zone (SW France, Bay of Biscay). Journal of Environmental Monitoring 7: 1-9.
- Moore, W. S. and Shaw, T. J., 2008.** Fluxes and behavior of radium isotopes, barium, and uranium in seven Southeastern US rivers and estuaries. Marine Chemistry 108(3-4): 236-254.
- Morales-Nin, B., 1987.** Ultrastructure of the organic and inorganic constituents of the otolith of the sea bass. In : Age and growth of fish. Summerfelt, R.C., Hall, G.E. (Eds). Ames, Iowa, USA: Iowa State University Press, 331-343.

- Morales-Nin, B., and Panfili, J., 2002.** Estimation de l'âge. In Manuel de Sclérochronologie des poissons. Panfili, J., De Pontual, H., Troadec, H., Wright, P.J. (eds). IFREMER-IRD, 91-99.
- Morandau, G., Casamajor (De), M.-N., Cail-Milly, N., 2009.** Pêche maritime dans le bassin de l'Adour et les courants côtiers landais en 2007 (saison civile 2007/2008). Rapport Ifremer, 41p.
- Morat, F., Betouille, S., Robert, M., Thailly, A. F., Biagianti-Risbourg, S. and Lecomte-Finiger, R., 2008.** What can otolith examination tell us about the level of perturbations of Salmonid fish from the Kerguelen Islands? Ecology of Freshwater Fish 17(4): 617-627.
- Morel, F.M.M., and Hering, J.G., 1993.** Principles and applications of aquatic chemistry. Wiley-Interscience publication.
- Moreno, M.J., Pacheco-Arjona, J., Rodriguez-González, P., Preud'homme, H., Amouroux, D., Donard, O.F.X., 2006.** Simultaneous determination of monomethylmercury, monobutyltin, dibutyltin and tributyltin in environmental samples by multi-elemental species-specific isotope dilution analysis using electron ionisation GC-MS. Journal of Mass Spectrometry 41: 1491-1497.
- Moriarty, C., 1996.** Variation in numbers of eels *Anguilla Anguilla* caught by constant effort in a lake, 1981-1994. Ecology of Freshwater Fish 5: 148-152.
- Moriarty C., and Dekker W., (Eds) 1997.** Management of European eel fisheries. Irish Fisheries Bulletin 15, p108.
- Moriarty, C., 1999.** Strategy for the development of the eel fishery in Ireland. Irish Fisheries Bulletin 19: 1-47.
- Mormede, S., and Davies, I. M., 2001.** Trace elements in deep-water fish species from the Rockall Trough. Fisheries Research 51(2-3): 197-206.
- Morrison, W. E. and Secor, D. H., 2003.** Demographic attributes of yellow-phase American eels (*Anguilla rostrata*) in the Hudson River estuary. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 60(12): 1487-1501.
- Morrisson, W.E., Secor, D.H., Piccoli, P.M., 2003.** Estuarine habitat use by Hudson river American eels as determined by otolith Strontium:Calcium ratios. In Dixon, D.A. Ed. Biology, management and protection of catadromous eels. American Fisheries Society, Symposium 33, Bethesda, p. 87-100.
- Morrisson, W. E., Secor, D.H., 2004.** Abundance of yellow-phase American eels in the Hudson River estuary. Transaction of the American Fisheries Society 133: 896-910.
- Morse, J. W., and Bender, M. L., 1990.** Partition coefficients in calcite: examination of factors influencing the validity of experimental results and their application to natural systems. Chemical Geology 82: 265-277.

- Mounaix, B., 1992.** Intercalibration et validation des méthodes d'estimation d'âge chez l'anguille européenne (*A. anguilla*). Application du bassin versant de la Vilaine. Thèse ENSA Rennes, 146p.
- Mounaix, B., and Fontenelle, G., 1994.** Anguille estuariennes et fluviales : apports de l'otolithométrie. Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture 335: 67-80.
- Müller, W., Alt, K. W., Bondioli, L., Gulson, B. 2006.** High-resolution records of past and modern Pb exposure: Laser-ablation ICPMS profiles from tooth enamel. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 70(18, Supplement 1): A436.
- Mugiya, Y., Hirabayashi, S., Ohsawa, T., 1985.** Microradiography of otoliths and vertebral centra in the flatfish *Limanda herzensteini*: hypermineralization in the hyaline zone. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 51: 219-225.

-N-

- Nägler, T. F., Eisenhauer, A., Müller, A., Hemleben, C., and Kramers, J., 2000.** The $\delta^{44}\text{Ca}$ -temperature calibration on fossil and cultured *Globigerinoides sacculifer*: New tool for reconstruction of past sea surface temperatures. *Geochemistry, Geophysics, Geosystems* 1(9): 1052.
- Nebert, D.W., 1991.** Proposed role of drug-metabolizing enzymes: regulation of steady state levels of the ligands that effect growth, homeostasis, differentiation, and neuroendocrine functions. *Molecular Endocrinology* 5: 1203-1214.
- Nelson, D.R., Kamataki, T., Waxman, D., Guengerich, F.P., Estabrook, R.W., Feyereisen, R., Gonzalez, F.J., Coon, M.J., Gunsalus, I.C., Gotoh, O., Okuda, K., Nebert, D.W., 1993.** The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature. *DNA Cellular Biology* 12: 1-51.
- Neveu, A., 1981.** Variations saisonnières et journalières de l'alimentation de l'anguille (*Anguilla anguilla* L.) dans des conditions naturelles. *Oecology Applic.* 2: 99-116.
- Ney J.J., and Van Hassel J.H., 1983.** Sources of variability in accumulation of heavy metals by fishes in a Roadside Stream. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 12 : 701-706.
- Nilo, P., and Fortin, R., 2001.** Synthèse des connaissances et établissement d'une programmation de recherche sur l'anguille d'Amérique (*Anguilla rostrata*). Univ. Du Québec à Montréal, Dépt Sciences biologiques pour la Société de la faune et des parcs du Québec, Direction de la recherche sur la faune, Québec, 298p.

Noël-Lambot, F., Gerday, C., Distèche, A., 1978. Distribution of Cd, Zn and Cu in liver and gills of the eel *Anguilla anguilla* with special reference to metallothioneins. *Comparative Biochemistry and Physiology* 61C: 177-187.

Nordberg, G., 1996. Human cadmium exposure in the general environment and related health risks. *In* Sources of cadmium in the environment. OECD, Paris, 482p.

-O-

Ogino, Y., Itakura, T., Kato, H., Aoki, J., Sato, M., 1999. Functional analysis of promoter region from eel cytochrome P450 1A1 gene in transgenic medaka. *Marine Biotechnology* 1: 364-370.

Oliveira, K., 1997. Movements and growth rates of yellow-phase American eels in the Annaquatucket River, Rhode Island. *Transaction of the American Fisheries Society* 126: 638-646.

Oliveira Ribeiro, C.A., Pelletier, E., Pfeiffer, W.C., Rouleau, C., 2000. Comparative uptake, bioaccumulation, and gill damages of inorganic mercury in tropical and nordic freshwater fish. *Environmental Research* 83: 286-292.

Oliveira Ribeiro, C.A., Schatzmann, M., Silva de Assis, H.C., Silva, P.H., Pelletier, E., Akaishi, F.M., 2002. Evaluation of tributyltin subchronic effects in tropical freshwater fish (*Astyanax bimaculatus*, Linnaeus, 1758). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 51: 161-167.

Oliveira Ribeiro, C. A., Voltaire, Y., Sanchez-Chardi, A., Roche, H., 2005. Bioaccumulation and the effects of organochlorine pesticides, PAH and heavy metals in the Eel (*Anguilla anguilla*) at the Camargue Nature Reserve, France. *Aquatic Toxicology* 74(1): 53-69.

Olsson, I.C., and Greenberg, L.A., 2004. Partial migration in a landlocked brown trout population. *Journal of Fish Biology* 65: 106-121.

Olsson, I.C., Greenberg, L.A., Bergman, E., Wysujack, K., 2006. Environmentally induced migration: the importance of food. *Ecology Letters* 9: 645-651.

Omura, T., and Sato, R., 1964. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. *Journal of Biological Chemistry* 239: 2370-2378.

Omura, T., 1999. Forty years of Cytochrome P450. *Biochemistry and Biophysics Research Communications* 266: 690-698.

Orr, J. C., Fabry, V. J., Aumont, O., Bopp, L., Doney, S. C., Feely, R. A., Gnanadesikan, A., Gruber, N., Ishida, A., Joos, F., Key, R. M., Lindsay, K., Maier-Reimer, E., Matear, R., Monfray, P., Mouchet, A., Najjar, R. G., Plattner, G.-K., Rodgers, K. B., Sabine, C. L., Sarmiento, J. L., Schlitzer, R., Slater, R. D., Totterdell, I. J., Weirig, M.-F., Yamanaka, Y., Yool, A., 2005.

Anthropogenic ocean acidification over the twenty-first century and its impact on calcifying organisms. *Nature* 437: 681-686.

Otake, T., Ishii, T., I., Nakahara, M. and Nakamura, R., 1997. Changes in otolith strontium:calcium ratios in metamorphosing *Conger myrisaster leptocephali*. *Marine Biology* 128: 565-572.

Outridge, P. M., Evans, R. D., Wagemann, R., Stewart, R. E. A., 1997. Historical trends of heavy metals and stable lead isotopes in beluga (*Delphinapterus leucas*) and walrus (*Odebenus rosmarus rosmarus*) in the Canadian arctic. *The Science of Total Environment* 203: 209-219.

-P-

Pacheco, M., and Santos, M.A., 1998. Induction of Liver EROD and Erythrocytic Nuclear Abnormalities by Cyclophosphamide and PAHs in *Anguilla anguilla* L.. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 40: 71-76.

Pajuelo J.G., and Lorenzo J.M., 2002. Growth and age estimation of *Diplodus sargus cadenati* (Sparidae) off the Canary Islands. *Fisheries Research* 59: 93-100.

Palstra, A.P., van Ginneken, V.J.T., Mürk, A.J., van den Thillart, G.E.E.J.M., 2006. Are dioxin-like contaminants responsible for the eel (*Anguilla anguilla*) drama? *Naturwissenschaften* 93: 145-148.

Palstra, A.P., Heppener, D.F.M., van Ginneken, V.J.T., Székely, C., van den Thillart, G.E.E.J.M., 2007. Swimming performance of silver eels is severely impaired by the swim-bladder parasite *Anguillicola crassus*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 352(1): 244-256.

Pannella, G., 1971. Fish otoliths: daily growth layers and periodical patterns. *Science* 173: 1124-1127.

Panfili, J., and Ximénés, M.-C., 1994. Evaluation de l'âge et de la croissance de l'anguille européenne (*Anguilla anguilla* L.) en milieu continental : méthodologies, validation, application en Méditerranée et comparaison en Europe. *Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture* 335: 43-66.

Panfili, J., Pontual (de), H., Troadec, H., Wright, P.J. (ed), 2002. Manuel de sclérochronologie des Poissons. Ifremer-IRD, Rennes 463p.

Parker, S.J., 1995. Homing ability and home range of yellow-phase American eels in a tidally dominated estuary. *Journal of the Marine Biology Association U.K.* 75:127-140.

Payne J.F., and Penrose W.R., 1975. Induction of aryl hydrocarbon (benzo[a]pyrene) hydroxylase in fish by petroleum. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 14: 112-116.

Pease, B.C., Reynolds, J.D., Walsh, C.T., 2003. Validation of otolith age determination in Australian longfinned river eels, *Anguilla reinhardtii*. *Marine and Freshwater Research* 54: 995-1004.

- Pécheyan, C., Cany, S, Donard, O.F.X., 2005.** Ablation laser femtoseconde à haute cadence de tir et basse énergie couplée à une détection ICP-MS: résultats préliminaires. *Canadian Journal of Analytical Sciences and Spectroscopy* 50: 228-239.
- Pécheyan, C., Cany, S, Chabassier, P., Mottay, E., Donard, O.F.X., 2007.** High repetition rate and low energy femtosecond laser ablation coupled to ICPMS detection: a new analytical approach for trace element determination in solid samples. *Journal of Physics: Conference series*, 59:112-117.
- Pedlar, R.M., and Klaverkamp, J.F., 2002.** Accumulation and distribution of dietary arsenic in Lake Whitefish (*Coregonus clupeaformis*). *Aquatic Toxicology* 57(3):153-66.
- Pfaffl, MW. 2001.** A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 29(9):2002–2007.
- Philipps, D.J.H., 1977.** The use of biological indicator organisms to monitor trace metal pollution in marine and estuarine environments – a review. *Environmental Pollution* 13: 281-317.
- Pierron, F., Baudrimont, M., Lucia, M., Durrieu, G., Massabuau, J.-C., Elie, P., 2008.** Cadmium uptake by the European eel: Trophic transfer in field and experimental investigations. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 70(1): 10-19.
- Picar, J., 1985.** Réflexions sur les écosystèmes marins benthiques : hiérarchisation, dynamique spatio-temporelle. *Téthys* 11(3/4) : 230-242.
- Pisonero, J., Fliegel, D., Günther, D., 2006.** High efficiency aerosol dispersion cell for laser ablation-ICP-MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 21: 922-931.
- Point, D., Bareille, G., Stoichev, Amouroux, D., Donard, O.F.X., 2003.** Trace metals inputs in the Adour urban estuary: Influence and impact of human pressure. *Journal de Physique. IV : JP.* 107(2): 1071-1074.
- Point, D., 2004.** Spéciation et biogéochimie des éléments traces métalliques dans l'estuaire de l'Adour. Thèse de l'Université de Pau et des Pays de l'Adour, spécialité environnement et matériaux, soutenue le 25 novembre 2004 à Pau, 344p.
- Point, D., Bareille, G., Amouroux, D., Etcheber, H., Donard, O.F.X., 2007.** Reactivity, interactions and transport of trace elements, organic carbon and particulate material in a mountain range river system (Adour River, France). *Journal of Environmental Monitoring* 9(2): 157-167.
- Poitrasson, F., Mao, X., Mao S.S., Freydier R., Russo R.E., 2003.** Comparison of Ultraviolet Femtosecond and Nanosecond Laser Ablation Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry Analysis in Glass, Monazite, and Zircon. *Analytical Chemistry.* 75: 6184-6190.
- Popper, A.N., Fay, R.R., 1993.** Sound detection and processing by fish: critical review and major research questions. *Brain Behavior and evolution* 50: 13-221.

- Poulos, T.L., Finezl, B.C., Gunsalus, I.C., Wagnre, G.C., Kraut, J., 1985.** The 2.6-Å crystal structure of *Pseudomonas putida* cytochrome P-450. *Journal of Biological Chemistry* 260: 16122-16130.
- Prosi, F., 1979.** Heavy metals in aquatic organisms. In: Förstner U and Wittmann GTW (eds.) *Metal Pollution in the Aquatic Environment*. Springer-Verlag, Berlin, Germany. 271-323.
- Prouzet P. [coordinateur] 2002.** Historique des captures de civelles, intensité de leur exploitation, variation de leur capturabilité par la pêche professionnelle maritime et indices de colonisation sur le bassin versant de l'Adour ». Contrat EC/DG FISH (DG XIV) 99/023, 147 p.
- Prouzet, P. (coordinateur), 2003.** Etude de la civelle (*Anguilla anguilla*) dans l'estuaire de l'Adour : Pêche, biologie, comportement. Modélisations hydrodynamique et comportementale. Estimation des flux de civelles en estuaire. Rapport de contrat Ifremer/DRV/RH-LA – Agence de l'Eau Adour – Garonne – MEDAD- Institution Adour, 295p. Disponible sur <http://www.ifremer.fr/indicang/boite-bassins-versants/pdf/prog-amphihalins-civelle.pdf>
- Prouzet, P., 2006.** Impact des facteurs anthropiques et naturels sur le fonctionnement de quelques populations halieutiques. Nécessité d'une approche écosystémique pour une gestion intégrée de ces ressources halieutiques. Mémoire présenté pour l'obtention de l'Habilitation à Diriger des Recherches, spécialité : Biologie de l'Environnement. Soutenue le 6 décembre 2006 à l'Université de Pau et des Pays de l'Adour, Anglet, 144p.
- Prouzet, P., Bouvet, J.-C., Bru, N., Boussouar, A., 2008.** Quantification de la biomasse de civelles (*Anguilla anguilla*) dans l'estuaire de la Loire et estimation du taux d'exploitation saisonnier de la pêche professionnelle pour les saisons de pêche 2003 à 2005. Rapport Indicang, 45p. Disponible sur <http://www.ifremer.fr/indicang/boite-bassins-versants/pdf/rapport-final-pecherie-bv-gironde.pdf>

-Q-

- Quéro, J.C., and Vayne, J.J., 2005.** Les poissons de mer des pêches françaises. Delachaux et Niestlé, pp.86-88.

-R-

- Rainbow, P.S., 2006.** Biomonitoring of trace metals in estuarine and marine environments. *Australian Journal of Ecotoxicology* 12: 107-122.
- Raith, A., Perkins, W. T., Pearce, N. J. G., Jeffries, T. E., 1996.** Environmental monitoring on shellfish using UV laser ablation ICP-MS. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 355: 789-792.

