Contamination des crustacés décapodes par les composés organohalogénés. Etude détaillée de la bioaccumulation des PCB chez l'araignée de mer Maja brachydactyla

Nathalie Bodin

▶ **To cite this version:**

Nathalie Bodin. Contamination des crustacés décapodes par les composés organohalogénés. Etude détaillée de la bioaccumulation des PCB chez l'araignée de mer Maja brachydactyla. Océan, Atmosphère. Université de Bretagne occidentale - Brest, 2005. Français. NNT : . tel-00012026v2

HAL Id: tel-00012026

https://theses.hal.science/tel-00012026v2

Submitted on 13 Jun 2006

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

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

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE BRETAGNE OCCIDENTALE

U.F.R. DES SCIENCES DE LA MER

Présentée par

Nathalie BODIN

Pour l'obtention du grade de

Docteur de l'Université de Bretagne Occidentale

Spécialité Océanologie biologique

Contamination des crustacés décapodes par les composés organohalogénés. Etude détaillée de la bioaccumulation des PCB chez l'araignée de mer *Maja brachydactyla*

Soutenue le 8 décembre 2005

Devant la commission d'examen composée de Mesdames et Messieurs :

- Hélène Budzinski, Directeur de Recherche CNRS, Université de Bordeaux	Rapporteur
- Pascal Riera, Maître de Conférences, Université Paris VI	Rapporteur
- Jacques Clavier, Professeur, UBO-IUEM	Examinateur
- Christian Hily, Chargé de Recherche CNRS, UBO-IUEM	Examinateur
- Pim Leonards, Professeur, RIVO, Pays-Bas	Examinateur
- Monique Guillou, Ingénieur de Recherche, UBO-IUEM	Directeur de Thèse
- Alain Abarnou, Cadre de Recherche, IFREMER Brest	Invité
- Daniel Latrouite, Cadre de Recherche, IFREMER Brest	Invité

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE BRETAGNE OCCIDENTALE

U.F.R. DES SCIENCES DE LA MER

Présentée par

Nathalie BODIN

Pour l'obtention du grade de

Docteur de l'Université de Bretagne Occidentale

Spécialité Océanologie biologique

Contamination des crustacés décapodes par les composés organohalogénés. Etude détaillée de la bioaccumulation des PCB chez l'araignée de mer *Maja brachydactyla*

Soutenue le 8 décembre 2005

Devant la commission d'examen composée de Mesdames et Messieurs :

- Hélène Budzinski, Directeur de Recherche CNRS, Université de Bordeaux	Rapporteur
- Pascal Riera, Maître de Conférences, Université Paris VI	Rapporteur
- Jacques Clavier, Professeur, UBO-IUEM	Examinateur
- Christian Hily, Chargé de Recherche CNRS, UBO-IUEM	Examinateur
- Pim Leonards, Professeur, RIVO, Pays-Bas	Examinateur
- Monique Guillou, Ingénieur de Recherche, UBO-IUEM	Directeur de Thèse
- Alain Abarnou, Cadre de Recherche, IFREMER Brest	Invité
- Daniel Latrouite, Cadre de Recherche, IFREMER Brest	Invité

Je dédie cette thèse à la mémoire de mon grand père, Papy Max.

Remerciements

Ce travail a été réalisé grâce à un co-financement octroyé par la Région Bretagne et l'IFREMER.

Je tiens à remercier en tout premier lieu Monique Guillou, Alain Abarnou et Daniel Latrouite qui ont codirigé cette thèse. Merci pour votre confiance durant ces trois années.

Je remercie les rapporteurs de cette thèse, Hélène Budzinski et Pascal Riera, pour la rapidité avec laquelle ils ont lu mon manuscrit et l'intérêt qu'ils ont porté à mon travail. Merci également aux autres membres du jury qui ont accepté de juger ce travail : Jacques Clavier, Christian Hily et Pim Leonards qui s'est déplacé des Pays-Bas.

Pour reprendre un ordre plus chronologique, je voudrais remercier plusieurs personnes qui ont joué un rôle fondamental dans ma formation. Tout d'abord Thierry Burgeot, du laboratoire d'Ecotoxicologie de l'IFREMER à Nantes, sans qui rien ne se serait passé s'il n'avait pas accepté de me garder pendant 14 longs mois en stage de Maîtrise et DEA. Un grand merci également à Farida Akcha et Daniel Cossa : en plus de l'immense amitié que je vous porte, je vous serai éternellement reconnaissante pour m'avoir transmis votre passion pour la Recherche. Merci à vous deux pour tous vos conseils et la confiance que vous m'avez témoignée.

Je profite de ces avant-propos pour remercier également toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin, de façon scientifique ou personnelle, à la concrétisation de ce travail de thèse.

Mes premières pensées vont à Véronique Loizeau, Anne-Marie Le Guellec et Xavier Philippon (dit « Pon-Pon ») qui m'ont supportée pendant ces trois années ! Merci à tous les trois d'être si simples. Anne-Marie, merci pour ta bonne humeur de tous les jours, pour ta patience et ta précieuse aide au laboratoire (il n'est pas facile de convertir une biologiste à la chimie analytique!), mais surtout pour m'avoir tant soutenue dans tous mes moments de doute. Tu es une véritable amie et mère pour moi ; merci Anne-Marie. Véro, sans toi, je ne sais ce que serait devenue ma thèse. Je ne te remercierai jamais assez pour toute l'aide que tu m'as apportée (en particulier au moment de la rédaction finale!). Merci également pour ta disponibilité, ta bonne humeur et tout ce que tu m'as appris pendant ces trois années de thèse.

