



VetAgro Sup  
Campus Vétérinaire de Lyon



Ensemble, développons un territoire exceptionnel

# RAPPORT D'ANALYSES TOXICOLOGIQUES Sur 11 individus de Loutre d'Europe (*Lutra lutra*) du Marais Poitevin

## Rédaction :

Chales LEMARCHAND  
VetAgro Sup  
Campus vétérinaire de Lyon  
Laboratoire de toxicologie  
1 Avenue Bourgelat  
69 280 Marçay l'Etoile

26 octobre 2012

Action financée par :



Référence : BC n° 0000003694 du 19-9-11 / BC n° 0000003348 du 17-2-11

26 octobre 2012.

## RAPPORT D'ANALYSES TOXICOLOGIQUES Sur 11 individus de Loutre d'Europe (*Lutra lutra*) du Marais Poitevin

### I. Caractéristiques générales de l'échantillon :

Le tableau ci-dessous rassemble les informations biométriques, mesurées sur les individus autopsiés et utilisés dans l'interprétation. Globalement, les individus analysés se caractérisaient par un bon état général, leur indice K étant satisfaisant. La structure de l'échantillon fait apparaître une grande majorité de femelles (9 sur 11) et d'individus adultes (10 sur 11), ce qui ne correspond pas à un échantillonnage aléatoire. Ce biais relatif est inhérent à ce type d'analyses sur des espèces protégées récupérées indirectement (ici suite à des collisions routières).

Individu	Age	Longueur	Masse	Indice K	Département	Date
LF 159	SubAdulte	85	4,1	1,029993593	85	28/09/01
LM 160	Adulte	113,5	8,1	1,201270866	85	11/08/07
LF 161	Adulte	110,5	7,1	0,952761946	85	04/11/07
LF 162	Adulte	101	5,9	0,981489882	85	21/01/07
LF 163	Adulte	102,5	5,2	0,835093694	85	21/11/06
LF 164	Adulte	109	6,5	0,91	85	07/09/07
LF 165	Adulte	108,4	6,8	0,955324305	85	01/01/00
LM 166	Adulte	incomplet	9,5	nd	85	07/02/95
LF 167	Adulte	105,5	6,2	0,92935194	85	29/08/06
LF 168	Adulte	101,5	6,5	1,068615365	85	09/12/05
LF 169	Adulte	95	5,5	1,059168781	85	09/01/03

## II. Résultats

### 1. Contamination par les pesticides

Le tableau ci-dessous rassemble les résultats de contamination des loutres analysées par l'ensemble des pesticides considérés dans l'étude. En fonction de l'état des tissus prélevés et des quantités disponibles, l'analyse a porté sur le foie et / ou la graisse caudale des loutres (résultats en  $\text{mg.kg}^{-1}$  en poids de lipides ; L.D. : limite de détection, nd : non dosé ; OC : organochloré ; AVK : anticoagulants).

Individu	Organe	DDTs	Autres OC	PCBs	Herbicides	Organo Phosphorés et carbamates	pyréthrines	AVK
LF 159	foie	nd	<L.D.	nd	<L.D.	<L.D.	<L.D.	<L.D.
	graisse	0,14	nd	1,06	<L.D.	<L.D.	<L.D.	<L.D.
LM 160	foie	nd	nd	nd	<L.D.	<L.D.	<L.D.	<L.D.
	graisse	0,45	<L.D.	1,3	<L.D.	<L.D.	<L.D.	<L.D.
LF 161	foie	nd	nd	nd	<L.D.	<L.D.	<L.D.	<L.D.
	graisse	0,12	<L.D.	0,39	<L.D.	<L.D.	<L.D.	<L.D.
LF 162	foie	nd	nd	nd	<L.D.	<L.D.	<L.D.	<L.D.
	graisse	0,37	<L.D.	0,91	<L.D.	<L.D.	<L.D.	<L.D.
LF 163	foie	nd	nd	nd	<L.D.	<L.D.	<L.D.	<L.D.
	graisse	0,42	<L.D.	2,06	<L.D.	<L.D.	<L.D.	<L.D.
LF 164	foie	nd	nd	nd	<L.D.	<L.D.	<L.D.	<L.D.
	graisse	0,37	<L.D.	2,31	<L.D.	<L.D.	<L.D.	<L.D.
LF 165	foie	nd	nd	nd	<L.D.	<L.D.	<L.D.	<L.D.
	graisse	0,78	0,02	3,51	<L.D.	<L.D.	<L.D.	<L.D.
LM 166	foie	nd	nd	nd	<L.D.	<L.D.	<L.D.	<L.D.
	graisse	<L.D.	<L.D.	0,11	<L.D.	<L.D.	<L.D.	<L.D.
LF 167	foie	nd	nd	<L.D.	<L.D.	<L.D.	<L.D.	<L.D.
	graisse	0,35	<L.D.	0,74	<L.D.	<L.D.	<L.D.	<L.D.
LF 168	foie	nd	nd	nd	<L.D.	<L.D.	<L.D.	<L.D.
	graisse	0,15	<L.D.	0,65	<L.D.	<L.D.	<L.D.	<L.D.
LF 169	foie	nd	nd	nd	<L.D.	<L.D.	<L.D.	<L.D.
	graisse	0,42	<L.D.	1,08	<L.D.	<L.D.	<L.D.	<L.D.