- Rao, L.M., Padmaja, G., 2000.** Bioaccumulation of heavy metals in *M. cyprinoids* from the harbour waters of Visakhapatnam. *Bulletin of Pure Applied Science* 19A(2): 77-85.
- Redmayne, A.C., Kim J.P., Closs, G.P., Hunter, K.A., 2000.** Methyl mercury bioaccumulation in long-finned eels, *Anguilla dieffenbachia*, from the three rivers in Otago, New Zealand. *The Science of the Total Environment* 262: 37-47.
- Rees, C.B., McCormick, S.D., Vanden Heuvel, J.P., Li, W., 2003.** Quantitative PCR analysis of CYP1A1 induction in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquatic Toxicology* 62: 67-78.
- Rees, C.B., McCormick, S.D., Li, W., 2005.** A non-lethal method to estimate CYP1A expression in laboratory and wild Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Comparative Biochemistry and Physiology C* 141: 217-224.
- Reibisch, J., 1899.** Ueber die Einzahl bei *Pleuronectes platessa* und die Alterbestimmung dieser Form aus den Otolithen. *Wissenschaftliche Meeruntersuchungen (Kiel)* 4: 233-248.
- Reuer, M. K., Boyle, E. A., Cole, J. E., 2003.** A mid-twentieth century reduction in tropical upwelling inferred from coralline trace element proxies. *Earth and Planetary Science Letters* 210: 437-452.
- Réveillac, E., Feunteun, E., Gagnaire, P.A., Berrebi, P., Bosc, P., Lecomte-Finiger, R., Robinet, T., 2008.** *Anguilla marmorata* larval migration plasticity as revealed by otolith microstructural analysis. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 65(10): 2127-2137.
- Reynaud, S., Marrionet, D., Taysse, L., Deschaux, P., 2005.** Interleukin-1alpha and tumor necrosis factor alpha modulate cytochrome P450 activities in carp (*Cyprinus carpio*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 62: 355-362.
- Ribeiro, C.A.R., Voltaire, Y., Sanchez-Chardi, A., Roche, H., 2005.** Bioaccumulation and the effects of organochlorine pesticides, PAH and heavy metals in the Eels (*Anguilla anguilla*) at the Camargue nature reserve, France. *Aquatic Toxicology* 74: 5-69.
- Richardson, C. A. 1987.** Microgrowth patterns in the shell of the Malaysian cockle *Anadara granosa* (L.) and their use in age determination. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 111(1): 77-98.
- Richardson, C. A., Chenery, S. R. N., Cook, J. M., 2001.** Assessing the history of trace metal (Cu, Zn, Pb) contamination in the North sea through laser ablation ICP-MS of horse mussel *Modiolus modiolus* shells. *Marine Ecology Progress Series* 211: 157-167.
- Richardson, C. A., Peharda, M., Kennedy, H., Kennedy, P., Onofri, V., 2004.** Age, growth rate and season of recruitment of *Pinna nobilis* (L) in the Croatian Adriatic determined from Mg:Ca and Sr:Ca shells profiles. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 299: 1-16.

- Ricker, W.E., 1975.** Computation and interpretation of the biological statistics of fish populations. Bulletin of the Fisheries Research Board of Canada 191: 1–382.
- Ricoux C., Gasztwott B., 2005.** Evaluation des risques sanitaires liés à l'exposition de forts consommateurs de produits de la pêche de rivière contaminés par des toxiques de l'environnement. Rapport du CIRE, p72.
- Rietzler, A.C., Fonseca, A.L., Lopes, G.P., 2001.** Heavy metals in tributaries of Pampulha reservoir. Minas Gerais. Brazilian Journal of Biology 61: 363-370.
- Rigaud, C., Lafaille, P., Prouzet, P., Feunteun, E., Diaz, E., Castellano, J., De Casamajor, M.-N., 2008.** Des compléments sur la biologie. In L'anguille européenne : indicateurs d'abondance et de colonisation. Adam, G., Feunteun, E., Prouzet, P., Rigaud, C. (Eds). Edition QUAE, 393p.
- Rimstidt, J. D., A. Balog, and J. Webb. 1998.** Distribution of trace element between carbonate minerals and aqueous solutions. Geochimica et Cosmochimica Acta 62: 1851-1863.
- Robbe, D., Marchandise, P., Gouleau, D., 1985.** Métaux lourds dans les sédiments de l'estuaire de la Loire. Water research, 19:1555-1563.
- Robinet, T., and Feunteun, E., 2002.** Sublethal Effects of Exposure to Chemical Compounds: A cause for the Decline in Atlantic Eels? Ecotoxicology 11: 265-277.
- Robins, C.R., Cohen, D.M., Robins, C.H., 1979.** The eels, *Anguilla* and *Histobranchus*, photographed on the floor of the deep Atlantic in the Bahamas. Bulletin of Marine Science 29:401-445.
- Robinson, W.R., Peters, R.H., Zimmerman, J., 1983.** The effects of body size and temperature on metabolic rate of organisms. Canadian Journal of Zoology 61: 281-288.
- Roche, H., Buet, A., Ramade, F., 2002.** Accumulation of lipophilic microcontaminants and biochemical responses in eels from the Camargue Biosphere Reserve. Ecotoxicology 11: 155-164.
- Rodriguez Martin-Doimeadios, R.C., Tessier, E., Amouroux, D., Guyoneaud, R., Duran, R., Caumette P., Donard, O.F.X., 2004.** Mercury methylation/demethylation and volatilization pathways in estuarine sediment slurries using species-specific enriched stable isotopes. Marine Chemistry 90: 107-123.
- Roling, J.A., Bain, L.J., Baldwin, W.S., 2004.** Differential gene expression in mummichogs (*Fundulus heteroclitus*) following treatment with pyrene: comparison to a creosote contaminated site. Marine Environmental Research 57: 377-395.
- Rooker, J.R., Secor, D.H., DeMetrio, G., Schloesser, R., Block, B.A., Neilson, J.D., 2008.** Natal Homing and Connectivity in Atlantic Bluefin Tuna Populations. Science 322: 742-744.
- Rosenheim, B. E., P. K. Swart, and S. R. Thorrold. 2005.** Minor and trace elements in sclerosponge *Ceratoporella nicholsoni*: Biogenic aragonite near the inorganic endmember? Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology 228: 109-129.

- Saquet M., Halden N.M., Babaluk J., Campbell J.L., Nejedly Z., 2002.** Micro-PIXE analysis of trace element variation in otoliths from fish collected near acid mine tailings: Potential for monitoring contaminant dispersal. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B* 189 : 196-201.
- Sano, Y., Shirai, K., Takahata, N., Amakawa, H., Otake, T., 2008.** Ion microprobe Sr isotope analysis of carbonates with about 5 µm spatial resolution: An example from ayu otolith. *Applied Geochemistry* 23(8): 2406-2413.
- Santschi, P.H., Presley, B.J., Wade, T.L., Garcia-Romero, B., Baskaran, M., 2001.** Historical contamination of HAPs, PCBs, DDTs, and heavy metals in Mississippi River delta, Galveston bay and Tampa bay sediments. *Marine Environmental Research* 52: 51-79.
- Sarasquete, C., Ortiz, J.B., Gisbert, E., 2001.** Immunohistochemical distribution of cytochrome P4501A in larvae and fingerlings of the Siberian sturgeon, *Acipenser baeri*. *Histochemistry Journal* 33: 101-110.
- Schatchter, D., Marilley, M., Kiener, A., 1969.** Pollution de l'étang de l'Olivier par du lindane en septembre 1967. Mortalité de la faune. *Bulletin Français de Pisciculture* 232:83-89.
- Schlezinger, J.J., Stegeman, J.J., 2000.** Dose and inducer-dependent induction of cytochrome P450 1A in endothelia of the eel, including in the swimbladder rete mirabile, a model microvascular structure. *Drug Metabolism and Disposition* 28: 701-708.
- Schmidt J., 1922.** The breeding place of the eel. *Philosophical Transactions of the Royal Society* 211: 179-208.
- Schoth, M., and Tesch, F.-W., 1982.** Spatial distribution of 0-group eel larvae (*Anguilla sp.*) in the Sargasso Sea. *Helgoländer Meeresuntersuchungen* 35:309-320.
- Secor, D.H., Henderson-Arzapalo, A., Piccoli, P.M., 1995.** Can otolith microchemistry chart patterns of migration and habitat utilization in anadromous fishes? *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 192: 15-33.
- Secor, D. H. and Rooker, J. R., 2000.** Is otolith strontium a useful scalar of life cycles in estuarine fishes? *Fisheries Research* 46(1-3): 359-371.
- Secor, D.H., Rooker, J.R., Zlokovitz, E., Zdanowicz, V.S., 2001.** Identification of riverine, estuarine, and coastal contingents of Hudson River striped bass based upon otolith elemental fingerprints. *Marine Ecology Progress Series* 211: 245-253.
- Seyama, H., 2003.** Application of SIMS to the analysis of environmental samples. *Applied Surface Science*, 203-204, 745-750.

- Shailaja, M.S., D'Silva, C., 2003.** Evaluation impact of pAH on a tropical fish. *Oreochromis mossambicus* using multiple biomarkers. *Chemosphere* 55: 797-809.
- Shen, J., Yang, L., Yang, X., Matsumoto, R., Tong, G., Zhu, Y., Zhang, Z., Wang, S., 2005.** Lake sediment records on climate change and human activities since the Holocene in Erhai catchment, Yunnan Province, China. *Science in China Series D: Earth Sciences* 48(3): 353-363.
- Shiao, J. C., Lozys, L., Iizuka, Y. and Tzeng, W. N., 2006.** Migratory patterns and contribution of stocking to the population of European eel in Lithuanian waters as indicated by otolith Sr:Ca ratios. *Journal of Fish Biology* 69(3): 749-769.
- Sinclair, D. J., Kinsley, L. P. J., Mc Culloch, M. T., 1998.** High resolution analysis of trace elements in corals by laser ablation ICP-MS. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 62: 1889-1901.
- Sinclair, D.J. 1999.** High spatial-resolution analysis of trace elements in corals using laser ablation ICPMS. PhD thesis, The Australian National University, Canberra, Australia.
- Sinclair, D. J., and M. T. Mc Culloch. 2004.** Corals record low mobile barium concentrations in the Burdekin River during the 1974 flood: evidence for limited Ba supply to rivers? *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 214: 155-174.
- Sinclair, D. J., 2005.** Non-river flood barium signals in the skeletons of corals from coastal Queensland, Australia. *Earth and Planetary Science Letters* 237(3-4): 354-369.
- Smart, K.E., Kilburn, M.R., Salter, C.J., Smith, J.A.C., Grovenor, C.R.M., 2007.** NanoSIMS and EPMA analysis of nickel localisation in leaves of hyperaccumulator plant *Alyssum lesbiacum*. *International Journal of Mass Spectrometry* 260(2-3): 107-114.
- Spazier, E., Storch, V., Braunbeck, T., 1992.** Cytopathology of spleen in eel *Anguilla anguilla* exposed to a chemical spill in the Rhin river. *Disease of Aquatic Organism* 14: 1-22.
- Stagg, R.M., Rusin, J., McPhail, M.E., McIntosh, A.D., Moffat, C.F., Craft, J.A., 2000.** Effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on expression of CYP1A in salmon (*Salmo salar*) following experimental exposure and after the Braer oil spill. *Environmental Toxicology and Chemistry* 19: 2797-2805.
- Stecher, H. A., Krantz, D. E., Lord, J. C., Luther, G. W., Bock, K. W., 1996.** Profiles of strontium and barium in *Mercenaria mercenaria* and *Spisula solidissima*. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 60: 3445-3456.
- Stegeman, J.J., Teng, F.Y., Snowberger, E.A., 1987.** Induced cytochrome P-450 in winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*) from coastal Massachusetts evaluated by catalytic assay and monoclonal antibody probes. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 44: 1270-1277.

- Stegeman J.J., and Hahn M.E., 1994.** Biochemistry and molecular biology of monooxygenases' current perspectives on forms, functions, and regulation of cytochrome P450 in aquatic species. *In* Aquatic toxicology. Molecular, biochemical, and cellular perspectives. Malins D.C. & Ostrander G.K. (eds), Lewis Publishers, Boca Raton, 87-206.
- Stein, E. D., Chen, Y., Winer, A. M., 1996.** Environmental Distribution and Transformation of Mercury Compounds. *Critical Review in Environmental Science and Technology* 26: 1-43.
- Stewart, R. E. A., Outridge, P. M., Stern, R. A., 2003.** Walrus life-history movements from lead isotopes in annual layers of teeth. *Marine Mammal Science* 19: 808-818.
- Stirling, C. H., Esat, T. M., McCulloch, M. T., Lambeck, K., 1995.** High-precision U-series dating of corals from Western Australia and implications for the timing and duration of the Last Interglacial. *Earth and Planetary Science Letters* 135(1-4): 115-130.
- Stoichev, T., Amouroux, D., Wasserman, D., Point, D., De Diego, G., Bareille, G., Donard, O.F.X., 2004.** Dynamics of mercury species in surface sediments of the macrotidal estuarine – coastal system (Adour river, Bay of Biscay). *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 59: 511-521.
- Stoichev, T., Amouroux, D., Monperrus, M., Point, D., Tessier, E., Bareille, G., Donard, O. F. X., 2006.** Mercury in surface waters of a microtidal urban estuary (River Adour, south-west France). *Chemistry and Ecology* 22: 137-148.
- Storelli, M.M., Barone, G., Garofalo, R., Marcotrigiano, G.O., 2007.** Metals and organochlorine compounds in eel (*Anguilla anguilla*) from the Lesina lagoon, Adriatic Sea (Italy). *Food Chemistry* 100: 1337-1341.
- Suciu, I., Prodan, L., Lazar, V., Ilea, E., Cocirla, A., Olinici, L., Paduraru, A., Zagreanu, O., Lengyel, P., Gyroffi, L., Andru, D., 1981.** Research on copper poisoning. *Med Lav* 72(3): 190-197.
- Summerfelt, R.C., and Hall, G.E., 1987.** Age and Growth of Fish. Ames, Iowa, USA: Iowa State University Press, 544p.
- Sun, L. T., and Jeng, S.S., 1998.** Comparative zinc concentrations in tissues of common carp and other aquatic organisms. *Zoological Studies* 37(3): 184-190.
- Svedang, H., Wickstrom, H., Reizenstein, M., Holmgren, K., Florenius, P., 1998.** Accuracy and precision in eel age estimation, using otoliths of known and unknown age. *Journal of Fish Biology* 53: 456-464.
- Swan, S.C., Gordon, J.D.M., Shimmield, T., 2003.** Preliminary Investigations on the Uses of Otolith Microchemistry for Stock Discrimination of the deep-water Black Scabbardfish (*Aphanopus carbo*) in the North East Atlantic. *Journal of Northwest Atlantic Fishery Science* 31: 221-231.

Szlinder-Richert J, Barska I, Mazerski J, Usydus Z, 2009. PCBs in fish from the southern Baltic Sea: levels, bioaccumulation features, and temporal trends during the period from 1997 to 2006. *Marine Pollution Bulletin* 58: 85-92.

-T-

Tabouret, H., Bareille, G., Caill-Milly, N., Budzinski, H., Donard, O.F.X., submitted (a). Heavy metal and organochlorinated compound pressure on the European eel (*Anguilla anguilla*) in the Adour estuary and associated wetlands (France).

Tabouret, H., Bareille, G., Claverie, F., Pécheyran, C., Prouzet, P., Donard, O.F.X., submitted (b). Simultaneous use of strontium:calcium and barium:calcium in otolith as markers of habitat: application to the European eel (*Anguilla anguilla*) in the Adour basin.

Tanabe, S., Kannan, N., Subramanian, A., Watanabe, S., & Tatsukawa, R., 1987. Highly toxic coplanar PCBs: occurrence, source, persistency and toxic implications to wildlife and humans. *Environmental Pollution* 47: 147–163.

Tanabe, S., 1988. PCB problems in the future: foresight from current knowledge. *Environmental Pollution* 50: 5-28.

Tapie, N., Budzinski, H., Le Ménach, K., 2008. Fast and efficient extraction methods for the analysis of polychlorinated biphenyls and polybrominated diphenyl ethers in biological matrices. *Analytical Bioanalytical Chemistry* 391: 2169-2177.

Teissier, G., 1960. Relative growth. *In The Physiology of Crustacea, Metabolism and Growth.* Waterman, T.H. (Ed.), Academic Press, New York.

Tesch, F.W., 1977. *The Eel Biology and Management of Anguillids Eels.* Chapman and Hall Ltd., London.

Tesch, F.W., 1982. Further studies on eel larvae collections taken by R.V. Heincke, 1981 in the Sargasso Sea during the North Atlantic transects. *ICES, C.M.*, 3-7p.

Tesch, F.W., 1985. A review on the competitive situation of the eel in relation to other species. EIFAC Working party on eel, Perpignan, 30 p.

Tesch F.W., 1998. Age and growth rates of North Atlantic eel larvae (*Anguilla spp.*), based on published length data. *Helgoländer Meeresunters* 52: 75-83.

Tesch, F.W., 2003. *The eel.* Fifth edition. Thorpe, J.E., Ed. Blackwell publishing, Oxford, 408p.

Testa B., 1990. Mechanisms of inhibition of xenobiotic-metabolizing enzymes. *Xenobiotica* 20: 1129-1137.