Je remercie également Christian Hily et François Le Loc'h, que je suis allée embêter maintes et maintes fois de l'autre côté du grillage. Merci pour leurs précieux conseils, leur gentillesse et leur disponibilité. François, tu as été mon mentor, mon frère spirituel pendant ces derniers mois de thèse. Je ne pourrais jamais suffisamment te remercier pour m'avoir autant soutenue dans cette période particulièrement difficile.

Sans qui rien ne ce serait fait, Xavier Caisey, « l'homme araignée ». Merci pour tes conseils en matière de pêche d'araignées, des tes talents de plongeur et de ta gentillesse. Un grand merci également à tous les autres plongeurs scientifiques, Xavier Philippon, Christian Minguand et Olivier Dugornay, aux différents pêcheurs professionnels qui ont accepté de m'aider à réaliser les prélèvements en hiver (Mr. Poupel, Mr. Corroleur), et enfin un grand merci à tous les plongeurs apnéistes et en bouteille du département de Seine Maritime, sans qui les prélèvements dans le secteur d'Antifer auraient été très difficiles, voire impossibles ! Merci en particulier à Pierre Brochier et Régis Hocdé. Sans oublier François Leboulanger et Christophe Minier qui m'ont accueillie à des heures irraisonnables dans les laboratoires de l'université du Havre pour mes nombreuses dissections de crustacés.

Je souhaiterais également remercier Xavier Bodiguel, Véronique Loizeau, Cédric Bacher et Alain Ménesguen pour leur aide et leur patience quant au développement d'un modèle de bioaccumulation chez l'araignée de mer. Ce travail n'apparaît pas dans mon manuscrit mais qu'ils ne s'inquiètent pas, il verra le jour quand même…

Un grand merci également à tout le département anciennement DEL-EC, maintenant DYNECO, pour la bonne ambiance qui y régnait, la gentillesse de chacun, et les pauses cafés si conviviales. Merci particulièrement à Françoise Andrieux, Annie Chapelle, Alain Aminot, Agnès Youenou, Philippe Cann, Aline Blanchet, David Le Berre, Marcel Chaussepied, Jean-François Guillaud, Jean-Do Gaffet (merci pour ma voiture), Rémi Le Menn, Philippe Cugier, Pierre Bodenes sans oublier les trois drôles de dames Anne-Laure Le Velly, Jacqueline Quentel et Marie-Christine Mazé qui ont m'ont toujours aidée avec le sourire pour mes problèmes de missions et financiers.

Je n'oublierai jamais les séances piscines avec Françoise et Annie, ainsi que les séances de footing et vélo avec François et Caro. Sans vous et ces moments de « défoulement », je n'aurais jamais pu tenir le coup.

Je tiens à remercier également tous mes amis, qui malgré mes longues périodes de silence, ne m'ont jamais abandonnée. Merci à tous pour votre patience, votre soutien : Agnès, Delph, Nancy, Laeti, Alice, Yoann, Laure, Paco, Nag, Emina, Xavier Claire, Caro, Benoît.

Enfin un grand merci tout spécial à ma famille, en particulier mes parents et mon frère Alexis qui m'ont supportée, soutenue, encouragée tout au long de ces trois années. Qu'ils trouvent ici l'expression de ma profonde reconnaissance et le témoignage de mon amour.

CONTAMINATION DES CRUSTACES DECAPODES PAR LES COMPOSES ORGANOHALOGENES : ETUDE DETAILLEE DE LA BIOACCUMULATION DES PCB CHEZ L'ARAIGNEE DE MER *MAJA BRACHYDACTYLA*

Résumé

Les crustacés décapodes marins sont des organismes macrobenthiques opportunistes, d'intérêt commercial, et susceptibles d'accumuler les contaminants. Dans un souci de sécurité du consommateur, une évaluation de la contamination de quatre espèces principales par les polychlorobiphényles (PCB), les polybromodiphényles éthers (PBDE) et les dioxines (PCDD/F) a été réalisée dans les eaux côtières de Bretagne et Normandie. Au regard des normes sanitaires actuelles, la consommation de chair de crustacés ne pose aucun problème de santé publique. Dans une seconde partie, les processus biologiques influant sur la bioaccumulation des polychlorobiphényles chez l'araignée de mer Maja brachydactyla ont été appréhendés. D'un point de vue quantitatif, l'organotropisme, le régime alimentaire et l'âge apparaissent comme les principaux facteurs d'influence. D'un point de vue qualitatif, les empreintes de contamination en PCB sont dépendantes du sexe, et dans une moindre mesure du comportement migratoire de l'espèce. L'analyse des isotopes stables du carbone ($\delta^{13}C$) et de l'azote ($\delta^{15}N$) dans la chaîne trophique de l'araignée de mer a confirmé le haut niveau de complexité des relations alimentaires dans le cas de prédateurs supérieurs omnivores. L'utilisation de la méthode isotopique stable en parallèle à l'analyse des contaminants a mis en évidence la bioamplification des congénères de PCB les plus persistants le long de la chaîne trophique de l'araignée de mer. A l'inverse, certains composés de structure chimique particulière sont métabolisés par les crustacés décapodes.