Les pesticides organochlorés ont été détectés dans l'intégralité des individus, mais les concentrations, inférieures pour la plupart à  $0,5 \text{ mg.kg}^{-1}$  en poids de lipides se sont avérées très faibles, significativement moins importantes que dans les zones amont du bassin de la Loire ( $p < 0,05$ ). Les résidus de DDTs (DDE et DDD) restent les éléments majoritaires de l'ensemble des pesticides organochlorés recherchés, la molécule mère n'ayant pas été détectée. Les autres pesticides organochlorés relevés (essentiellement des traces de lindane, la plupart des autres éléments n'étant pas retrouvés), sont restés à de très faibles niveaux. Les variations observées de la contamination des loutres selon le sexe ou l'âge des individus sont restées faibles et non significatives (à relier avec la structure de l'échantillon).

Les PCBs dominent largement le *pool* total de composés organochlorés, sont détectés dans l'ensemble des individus et leur concentration maximale a atteint 3,51 mg.kg<sup>-1</sup> en poids de lipides. Comme pour les pesticides organochlorés, les concentrations moyennes et maximales des PCBs dans les tissus des loutres sont relativement faibles, et les variations observées de la concentration en PCBs suivant le sexe ou l'âge des loutres se sont avérées non significatives.

Parmi l'ensemble des composés analysés, aucun des pesticides organophosphorés, des herbicides, des pesticides carbamates ou des pyréthrinés n'a été détecté dans les tissus des loutres. L'analyse ayant été effectuée dans la même série que celles concernant d'autres espèces d'une étude globale sur le bassin de la Loire (notamment le balbuzard pêcheur), tout risque de biais expérimental lié à une non détection peut être ici exclu. Si l'absence des carbamates et des pyréthrinés a été constatée pour d'autres super prédateurs et semble suggérer une absence d'accumulation de ces composés dans les réseaux trophiques aquatiques de manière robuste, en revanche l'absence de pesticides organophosphorés et d'herbicides au sein des loutres de cette population semble plus surprenante, dans la mesure où leur présence (même faible et dispersée) dans les deux oiseaux étudiés par ailleurs (grand cormoran et balbuzard pêcheur, résultats non présentés ici) souligne leur persistance environnementale et leur capacité accumulative dans les réseaux trophiques jusqu'aux niveaux supérieurs. Toutefois, les données bibliographiques pour la loutre d'Europe restent rares concernant ces composés pour une éventuelle comparaison, ou la vérification d'hypothèses pour tenter d'expliquer ces résultats, l'essentiel des travaux s'intéressant aux organochlorés et aux métaux.

Aucune des loutres analysées ici ne s'est avérée contaminée par les anticoagulants recherchés. Parmi l'ensemble des loutres du bassin de la Loire (tous sites de récupération confondus) analysées quant à leur éventuelle contamination par des résidus d'anticoagulants, seulement deux individus se sont avérés contaminés par la bromadiolone, les deux individus concernés étaient des mâles provenant du même secteur de la rivière Allier dans le département du Puy-de-Dôme, où la bande de ripisylve et les berges ont longtemps été traitées à l'aide d'appâts empoisonnés aux anticoagulants en vue de l'élimination des ragondins et des rats musqués. Les

anticoagulants ne semblent pas constituer un danger pour la conservation de la loutre, d'autant plus que les pratiques actuelles n'autorisent plus l'utilisation d'anticoagulants en zone aquatique. Cependant, l'abaissement régulier des seuils de détection analytiques met de plus en plus souvent en évidence l'importante dissémination environnementale des anticoagulants, et une vigilance certaine devra être de mise à l'avenir quant à leur suivi, ces résultats soulignant le risque d'intoxications d'espèces non ciblées lors des campagnes de contrôle des espèces de ravageurs ou d'indésirables.