- Thierault, V., and Dodson, J.J., 2003.** Body size and the adoption of a migratory tactic in brook char. *Journal of Fish Biology* 63: 1144-1159.
- Thorrold, S.R., Jones, C.M., Campana, S.E., 1997.** Response of otolith microchemistry to environmental variations experienced by larval and juvenile Atlantic croaker (*Micropogonias undulatus*). *Limnology and Oceanography* 42: 102-111.
- Thorrold, S.R., Jones, C.M., Campana, S.E., McLaren, J.W., Lam, J.W.H., 1998.** Trace element signatures in otoliths record natal river of juvenile American shad (*Alosa spadissima*). *Limnology and Oceanography* 43: 1826-1835.
- Thorrold, S.R., and Shuttleworth, S., 2000.** In situ analysis of trace elements and isotope ratios in fish otoliths using laser ablation sector field inductively coupled plasma mass spectrometry. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 57(6): 1232-1242.
- Thresher, R. E., Proctor, C. H., Gunn, J. S. and Harrowfield, I. R., 1994.** An evaluation of electron-probe microanalysis of otoliths for stock delineation and identification of nursery areas in a southern temperate groundfish, *Nemadactylus macropterus* (Cheilodactylidae). *Fishery Bulletin* 92: 817-840.
- Tom, M., and Auslander, M., 2005.** Transcript and protein environmental biomarkers in fish – a review. *Chemosphere* 59: 155-162.
- Tomas, J. and Geffen, A. J., 2003.** Morphometry and composition of aragonite and vaterite otoliths of deformed laboratory reared juvenile herring from two populations. *Journal of Fish Biology* 63(6): 1383-1401.
- Trut, G., and Mayeur, D., 2004.** Etude de la qualité des eaux de l'estuaire de l'Adour (suivi 2001-2003). Ifremer, 100p.
- Tseng, C.M., De Diego, A., Martin, F.M., Amouroux, D., Donard, O.F.X., 1997.** Rapid determination of inorganic mercury and methylmercury in biological reference materials by hydride generation, cryofocusing, atomic absorption spectrometry after open focused microwave-assisted alkaline digestion *Journal of Analytical and Atomic Spectrometry* 12: 743-750.
- Tsui, M.T.K., and Wang, W.-X., 2004.** Temperature influences on the accumulation and elimination of mercury in a freshwater cladoceran, *Daphnia magna*. *Aquatic Toxicology* 70(3): 245-256.
- Tsukamoto K., 1992.** Discovery of the spawning area for Japanese eel. *Nature* 356: 789-791.
- Tsukamoto, K., Nakai, I., Tesch, W.V., 1998.** Do all freshwater eels migrate? *Nature* 396: 635-636.
- Tsukamoto K., and Arai T., 2001.** Facultative catadromy of the eel *Anguillicola japonica* between freshwater and seawater habitats. *Marine Ecology Progress Series* 220: 265-276.
- Tucker, D. W., 1959.** A new solution to the Atlantic eel problem. *Nature* 183: 495-501.

- Tzeng W.N., 1996.** Effects of salinity and ontogenic movements on strontium: calcium ratios in the otoliths of the Japanese eel, *Anguilla japonica* Temminck and Schlegel. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 199: 111-122.
- Tzeng, W. N., Severin, K. P., Wickström, H., 1997.** Use of otolith microchemistry to investigate the environmental history of European eel *Anguilla anguilla*. *Marine Ecology Progress Series* 149(1-3): 73-81.
- Tzeng, W. N., Wang, C. H., Wickström, H., Reizenstein, M., 2000.** Occurrence of the semi-catadromous European eel *Anguilla anguilla* in the Baltic Sea. *Marine Biology* 137(1): 93-98.
- Tzeng, W. N., Shiao, J. C., Iizuka, Y., 2002.** Use of otolith Sr:Ca ratios to study the riverine migratory behaviors of Japanese eel *Anguilla japonica*. *Marine Ecology Progress Series* 245: 213-221.
- Tzeng, W.-N., Iizuka, Y., Shiao, J.-C., Yamada, Y., Oka, H. P., 2003.** Identification and growth rates comparison of divergent migratory contingents of Japanese eel (*Anguilla japonica*). *Aquaculture* 216(1-4): 77-86.
- Tzeng, W. N., Chang, C. W., Wang, C. H., Shiao, J. C., Iizuka, Y., Yang, Y. J., You, C. F., Lozys, L., 2007.** Misidentification of the migratory history of anguillid eels by Sr/Ca ratios of vaterite otoliths. *Marine Ecology Progress Series* 348(285-295).

-U-

- Usero J., Izquierdo C., Morillo J., Gracia I., 2003.** Heavy metals in fish (*Solea vulgaris*, *Anguilla anguilla*, *Liza aurata*) from salt marshes on the southern Atlantic coast of Spain. *Environment International* 29: 949-956.

-V-

- Van Der Oost, R., Van der Schooten, F.J., Ariese, F., Heida, H., Satumalay, K., Vermeulen, N.P.E., 1994.** Bioaccumulation, biotransformation and DNA binding of PAHs in feral eel (*Anguilla anguilla*) exposed to polluted sediments: a field survey. *Environmental Toxicology and Chemistry* 13(6): 859-870.
- Van Der Oost, R., Goksoyr, A., Celander, M., Heida, H., Vermeulen, N.P.E., 1996.** Biomonitoring of aquatic pollution with feral eel (*Anguilla anguilla*) II Biomarkers: pollution-induced biochemical responses. *Aquatic Toxicology* 36: 189-222.

- Van Der Oost, R., Vindimian, E., Van Den Brink, P.J., Satumalay, K., Heida, H., Vermeulen, N.P.E., 1997.** Biomonitoring aquatic pollution with feral eel (*Anguilla anguilla*). III. **Statistical** analyses of relationships between contaminant exposure and biomarkers. *Aquatic Toxicology* **39**: 45-75.
- Van Der Oost, R., Beyer, J., 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., Dapper, R., Witte, J.I., 2001.** The nursery function of the intertidal areas in the western Wadden Sea for 0-group sole *Solea solea* (L.). *Journal of Sea Research* **45**: 271-279.
- Van Ginneken, V., Van Den Thillart, G., 2000.** Eel fat stores are enough to reach the Sargasso. *Nature* **403**: 156-157.
- Van Ginneken, V., Antonissen, E., Müller, U.K., Booms, R., Eding, E., Verreth, J., Van Den Thillart, G., 2005.** Eel migration to the Sargasso: remarkably high swimming efficiency and low energy costs. *Journal of Experimental Biology* **208**: 1329-1335.
- Van Ginneken, V., Durif, C., Balm, S.P., Boot, R., Verstegen, M.W.A., Antonissen, E., Van Den Thillart, G., 2007.** Silvering of European eel (*Anguilla anguilla* L.): seasonal changes of morphological and metabolic parameters. *Animal Biology* **57**: 63-77.
- Vander Putten, E., Dehairs, F., Keppens, E., Baeyens, W., 2000.** High resolution distribution of trace elements in the calcite shell layer of modern *Mytilus edulis*: Environmental and biological controls. *Geochimica and Cosmochimica Acta* **64**: 997-1011.
- Veinott, G., Northcote, T., Rosenau, M., Evans, R.D., 1999.** Concentrations of strontium in the pectoral fin rays of the white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) by laser ablation sampling – inductively coupled plasma – mass spectrometry as an indicator of marine migrations. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **56**: 1981-1990.
- Veinott, G., and Porter, R., 2005.** Using otolith microchemistry to distinguish Atlantic salmon (*Salmo salar*) parr from different natal streams. *Fisheries Research* **71**(3): 349-355.
- Veyssy E., 1998.** Transfert de matières organiques des bassins versants aux estuaires de la Gironde et de l'Adour (Sud-Ouest de la France). Thèse de l'Université de Bordeaux I, soutenue à Talence, 264p.
- Vollestad, L.A., and Jonsson, B., 1988.** A 13-year study of the population dynamics and growth of the European eel (*A. anguilla*) in a Norwegian river: evidence for density-dependant mortality, and development of a model for predicting yield. *Journal of Animal Ecology* **57**: 983-997.

- Walther B.D., and Thorrold S.R., 2006.** Water, not food, contributes the majority of strontium and barium deposited in the otoliths of a marine fish. *Marine Ecology Progress Series* 311: 125-130.
- Walsh, F.M., Crosson, F.J., Bayley, M., McReynolds, J., Pearson, B.J., 1977.** Acute copper intoxication. pathophysiology and therapy with a case report. *American Journal of Diseases of Children* **131**(2): 149-151.
- Watanabe, T., Winter, A., Oba, T., 2001.** Seasonal changes in sea surface temperature and salinity during the Little Ice Age in the Caribbean Sea deduced from Mg/Ca and 18O/16O ratios in corals. *Marine Geology* 173: 21-35.
- Watson, E. B., 1996.** Surface enrichment and trace-element uptake during crystal growth. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 60(24): 5013-5020.
- Weatherley, A.H., and Gill, H.S., 1987.** The study of fish growth. *In* Weatherley AH, Gill HS (eds) *The biology of fish growth*. Academic Press, London, pp 1-21.
- Wells, B. K., Rieman, B. E., Clayton, J. L., Horan, D. L. and Jones, C. M., 2003.** Relationships between water, otolith, and scale chemistries of westslope cutthroat trout from the Coeur d'Alene River, Idaho: The potential application of hard-part chemistry to describe movements in freshwater. *Transactions of the American Fisheries Society* 132(3): 409-424.
- Wepener, V., Van Vuren, J.H.J., Du Preez, H.H., 2001.** Uptake and distribution of a copper, iron, and zinc mixture in gill, liver and plasma of a freshwater teleost, *Tilapia sparrmanii*. *Water SA* 27(1): 99-108.
- Whitlock, J.P., Okino, S.T., Dong, L., Ko, H.P., Clarke-Katzenberg, R., Ma, Q., Li, H., 1996.** Induction of cytochrome P4501A1: a model for analyzing mammalian gene transcription. *FASEB Journal* 10: 809-818.
- Whitlock J.P.Jr., 1999.** Induction of cytochrome P4501A1. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 39: 103-125.
- Whyte, J. J., Jung, R. E., Schmitt, C. J., Tillitt, D. E., 2000.** Ethoxyresorufin-Odeethylase (EROD) activity in fish as a biomarker of chemical exposure. *Critical Reviews in Toxicology* 30: 347–570.
- Wicklund, A., Norrgren, L., Runn, P., 1990.** The Influence of Cadmium and Zinc on Cadmium Turnover in the Zebrafish *Brachydanio rerio*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 19: 348-353.
- Wicklund-Glynn, A., Olsson, P.E., 1991.** Cadmium turnover in minnows, *Phoxinus phoxinus*, pre exposed to water borne Cd. *Environmental Toxicology and Chemistry* 10: 383-394.

- Winter, H. V., Jansen, H. M., Bruijs, M. C. M., 2006.** Assessing the impact of hydropower and fisheries on downstream migrating silver eel, *Anguilla anguilla*, by telemetry in the River Meuse. *Ecology of Freshwater Fish* 15:221–228.
- Wright, P. J., Panfili, J., Morales-Nin, B., Geffen, A.J., 2002.** Otolithes. Manuel de Sclérochronologie des poissons. D. P. H. Panfili J., Troadec H., Wright P.J., IRD-IFREMER: 31-57.
- Wyndham, T., McCulloch, M., Fallon, S., Alibert, C., 2004.** High-resolution coral records of rare earth elements in coastal seawater: biogeochemical cycling and a new environmental proxy. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 68(9): 2067-2080.

-Y-

- Yamaguchi, N., Gazzard, D., Scholey, G., Macdonald, D.W., 2003.** Concentrations and hazard assessment of PCBs, organochlorine pesticides and mercury in fish species from the upper Thames: River pollution and its potential effects on top predators. *Chemosphere* 50: 26
- Yeung, H.Y., Wong, C.C., Wong, M.H., Wong, C.K., 2003.** Differential expression of *CYP1A1* mRNA in gill, intestine and liver of tilapia fed with PCB Aroclor-1254 and Aroclor-1260 spiked food. *Chemosphere* 52: 1659-1665.
- Yilmaz, F., Ozdemir, N., Demirak, A., Levent Tuna, A., 2007.** Heavy metal levels in two fish species *Leuciscus cephalus* and *Lepomis gibbosus*. *Food Chemistry* 100(2): 830-835.
- Yoshinaga, J., Nakama, A., Morita, M. and Edmonds, J. S., 2000.** Fish otolith reference material for quality assurance of chemical analyses. *Marine Chemistry* 69(1-2): 91-97.
- Yvon, B., 1982.** Etude des métaux (Cd, Cu, Fe, Mn, Pb et Zn) dans les eaux et les matières en suspension de la Basse-Loire. PhD Thesis 1982. University of Nantes, France.

-Z-

- Zhang, L., and Wang, W.-X., 2007.** Waterborne cadmium and zinc uptake in a euryhaline teleost *Acanthopagrus schlegeli* acclimated to different salinities. *Aquatic Toxicology* 84(2): 173-181.
- Zumholz, K., Hansten, T., Hillian, F., Horreard, F., Piatkowski, U., 2007.** Elemental distribution in cephalopod statoliths: NanoSIMS provides new insights into nano-scale structure. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 17(2-3): 487-491.

CHAPITRE VIII

ANNEXES – ETUDE COMPLEMENTAIRE

Otolith Sr:Ca and Ba:Ca ratios as revealed by femtosecond laser ablation ICP-MS to examine migration patterns of three amphidromous *Sicyopterus* (Gobioidei: Sicydiinae) species: evidence of flexible adult behaviour.

C. Lord¹, H. Tabouret², F. Claverie², C. Pécheyran², P. Keith¹

¹ *Biologie des Organismes et Ecosystèmes Aquatiques (BOREA UMR 5178 MNHN-CNRS-UMPC-IRD), Muséum National d'Histoire Naturelle, Département Milieux et Peuplements Aquatiques, CP-026, 43 rue Cuvier, 75231 Paris, France*

² *Laboratoire de Chimie Analytique Bio-Inorganique et Environnement (LCABIE UMR 5034 CNRS-UPPA), Université de Pau et des Pays de l'Adour, Bâtiment Sciences, Avenue de l'Université, 64000 Pau, France*

Article soumis : *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*

Abstract

Streams in Indo-Pacific islands are home to populations of amphidromous gobies. The adult fish live, grow and breed in fresh water. Newly hatched larvae are swept down to sea where they undergo larval development during three to six months. This marine phase is thought to be important in terms of the dispersion of amphidromous species, allowing them to colonise remote and isolated islands. After this period, post-larvae recruit back to rivers, where they metamorphose into juveniles and colonise the adult habitat. We studied three *Sicyopterus* species; two of them are endemics (one to New Caledonia, the other to Vanuatu) while the third occurs over 18,000 km in the Indo-Pacific region. Both endemic species live in sympatry with the cosmopolitan species. We analysed depositional patterns of strontium (Sr) and barium (Ba) in the otolith of adults, as the isotopic ratio Sr:Ca (calcium) is the most commonly used, and Ba:Ca also seems to be interesting in the investigation of diadromous behaviour. These preliminary studies of *Sicyopterus* otoliths were undertaken using the innovative technique of a femtosecond ablating laser coupled to an ICP-MS. All specimens sampled showed evidence of a marine larval stage, confirming amphidromy. Results showed that Ba is useful in the study of diadromous migration patterns of specimens caught in New Caledonian rivers but it proved to be unnecessary in Vanuatu rivers. The Sr:Ca results uncovered three different adult behaviours within the river they inhabit. (i) Some of the fish stay in elevated locations ("square profile") while others (ii) undertake back-and-forth migrations between the higher and lower reaches ("up-and-down profile"). Finally, (iii) others stayed in the lower reaches ("constant profile"). These results, showing a high flexibility in the migratory behaviour of *Sicyopterus*, have important implications for the management and conservation of these species and of their habitat.

Keywords: *Sicyopterus*, otolith microchemical analysis, femtosecond laser ablation ICP-MS, Sr:Ca, Ba:Ca, amphidromy, New Caledonia, Vanuatu, migratory behaviour.

I. Introduction

Myers (1949) has described the term amphidromy as being a distinct form of diadromy: for an amphidromous species, migrations between the sea and freshwater do not involve reproduction. The growth, feeding and breeding biota are the same, i.e., the river. After hatching, larvae are carried down the river towards the sea where they undergo larval development during three to six months (Keith *et al.*, 2008; Lord *et al.*, accepted). The marine environment is the biota in which larval growth takes place; this marine larval phase is important in terms of the dispersion of these species (Keith *et al.*, 2008). After this marine phase, the post-larvae recruit back to rivers, where they undergo an extensive metamorphosis. Translucent post-larvae feed on plankton at sea and have a terminal mouth. Adults are benthic and herbivorous, feeding on algae and diatoms by scraping them off the hard substrate (Lord & Keith, 2008). Therefore, post-larvae have to shift from a pelagic carnivorous feeding mode to a benthic herbivorous one. Although this amphidromous life cycle is poorly understood, it is nevertheless not uncommon, especially in tropical Gobioidae fish, as about 150 species exhibit this life history pattern (McDowall 1988, 1993; Ryan, 1991; Keith & Lord, 2009a). Amphidromy seems to be an adaptation to the colonisation of islands, which are fragmented habitats and subject to extreme seasonal variations in climate and hydrology (Keith, 2003).

Otoliths are well-known paired calcified structures in the fish's inner ear. They are metabolically inert and grow continuously, on a daily basis (Pannella, 1971), throughout the fish's life. Layers of aragonite crystalline microstructure are deposited each day on a protein matrix (Campana & Thorrold, 2001). Although the growth is continuous, it is affected by stress (lack of food, reproduction period, metamorphosis, etc.), slowing down the growth and resulting in tighter daily increments. These events therefore leave specific marks on the otoliths. Otoliths have long been used as life recorders of the fish's life (Lecomte-Finiger, 1999); microstructures and macrostructures being used to accurately estimate the fish's age and to analyse and date specific events such as recruitment, metamorphosis or reproduction. In the case of amphidromous species, metamorphosis is materialised on the otolith by a metamorphosis check mark, formed as the fish recruits to the rivers (Shen & Tzeng, 2002; Keith *et al.*, 2008).

In the daily increments, minor elements of the aquatic environment are trapped in the matrix during the calcification process. They enter the fish's body mainly via gill transport to the blood and to the endolymph in which otoliths bathe in the inner ear (Campana, 1999). In combination with age data, otolith elemental composition has been used to reconstruct the migratory environmental history of fish (Elfman *et al.*, 2000; Halden *et al.*, 2000; Daverat *et al.*, 2005; Shiao *et al.*, 2006; Arai *et al.*, 2007).