Mots clés

Contaminants organiques, bioaccumulation, crustacés décapodes, isotopes stables, réseaux trophiques, bioamplification, biotransformation, sécurité sanitaire.

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE 1

CHAPITRE I : CONTEXTE SCIENTIFIQUE 9

1. Les crustacés décapodes : aspects biologiques 11

1.1. L'araignée de mer *Maja brachytactyla* (Balss, 1922) 12

1.1.1. Répartition géographique 12

1.1.2. Habitat et comportements particuliers 12

1.1.3. Morphologie et dimorphisme sexuel 13

1.1.4. Croissance 14

1.1.5. Migration 16

1.1.6. Reproduction 17

1.1.7. Régime alimentaire et prédation 19

1.2. Le tourteau ou crabe dormeur *Cancer pagurus* (Linnaeus, 1758) 21

1.2.1. Répartition géographique et habitat 21

1.2.2. Caractères distinctifs 21

1.2.3. Croissance 22

1.2.4. Migration 22

1.2.5. Reproduction 23

1.2.6. Régime alimentaire et prédation 23

1.3. L'étrille *Necora puber* (Linnaeus, 1767) 24

1.3.1. Répartition géographique et habitat 24

1.3.2. Caractères distinctifs 24

1.3.3. Croissance 25

1.3.4. Reproduction 25

1.3.5. Régime alimentaire et prédation 25

1.4. La langoustine *Nephrops norvegicus* (Linnaeus, 1758) 26

1.4.1. Répartition géographique et habitat 26

1.4.2. Caractères distinctifs 27

1.4.3. Croissance 27

1.4.4. Migration 28

1.4.5. Reproduction 28

1.4.6. Régime alimentaire et prédation 28

2. Les crustacés décapodes : aspects commerciaux 29

2.1. La pêche 29

2.2. La consommation humaine....30
3. Les isotopes stables....30
3.1. Généralités....30
3.2. Isotopes stables et réseaux trophiques....31
3.2.1. Fractionnement isotopique au sein du réseau trophique....31
3.2.2. Utilisation des isotopes stables au sein des réseaux trophiques des milieux aquatiques....32
3.3. Avantages et limites de la méthode des isotopes stables....34
4. Les contaminants organohalogénés....35
4.1. Les Dioxines....37
4.1.1. Structure chimique....37
4.1.2. Synthèse et origine....38
4.1.3. Propriétés physico-chimiques....41
4.1.4. Toxicité....41
4.1.5. Réglementation....45
4.2. Les Polychlorobiphényles (PCB)....46
4.2.1. Structure chimique et synthèse....46
4.2.2. Propriétés physico-chimiques....48
4.2.3. Utilisations....48
4.2.4. Toxicité....50
4.2.5. Réglementation....51
4.3. Les Polybromodiphényles éthers (PBDE)....52
4.3.1. Structure chimique et synthèse....52
4.3.2. Utilisations....53
4.3.3. Propriétés physico-chimiques....54
4.3.4. Toxicité....55
4.3.5. Réglementation....56
4.4. Bioconcentration / bioaccumulation / bioamplification des contaminants organohalogénés....56

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES....59

1. Protocole d'échantillonnage....61
1.1. Contamination des crustacés décapodes exploités par les composés organohalogénés (Articles 1 et 2)....61
1.2. Influence de facteurs ontogéniques sur la contamination en PCB et les signatures isotopiques du carbone et de l'azote chez l'araignée de mer (Articles 3 et 4)....62

1.2.1. Description des populations de *Maja brachydactyla* 63
1.2.2. Stratégie d'échantillonnage 67
1.3. Le réseau trophique de l'araignée de mer *Maja brachydactyla* (Article 6) 69
2. Préparation des échantillons avant analyses des contaminants et des isotopes stables du carbone et de l'azote 71
2.1. Lyophilisation 71
2.2. Broyage et homogénéisation 71
3. Protocole d'analyse des isotopes stables du carbone et de l'azote 71
3.1. Pré-traitements 71
3.2. Analyse par spectrométrie de masse isotopique couplée à un analyseur élémentaire (IRMS-EA) 72
4. Protocole d'analyse des contaminants organohalogénés 73
4.1. Analyse des PCB par chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à capture d'électrons (GC-ECD) 73
4.1.1. Protocole expérimental 73
4.1.2. Validation et qualification du protocole 76
4.2. Analyse des dioxines, PCB et PBDE par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse (GC-MS) 78