## 2. Contamination par les métaux

Le tableau ci-dessous rassemble les résultats de contamination des loutres analysées par l'ensemble des métaux considérés dans l'étude. En fonction de l'état des tissus prélevés et des quantités disponibles, l'analyse a porté sur le foie et / ou le rein des loutres (résultats en mg.kg<sup>-1</sup> en poids sec, sauf mercure en poids frais; L.D. : limite de détection, nd : non dosé).

Le plomb, le cadmium, le cuivre et le mercure ont une été systématiquement détectés dans l'ensemble des loutres. En revanche et à la différence du secteur amont du bassin de la Loire, l'arsenic n'a pas été détecté sur la zone du marais Poitevin, dans aucune des loutres analysées.

	Plomb		Cadmium		Cuivre		Mercure		Arsenic	
	Foie	Rein	Foie	Rein	Foie	Rein	Foie	Rein	Foie	Rein
<b>LF 159</b>	0,05	0,07	0,02	0,83	45,53	29,98	2,39	nd	<L.D.	<L.D.
<b>LM160</b>	0,18	0,35	<L.D.	0,06	11,06	7,13	1,97	nd	<L.D.	<L.D.
<b>LF 161</b>	0,16	0,09	0,1	0,15	18,32	58,29	1,31	nd	<L.D.	<L.D.
<b>LF 162</b>	0,1	0,14	0,1	0,21	12,24	47,03	3,67	nd	<L.D.	<L.D.
<b>LF 163</b>	0,06	0,04	0,43	0,26	18,39	20,53	4,82	nd	<L.D.	<L.D.
<b>LF 164</b>	<L.D.	0,25	0,42	0,74	24,75	19,61	1,47	nd	<L.D.	<L.D.
<b>LF 165</b>	0,03	0,09	0,05	0,23	44,57	41,78	0,87	nd	<L.D.	<L.D.
<b>LM 166</b>	<L.D.	<L.D.	<L.D.	<L.D.	<L.D.	8,09	0,54	nd	<L.D.	<L.D.
<b>LF 167</b>	0,12	0,17	0,21	0,72	17,87	40,18	0,99	nd	<L.D.	<L.D.
<b>LF 168</b>	0,11	0,04	0,06	0,43	70,15	29,59	0,93	nd	<L.D.	<L.D.
<b>LF 169</b>	0,06	0,05	0,11	0,41	37,84	27,1	1,44	nd	<L.D.	<L.D.

Les moyennes des concentrations en plomb et cadmium dans les foies des loutres ont atteint 0,8 et 0,4 mg.kg<sup>-1</sup> en poids sec, respectivement. On relève pour ces deux éléments d'importantes variations interindividuelles, non significatives en fonction de l'âge ou du sexe des individus analysés. Pour ces deux éléments, les niveaux de

contamination observés sont nettement inférieurs aux seuils toxiques décrits dans la bibliographie, et il apparaît donc que le plomb et le cadmium, s'ils demeurent détectables dans l'ensemble des individus, ne semblent pas menacer l'espèce localement.

Les concentrations en cuivre mesurées dans les tissus des loutres au cours de cette étude se sont révélées relativement importantes, particulièrement pour certains individus, pour lesquels la concentration hépatique en cuivre est supérieure à 50 mg.kg<sup>-1</sup> en poids sec. Ces valeurs sont inférieures à celles pouvant induire des effets délétères immédiats, ce qui limiterait donc la toxicité du cuivre pour l'espèce, mais on peut souligner, dans des environnements fortement imprégnés par le cuivre, un risque d'une certaine saturation des capacités de l'organisme à réguler d'autres métaux bivalents, comme le plomb, le cadmium (analysés ici), le nickel ou encore le zinc (non recherchés). Les variations interindividuelles sont pour cet élément également assez importantes, non significatives selon l'âge ou le sexe des loutres analysées.