Indeed, microchemical techniques enable the identification of life history events in individual fish by detecting trace elements in the microstructure of their otoliths (Campana, 1999; Arai, 2002). The strontium:calcium (Sr:Ca) ratio is the most commonly used to describe migratory patterns of diadromous and catadromous fish (Limburg *et al.*, 2001; Milton *et al.*, 2008). Sr deposition in the otolith varies between marine and freshwater habitats (Campana, 1999), as seawater contains high levels of Sr whereas freshwater contains low levels. The Sr content in the otolith of teleost fish is positively correlated to ambient salinity (Secor *et al.*, 1995; Secor and Rooker, 2000; Tzeng, 1996; Tsunagawa & Arai, 2008). The rate of Sr is assumed to be an indicator of past environmental (temperature and salinity) and physiological conditions (Campana, 1999). Elevated Sr:Ca ratios in fish otoliths are widely accepted as proof of occupation of marine habitats (Crook *et al.*, 2006; Howland *et al.*, 2001; Kalish, 1990; Radtke 1989, Shen *et al.*, 1998) or of a marine larval stage (Closs *et al.*, 2003).

Recent studies (McCulloch *et al.*, 2003; Elsdon & Gillanders, 2005a; Hamer *et al.*, 2006) also have underlined the potential of Ba:Ca ratios for tracing environmental histories of fish, since, like Sr, it is able to be incorporated in the otolith proportionally to the ambient concentration (Bath *et al.*, 2000; Milton & Chenery, 2001; Elsdon & Gillanders, 2004; de Vries *et al.*, 2005). Furthermore, McCulloch *et al.* (2005) highlighted the strong inverse correlation between Sr:Ca and Ba:Ca in barramundi (*Lates calcarifer*) otoliths, as Ba levels are sometimes high in fresh water (McCulloch *et al.*, 2003). Bath *et al.* (2000) also revealed that the temperature affected Sr incorporation but not that of Ba, thus justifying the coupling of Ba and Sr to reconstruct migratory histories. Crook *et al.* (2006) also indicate that the analysis of Ba:Ca ratios is relevant, as changing levels of this isotope across the otolith indicate diadromy. The joint use of Sr:Ca and Ba:Ca ratios should reveal the environments through which the fish has travelled despite the fact that these elements have limitations. Elemental concentration in tropical rivers or estuaries can be highly variable depending on sediment loads, river flow or seasons (McCulloch *et al.*, 2005).

In this study we analysed the otoliths of three amphidromous *Sicyopterus* (Teleostei: Gobioidae) species. *Sicyopterus aiensis* Keith, Watson & Marquet, 2004 and *Sicyopterus sarasini* Weber & de Beaufort 1915 are respectively endemic to Vanuatu and to New Caledonia. *Sicyopterus lagocephalus* (Pallas, 1767) is a cosmopolitan species, its distribution area ranging from the western Indian Ocean to French Polynesia in the Pacific. Both endemic species live in sympatry with the cosmopolitan species. Depositional patterns for Sr and Ba were assessed in the otoliths of adults of the three *Sicyopterus* species using femtosecond laser ablation ICP-MS (inductively coupled plasma – mass spectrometry). This method allows the quantitative determination of trace and minor elements within the otolith at a high spatial resolution (Coutant & Chen, 1993; Arai & Hirata, 2006; Chu *et al.*, 2006). The use of femtosecond laser ablation showed limited sample damage during ablation and lower

elemental fractionation. This method thus provides more precise and effective ablation resulting in a larger elemental signal on the ICP-MS with good repeatability compared to nanosecond ablation systems (Fernandez *et al.*, 2007; Claverie, 2009; Tabouret, 2009).

We analysed the depositional patterns of Sr:Ca and Ba:Ca ratios in the otoliths, the two most commonly analysed, to test whether the joint use of these two elements is relevant in the New Caledonia/Vanuatu region. We wanted to confirm the amphidromous life cycle for all three species, and to see whether different migratory patterns could be observed between and within each of the *Sicyopterus* species explaining the distribution pattern observed.

II. Material and methods

1. Sampling

Vanuatu

Fish were sampled on Santo Island in November 2006, the largest and oldest island in the Vanuatu archipelago. Two rivers were prospected on the western coast of Santo, namely Pelouva and Penaorou rivers, the former being an affluent of the latter (Fig 1.). Both elevated and estuarine locations were prospected. A total of 24 *S. lagocephalus* and 23 *S. aiensis* were caught (Tab. 1). Pelouva and Penaorou rivers are similar in terms of substrate (volcanic) and topology. There is however an important difference between the two: Penaorou River is taboo, and therefore, no fishing or any other activity is allowed. Population densities were very high in this river, in terms of fish and decapod crustaceans, in comparison to Pelouva River (Keith *et al.*, in press).

New Caledonia

In New Caledonia, seven different rivers were sampled, between June 2006 and February 2007. Four rivers in the North Province, on the northeastern, coast were sampled (Tiwaka, Kokengoné, Népwé Mwéru and Ponandou). In the South Province, three rivers were prospected (Barendeu, Trou Bleu and Co-Daru Kwatéa) (Fig. 1). A total of 22 *S. lagocephalus* and of 24 *S. sarasini* were sampled (Tab. 1). Rivers in the North and South Provinces are different in terms of substrate. Indeed, there are two major types of hydrosystem: on the one hand, the short and oxygenated streams in the North Province, generally on metamorphic substrate; and on the other hand, the large stream of the South Province, generally on ultramafic substrate, i.e., a substrate from which nickel is extracted (Keith *et al.*

2009). *S. lagocephalus* is found in both hydrosystems, whereas *S. sarasini* strictly occurs in rivers in the South Province.

A total of 93 fish were caught in the two areas (Tab. 1). All fish were sampled by electro-fishing (portable Dekka 3000, Germany), using a large hand net. The standard length of fish was measured with a dial calliper, and fish were kept in 95° alcohol.

Table 1: Sampling locations in Vanuatu and New Caledonia for the three *Sicyopterus* species and the number of specimens sampled (N).

Species	Location	River	Altitude (m)	N
<i>S. lagocephalus</i>	Santo (Vanuatu)	Pelouva	256	10
	Santo (Vanuatu)	Penaorou	120	12
	Santo (Vanuatu)	Penaorou	0	2
	North Province (NC)	Ponandou	30	1
	North Province (NC)	Kokengoné	250	1
	North Province (NC)	Tiwaka	20	3
	North Province (NC)	Népwé Mwéru	30	1
	South Province (NC)	Barendeu	110	9
	South Province (NC)	Co-Daru Kwatéa	0	8
				Total 47
<i>S. aiensis</i>	Santo (Vanuatu)	Pelouva	256	4
	Santo (Vanuatu)	Penaorou	120	11
	Santo (Vanuatu)	Penaorou	0	7
				Total 22
<i>S. sarasini</i>	South Province (NC)	Barendeu	110	19
	South Province (NC)	Co-Daru Kwatéa	0	3
	South Province (NC)	Trou Bleu	0	2
				Total 24
			Total	93

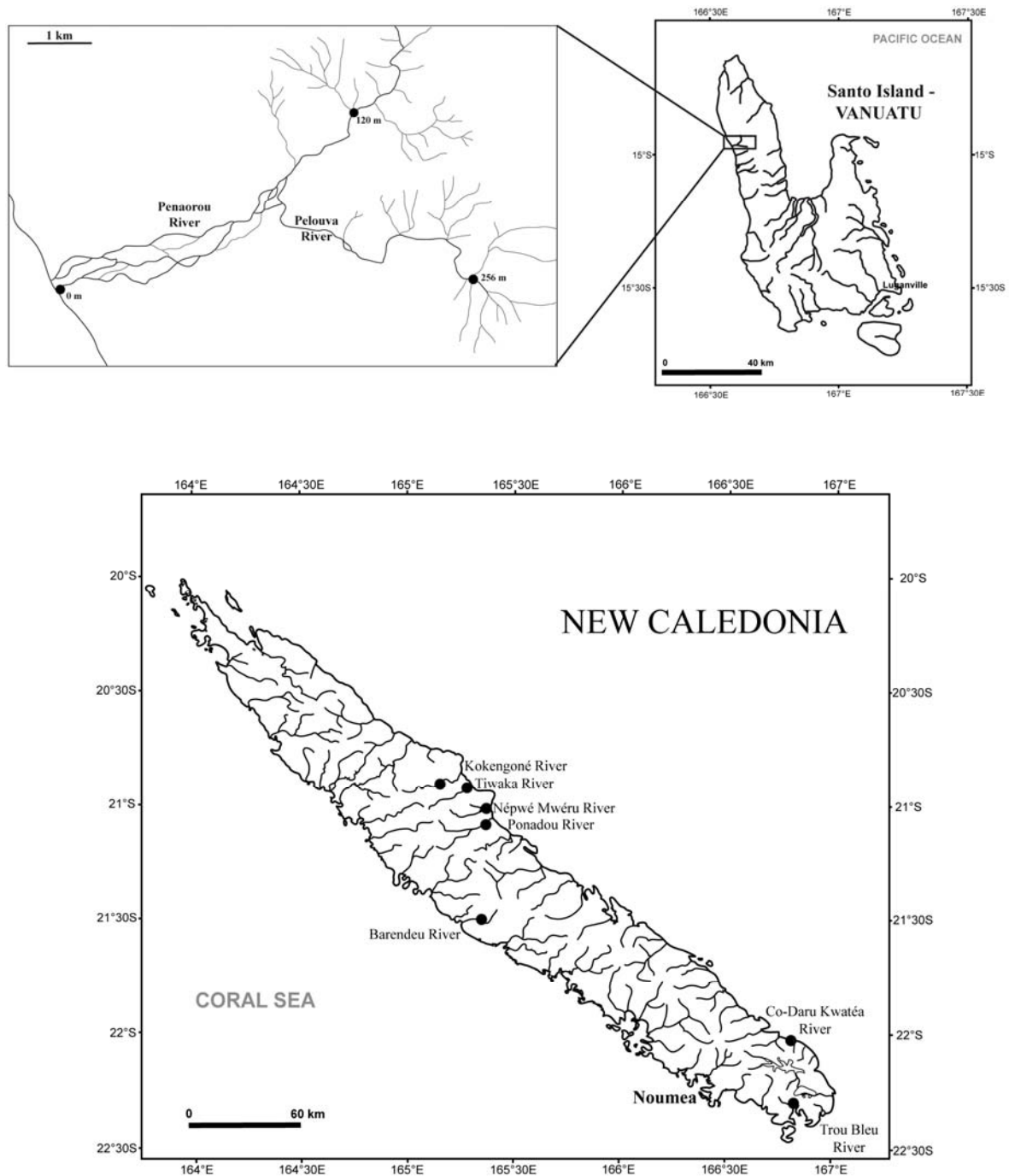


Figure 1: Sampling locations in New Caledonia and Vanuatu

2. Otolith preparation and Sr:Ca and Ba:Ca ratio determination by femtosecond laser ablation ICP –MS analysis.

Right sagittal otoliths were extracted from the fish under a binocular magnifier (Olympus VMZ). The otoliths were placed in distilled water just after extraction in order to eliminate any remaining tissue from the *macula* and the vestibule (Secor *et al.* 1992). Once cleaned, the otoliths were kept dry. Right otoliths were embedded in Araldite 2020 Epoxy resin (Escil, Chassieu, France). They were then ground

in transverse section down to the otolith's core using first a 1200-grain carbide silicon abrasive disc then a finer 2400-grain disc (Escil Chassieu, France). Milli-Q water was used as a grinding lubricant. Then, the otolith preparations were polished with diamond paste of decreasing grain diameter (3 to 0.1 μm) on a felt-polishing disc. Between polishing with each different sized disc, the otolith preparations were sonicated in Milli-Q water. Grinding and polishing were performed on an automatic TegraPol 35 grinder (Struers, Champigny-sur-Marne, France). A 10N force was applied on the samples and the rotating speed was set at 150 rpm. Regular checks were made under an Olympus BX40 light microscope to ensure that the core of the otolith was never ground, and therefore destroyed. By using an automatic grinder, it is possible to achieve a perfectly flat surface, which is important for laser ablation analysis. Finally, the otoliths were rinsed and sonicated in Milli-Q water and dried prior to the laser ablation-ICP-MS analysis.

Otolith samples were analysed with an IR 1030 nm femtosecond laser (Alfamet-Novalase, France) coupled to an Elan DRC II (Perkin Elmer) mass spectrometer. A linear raster scan ablation (width: 20 μm) was made along the longest radius of the otolith. The laser beam was applied with a 500 Hz frequency at a speed of 5 $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$. The length of the ablation transect depends on the size of the sagittal otolith. The transect runs from otolith edge to edge, passing through the core and the metamorphosis check mark (Fig. 2).

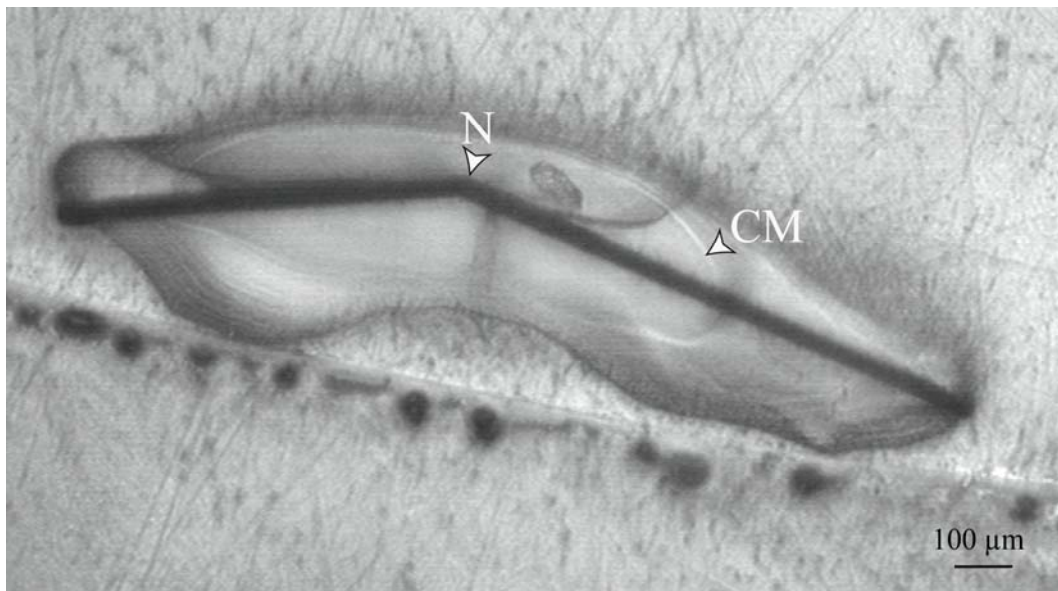


Figure 2: *S. lagocephalus* (SL = 32 mm) sagittal otolith from the Co-Daru Kwatéa River (New Caledonia), showing the entire continuous transect made by femtosecond laser ablation ICP-MS, from edge to edge passing through the nucleus (N) and the metamorphosis check mark (CM).

The entire transect was selected in order to determine chronological variation of ^{86}Sr and ^{138}Ba . A pre-cleaning ablation, consisting in a very fast ($50 \mu\text{m s}^{-1}$) ablation and removing the outermost surface ($\sim 2 \mu\text{m}$), was performed in order to avoid contamination by the sample surface (Wyndham *et al.*, 2004). Table 2 gives ablation and coupling characteristics. Analytical accuracy was achieved with the fish certified otolith reference material No 22 (National Institute for Environmental Studies, Japan) (Yoshinaga *et al.*, 2000). ^{43}Ca was used as an internal standard for each ablation to check for variation in ablation yield. Strontium and barium were standardised to calcium (i.e., Sr:Ca and Ba:Ca) based on the stoichiometry of calcium carbonate ($400\,000 \mu\text{g Ca g}^{-1}$ otolith), as these elements can substitute for calcium in the otolith matrix (Campana, 1999). Quantification of ^{86}Sr and ^{138}Ba concentration was allowed with the use of a standard curve based on the analysis of calcite pellets (Barats *et al.*, 2007). The average detection limit based on three standard deviations (SD) of the blank gas was 767 ng g^{-1} for ^{86}Sr and 32 ng g^{-1} for ^{138}Ba .

Table 2: Operating conditions for the femtosecond laser ablation ICP-MS

Laser ablation

Instrumentation	Femtosecond laser (Alfamet – Novalase, France)
Wavelength	1030 nm
Repetition rate	500 Hz
Energy	$9 \mu\text{J pulse}^{-1}$
Sampling strategies	Linear raster scan
Plate speed	$50 \mu\text{m s}^{-1}$ (pre-ablation), $5 \mu\text{m s}^{-1}$ (ablation)

ICP-MS

Instrumentation	Elan DRC II, Perkin Elmer
Dual sample introduction system	
Torch	2 inlets – Internal injector diameter 1.5 mm
Nebuliser	Pneumatic concentric nebulizer 1 ml min^{-1}
Spray Chamber	Cooled impact bead (2°C)
Coolant gas flow (Ar)	15 L min^{-1}
Auxiliary gas flow (Ar)	0.8 L min^{-1}
Nebuliser gas flow (He)	0.6 L min^{-1}
Isotopes and dwell time (ms)	^{138}Ba , (25 ms, 0.75 amu) ^{86}Sr , ^{43}Ca (5 ms, 0.3 amu)
Internal standard (m/z)	^{43}Ca

III. Results

For all specimens, the whole transect is represented. Thus, the profiles are symmetrical. Representing whole transects is a means to make sure that the observations are not artefactitious, if repeated on both half transects.