CHAPITRE III : SYNTHESE 83

1. Contamination des crustacés décapodes exploités par les composés organohalogénés (Articles 1 et 2) 85
1.1. Synthèse bibliographique de la contamination des crustacés par les PCB, dioxines et PBDE 86
1.2. Niveaux de contamination en PCB, dioxines et PBDE chez les crustacés décapodes prélevés sur les côtes françaises 89
1.3. Empreintes de contamination par les PCB, dioxines et PBDE chez les crustacés décapodes prélevés sur les côtes françaises 91
1.4. Conclusion 95
2. Isotopes stables du carbone et de l'azote chez l'araignée de mer *Maja brachydactyla* (Articles 3 et 4) 96
2.1. Variabilité tissulaire des rapports isotopiques du carbone et de l'azote (Article 3) 97
2.2. Influence de variations ontogéniques sur les signatures isotopiques du carbone et de l'azote chez *Maja brachydactyla* (Article 4) 99
2.3. Conclusion 103

3. Bioaccumulation des polychlorobiphényles chez l'araignée de mer Maja *brachydactyla* (Articles 5 et 6) 104

3.1. Influence de facteurs ontogéniques sur la contamination en PCB chez *Maja brachydactyla* (Article 5) 104

3.2. PCB et isotopes stables le long de la chaîne trophique de l'araignée de mer *Maja brachydactyla* (Article 6) 111

3.3. Conclusion 115

CONCLUSION ET PERSPECTIVES 117

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 127

ANNEXES 149

Article 1 : Organochlorinated contaminants in decapod crustaceans from the coasts of Brittany and Normandy (France) 151

Article 2 : PCB, PCDD/F and PBDE levels and profiles in crustaceans from the coastal waters of Brittany and Normandy (France) 181

Article 3 : Variability of stable isotopes of carbon and nitrogen among decapod crustacean tissues in relation to lipid content. 207

Article 4 : Variability of stable isotopes signatures ($\delta^{13}C$ and $\delta^{15}N$) in two spider crab populations (*Maja brachydactyla*) in Western Europe 225

Article 5 : PCB contamination of the spider crab *Maja brachydactyla*: influence of physiological and ecological processes 247

Article 6 : Assessment of PCB bioaccumulation in the spider crab food web using stable isotopes. 273

Nouveau Chapitre de Thèse : Valorisation des compétences 323

Introduction générale

Avec le développement rapide de l'industrie chimique depuis le début du 20ème siècle, l'environnement s'est trouvé contaminé par des quantités croissantes de substances toxiques d'origines diverses, industrielles ou agricoles. La prise de conscience de la dégradation de notre cadre de vie par ces contaminants a conduit à s'intéresser à leur devenir dans l'environnement. En particulier, la caractérisation des sources et apports de ces substances aux milieux (diffusion et dispersion à travers les différents compartiments de l'environnement), la compréhension des processus de bioconcentration et de bioaccumulation dans le cas de contaminants persistants, et finalement les effets toxiques, directs ou indirects, qu'ils peuvent engendrer sur les individus et/ou populations sont désormais des questions majeures que se posent de nombreuses équipes de recherche à travers le monde.

Les Polluants Organiques Persistants (POP) sont des substances chimiques faiblement biodégradables, qui s'accumulent dans les tissus adipeux des organismes vivants, se propagent le long des chaînes alimentaires, et présentent le risque d'entraîner des effets nuisibles pour la santé humaine et l'environnement. Le caractère persistant de ces composés couplé à une certaine volatilité explique que ces POP puissent être détectés très loin de leurs lieux d'émission, jusqu'aux pôles, transportés par les courants marins ou atmosphériques. Les POP font aujourd'hui l'objet d'une préoccupation mondiale (UNEP, 2001). Parmi eux, trois familles de contaminants, particulièrement inquiétantes, seront traitées dans ce travail :

- les polychlorobiphényles (PCB) sont des composés organochlorés produits industriellement pour la première fois dans les années 1920, et principalement utilisés dans les installations électriques tels que les transformateurs et condensateurs. Leur forte toxicité pour l'homme et l'environnement, ainsi que leur omniprésence ont conduit l'Europe à interdire leur production et leur utilisation dans les systèmes ouverts depuis les années 1970. Ils font cependant toujours partie des contaminants les plus étudiés du fait des fortes concentrations mesurées dans les différents compartiments de l'environnement.

- les polybromodiphényles éthers (PBDE) sont des retardateurs de flamme bromés (BFR). Ils sont utilisés dans des domaines larges et variés tels que l'industrie, le transport ou la construction depuis le milieu du 20ème siècle. Depuis peu, des études ont montré leur omniprésence dans les écosystèmes et leur toxicité envers de nombreuses espèces (De Wit, 2000). C'est la raison pour laquelle le penta et l'octaBDE ont été interdits en Europe depuis 2004 et que le decaBDE pourrait l'être d'ici 2006. Certains chercheurs les ont qualifiés de « nouveaux problèmes PCB » ("a new PCB problem", De Wit, 2000 ; "New pollutants-Old diseases", Siddiqi et al., 2003)

- les dioxines (PCDD) et les furannes (PCDF) regroupées sous le terme "dioxines" sont des polluants ubiquitaires très stables. Ils se forment principalement lors des processus de combustion de nombreuses activités industrielles, mais résultent également d'événements naturels comme les éruptions volcaniques et les feux de forêt. Le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC) a classé la 2,3,7,8-TCDD, dioxine la plus toxique dite « dioxine de Seveso », dans le groupe 1 des cancérogènes certains pour l'homme.