Les concentrations hépatiques de mercure total des loutres se sont également avérées assez importantes, souvent supérieures à 1,0 mg.kg<sup>-1</sup> en poids frais. Ces valeurs demeurent toutefois inférieures au seuil toxique pour l'espèce, et sont restées non significatives en fonction de l'âge ou du sexe des loutres.

## **CONCLUSION**

Au vu de la dynamique naturelle très favorable de la population locale de la loutre, la contamination par les xénobiotiques analysés ici ne semble pas menacer la conservation de l'espèce, à court ou moyen terme. Toutefois, le caractère universel de la contamination des loutres, notamment par des éléments comme les pesticides organochlorés, les PCBs ou encore le mercure, associé à des dégradations locales des habitats, est susceptible, à long terme, de perturber cette dynamique d'expansion de population, en affectant les individus à la recherche de nouveaux territoires. Par ailleurs, les risques sanitaires encourus par la loutre suite à la contamination éventuelle par des résidus médicamenteux issus de l'industrie pharmaceutique sont encore très peu connus, mais des données récentes, basées sur des poissons ou d'autres mammifères comme les cétacés ou les pinnipèdes, imposent une certaine prudence et incitent à la diversification des analyses dans l'avenir.

## ANNEXE : Matériels et Méthodes

### 1. Analyse des pesticides organochlorés et des polychlorobiphényles (PCBs)

1.0 à 8.0 g d'échantillon (foie, rein, graisse de divers types, encéphale, muscle ou œufs selon les cas) est prélevé au sein de chaque individu analysé, en fonction de la quantité de tissu effectivement disponible; cet intervalle correspond au minimum indispensable pour une bonne représentativité analytique et chaque échantillon est pesé très précisément. 30 ml d'un mélange hexane/acétone (75/25) est ensuite ajouté à l'échantillon, l'ensemble est ensuite broyé à l'aide d'un Ultraturrax® (Ika, Werke, Germany), puis filtré à l'aide d'une membrane séparatrice de phase (Whatman 1 PS). Cette étape de broyage et d'extraction est effectuée deux fois. L'extrait est ensuite évaporé à 60°C à l'aide d'un évaporateur rotatif (Rotovapor), puis repris dans 10 ml d'hexane. 2 ml d'acide sulfurique fumant (SO<sub>3</sub> 7%) sont ensuite ajoutés, et après une centrifugation de 10 minutes à 4x *g*, 1 ml du surnageant est injecté en chromatographie en phase gazeuse pour l'analyse des pesticides organochlorés (lindane, endosulfan, DDE, DDD, DDT, heptachlor, heptachlor epoxyde, aldrin et metoxychlor).

1 ml de ce même surnageant est ajouté à 1 ml d'hydroxyde de potassium (KOH) à 2% dans de l'éthanol. Les tubes sont ensuite placés dans un bain-marie agité à 50°C pendant 30 minutes. Après refroidissement, 2 ml d'eau ultra-pure sont ajoutés, le mélange subit une centrifugation de 10 minutes à 4x *g*, et subissent une seconde hydrolyse à l'acide sulfurique fumant, telle que décrite ci-dessus. Après une dernière centrifugation à 4x *g*, le surnageant est utilisé pour la détection des PCBs (13 congénères: IUPAC no. 28, 52, 101, 105, 118, 128, 138, 149, 153, 156, 170, 180, 187) en chromatographie en phase gazeuse.

Le protocole de chromatographie en phase gazeuse, associé à un détecteur à capture d'électrons, notamment les températures et conditions d'injection est décrit dans la bibliographie (Lemarchand et al. 2007, 2010, 2011a,b, 2012). L'ensemble des opérations est mené en duplicats ou triplicats suivant la quantité de matériel biologique effectivement disponible. Les concentrations en pesticides et PCBs sont calculées à partir de standards disponibles sur le marché (CIL, St Foy la Grande, France, pureté >99%; niveau de récupération sur les standards supérieur à 92%; linéarité déterminée entre 5 et 100 ng/g ( $r^2 > 0.99$  sur des standards, courbes de calibration à 5 points). Les limites de détection varient entre 0.5 et 1.0 ng/g pour chaque élément (pesticide ou

congénère de PCB). Des échantillons certifiés de foie de poisson (morue) (cod liver oil BCR349) ont été utilisés en tant qu'élément de contrôle qualité.