1. Vanuatu samples

For all otoliths of both the species *S. lagocephalus* and *S. aiensis*, high Sr:Ca ratios (Sr:Ca = $10\text{-}12 \times 10^{-3}$) were observed in the central region of the transect, corresponding to the zone between the core of the otolith and the metamorphosis check mark. For all individuals caught in Vanuatu, whatever the river or the species, the Ba:Ca ratios in the otoliths all along the transect were very low (Ba:Ca = $0\text{-}10 \times 10^{-6}$) (Fig. 3; Fig. 4). For both species, Sr:Ca ratios show a significant decrease just after the metamorphosis check mark (Sr:Ca = $2\text{-}4 \times 10^{-3}$). Femtosecond laser scanning revealed two types of Sr:Ca profiles. For 75% of *S. lagocephalus* and 47.8% of *S. aiensis*, the Sr:Ca ratios stayed at this low level until the fish was caught (Fig. 3a & 3b; Fig. 4a & 4b), and this profile occurred in both rivers sampled. We called this profile a “square” profile. The second type of profile was found for individuals exclusively caught in the Penaorou River: for 25% of *S. lagocephalus* and 52.2% of *S. aiensis*, the Sr:Ca ratios showed one to two peaks, the Sr:Ca ratio returning to a high level (Sr:Ca = $10\text{-}12 \times 10^{-3}$) after the metamorphosis check mark decrease (Fig. 3c; Fig. 4c, 4d, 4e). The profile for individuals showing this behaviour has been termed “up-and-down”.

2. New Caledonian samples

For all otoliths of both species, *S. lagocephalus* and *S. sarasini*, high Sr:Ca ratios (Sr:Ca = $10\text{-}12 \times 10^{-3}$) were observed in the central region of the transect, corresponding to the zone between the core of the otolith and the metamorphosis check mark (Fig. 5; Fig. 6). After the metamorphosis check mark, femtosecond laser scanning revealed two types of Sr:Ca profiles. For all specimens, caught in Barendeu, Tiwaka, Ponandou, Népwé Mwéru and Kokengoné rivers, the profiles are the same: the Sr:Ca ratios show a strong decrease after the metamorphosis check mark (Sr:Ca = $2\text{-}4 \times 10^{-3}$) and stay at this low level until the fish was caught (Fig. 5a & 5b; Fig. 6a & 6b). For all specimens caught in the Co-Daru and in the Trou Bleu Rivers, the Sr:Ca ratios stay at a high constant level (Sr:Ca = $10\text{-}12 \times 10^{-3}$) throughout the fish's life. There is no transition before and after the metamorphosis check mark, unlike all other individuals (Fig 5c; Fig 6c & 6d). Concerning the Ba:Ca ratios for all fish sampled in New

Caledonian rivers, a different pattern from that of Vanuatu emerged. For all otoliths, the Ba:Ca ratio is low ($Ba:Ca = 0.2 \times 10^{-6}$) when the Sr:Ca ratio is high. Conversely, the Ba:Ca ratio is high ($Ba:Ca = 40-80 \times 10^{-6}$) when the Sr:Ca is low. Thus, for both species caught in New Caledonia, the Ba:Ca ratios exhibit a strong inverse pattern compared with Sr:Ca ratios (Fig 5; Fig 6).

All the different behaviours found either in Vanuatu and New Caledonia were observed whatever the size of the gender of the fish, these latter two characteristics not seeming to influence behaviour.

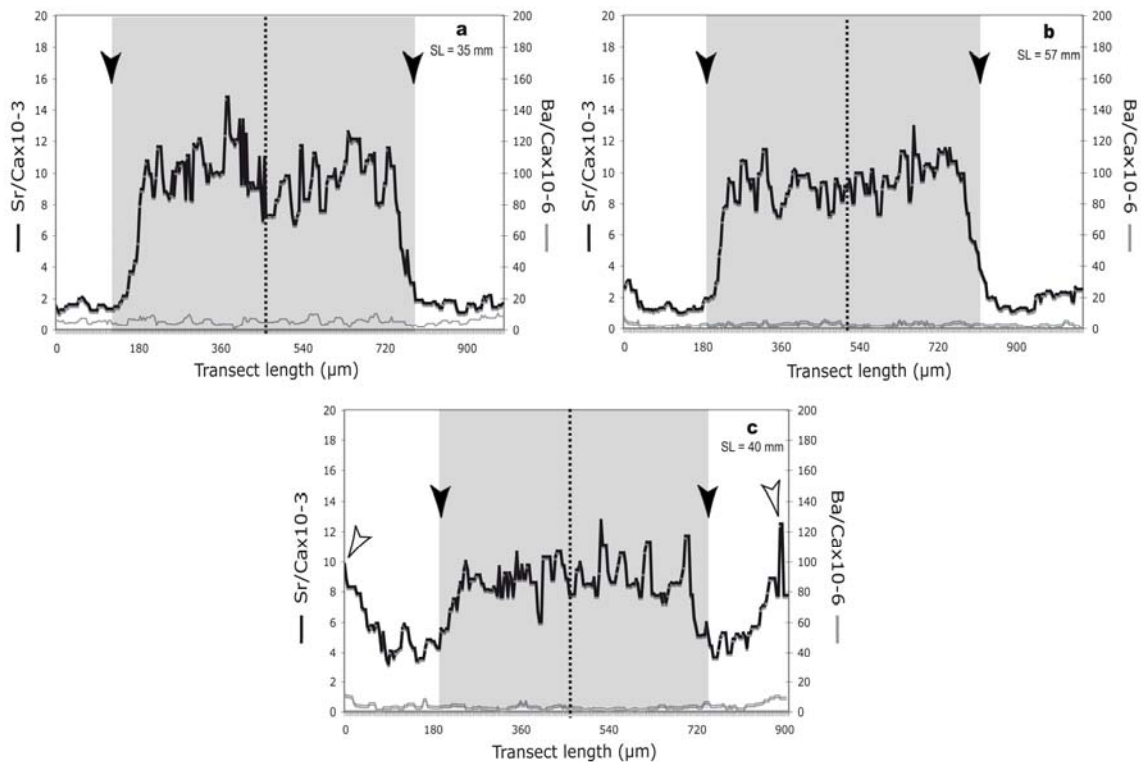


Figure 3: Changes in Sr:Ca and Ba:Ca ratios along the sagittal otolith edge-to-edge transect for 3 *S. lagocephalus* specimens from Vanuatu. The grey shading corresponds to the marine larval phase, the dotted line indicates the position of the nucleus and the black arrows correspond to the metamorphosis check mark. a and b are “square” profiles (Pelouva River). c is an “up-and-down” profile (Penaorou estuary). The white arrows indicate the return to high Sr:Ca values. SL: standard length of the fish in millimetres.

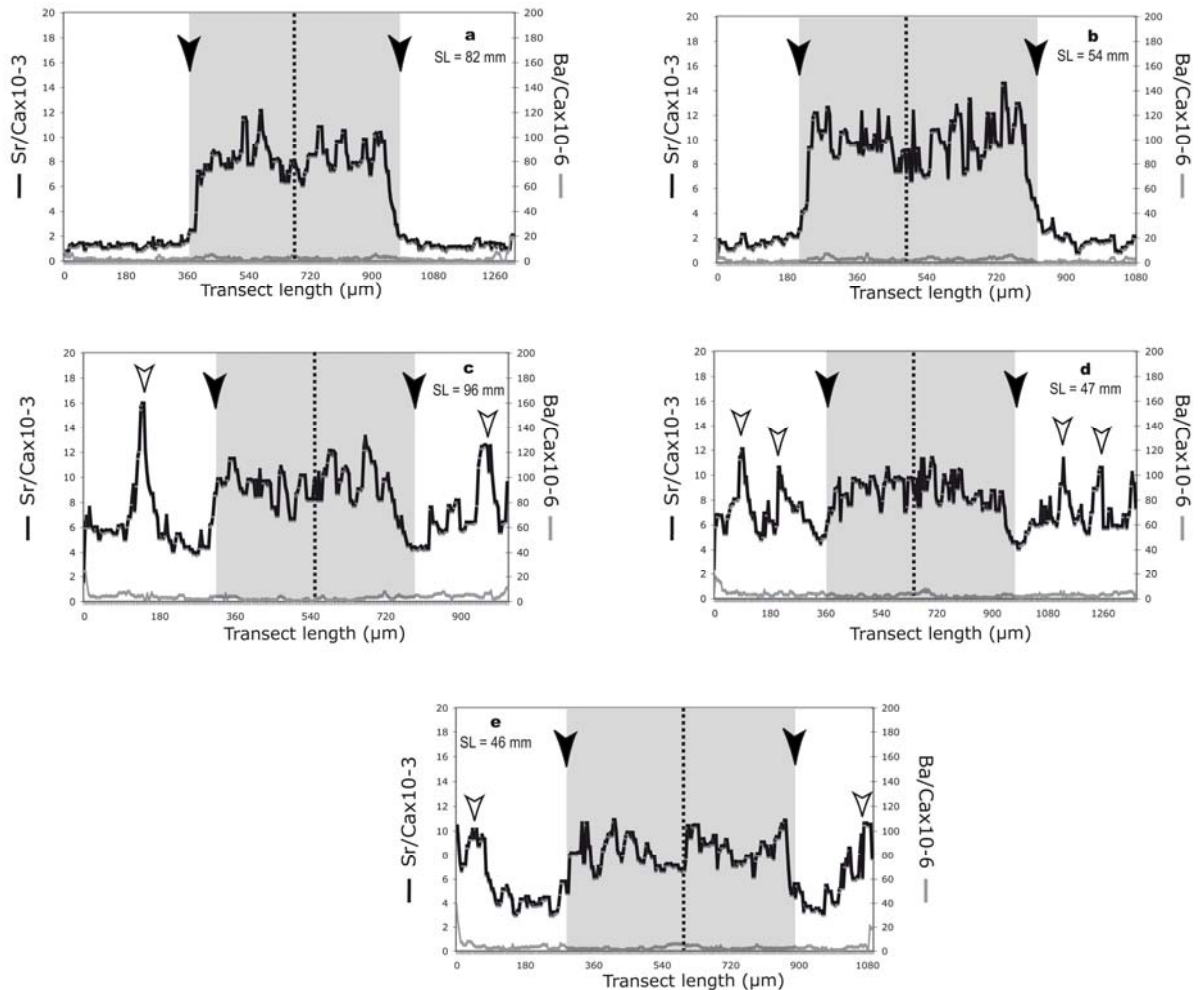


Figure 4: Changes in Sr:Ca and Ba:Ca ratios along the sagittal otolith edge-to-edge transect for 5 *S. aiensis* specimens from Vanuatu. The grey shading corresponds to the marine larval phase, the dotted line indicates the position of the nucleus and the black arrows correspond to the metamorphosis check mark. a and b are “square” profiles (Penaorou River, elevated location). c, d (Penaorou River, elevated location) and e (Penaorou Estuary) are “up-and-down” profiles. The white arrows indicate the return to high Sr:Ca values. SL: standard length of the fish in millimetres.

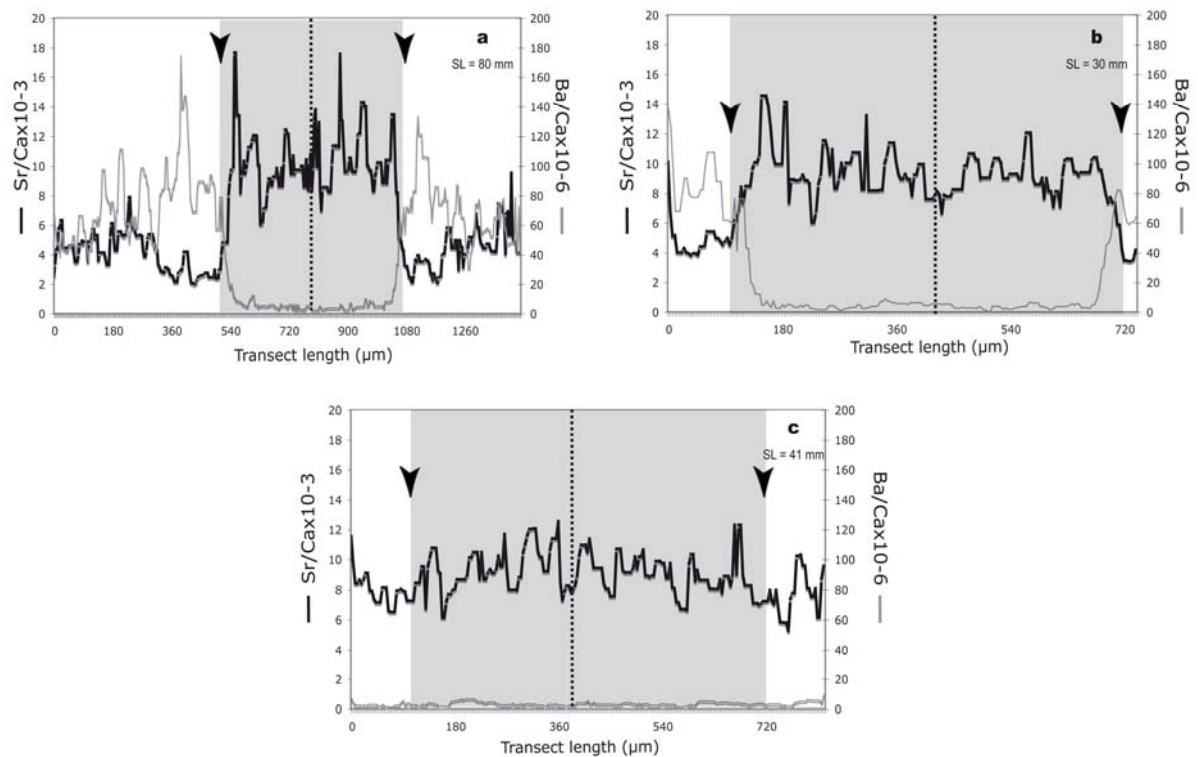


Figure 5: Changes in Sr:Ca and Ba:Ca ratios along the sagittal otolith edge-to-edge transect for 3 *S. lagocephalus* specimens from New Caledonia. The grey shading corresponds to the marine larval phase, the dotted line indicates the position of the nucleus and the black arrows correspond to the metamorphosis check mark. a (Barendeau River) and b (Tiwaka River) are “square” profiles. c (Co-Daru Kawatéa River) is a “constant” profile. SL: standard length of the fish in millimetres.

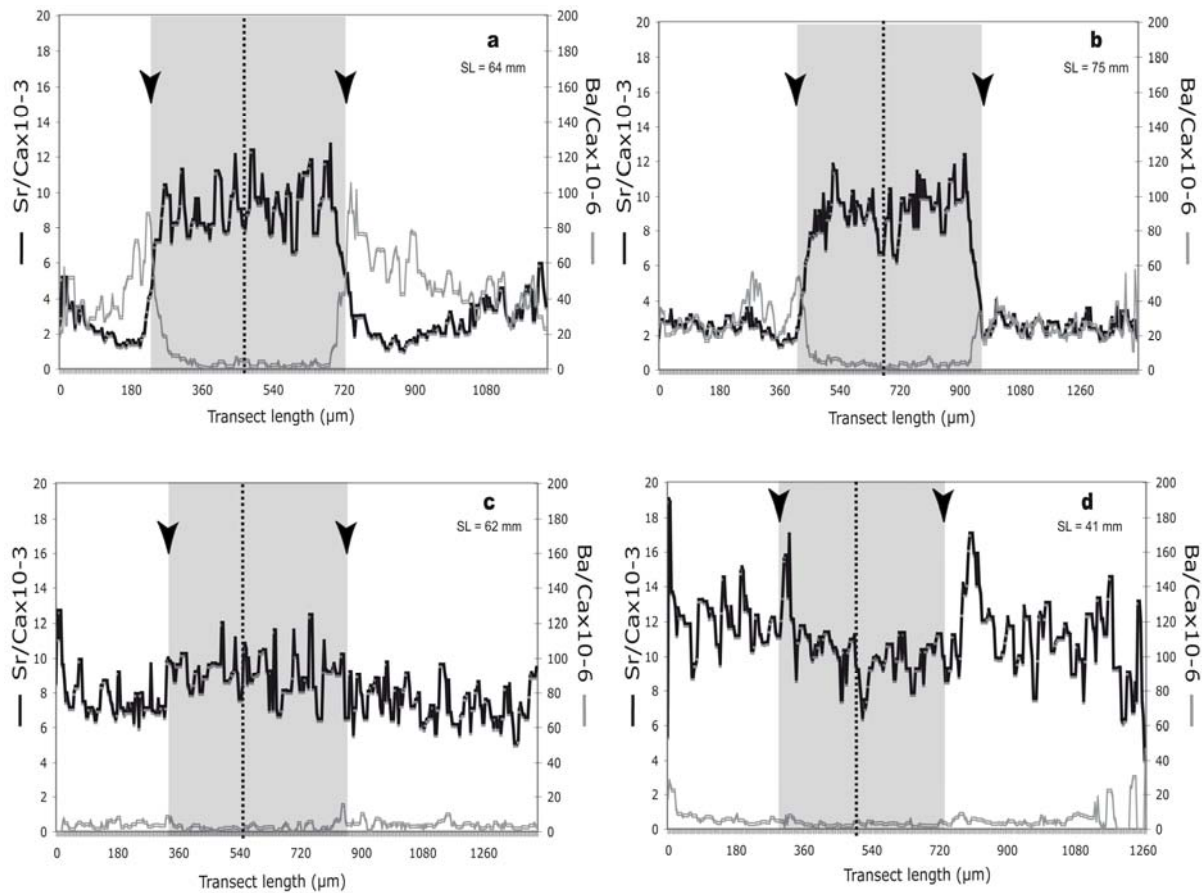


Figure 6: Changes in Sr:Ca and Ba:Ca ratios along the sagittal otolith edge-to-edge transect for 4 *S. sarasini* specimens from New Caledonia. The grey shading corresponds to the marine larval phase, the dotted line indicates the position of the nucleus and the black arrows correspond to the metamorphosis check mark. a and b (Barendeau River) are “square” profiles. c (Co-Daru Kwatéa River) and d (Trou Bleu River) are “constant” profiles. SL: standard length of the fish in millimetres.