Les milieux aquatiques représentant les trois quarts de la surface du globe, ils constituent des « réservoirs » pour ces composés, qui y sont tous potentiellement transférés. Différentes études ont montré que, exceptée une introduction directe, la déposition atmosphérique à travers l'interface air-eau constitue la voie principale de transfert des POP des sources anthropiques dans les écosystèmes aquatiques marins et continentaux (Wania et al., 1998; Warren et al., 2003). D'une manière générale, les océans semblent être les sites majeurs de stockage des POP, en particulier des plus volatiles. Présents dans l'eau à l'état de traces, généralement à des concentrations inférieures au nanogramme par litre, une grande partie des composés d'origine anthropique ou naturelle s'adsorbent sur les particules en suspension (détritiques et phytoplanctoniques), et entrent ainsi dans les cycles biologiques. Cette capacité d'adsorption dépend du caractère hydrophobe des composés, propriété qui varie de façon inverse avec la solubilité et qui traduit ainsi leur affinité pour les lipides. Les contaminants tels que les PCB, les dioxines, et les PBDE sont des composés particulièrement lipophiles qui s'accumulent dans les tissus adipeux des organismes. Par la suite, ils peuvent être transportés par voie trophique le long des chaînes alimentaires, et ainsi atteindre des concentrations considérables (voire toxiques) dans les tissus des prédateurs situés aux échelons supérieurs des réseaux trophiques (y compris l'homme).

En milieu marin, la grande majorité des recherches sur les processus de bioaccumulation des contaminants organiques s'est focalisée jusqu'à présent sur des animaux filtreurs, les mollusques bivalves (transfert eau-biota), ou bien sur les prédateurs finaux tels que les poissons ou mammifères (Muir et al., 2003 ; Van der Oost et al., 2003). Dans ce dernier maillon trophique, un groupe a cependant été peu étudié, particulièrement en Europe, les crustacés décapodes. Ces organismes benthiques constituent pourtant le maillon final de chaînes trophiques complexes, et vivent pour une grande majorité dans les eaux très côtières. L'ensemble de ces éléments en fait des espèces potentiellement soumises aux pollutions chimiques. L'une des raisons de ce désintérêt, à l'inverse des poissons et mollusques bivalves,

tient sans doute à la méconnaissance de la biologie de ces crustacés décapodes notamment de leur régime alimentaire. Leur caractère opportuniste, c'est-à-dire leur faculté d'adapter leur comportement alimentaire aux ressources disponibles dans le milieu, rend en effet difficiles les études classiques de régime alimentaire telles que l'analyse des contenus stomacaux ou les observations *in situ*. C'est la contamination de ce groupe par les composés organohalogénés que nous avons choisi d'étudier dans ce travail.

Les objectifs de cette étude sont multiples.

Dans un premier temps, un état des lieux de la contamination des crustacés décapodes des eaux côtières françaises par les PCB, dioxines et PBDE s'est avéré nécessaire. Pour cela, quatre espèces ont été sélectionnées : l'araignée de mer *Maja brachydactyla*, le tourteau *Cancer pagurus*, l'étrille *Necora puber* et la langoustine *Nephrops norvegicus*. Ces crustacés décapodes constituent des espèces particulièrement appréciées en termes de consommation par la population française (OFIMER, 2003). De plus, ce travail s'est focalisé sur deux secteurs géographiques, dans le but d'obtenir une estimation des niveaux de contamination maximaux et minimaux des crustacés dans les eaux côtières françaises :

- la partie orientale de la Baie de Seine : à proximité de l'Estuaire de la Seine, cette zone est exposée à des apports de contaminants d'origine anthropique (hydrocarbures, pesticides, PCB, dioxines...) liés aux activités les plus diverses siégeant sur l'ensemble du bassin versant. Les organismes qui y vivent présentent de forts niveaux de contamination par ces diverses substances (Claisse, 1989 ; Abarnou et al., 2000)

- les régions de Bretagne et de Basse Normandie : le Réseau National d'Observation (RNO) y mesure depuis trente ans les concentrations en PCB les plus faibles dans les mollusques bivalves (Claisse, 1989). Le choix de ces zones côtières peu contaminées, où la pêche des crustacés représente 90% de la pêche française (OFIMER, 2003), doit permettre d'évaluer de façon plus juste la qualité générale des produits de la mer mis sur le marché, mais également d'appréhender de manière générale les processus de bioaccumulation et biotransformation des contaminants.

Le second objectif de cette étude est d'étudier de manière plus précise les processus influant sur la bioaccumulation des contaminants organochlorés chez les crustacés décapodes. En effet, les grandes fonctions biologiques, telles que la respiration, l'alimentation, la croissance, la reproduction et la migration peuvent influer sur la contamination et l'élimination des contaminants organiques des organismes. Pour ce faire nous nous sommes focalisés sur une

espèce, l'araignée de mer *Maja brachydactyla* et nous avons retenu les PCB comme « composés marqueurs ».