## **2. Analyse des pesticides organophosphorés**

5 g d'échantillon (foie, rein, graisse de divers types, encéphale, muscle ou œufs selon les cas) sont mélangés et homogénéisés dans 60 ml de dichlorométhane et 10 g de sulfate anhydre. Le mélange est ensuite filtré à travers un filtre séparateur de phase (Whatman 1 PS) et évaporé sous aspiration à 40°C. Les échantillons secs sont ensuite repris dans 3 ml d'éthanol, puis subissent un passage aux ultrasons. L'échantillon est ensuite purifié sur une colonne Sep-Pak R300 (Silica Waters, 020810; 500 mg) conditionnée avec 2 ml de méthanol et 2 ml d'éthanol, la colonne étant éluée avec 2 ml de dichlorométhane. Les échantillons purifiés sont évaporés à sec et repris dans 3 ml de dichlorométhane. Les concentrations en pesticides organophosphorés (OP) et les carbamates (CA) (Dichlorvos, Carbofuran, Mevinphos, Phorate, Phorate oxon, Phorate sulfone, Methiocarbe, Terbufos, Diazinon, Disulfoton, Chlorpyriphos methyl, Chlorpyriphos ethyl, Fenitrothion, Pymiphos methyl, Malathion, Fenthion, Parathion, Methidathion, Disulfoton sulfone, Triazophos) sont mesurées à l'aide d'un dispositif de chromatographie en phase gazeuse couplé (6890 GC Agilent®) à un spectromètre de masse (5973N MS, colonne HP5-MS 30 m, finesse 0,25 µm). Pour chaque échantillon et chaque élément servant de standard, 2 µl sont injectés. Le programme de température, à partir de 100°C maintenus pendant 2 minutes, atteint 200°C au rythme de 55°C/minute, maintenus pendant 5 minutes, puis 220°C au rythme de 50°C/minute, maintenus pendant 3 minutes, puis enfin 300°C à 60°C/minutes. A l'issue de l'élution de l'échantillon, le système est maintenu à 300°C pendant 2 minutes. Le temps total d'analyse est de 13 minutes et 55 secondes. L'injecteur est maintenu à 250°C et le flux de gaz vecteur (He) est de 2,5 ml/minute. Chaque pesticide organophosphoré ou carbamate est identifié à partir de son temps de rétention et de 3-4 ions de fragmentation, avec des taux prédéfinis et une variabilité de chaque ion autour de 20%. La linéarité est confirmée entre 25 et 500 ng/g avec des courbes de calibration à 5 points ( $r^2 > 0.99$ ). Le niveau de récupération sur les standards est supérieur à 76% pour tous les échantillons (et atteint 100 %) et le renouvellement est considéré comme acceptable si le coefficient de variation est inférieur à 15%.



### **3. Analyse des pyréthrinés**

5 g d'échantillon (foie, rein, graisse de divers types, encéphale, muscle ou œufs selon les cas) sont prélevés et homogénéisés dans 60 ml d'éthanol et 10 g de sulfate anhydre, puis filtrés à travers une membrane séparatrice de phase (Whatman 1 PS). L'extrait est ensuite dissous dans 5 ml d'éthanol, et subit une seconde procédure d'extraction. Les concentrations sont ensuite déterminées à l'aide d'une chromatographie en phase gazeuse avec détecteur à capture d'électrons (GC/ECD Agilent GC-ECD 6850 avec une colonne HP1 de 30 m, ID 0.32 mm, film 0.25µm), confirmée ensuite par spectrométrie de masse (GC/MS) selon une méthode modifiée à partir d'un protocole de l'AFSSA. Pour chaque échantillon et chaque témoin, le volume injecté est de 2 µL. Le programme de température est le suivant : température initiale de 100°C, première élévation de 6°C/minute jusqu'à 220°C, maintenue pendant 10 minutes, puis seconde élévation de 7°C par minute jusqu'à 285°C maintenue pendant 1 minute, avec un temps total d'analyse de 42,29 min. Température de l'injecteur de 230°C, température du détecteur 300°C. Flux total d'Helium de 9 ml/min. Les Pyréthrinés (Tefluthrine, Cyhalothrine, Permethrine, Cifluthrine, Cyperméthrine, Fenvelarate, Deltaméthrine) sont ensuite identifiés selon leur temps de rétention. La linéarité est confirmée entre 10 et 100 ng.g<sup>-1</sup> avec des courbes de calibration à 5 points ( $r^2 > 0.99$ ). Le niveau de récupération est déterminé entre 82% et 94% pour tous les échantillons standard, et la répétabilité des analyses est considérée comme acceptable si les coefficients de variations restent inférieurs à 15%. Pour tous les échantillons positifs (i.e. détectant des pyréthrinés), une analyse de confirmation par chromatographie en phase gazeuse couplée à une spectrométrie de masse (GC/MS) est effectuée en mode SIM. Comme pour les pesticides organophosphorés, l'identification est basée sur les temps de rétentions et 3 ou 4 ions selon les composés.