IV. Discussion

Our study is the first to investigate the migratory history of three *Sicyopterus* species using otolith microchemical analyses based on Sr:Ca and Ba:Ca ratios. The Sr:Ca ratios are the same for all three species in the central part of the transect, i.e., between the core of the otolith and the metamorphosis check mark. These Sr:Ca ratios were high, between $10\text{--}12 \times 10^{-3}$, a value generally reflecting a marine habitat (Radtke & Kinzie, 1996; Crook *et al.*, 2006; Jessop *et al.*, 2006; Tsunagawa & Arai, 2008; Tsunagawa *et al.*, 2009; Tabouret *et al.*, in prep a.). *Sicyopterus* larvae hatch in the river, often in elevated locations (Radtke & Kinzie, 1996; Keith *et al.*, 2008); at this stage the otolith is only composed of its core. Larvae have only about 3 days to undergo a downstream migration towards the sea, where they spend a variable amount of time (Keith *et al.*, 2008; Lord *et al.*, accepted). Then, post-larvae return to rivers while undergoing their metamorphosis, materialised on the otolith by the check mark. From hatching to metamorphosis (recruitment to rivers), Sr:Ca ratios are high, reflecting the

marine phase. The metamorphosis check mark always coincided with a precipitous decline in the Sr:Ca ratio. These results confirm the amphidromous life cycle of these species. In their work studying different gobies using Sr:Ca ratios, Chang *et al.* (2006) confirmed that the amphidromous life history of *Sicyopterus japonicus*. *Lentipes concolor* in Hawaii shows a typical amphidromous migratory pattern, although this species is found in very high locations and often in intermittent flowing streams (Radtke & Kinzie, 1996).

Even though larvae hatch in rivers, there is no difference in Sr:Ca ratios between the core of the otolith and the marine phase; but since they hatch in freshwater, a decrease in Sr:Ca should be observed in the core. The incorporation of elements into otoliths is physiologically and environmentally regulated. Water mass chemistry, temperature and fish growth rates are all thought to influence otolith elemental composition (Fowler *et al.*, 1995; Farrel & Campana, 1996; Dove *et al.*, 1996; Geffen *et al.*, 1998; Campana, 1999; Bath *et al.*, 2000; Milton & Chenery, 2001; Elsdon & Gillanders, 2005b). In addition to salinity, and temperature (Kalish, 1989; Secor *et al.*, 1995; Bath *et al.*, 2000; Arai 2002), the physiological condition is also known to have the potential to influence changes in the Sr:Ca ratio in the otolith (Kalish, 1989; Sadovy & Severin, 1992). In line with our work, Tsunagawa *et al.* (2009) found that *Rhinogobius flumineus* otoliths showed high Sr contents around the core, although this species lays its eggs in freshwater. Anguillid and conger eels show low Sr contents around the core in spite of hatching in seawater (Arai *et al.*, 1997; Correia *et al.*, 2003). Salmonid fish, show high to low Sr contents around the core, depending of where the female matured: it differed depending on whether vitellogenesis was completed at sea or in freshwater (Arai & Tsukamoto, 1998; Volk *et al.*, 2000). Thus, the high Sr content that we observed around the otolith core of the three *Sicyopterus* species may be the result of specific physiological effects taking place during egg formation and development, and during the first days of larval life, during which stressful events occur (rapid downstream migration, uptake of yolk sac reserves, physiological changes for adaptation to life in the marine environment, opening of the mouth, etc.) (Keith *et al.*, 2008). Additionally, there is a lack of information regarding the effect of exposure time on elemental uptake into calcified structures. Elsdon & Gillanders (2005c) showed that the saturation of Sr:Ca in *Acanthopagrus butcheri* (Teleostei: Sparidae) otoliths occurred after 20 days' exposure. After hatching, *Sicyopterus* larvae have only up to three days to reach the sea (Keith *et al.*, 2008; Valade *et al.*, submitted); this period of three-days' exposure in fresh water is probably too short to allow any interpretation of the elemental composition of the otolith core. Another factor, linked to the methodology used, may explain the fact that Sr contents stay high around the otolith core. With this LA-ICP-MS technique, the width of the ablated surface is 20 μm . Moreover, with this ablation strategy, the depth of the scan is $16 \pm 3 \mu\text{m}$ (Tabouret *et al.*, in prep b). In *Sicyopterus* species, the otolith core measures less than 10 μm . The ablated surface, although passing through the core, is a lot wider and deeper than the

core itself. Therefore, the material analysed corresponds to the core and to its surrounding area, probably masking information contained in the nucleus.

Although the Sr:Ca ratio in all otolith analyses appears to reflect typical amphidromous life history, the fluctuations of this ratio in our study are different after the metamorphosis check mark, within and between the three species, depending on the river in which individuals were caught. However, we did not observe any species-specific patterns that would indicate the *Sicyopterus* genus' ability to adapt to the specificities of its adult environment.

In Vanuatu, both for the wide spread species *S. lagocephalus* and for the endemic *S. aiensis*, two types of profiles were observed. For the 47 specimens analysed, individuals, whatever their size, underwent an upstream migration as soon as they enter estuaries. This behaviour is reflected by the strong decrease in the Sr:Ca ratio when ablating through the metamorphosis check mark. Some of these individuals will stay in elevated locations throughout their entire life. *Sicyopterus* species are known to be territorial (Marquet *et al.*, 2003; Lord & Keith, 2008). Fish that have found a territory in the mid to higher reaches are most likely to stay there. We have thus observed what we have called a "square profile" (Fig. 3a, 3b, 4a, 4b). This type of profile was observed for all the fish caught in the Pelouva River (260 m altitude) and for some of the fish caught in the higher reaches of the Penaorou River. All other fish, caught in the higher reaches of the Penaorou River and in the estuary, exhibited "up-and-down" profiles (Fig. 3c, 4c, 4d, 4e). After having reached elevated locations, reflected by a low Sr:Ca ratio, fish returned to estuarine waters that are under the influence of the intertidal zone, reflected by peaks of high Sr:Ca ratios. This adult downstream migration can take place several times in the life of the fish, as for some individuals several peaks were observed (Fig. 4d). These fish only return to estuaries and not to sea, as we never caught them at sea and as it has also been shown that adult fish are not physiologically adapted to life in saltwater (Taillebois, 2009). The Sr:Ca ratio found for the marine phase and returns to the estuary were the same ($\geq 10\text{-}12 \times 10^{-3}$). This shows that some estuarine locations may have an Sr:Ca ratio close to or greater than seawater (Limburg, 1995; Wells *et al.*, 2003; Kraus & Secor, 2004; Tabouret *et al.*, in prep. a). In their study analysing Sr:Ca ratios, Tsunagawa & Arai (2008) found that the migratory histories of *Rhinogobius* spp. differ significantly both within and between species and that they have flexible migratory patterns allowing them to use the full range of salinity during their life history.

The first possible explanation for this "up-and-down" pattern is that it is for reproduction purposes. Gobies of the *Sicyopterus* genus are known to spawn repeatedly during the year (Valade, 2001; Keith *et al.*, 2004; 2006). In *Awaous guamensis* (Valenciennes, 1837) from the Pacific area, the adult fish normally migrate downstream to the spawning grounds, which are generally situated in the first shallow rapids encountered upstream from the river mouth (Ego, 1956; Kido & Heacock, 1992;

Keith & Lord, 2009). This type of behaviour is also known for the *Rhinogobius* species complex in Japanese streams. This is probably the result of a negative correlation between the survival of embryos during migration to the sea and the distance from the spawning ground to the river mouth (Tamada, 2001). Some experiments demonstrated that newly hatched larvae are physiologically better adapted to life in seawater, while prolonged exposure to freshwater markedly delayed development and increased mortality (Bell and Brown, 1994; Lindstrom and Brown, 1994; Lindstrom, 1998; Keith, 2003; Yokoi & Hosoya, 2005; Valade *et al.*, submitted). Therefore, larvae rapidly need to reach seawater after hatching. The closer they are to the river mouth, the more chance they have of quickly reaching the sea. For *Rhinogobius* species, Moriyama *et al.* (1998) estimated that in low river flow, embryos from the upstream reaches die of starvation before they reach the sea. As a result, Iguchi and Mizuno (1991) suggested that early starvation of larvae limits the reproductive success of fish located far from the sea, which would result in a strong selection of fish reproduction in certain regions of rivers within a given distance from the sea. Valade (2001) and Valade *et al.* (submitted) showed that *Sicyopterus lagocephalus* larvae die after 3 to 7 days if they have not reached the sea. Fish therefore seem to migrate towards the lower reaches in order to find suitable spawning grounds or to favour larval downstream migration.

Another hypothesis concerns fish density in the river. Penaorou River is taboo; there is therefore no fishing or human activity of any kind in this river. Population densities, for all fish and decapod crustaceans, exhibited in this river were very high, and greater than in the Pelouva River (Keith *et al.*, in press). A high population density leads to a higher level of competition for territory, food and reproduction. In the “up-and-down” profiles found in the Penaorou River, the first Sr:Ca peak is observed about 180 μm after the metamorphosis check mark, corresponding to individuals measuring between 40 and 45 mm in standard length. Although age estimation after the metamorphosis check mark has not yet been achieved (Lord *et al.*, accepted), we assume that 40 mm individuals are young and they may be in search of a territory. The competition being too great, they may undertake up-and-down migrations along the river in order to find a territory. Radtke & Kinzie (1996) found results for *Lentipes concolor* that they interpreted as possible secondary excursions to estuaries by juveniles. Agonistic relationships between individuals might indeed be one cause for the “up-and-down” profiles observed in the Penaorou River. The juveniles must migrate from the lower or medium reaches of river habitats to the habitats they will occupy as adults. Yuma *et al.* (2000) noted for *Rhinogobius sp.* that beyond the first major waterfall, which acts as a barrier against predators, schooling and escape behaviours are replaced by agonistic interactions between juveniles competing for space and food (Keith, 2003). For *Sicyopterus stimpsoni*, the species' distribution along the river is determined by the aggression of coloured post-larvae and subsequent migration upstream of the least coloured

individuals. When the least coloured post-larvae reach a site with a lower density of competitors, they stop migrating and develop coloured signals. At this time, aggression becomes important in the distribution of the species, with adults and coloured juveniles displace non-coloured young (Nishimoto & Fitzsimons, 1986). Males of adjacent territories show little or no aggressive behaviour among themselves because the boundaries are exactly defined; however they will chase males passing through their territory (Nishimoto & Fitzsimons, 1986; Osugi *et al.*, 1998). In the genus *Lentipes*, the adults are territorial (especially the males) (Fitzsimons and Nishimoto, 1990; Watson *et al.*, 2002). In *Lentipes concolor*, males establish a territory in the upper part of the river. These territories are always situated in areas that experience strong currents and good water clarity. They vary in size from 0.1 to 4 m² (Fitzsimons and Nishimoto, 1990) and are larger in still waters (pools) and smaller in riffles. The females move between the territories of different males and are courted when gravid. However, a number of females have been reported on the same territory for 32 months (Fitzsimons and Nishimoto, 1990). Beyond the “barrier” of the first waterfalls, most juveniles will develop dark colours and defend a temporary feeding and resting territory, forcing others of the same species to migrate upstream. In some species, the adult population is redistributed when adults swim downstream for reproduction, which creates space upstream for the juveniles (Ego, 1956).

In New Caledonia, for both *S. lagocephalus* and the endemic *S. sarasini*, once again two different patterns were observed. Sr:Ca ratios also exhibited a typical amphidromous life cycle with the Sr:Ca ratio being high between the nucleus to the metamorphosis check mark. For all the rivers prospected, except the Trou Bleu and the Co-Daru Kwatéa Rivers in the South Province, all individuals showed a “square” profile (Fig. 5a, 5b, 6a, 6b). As soon as post-larvae entered the estuary, they migrated upstream and never returned to estuarine locations. Rivers in the North of New Caledonia are short and fast flowing, ensuring reproductive success even if larvae hatch in elevated locations. In this area, *S. lagocephalus* is the only *Sicyopterus* occurring in the streams (Marquet *et al.*, 2003). It is therefore not competing with another species to find a territory and settle. Rivers in the South Province, like those studied in this work, generally have low population densities (Marquet *et al.*, 2003). *S. sarasini* and *S. lagocephalus* live in sympatry in these rivers but they may not be competing for space.

For the Trou Bleu and the Co-Daru Kwatéa Rivers, we only found one type of profile for both species. The profile was “constant”, with a high and stable Sr:Ca ratio even for large individuals (Fig. 5c, 6c, 6d). No decrease was observed with the metamorphosis check mark. This suggests that fish stay in estuarine waters throughout their entire life. This can be explained by the fact that in the Co-Daru Kwatéa River, the stream is rapidly interrupted. About 50 metres upriver from the river mouth, no water flowed (pers. obs). The Trou Bleu River is very short and has very sparse vegetation on the riverbanks. Very little water flows in this river and the temperature can be high (more than 28°C). Sicydiinae species

tend rather to inhabit streams shadowed by vegetation as it keeps the water at a viable temperature (no more than 24°C) (Marquet *et al.*, 2003). In both rivers, there were obstacles to the upstream migration, showing that *S. sarasini* and *S. lagocephalus* are capable of living in a brackish environment. However, when there is no barrier to upstream migration in the river, every individual that we analysed migrated upstream straight after recruitment in fresh water.

The journey undertaken by the post-larvae from the sea to the river, inevitably leads to encounters with predators. Major predators would include open-water predators, such as *Kuhlia* sp., and ambush predators, such as *Eleotris* sp. (Kinzie, 1992; Kido, 1996; Keith *et al.*, 2002). These predators are mainly found in the lower course of the river, and quickly migrating upstream is one way of escaping predation. If there are barriers to migration, like in the case of the Trou Bleu and the Co-Daru Kwatéa rivers, fish are trapped in the estuary and are highly threatened by predation. Additionally, individuals will probably also suffer more from competition for food and territory if unable to migrate upstream to find suitable habitats. As a consequence, in these two rivers, *Sicyopterus* populations were very depleted, with very low densities.

Otolith Sr:Ca ratio has been widely used to determine fish migratory histories and the reconstruction of movements between marine and freshwater habitats of diadromous species (Arai & Tsukamoto, 1998; Tsukamoto & Arai, 2001; Arai & Hirata, 2006). Investigating the elemental composition of otoliths has been used on a few amphidromous fish, such as *Lentipes concolor* in Hawaii (Radtke & Kinzie, 1996; Radtke *et al.*, 1999), the stocked ayu, *Plecoglossus altivelis* (Otake & Uchida, 1998; Arai, 2006; Kuroki *et al.*, 2006) and various *Rhinogobius* species (Tsunagawa & Arai, 2008; Tsunagawa *et al.*, 2009). Otolith elemental analysis also has been widely used to investigate diadromous patterns in many eel species (Arai *et al.*, 1997; Arai *et al.*, 2000; Arai *et al.*, 2004; Jessop *et al.*, 2002; Jessop *et al.*, 2006; Tabouret *et al.*, in prep. a.). The Ba:Ca ratio, on the other hand, has aroused little interest in the ichthyological community despite its potentially promising results (Bath *et al.*, 2000; de Vries *et al.*, 2005; Elsdon & Gillanders, 2005b; Gillanders, 2005; McCulloch, 2005). In this study, the water's geochemical composition is unknown; we chose to investigate the behaviour of Ba:Ca and Sr:Ca ratios in *Sicyopterus* otoliths, as they can both be used in the analysis of diadromous movements. However, the Ba:Ca ratio did not prove effective for the analysis of fish caught in Vanuatu rivers: the Ba:Ca ratio was very low, whatever the ambient salinity. The Sr:Ca ratio was the only informative measure concerning the migration pattern of the fish. Bath *et al.* (2000) showed that Sr incorporation in the otolith can be influenced by ambient temperature, however, in tropical island streams, temperature variations are very low. As a consequence, it is very likely that the Sr:Ca pattern that we observed for Vanuatu specimens reflects individual migrations, and is not the result of temperature fluctuations during the adult life of the fish. In New Caledonia, the Ba:Ca ratio showed an

inverse pattern to that of Sr:Ca. The Ba:Ca ratio was high whenever the Sr:Ca ratio was low. The joint use of Ba:Ca and Sr:Ca, in the case of New Caledonia, was thus interesting and, as the incorporation of Ba is not affected by environmental factors (Bath *et al.*, 2000), the profiles observed for both ratios truly reflected fish movements. The use of Ba:Ca, although it has been proven to be valuable in many recent studies (McCulloch, 2005; Tabouret *et al.*, in prep. a), is not relevant in all cases, Vanuatu being a case in point. It would be best, whenever possible, to analyse the water's geochemical composition prior to otolith microchemical analysis. This would provide information about which trace elements could be used as environmental markers in a specific river system (Ba, Mn, Mg...) (Elsdon and Gillanders, 2006).