Nous avons choisi l'araignée parce que c'est l'espèce dont le cycle biologique est le mieux connu comparé à celui des autres crustacés (Le Foll, 1993) ; ceci concerne particulièrement la croissance, le comportement migratoire et le cycle de reproduction. L'alimentation est également une fonction biologique importante susceptible d'influencer les facteurs de bioaccumulation des contaminants, mais mal connue pour les raisons précédemment citées. Cet aspect (positionnement trophique, et variation du régime alimentaire) sera ici appréhendé par une méthode originale, l'analyse des isotopes stables du carbone et de l'azote. Cette technique consiste à déterminer les rapports des quantités d'isotopes stables du carbone ($^{13}C/^{12}C$) et de l'azote ($^{15}N/^{14}N$) dans les tissus des organismes. Son intérêt est basé sur le fait qu'il existe une étroite relation entre les compositions isotopiques du consommateur et celles de sa nourriture (Dufour et Gerdeaux, 2001).

Nous avons retenu les PCB parce que ces substances, contrairement aux dioxines et PBDE, sont très étudiées depuis les années 1960 (Jensen, 1966), et leurs concentrations importantes dans les différents compartiments de l'environnement facilitent leur analyse chimique. Ce travail porte sur des populations d'araignées provenant de deux secteurs géographiques : une zone fortement contaminée par les PCB, la Baie de Seine, et une zone considérée comme « peu contaminée par ces substances », la Mer d'Iroise (Ouest Bretagne).

L'exposé de cette étude s'articule en différents chapitres. Le chapitre I fait le point sur les différentes facettes de ce travail : i) une synthèse bibliographique sur les principales étapes du cycle de vie des quatre espèces de crustacés ciblées ii) puis une revue de la conception actuelle de l'analyse des isotopes stables dans l'étude des réseaux trophiques aquatiques iii) enfin, une synthèse des trois familles de contaminants étudiées (dioxines, PCB et PBDE) quant à leurs caractéristiques physico-chimiques, leurs principaux domaines d'utilisation, ainsi que leur toxicité vis-à-vis des êtres vivants et les réglementations qui en découlent. Le chapitre II regroupe le protocole d'échantillonnage mis en place ainsi que les différentes techniques d'analyses chimiques utilisées tout au long de ce travail. Enfin, l'ensemble des résultats obtenus est présenté et discuté au chapitre III dans des publications regroupées en 3 trois parties, chacune étant introduite par une courte synthèse résumant les résultats s'y rapportant. La première partie concerne la contamination des crustacés décapodes exploités par les composés organohalogénés (Articles 1 et 2), tandis que la seconde et la troisième

traitent de l'analyse isotopique stable du carbone et de l'azote (Articles 3 et 4) et de la bioaccumulation des PCB (Articles 5 et 6) chez l'araignée de mer *Maja brachydactyla.*

Chapitre I : Contexte scientifique

Ce chapitre est tout d'abord consacré à un bref rappel des grandes caractéristiques du cycle de vie des quatre espèces de crustacés retenues pour cette étude, à savoir l'araignée de mer, le tourteau, l'étrille et la langoustine. Des données récentes concernant la pêche et la consommation de ces organismes par la population française sont également présentées.

Une seconde partie aborde le principe ainsi que les avantages et inconvénients de l'analyse des isotopes stables du carbone et de l'azote pour l'étude des interactions trophiques entre les organismes.

Enfin dans la dernière partie, sont présentées les principales caractéristiques des trois familles de contaminants organohalogénés étudiés (structure et origine, propriétés physico-chimiques, toxicité…), ainsi qu'un bref rappel concernant les processus agissant sur la bioaccumulation de ces composés par les organismes.

1. Les crustacés décapodes : aspects biologiques

L'ordre des crustacés décapodes constitue un groupe d'animaux très abondants et diversifiés, puisqu'ils représentent 75-80% de toutes les espèces animales décrites de l'embranchement des Arthropodes. Leurs caractéristiques principales sont la présence de nombreux appendices articulés, d'un exosquelette segmenté chitineux, de deux paires d'antennes, et d'yeux composés. Les 45000 espèces qui composent la classe des crustacés présentent une grande diversité de formes et de modes de vie allant du zooplancton marin jusqu'aux énormes crabes dont l'envergure peut atteindre le mètre.

A la différence de la plupart des organismes, les crustacés grandissent de manière discontinue par le biais de mues successives au cours desquelles ils renouvellent la totalité de leur squelette externe et interne. Le rejet de toutes les parties dures empêche la détermination directe de l'âge par la méthode classique du décompte des marques de croissance sur les pièces calcifiées (otolithes chez les poissons, coquille chez les mollusques…). Pour contourner cette impossibilité, des méthodes indirectes ont été utilisées : analyse des distributions de fréquences de taille, marquage-recapture, élevage, mesure d'éléments radioactifs (Le Foll, 1989 ; Reyss, et al., 1996), quantification de la lipofuscine dans les pédoncules oculaires (Sheehy, 1990 ; O'Donovan et Tully, 1996). Sur la base de ces techniques un schéma de croissance moyenne a pu être établi pour la plupart des espèces de crustacés, mais toutes les études font ressortir une très forte variabilité autour des valeurs moyennes et soulignent l'impossibilité de lier taille et âge pour un individu donné.