### **4. Analyse des herbicides**

2 g de muscle sont homogénéisés durant 5 minutes dans 8 ml d'acétone, et centrifugés à 4x g; le surnageant est ensuite placé dans des tubes séparés, et cette procédure d'extraction est effectuée deux fois. Les échantillons sont ensuite évaporés sous azote, le résidu sec étant ensuite repris dans une solution d'acétone et de méthanol (50:50). L'extrait est ensuite purifié à l'aide d'une colonne SPE C18 500 mg, conditionnée à l'aide de 2 ml d'acétone et de 2 ml de méthanol. La colonne est séchée

par aspiration et les échantillons purifiés sont repris dans dans 3 ml d'acétone. Après une évaporation sous azote, les échantillons sont repris dans 1 ml de méthanol. Les concentrations des herbicides dosés (Trifluraline, Atrazine, Simazine, Terbutylazine, Diuron, Alachlor, Metolachlor, Cyanazine, fongicide Epoxyconazole) sont déterminées par GC/MS. Un spectromètre de masse 5973N couplé à un chromatographe en phase gazeuse 6890 GC (Agilent®, colonne de 30m HP5-MS 0.25 mm ID, finesse 0.25µm) sont utilisés. Pour chaque échantillon et chaque standard, 2 µL sont injectés. Le programme de température démarre à 85°C maintenu pendant une minute, puis élévation de 6°C/minute jusqu'à 170°C (maintenu pendant 12 minutes), puis seconde élévation de 20°C/minute jusqu'à 280°C, maintenu pendant 4,33 minutes. Le temps total d'analyse est de 37 minutes. La température de l'injecteur est de 250°C et est en mode *splitless*. Chaque échantillon est identifié selon les temps de rétention et 3-4 ions selon les composés, avec des teneurs prédéfinies et 20% de variabilité pour chaque ion. La linéarité est confirmée entre 100 et 500 ng/g avec des courbes de calibration à cinq points ( $r^2 > 0.99$ ). Le niveau de récupération est déterminé entre 67% et 98% pour tous les échantillons et la reproductibilité est considérée comme acceptable lorsque les coefficients de variations restent inférieurs à 15%.

## **5. Analyse des raticides anticoagulants**

Les analyses destinées à mesurer les raticides anticoagulants (8 composés sont utilisés en France en lutte chimique: bromadiolone, chlorophacinone, difenacoum, difethialone, warfarin, coumatetralyl, brodifacoum, flocoumafén) dans les tissus ont été effectuées par chromatographie liquide à haute performance (HPLC). 1,0 à 2,0 g de foie sont utilisés. Tous les solvants et les réactifs utilisés sont de la plus haute pureté disponible. 50 µl de chaque échantillon ou solution standard sont injectés dans une colonne C18 (250 x 4 mm, pores de 10 nm, grains de 5 µm, Chromcart Nucleosil, Macherey-Nagel, Strasbourg, France). Le système HPLC utilisé est composé d'une pompe isocratique (L6000), d'un échantillonneur automatique (AS2000), d'un détecteur fluorimétrique (F1000) et d'un détecteur DAD-UV. Un logiciel spécifique (D7000 HSM) est utilisé pour l'acquisition des données (Merck, Nogent-sur-Marne, France). La plupart des anticoagulants sont détectés par fluorescence et détection UV, excepté pour la chlorophacinone et la difethialone. La linéarité est déterminée sur des standards de foie entre 0,05 et 1 mg/kg ( $r^2 > 0.99\%$ ). Le pourcentage de récupération varie entre 80.1% et

89.2% pour la bromadiolone, la chlorophacinone et le difenacoum (les trois composés les plus utilisés en France). La limite de détection est de 0.02 mg/kg pour tous les composés testés.