Rivers in Vanuatu lack barium, whereas it is present in New Caledonian rivers. The substrate in New Caledonia and Vanuatu differs considerably, Ba is probably only one of the differences (Keith *et al.*, 2009; Grancolas *et al.*, 2008). These two countries have different geological origins. Vanuatu islands have a double origin; some are volcanic and some correspond to coral reef that has been uplifted as the Pacific plate has risen above the Indo-Australian plate. On the other hand, New Caledonia is of continental origin. It separated from Gondwana 65 million years ago (Keith *et al.*, 2009). These facts may provide new insight into why we have two geographically close endemic species. We know that newly hatched Sicydiinae larvae are capable of an active salinity choice (Bell & Brown, 1995). Competent recruiting post-larvae might also be able to choose the freshwater coming from a specific substrate, in the same way as Salmonids (Dittman & Quinn 1996). It is likely that *S. sarasini* and *S. aiensis* individuals choose a particular substrate on which to settle (Keith *et al.* 2009). As part of Gondwana, New Caledonia has specific substrates that are not found in volcanic areas, like Vanuatu. Indeed, the three New Caledonian endemic gobies (*Protogobius attiti*, *Schismatogobius fuligimentus* and *Sicyopterus sarasini*) live on ultramafic substrate (Lord & Keith, 2008), which substrate may be inadequate for other species, like *S. aiensis*. For *S. lagocephalus*, Keith *et al.* (2005) suggested that it has probably acquired the ability to adapt to any type of substrate enabling it to live in sympatry with the other two *Sicyopterus* species studied in this work.

V. Conclusion

This preliminary work analysing Sr:Ca and Ba:Ca ratios on *Sicyopterus* otoliths, using a femtosecond laser ablation ICP-MS, showed that the Sr:Ca ratio is a very effective method for determining migration behaviours, whereas the Ba:Ca ratio only seems to be relevant in certain geological systems (i.e., New Caledonia in this work). The results of our study are, however, innovative and promising. For the first time, different adult migratory behaviours were observed in *Sicyopterus* species, and their amphidromous life cycle was confirmed. The elemental analysis of otoliths has

considerable potential for detecting the movements of freshwater species along salinity gradients. Our results reveal that, although strictly amphidromous, *Sicyopterus* species show flexibility in their adult life-history strategy to adapt to particular conditions and to ensure reproductive success. This flexibility, whatever the species, shows the ability of this genus to adapt to habitat particularities. If rivers show even the slightest favourable conditions, post-larvae seem to be capable of colonising freshwater streams. These different behaviours are a sort of “natural insurance” against extinction. However, two of the species involved in this study are endemic, with probably limited stocks. In islands, areas with substantial human activity primarily impact freshwater systems and resources. The simultaneous destruction of a few rivers, even only one or two (Keith *et al.*, 2002), housing Sicydiinae populations, could be sufficient to lead these species to extinction (Keith & Marion, 2002; Souchon & Keith, 2002). Our results also show that these species utilise the maximum potential of the streams they inhabit, from the estuary to the higher reaches, sometimes transiting up and down the stream. This presupposes that the entire stream be free of impassable barriers. In many islands, human impact is considerable on aquatic habitats, especially on river mouth habitats, which are of great importance for amphidromous species. As our results show, these species have to undergo two migrations to and from the sea. Some specimens might also use estuaries as reproductive grounds, and some even seem to stay there their entire life. The success of these species' life cycle depends on estuarine capacity to offer favourable settling conditions to recruiting post-larvae and on the maintenance of an open ocean-mountain corridor. Stream mouth habitats are critical for these species' survival and deserve particular attention by planners and managers (Radtke & Kinzie, 1996).

Acknowledgments

First, we would like to thank all the partners that have provided financial support for this work: the New Caledonian Government and the National Museum of Natural History of Paris (PPF “Ecologie fonctionnelle et développement durable des écosystèmes naturels et anthropisés”, and Leg Prevost) for the PhD fellowship, BIONEOCAL ANR, and the Fondation de France. We also thank the Vanuatu Environment Unit (D. Kalfatak) and the New Caledonian North and South Provinces (J-J. Cassan, C. Flouhr, J. Manauté and C. Méresse) for allowing sampling (permit No 1224-08/PS) and the “Santo 2006” field mission. We would also like to thank the laboratory formerly known as LASAA (Laboratoire d'Analyses Sclérochronologiques des Animaux Aquatiques), Brest, France, (E. Morize, E. Dabas and A. Ogor) for the otolith preparation internship. Finally, we would like to extend our thanks to D. Lord, native English speaker, for rereading this manuscript.

VI. References

- Arai, T. 2002. Migratory history of fishes: present status and perspectives of the analytical methods. *Jpn. J. Ichthyol.* 49: 1-23.
- Arai, T. 2006. Comparison of habitat use during early life stage between ayu *Plecoglossus altivelis* and ice goby *Leucopsarion petresi* along Sanriku Coast of Japan, as determined from otolith microchemistry. *Fisheries Sci.* 72: 382-387.
- Arai, T., and Hirata, T. 2006. Differences in the trace element deposition in otoliths between marine- and freshwater-resident Japanese eels, *Anguilla japonica*, as determined by laser ablation ICPMS. *Environ. Biol. Fish.* 75: 173-182.
- Arai, T., and Tsukamoto, K. 1998. Application of otolith Sr:Ca ratios to estimate the migratory history of masu salmon, *Oncorhynchus masou*. *Ichthyol. Res.* 45 (3): 309-313.
- Arai, T., Hirata, T., and Takagi, Y. 2007. Application of laser ablation ICPMS to trace the environmental history of chum salmon *Oncorhynchus keta*. *Mar. Environ. Res.* 63(1): 55-66.
- Arai, T., Kotake, A., Lokman, P.M., Miller, M.J., and Tsukamoto, K. 2004. Evidence of different habitat use by New Zealand freshwater eels *Anguilla australis* and *A. dieffenbachii*, as revealed by otolith microchemistry. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 266: 213-225.
- Arai, T., Otake, T., and Tsukamoto, K. 1997. Drastic changes in otolith microstructure and microchemistry accompanying the onset of metamorphosis in the Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 161: 17-22.
- Arai, T., Otake, T., and Tsukamoto, K. 2000. Timing of metamorphosis and larval segregation of the Atlantic eels *Anguilla rostrata* and *A. anguilla*, as revealed by otolith microstructure and microchemistry. *Mar. Biol.* 137: 39-45.
- Barats, A., Pécheyran, C., Amouroux, D., Dubascoux, S., Chauvaud, L., and Donard, O.F.X. 2007. Matrix-matched quantitative analysis of trace-elements in calcium carbonate shells by laser-ablation ICP-MS: Application to the determination of daily scale profiles in scallop shell (*Pecten maximus*). *Anal. Bioanal. Chem.* 387(3): 1131-1140.
- Bath, G. E., Thorrold, S.R., Jones, C.M., Campana, S.E., McLaren, J.W., and Lam, J.W. 2000. Strontium and barium uptake in aragonitic otoliths of marine fish. *Geochim. Cosmochim. Ac.* 64(10): 1705-1714.
- Bell, K.N.I., and Brown, J.A. 1995. Active salinity choice and enhanced swimming endurance in 0-8 day old larvae of diadromous gobies, including *Sicydium punctatum* (Pisces), in Dominica West Indies. *Mar. Biol.* 121: 409-417.
- Campana, S. E. 1999. Chemistry and composition of fish otolith: pathways, mechanism and applications. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 188: 263-297.
- Campana, S. E., and Thorrold, S. R. 2001. Otoliths, increments, and elements: keys to a comprehensive understanding of fish populations? *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 58: 30-38.
- Chang, M.-Y., Wang, C.-H., You, C.-F., and Tzeng, W.-N. 2006. Individual-based dispersal patterns of larval gobies in an estuary as indicated by otolith elemental fingerprints. *Sci. Mar.* 70S2: 165-174.
- Chu, Y.-W., Han, Y.-S., Wang, C.-H., You, C.-F., and Tzeng, W.-N. 2006. The sex-ratio of the Japanese eel *Anguilla japonica* in the Kaoping River of Taiwan: the effect of cultured eels and its implication. *Aquaculture.* 261: 1230-1238.
- Claverie, F. 2009. Développement et applications d'un système laser femtoseconde infra-rouge basse énergie haute cadence de tir, pour l'analyse d'éléments traces dans les solides par couplage ablation laser / ICPMS. Thèse de l'Université de Pau et des Pays de l'Adour, spécialité environnement et matériaux.

- Closs, G.P., Smith, M., Barry, B., and Markwitz, A. 2003. Non-diadromous recruitment in coastal population of common bully (*Gobiomorphus cotidianus*). New Zeal. J. Mar. Fresh. 37: 301-313.
- Correia, A.T., Antunes, C. Isidro, E.J., and Coimbra, J. 2003. Changes in otolith microstructure and microchemistry during larval development of the European conger eel (*Conger conger*). Mar. Biol. 142: 777-789.
- Coutant, C.C., and Chen C.H. 1993. Strontium microstructures in scales of freshwater and estuarine striped bass (*Morone saxatilis*) detected by laser ablation mass spectrometry. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 50:1318-1323.
- Crook, D. A., Macdonald, J.I., O'Connor, J.P., and Barry, B. 2006. Use of otolith chemistry to examine patterns of diadromy in the threatened Australian grayling *Prototroctes maraena*. J. Fish. Biol. 69(5): 1330-1344.
- Daverat, F., Tomas, J., Lahaye, M., Palmer, M., and Elie, P. 2005. Tracking continental habitat shifts of eels using otolith Sr/Ca ratios: validation and application to the coastal, estuarine and riverine eels of the Gironde-Garonne-Dordogne watershed. Mar. Freshwater Res. 56: 619-627.
- De Vries, M.C. Gillanders, B.M., and Elsdon, T.S. 2005. Facilitation of barium uptake into fish otoliths: Influence of strontium concentration and salinity. Geochim. Cosmochim. Ac. 69(16): 4061-4072.
- Dittman, A.H., and Quinn, T. P 1996. Homing in Pacific salmon: mechanisms and ecological basis. J. Exp. Biol. 199: 83-91.
- Dove, S.G., Gillanders, B.M., and Kingsford, M.J. 1996. An investigation of chronological differences in the deposition of trace metals in the otoliths of two temperate reef fishes. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 205:15-33
- Ego, K. 1956. Life history of freshwater gobies. In: Freshwater Games Fish Management Research, Project No. 4-4-R. Department of Land and Natural Resources, Honolulu, pp. 1-23.
- Elfman, M., Limburg, K. E., Kristiansson, P., Svedäng, H., Westin, L., Wickström, H., Malmqvist, K., and Pallon, J. 2000. Complex life histories of fishes revealed through natural information storage devices: case studies of diadromous events as recorded by otoliths. Nucl. Instrum. Meth. B: Beam Interactions with Materials and Atoms B 161-163: 877-881.
- Elsdon, T.S., and Gillanders, B.M. 2004. Fish otolith chemistry influenced by exposure to multiple environmental variables. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 313(2): 269-284.
- Elsdon, T.S., and Gillanders, B. M. 2006. Temporal variability in strontium, calcium, barium and manganese in estuaries: implications for reconstructing environmental histories of fish from chemicals in calcified structures. Estuar. Coast. Shelf S. 66: 147-156.
- Elsdon, T.S., and Gillanders, B.M. 2005a. Alternative life-history patterns of estuarine fish: barium in otoliths elucidates freshwater residency. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 62(5): 1143-1152.
- Elsdon, T.S., and Gillanders, B.M. 2005b. Consistency of patterns between laboratory experiments and field collected fish in otolith chemistry: an example and applications for salinity reconstructions. Mar. Freshwater Res. 56(5): 609-617.
- Elsdon, T.S., and Gillanders, B.M. 2005c. Strontium incorporation into calcified structures: separating the effects of ambient water concentration and exposure time. Mar. Ecol. Prog. Ser. 285 : 233-243.
- Farrel, J., and Campana, S.E. 1996. Regulation of calcium and strontium deposition on the otolith of juvenile tilapia, *Oreochromis niloticus*. Comp. Biochem. Phys. A. 115A: 103-109.
- Fernandez, B., Claverie, F., Pécheyran, C., and Donard, O.F.X. 2007. Direct analysis of solid samples by fs-LA-ICP-MS. Trends Anal. Chem. 26: 951-966.

- Fitzsimons, J.M., and Nishimoto, R.T. 1990. Territories and site tenacity in males of the Hawaiian stream goby *Lentipes concolor* (Pisces: Gobiidae). *Ichthyol. Explor. Fres.* 1: 185-189.
- Fowler, A.J., Campana, S.E., Jones, C.M., and Thorrold S.R. 1995. Experimental assessments of the effect of temperature and salinity on elemental composition of otoliths using solution-based ICPMS. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 52: 1421-1430.
- Geffen, A.J., Pearce, N., Perkins, W. 1998. Metal concentrations in fish otoliths in relation to body composition after laboratory exposure to mercury and lead. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 165: 235– 245.
- Gillanders, B.M. 2005. Otolith chemistry to determine movements of diadromous and freshwater fish. *Aquat. Living Resour.* 18(3): 291-300.
- Halden, N.M., Mejia, S.R., Babaluk, J.A., Reist, J.D., Kristofferson, A.H., Campbell, J.L., and Teesdale, W.J. 2000. Oscillatory zinc distribution in Arctic char (*Salvelinus alpinus*) otoliths: the result of biology or environment? *Fish. Res.* 46(1-3): 289-298.
- Hamer, P.A., Jenkins, G.P., and Coutin, P. 2006. Barium variation in *Pagrus auratus* (Sparidae) otoliths: A potential indicator of migration between an embayment and ocean waters in south-eastern Australia. *Estuar. Coast. Shelf S.* 68(3-4): 686-702.
- Howland, K.L., Tonn, W.M., Babaluk, J.A., and Tallman, R.F. 2001. Identification of freshwater and anadromous inconnu in the Mackenzie River system by analysis of otolith strontium. *T. Am. Fish. Soc.* 130: 725-741.
- Iguchi, K., and Mizuno, N. 1991. Mechanisms of embryonic drift in the amphidromous goby. *Rhinogobius brunneus*. *Environ. Biol. Fish.* 31: 295-300.
- Jessop, B.M., Shiao, J.-C., Iizuka, Y., and Tzeng, W.-N. 2002. Migratory behaviour and habitat use by American eels *Anguilla rostrata* as revealed by otolith microchemistry. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 233: 217-229.
- Jessop, B.M., Shiao, J.-C., Iizuka, Y., and Tzeng, W.-N. 2006. Migration of juvenile American eels *Anguilla rostrata* between freshwater and estuary as revealed by otolith microchemistry. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 310: 219-233.
- Kalish, J.M. 1989. Otolith microchemistry: validation of effects of physiology, age and environment on otolith composition. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 132: 151-178.
- Kalish, J.M. 1990. Use of otolith microchemistry to distinguish the rogeny of sympatric anadromous and non-anadromous salmonids. *Fish. Bull.* 88: 657-666.
- Keith, P. 2003. Biology and ecology of amphidromous Gobiidae in the Indo-Pacific and the Caribbean regions. *J. Fish Biol.* 63: 831-847.
- Keith, P., and Lord, C. In press. Tropical freshwater gobies: Amphidromy as a life cycle. In: *The Biology of Gobies*. Patzner R.A., Van Tassell J.L., Kovacic M., Kapoor B.G. (eds.), Science Publishers Inc.
- Keith, P., and Marion, L. 2002. Methodology for drawing up a Red List of threatened freshwater fish in France. *Aquat. Conserv.-Mar. Freshw. Ecosyst.* 12: 169-179.
- Keith, P., Galewski, T., Cattaneo-Berrebi, G., Hoareau, T., and Berrebi, P. 2005. Ubiquity of *Sicyopterus lagocephalus* (Teleostei: Gobioidae) and phylogeography of the genus *Sicyopterus* in the Indo-Pacific area inferred from mitochondrial cytochrome b gene. *Mol. Phyl. Evol.* 37: 721-732.
- Keith, P., Hoareau, T.B., Lord, C., Ah-Yane, O., Gimmoneau, G., Robinet, T., and Valade, P. 2008. Characterisation of post-larval to juvenile stages, metamorphosis and recruitments of an amphidromous goby, *Sicyopterus lagocephalus* (Pallas) (Teleostei: Gobiidae: Sicydiinae). *Mar. Freshwater Res.* 59: 876-889.
- Keith, P., Lord, C., and Vigneux, E. 2006. In vivo observations on post-larval development of freshwater gobies and eleotrids from French Polynesia and New Caledonia. *Ichthyol. Explor. Fres.* 17: 187-191.