1.1. L'araignée de mer *Maja brachydactyla* (Balss, 1922)

Embranchement : Crustacea
Classe : Eumalacostraca
Sous-classe : Eucarida
Ordre : Decapoda
Sous-ordre : Brachyura
Famille : Majidae
Genre : Maja
Espèce : brachydactyla

1.1.1. Répartition géographique

Maja brachydactyla est répandue en Atlantique depuis le sud de l'Irlande et de l'Angleterre jusqu'en Guinée, et en Manche le long de la côte sud de l'Angleterre, des côtes de Bretagne, du Cotentin et du nord de la France (Le Foll, 1993).

Elle a été distinguée depuis peu (Neumann, 1998) de l'espèce méditerranéenne *Maja squinado* (Herbst, 1788) sur la base, notamment, de différences morphologiques de la région distale des premiers gonopodes.

1.1.2. Habitat et comportements particuliers

La nature du substrat marin est un des facteurs qui conditionnent la distribution géographique, la forme, la structure et le mode de vie des organismes benthiques. *Maja sp.* n'est liée à aucun type de substrat (Lo Bianco, 1909; Karlovac, 1959; Bourdon, 1965; Stevcic 1968a) ; elle se trouve sur tous les types de fond (vaseux, rocheux, herbiers, sableux…), à une profondeur variant de 0 à plusieurs dizaines de mètres.

Comme de nombreux crabes, l'araignée a un comportement de camouflage bien marqué, auquel s'ajoute l'installation d'épibiontes sur la carapace, l'ensemble les protégeant des prédateurs (Wicksten, 1993; Parapar et al., 1997; Fernández et al., 1998). Les juvéniles vivent dans les zones de faible profondeur et se camouflent principalement grâce à la fixation d'algues, de cnidaires et de bryozoaires (Parapar et al., 1997). Lorsque les individus ont atteint la mue de puberté, le phénomène d'épibiose commence à se développer tandis que le comportement de camouflage diminue progressivement et finit par disparaître. Les épibiontes

observés par Parapar et al. (1997) sont principalement des algues, des cnidaires, des mollusques, et des crustacés ; quelques ascidies, éponges, bryozoaires et échinodermes ont également été identifiés.

Lo Bianco (1909), Bourdon (1965) et Stevcic (1968a) ont observé un autre comportement particulier chez *Maja sp.* à savoir l'enfouissement dans des sols mous de façon que seule la partie supérieure de la carapace soit découverte.

Dans les eaux peu profondes, les araignées de mer s'agrègent parfois en tas dont le rôle serait une protection contre les prédateurs potentiels (Stevcic, 1971). Stevcic (1971) montre qu'au cours de cette agrégation, les mâles de grande taille se positionnent en haut du tas par rapport aux plus petits mâles et aux femelles.

1.1.3. Morphologie et dimorphisme sexuel

Chez *Maja brachydactyla*, le dimorphisme sexuel est net ; il porte en particulier sur la forme de la languette abdominale (Figure 1) qui chez les femelles est large et ovale tandis que chez les mâles elle est étroite et a pratiquement la forme d'un rectangle allongé.

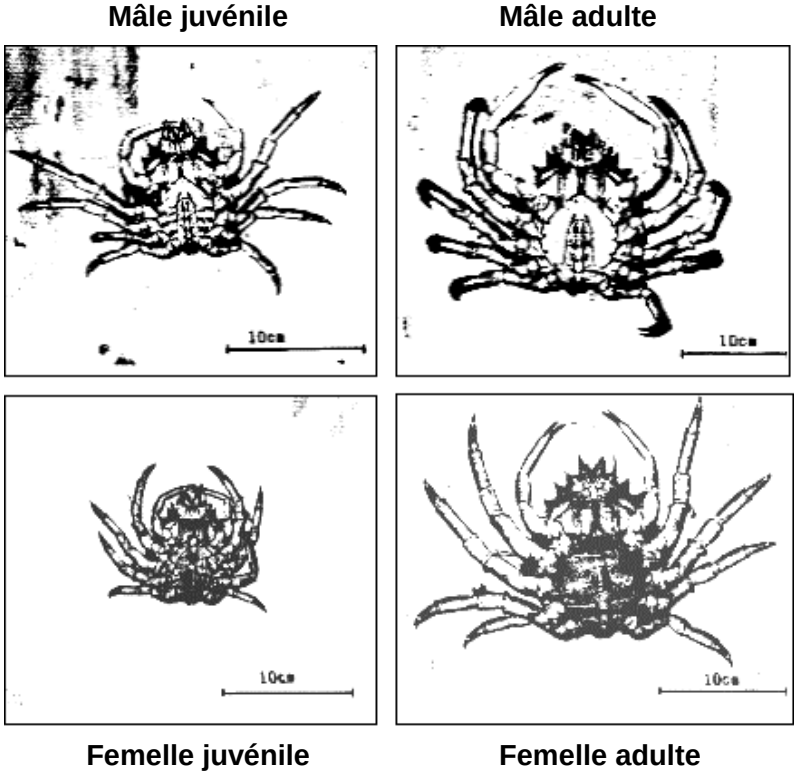

Figure 1 : Morphologie externe (vue ventrale) de *Maja brachydactyla* (De Kergariou, 1971; Le Foll, 1993)

La distinction juvénile/adulte se fait sur la base d'allométrie de croissance d'éléments de morphologie externe : les pinces chez les mâles (Figure 2) et l'abdomen chez les femelles (Figure 1 : abdomen plat chez les juvéniles et bombé chez les adultes).