## **6. Analyse des métaux lourds**

*Le plomb, le cadmium et le cuivre* sont analysés comme suit (Mazet et al. 2005; Lemarchand et al. 2010): des échantillons de foie broyés (1 à 2 g) sont séchés pendant une heure à 110°C, puis pendant 5 heures à 180°C. Après ce séchage, 0,3 g d'échantillon sont broyés dans un petit récipient et dilués dans 1 ml d'acide sulfurique à 50%. L'ensemble subit ensuite une digestion pendant 16 h, la température augmentant de 20°C à 700°C pendant les 10 premières heures, puis étant maintenue à 700°C pendant les 6 heures restantes. Les échantillons digérés sont ensuite dilués dans 2 ml d'acide nitrique et séchés lentement dans un récipient maintenu chaud. Après refroidissement, les échantillons sont repris dans 1 ml d'acide nitrique à 10% et transférés vers des tubes en polypropylène où ils sont dilués dans de l'eau ultra-pure Milli-Q. Les concentrations en métaux sont mesurées en spectrométrie d'absorption atomique (UNICAM 989 QZ, Thermo Optek, France) à l'aide de lampes spécifiques à chaque élément.

1,0 g de foie est utilisé pour les analyses de *mercure*. 1 ml d'eau ultra pure milliQ est ajoutée, puis 1,5 ml d'eau oxygénée (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) et 6,5 ml d'acide nitrique. Le mélange est ensuite minéralisé dans un four à micro-ondes (ETHOS) comme suit : augmentation des températures de 20 à 180°C en 10 minutes, maintenues à 180°C pendant 15 minutes. Après refroidissement, les échantillons sont transférés dans des tubes en polypropylène, une solution de KMnO<sub>4</sub> à 6,4% est ajoutée.

2,0 grammes de foie sont utilisés pour les analyses d'*arsenic*. L'échantillon est mixé dans 3 ml d'une solution de 100 ml de 4.0 g MgO et 40 g Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> dans un petit récipient. Les températures du four s'échelonnent de 20 °C à 700°C atteints en 8 heures, puis sont maintenues à 700°C pendant 8 heures. Après refroidissement à 1000°C, l'échantillon est remis en suspension à l'aide d'eau ultra-pure milliQ, puis dissous dans une solution de 50% d'acide chlorhydrique. 2,5 ml d'une solution d'iodure de potassium et d'acide ascorbique sont ensuite ajoutés, avec de l'eau ultra pure milliQ. Le mélange est ensuite porté à ébullition à 80°C pendant une heure. L'arsenic et le mercure sont dosés à l'aide d'un spectromètre d'absorption atomique (Perkin Elmer Analyst), utilisant des lampes spécifiques à chaque élément après une génération hybride. Chaque échantillon

d'analyse de métaux est mené en triplicat, et des échantillons certifiés de référence sont utilisés pour le contrôle qualité (CRM185R valeurs certifiées pour Pb, Cd, Cu, As, Hg avec 95% d'intervalle de confiance). Pour chaque série d'analyse, les échantillons certifiés ont été utilisés pour tester la récupération (>90%) et un passage à blanc est effectué pour tester toute éventuelle contamination. L'ensemble des concentrations en éléments métalliques et métalloïdes sont calculées selon une courbe de calibration à 5 points ( $r^2 > 0.99$ ), et les résultats sont exprimés en mg/kg de matière sèche. Les limites de détection sont de 20 µg/kg pour le plomb, le cadmium, le cuivre ou le mercure, et de 14 µg/kg pour l'arsenic.

## **7. Méthodes de calcul et analyses statistiques**

Les concentrations de 13 congénères de PCBs (IUPAC no. 28, 52, 101, 105, 118, 128, 138, 149, 153, 156, 170, 180 et 187) ont été ajoutées pour fournir la valeur «  $\Sigma$  13 PCB ». La contamination des œufs de balbuzard est calculée selon une base en poids frais, pour éviter toute surestimation liée à l'évaporation du contenu de l'œuf (et donc la concentration des xénobiotiques) avant l'analyse. Le test de Khi2 a été utilisé pour la vérification d'hypothèses liées à l'habitat des espèces et à son influence sur les résultats, les tests de Mann et Whitney ou de Kruskal et Wallis ont été utilisés pour comparer des échantillons indépendants, le test de coefficient de rangs de Spearman a lui été utilisé pour comparer des associations entre deux variables. Les statistiques ont été effectuées en utilisant *R*. (Ihaka and Gentleman 1996).