- Keith, P., Lord, C., Gerbeaux, P., and Kalfatak D. In press. Aquatic communities, focus on fish, shrimps and crabs. In: Natural History of Santo. Collection Patrimoines naturels, Muséum national d'Histoire naturelle, Paris.
- Keith, P., Lord, C., Marquet, G., and Kalfatak, D. 2009. Biodiversity and biogeography of amphidromous fishes from New Caledonia, a comparison with Vanuatu. *Zoologia Neocaledonica* 7. Biodiversity Studies in New Caledonia. Mémoires du Muséum national d'Histoire naturelle. 198: 175-183.
- Keith, P., Vigneux, E., and Marquet, G. 2002. Atlas des poissons et des Crustacés d'eau douce de Polynésie française. Publications Scientifiques du Muséum national d'Histoire naturelle, Paris. Patrimoines naturels. 55: 175 p.
- Keith, P., Watson, R.E., and Marquet, G. 2004. *Sicyopterus aiensis*, a new species of freshwater goby from Vanuatu (Teleostei: Gobioidi). *Cybium*. 28(2): 111-118.
- Kido, M.H. 1996. Morphological variation in feeding traits of native Hawaiian stream fishes. *Pac. Sci.* 50: 184-193.
- Kido, M.H., and Heacock, D.E. 1992. The spawning ecology of o'opu-nakea (*Awaous stamineus*) in Wainiha River. In: New Directions in Research Management and Conservation of Hawaiian Freshwater Stream, Biology and Fisheries Management, W.Devick (Ed.). Dept. of Aquatic Ressources, Honolulu. pp. 142-157.
- Kinzie III, R.A. 1992. How unique are Hawaiian freshwater gobies? In: New Directions in Research Management and Conservation of Hawaiian Freshwater Stream, Biology and Fisheries Management, W. Devick (Ed.). Dept. Aquatic Resources, Honolulu, pp. 18-39.
- Kraus, R.T., and Secor, D.H. 2004. Incorporation of strontium into otoliths of an estuarine fish. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 302(1): 85-106.
- Kuroki, M., Tao, M., Ishida, R., and Tsukamoto, K. 2006. Migratory history of wild and released ayu (*Plecoglossius altivelis*) in the Korube River, Japan. *Coastal Mar. Sci.* 30(2): 425-431.
- Lecomte-Finiger, R. 1999. L'otolithe : la "boîte noire" des Téléostéens. *Année Biologique*. 107-122.
- Limburg, K.E. 1995. Otolith strontium traces environmental history of subyearling American shad *Alosa sapidissima*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 119(1-3): 25-36.
- Limburg, K.E., Landergren, P., Westin, L., Elfman, M., and Kristiansson, P. 2001. Flexible modes of anadromy in Baltic sea trout: Making the most of marginal spawning streams. *J. Fish Biol.* 59(3): 682-695.
- Lindstrom, D.P. 1998. Reproduction, early development and larval transport dynamics of amphidromous Hawaiian Gobioids. Ph. D. Thesis, University of Michigan, Ann Arbor.
- Lindstrom, D.P., and Brown, C.L. 1994. Early development and biology of the amphidromous Hawaiian stream goby *Lentipes concolor*. In: Systematics and Evolution of Indo-Pacific Fishes. Proceedings of the Fourth Indo-Pacific Fish Conference. Faculty of Fisheries. Bangkok, Thailand, pp. 397-409.
- Lord, C., and Keith, P. 2008. Threatened fishes of the world: *Sicyopterus sarasini* Weber & Beaufort, 1915 (Gobiidae). *Environ. Biol. Fish.* 83: 169-170.
- Lord, C., Brun, C., Hautecoeur, M., Keith, P. In press. Insights on endemism: comparison of the duration of the marine larval phase estimated by otolith microstructural analysis of three amphidromous *Sicyopterus* species (Gobioidi: Sicydiinae) from Vanuatu and New Caledonia. *Ecol. Freshw. Fish.*
- Marquet, G., Keith, P., and Vigneux, E. 2003. Atlas des poissons et des crustacés d'eau douce de Nouvelle-Calédonie. Publications Scientifiques du Muséum national d'Histoire naturelle, Paris. Patrimoines Naturels. 58: 282p.

- McCulloch, M., Cappo, M., Aumend, J., and Miller, W. 2005. Tracing the life history of individual barramundi using laser ablation MC-ICP-MS Sr-isotopic and Sr/Ba ratios in otoliths. *Mar. Freshwater Res.* 56: 637-644.
- McCulloch, M., Fallon, S., Wyndham, T., Hendy, E., Lough, J., and Barnes, D. 2003. Coral record of increased sediment flux to the inner Great Barrier Reef since European settlement. *Nature*. 421(6924): 727-730.
- McDowall, R. M. 1993. Implications of diadromy for the structuring and modelling of riverine fish communities in New Zealand. *New Zeal. J. Mar. Fresh.* 27: 453-462.
- McDowall, R.M. 1988. *Diadromy in fishes*. Timber Press, Portland Oregon.
- Milton, D., Halliday, I., Sellin, M., Marsh, R., Staunton-Smith, J., and Woodhead, J. 2008. The effect of habitat and environmental history on otolith chemistry of barramundi *Lates calcarifer* in estuarine populations of a regulated tropical river. *Estuar. Coast. Shelf S.* 78(2): 301-315.
- Milton, D.A., Chenery, S.R. 2001. Sources and uptake of trace metals in otoliths of juvenile barramundi (*Lates calcarifer*). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 264(1): 47-65.
- Moriyama, A., Yanagisawa, Y., Mizuno, N., and Omori, K. 1998. Starvation of drifting goby larvae due to retention of free embryos in upstream reaches. *Environ. Biol. Fish.* 52: 321-329.
- Myers, G.S. 1949. Usage of anadromous, catadromous and allied terms for migratory fishes. *Copeia*. 49-97.
- Nishimoto, R.T., and Fitzsimons, J.M. 1986. Courtship, territoriality, and coloration in the endemic Hawaiian freshwater goby, *Lentipes concolor*. In: *Indo-Pacific Fish Biology. Proceedings of the 2nd International Conference on Indo-Pacific Fishes, Tokyo*, pp. 811-817.
- Osugi, T., Yanagisawa, Y., and Mizuno, N. 1998. Feeding of a benthic goby in a river where nektonic fishes are absent. *Environ. Biol. Fish.* 52: 331-343.
- Otake, T., and Uchida, K. 1998. Application of otolith microchemistry for distinguishing between amphidromous and non-amphidromous stocked ayu, *Plecoglossus altivelis*. *Fisheries Sci.* 64(4): 517-521.
- Pannella, G. 1971. Fish otoliths: daily growth layers and periodical patterns. *Science*. 173: 1124-1127.
- Radtke, R.L. 1989. Strontium-Calcium concentration ratios in fish otoliths as environmental indicators. *Biochemistry and Physiology. Part A: Physiology.* 92(2): 189-193.
- Radtke, R.L., and Kinzie III, R.A. 1996. Evidence of a marine larval stage in endemic Hawaiian stream gobies from isolated high-elevation locations. *T. Am. Fish. Soc.* 125: 613-621.
- Radtke, R.L., Townsend, D.W., Kinzie III, R.A., and Fey, D. 1999. Two-dimensional X-ray mapping of otoliths, a high-resolution technique for determining amphidromy in the tropical goby *Lentipes concolor* (Gill). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 238(1): 21-27.
- Ryan, P. A. 1991. The success of Gobiidae in tropical Pacific insular streams. *New Zeal. J. Zool.* 18: 25-30.
- Sadovy, Y., and Severin, K.P. 1992. Trace elements in biogenic aragonite: correlation of body growth rate and strontium levels in the otoliths of the white grunt, *Haemulon plumieri* (Pisces: Haemulidae). *B. Mar. Sci.* 50: 237-257.
- Secor, D.H., and Rooker, J.R. 2000. Is otolith strontium a useful scalar of life cycles in estuarine fishes? *Fish. Res.* 46: 359-371.
- Secor, D.H., Dean, J.M., and Campana, S.E. 1992. Otolith removal and preparation for microstructural examination. In: *Otolith microstructure examination and analysis* (Stevenson D. K. & Campana S. E., ed.), pp. 19-57. Ottawa, Canada: Canadian Special Publication of Fisheries and Aquatic Sciences 117.

- Secor, D.H., Henderson-Arzapalo, A., and Piccoli, P.M. 1995. Can otolith microchemistry chart patterns of migration and habitat utilization in anadromous fishes? *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 192: 15-33.
- Shen, K.N., and Tzeng, W.N. 2002. Formation of a metamorphosis check in otoliths of the amphidromous goby *Sicyopterus japonicus*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 228: 205-211.
- Shen, K.N., Lee, Y.C., Tzeng, W.N. 1998. Use of otolith microchemistry to investigate the life history pattern of gobies in a Taiwanese stream. *Zool. Stud.* 37: 322-329.
- Shiao, J.C., Lozys, L., Iizuka, Y., and Tzeng, W.N. 2006. Migratory patterns and contribution of stocking to the population of European eel in Lithuanian waters as indicated by otolith Sr:Ca ratios. *J. Fish Biol.* 69(3): 749-769.
- Souchon, Y., and Keith, P. 2002. Freshwater fish habitat: science, management and conservation in France. *Aquat. Ecosyst. Health Manag.* 4: 401-412.
- Tabouret, H. 2009. Recherche des marqueurs d'exposition aux contaminants et fréquentation des habitats chez l'anguille *Anguilla anguilla* de l'estuaire de l'Adour : de la réponse moléculaire à la microchimie de l'otolithe. Thèse de l'Université de Pau et des Pays de l'Adour, spécialité Environnement et Matériaux. 334 pp.
- Tabouret, H., Bareille, G., Claverie, F., Pécheyran, C., Prouzet, P., and Donard, O.F.X. In preparation a. Simultaneous use of strontium:calcium and barium:calcium ratio in otoliths as markers of habitat: application to the European eel (*Anguilla anguilla*) in the Adour basin.
- Tabouret, H., Claverie, F., Pécheyran, C., Bareille, G., Donard, and O.F.X. In preparation b. Femtosecond laser ablation/ICP-MS for the determination of the elemental composition in eel otoliths.
- Taillebois, L. 2009. Caractérisation de la métamorphose chez *Sicyopterus lagocephalus* (Teleostei : Gobioidi): biométrie et rôle des hormones thyroïdiennes. Master's thesis. Université Paris 6, France.
- Tamada, K. 2001. Clutch size and egg size in three species of *Rhinogobius* complex dwelling in a single stream. *Jpn. J. Ichthyol.* 48: 49-52.
- Tsukamoto, K., Arai, T. 2001. Facultative catadromy of the eel *Anguilla japonica* between freshwater and seawater habitats. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 220: 265-276.
- Tsunagawa, T., Arai, T. 2008. Flexible migration of Japanese freshwater gobies *Rhinogobius* spp. as revealed by Sr:Ca ratios. *J. Fish Biol.* 73: 2421-2433.
- Tsunagawa, T., Suzuki, T., Arai, T. 2009. Migratory history of *Rhinogobius* sp. OR morphotype "Shimahire" as revealed by otolith Sr:Ca ratios. *Ichthyol. Res.* 10.1007/s10228-009-0115-0
- Tzeng, W.N. 1996. Effects of salinity and ontogenic movements on strontium:calcium ratios in the otoliths of Japanese eel, *Anguilla japonica* Temmiinck and Schlegel. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 199: 111-122.
- Valade, P. 2001. Etude de la biologie de reproduction et des premiers stades larvaires des cabots bouches ronde à l'île de la Réunion. M.Sc. Thesis, University of La Reunion.
- Valade, P., Lord, C., Grondin, H., Bosc, P., Iida, M., Tsukamoto, K., and Keith, P., *submitted*. Early life history and description of larval stages of an amphidromous goby, *Sicyopterus lagocephalus* (Pallas, 1767) (Teleostei: Gobiidae: Sicydiinae).
- Volk, E.C., Blakley, A., Schroder, S.L., and Kuehner, S.M. 2000. Otolith chemistry reflects migratory characteristics of Pacific Salmonids: using otolith core chemistry to distinguish maternal associations with sea and freshwaters. *Fish. Res.* 46: 251-266.
- Watson, R.E., Keith, P., Marquet, G. 2002. *Lentipes kaaea*, a new species of freshwater goby from New Caledonia (Teleostei: Gobioidi: Sicydiinae). *Bulletin Français de pêche et de Pisciculture.* 364: 173-185.
- Wells, B.K., Rieman, B.E., Clayton, J.L., Horan, D.L., Jones, C.M. 2003. Relationships between water, otolith, and scale chemistries of westslope cutthroat trout from the

- Coeur d'Alene River, Idaho: The potential application of hard-part chemistry to describe movements in freshwater. *T. Am. Fish. Soc.* 132(3): 409-424.
- Wyndham, T., McCulloch, M., Fallon, S., and Alibert, C. 2004. High-resolution coral records of rare earth elements in coastal seawater: Biogeochemical cycling and a new environmental proxy. *Geochim. Cosmochim. Ac.* 68: 2067-2080.
- Yokoi, K., and Hosoya, K. 2005. Larval salinity tolerance in the endangered goby *Rhinogobius* sp. BI (Gobiidae) from the Bonin Islands. *Jpn. J. Ichthyol.* 52: 31-34.
- Yoshinaga, J., Nakama, A., Morita, M., and Edmonds, J.S. 2000. Fish otolith reference material for quality assurance of chemical analyses. *Mar. Chem.* 69(1-2): 91-97.
- Yuma, M., Maruyama, A., and Rusuwa, B. 2000. Behaviour and distribution of upstream-migrating juvenile *Rhinogobius* sp. (the orange form). *Ichthyol. Res.* 47: 379-384.

Résumé : Dans un contexte de déclin de l'anguille européenne (*Anguilla anguilla* L.) et de recherche de marqueurs biologiques retraçant la fréquentation des divers habitats et renseignant sur la qualité de ceux-ci, une approche pluridisciplinaire a été mise en place sur l'estuaire de l'Adour et ses zones humides. Deux axes ont été privilégiés. Le premier cherchait à visualiser la présence successive de l'espèce dans différents écosystèmes en se basant sur la composition élémentaire des otolithes. Le deuxième avait pour but d'évaluer la pression chimique inorganique et organique subie par l'anguille dans les zones d'études en s'appuyant sur la bioconcentration des contaminants dans les tissus mous et la réponse moléculaire précoce au stress chimique. En vue des analyses de la composition élémentaire des otolithes et pour répondre au mieux à la structure en trois dimensions, à la faible concentration des éléments dans la matrice tout en conservant une résolution spatiale la plus fine possible, quatre stratégies de micro-échantillonnage et d'analyses multi-élémentaires par ablation laser femtoseconde ICP-MS ont été testées (cratère, scan 1D, scan 2D, ablation flash). La méthodologie présentant le meilleur compromis par rapport aux objectifs fixés (enregistrement continu, approche multi-élémentaire) a ensuite été appliquée sur les otolithes d'anguilles jaunes du Bas-Adour. L'utilisation simultanée des profils continus de Sr et de Ba, après validation, constitue un outil facile d'utilisation, rapide et fiable pour reconstruire les historiques de fréquentation des différents écosystèmes estuariens et dulçaquicoles par l'anguille tout en s'affranchissant des problèmes potentiels liés aux inclusions de vaterite, un polymorphe du carbonate de calcium. Trois grands types de comportement ont pu être mis en évidence sur l'Adour : résidence en eau saumâtre, résidence en eau douce et nomadisme. Ce dernier est plus particulièrement illustré par un mouvement marqué vers l'eau saumâtre pour des individus ayant passé de trois à quatre ans dans l'eau douce. Parallèlement, l'étude de la contamination organique et inorganique des tissus mous de l'anguille a permis de déduire à la faible contamination des zones humides échantillonnées. La première estimation en condition naturelle de la réponse précoce au stress chimique par évaluation de l'expression hépatique du gène *CYP1A1* par RT-PCR en temps réel confirme ces résultats. En revanche, dans la partie estuarienne aval de l'Adour, les niveaux en Hg, présent en majorité sous sa forme méthylée dans les anguilles, et l'analyse des PCBs indiquent des valeurs qui suscitent un examen plus approfondi au regard des normes européennes en vigueur. La confrontation des différents descripteurs (contamination des tissus mous par les métaux lourds et organochlorés, indice de condition) utilisés conforte la qualité moindre de la zone estuarienne malgré des performances de croissance de l'anguille favorisées sur ces sites. Ainsi, cette étude supporte l'intérêt de la mise en œuvre de descripteurs multiples utilisés (niveaux de métaux lourds et organochlorés dans les tissus mous, réponse moléculaire au stress chimique, microchimie de l'otolithe, indice de condition, taux de croissance) dans des approches intégrées pour comprendre et préciser les relations existantes entre l'anguille et ses zones de croissance continentales.

Mots – clefs : *Anguilla anguilla* – otolithe – fs-LA-ICP-MS – *CYP1A1* – mercure – Polychlorobiphényles

Abstract: In a context of decline of European eel (*Anguilla anguilla* L.) and search for biological markers of habitat use and quality, a multidisciplinary approach was engaged on the Adour estuary and its associated wetlands. Two axes were developed. The first axis aimed at highlighting the successive presence of the species in different ecosystems based on the otolith elemental composition. The second aimed at the evaluation of the chemical pressure underwent by eels based on the contaminant bioconcentration in soft tissues and the early molecular response to the chemical stress. With a view to the analyses of otolith elemental composition taking into account the 3D structure, the low elemental concentration in the matrix and keeping the finest spatial resolution, four micro sampling strategies and multi elemental analyses using femtosecond laser ablation ICP-MS were tested (crater, 1D scan, 2D scan, flash ablation). The strategy showing the best compromise according to the objectives (continuous recording, multi elemental approach) was applied on otolith of yellow eels from the Adour. The simultaneous use of Sr and Ba profiles, after validation, represents a new tool, easy, fast and reliable for the reconstruction of freshwater and brackish ecosystems use by eel avoiding misinterpretation due to vaterite inclusions. Three major behaviors were highlighted on the Adour: a residency in brackish water, a residency in freshwater and nomad behavior. The last one is illustrated by a shift to brackish water after three to four years spent in freshwater. Simultaneously, the study of inorganic and organic contamination of eel soft tissues showed that sampled wetlands are moderately contaminated. These results were confirmed by the first estimation, in wild conditions, of the early response to the chemical stress using the hepatic expression of *CYP1A1* gene measured by real time RT-PCR. Conversely, in the downstream part of the Adour estuary, Hg loads in eels, especially methyl mercury, and PCBs analyses indicate values that need further investigations considering the European norms of consumption. The comparison of the different markers used (heavy metal and organochlorinated compounds contamination of soft tissues, condition index) support a lower quality of the estuary despite higher eel growth rate on this site. This study supports the use of numerous markers in integrated studies in order to understand and specify the relationships between eels and their continental growth zones.