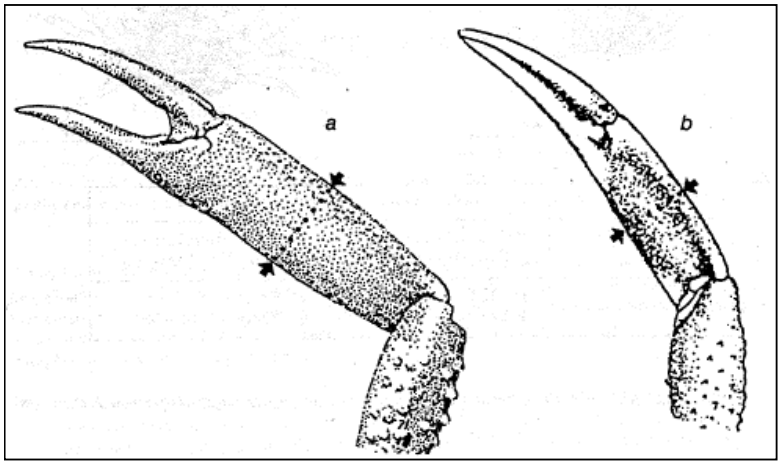

Figure 2 : Discrimination des juvéniles et adultes mâles pour la mesure de la largeur de la pince (a = adulte ; b = juvénile) (Le Foll, 1993).

1.1.4. Croissance

La mesure de référence d'une araignée est la longueur du céphalothorax prise de l'échancrure entre les deux cornes du rostre au point le plus postérieur de la carapace (Lc = Longueur standard de la CEE) (Journal officiel des communautés Européennes n° L288 du 11/10/86) (Figure 3). La longueur maximum que peut atteindre une araignée dépasse rarement 20 cm (araignée mâle).

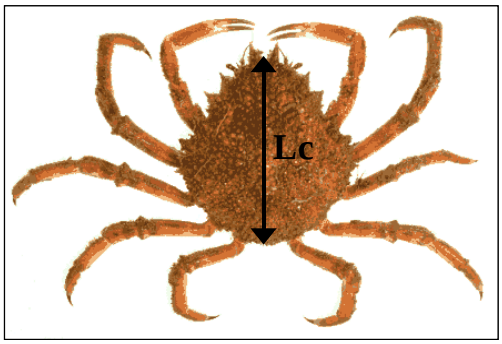

Figure 3 : Mesure de référence de la taille d'une araignée ; Lc = longueur du céphalothorax.

A la différence de la plupart des crustacés décapodes qui ont une croissance tout au long de leur vie, les crabes de la famille des majidés, dont *Maja brachydactyla*, ont la particularité de ne plus muer lorsqu'ils atteignent la maturité sexuelle, c'est à dire lorsqu'ils deviennent adultes, capables de se reproduire.

Après sa phase larvaire, l'araignée, dont la taille est de 2 à 3 mm, débute sa phase benthique. Pendant les deux années qui vont suivre, une quinzaine de mues successives permettront aux juvéniles de grandir jusqu'à une dizaine de centimètres. A la fin de l'été de sa troisième année, *Maja brachydactyla* réalisera sa dernière mue, appelée mue terminale ou mue de puberté. Dès lors elle est adulte et se reproduira l'hiver suivant (Figure 4).

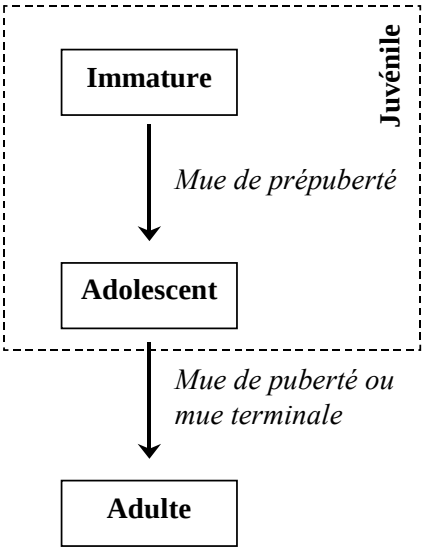

Figure 4 : Terminologie des différentes phases de croissance de *Maja brachydactyla* (Sampedro et al., 1999).

Détermination de l'âge des araignées de mer :

L'âge des araignées est difficile à déterminer du fait du manque de signes morphologiques externes. Un examen visuel de l'abdomen, de la carapace et des extrémités des pattes permet tout de même d'identifier cinq classes d'âge (Le Foll, 1993) :

- les araignées juvéniles ou « mousses » (avant la mue terminale) : abdomen plat chez les femelles, et largeur des pinces chez les mâles (cf. Chapitre 2, paragraphe 1.1.3). Les juvéniles de 0-1 an dont la longueur de la carapace est inférieure à 8 cm, se distinguent de ceux de 1-2 ans dont la longueur de la carapace est supérieure à 8 cm.

- les adultes de 2-3 ans (<1 an après la mue terminale); ils sont caractérisés par une carapace de couleur rouge vive sans fixation d'épibiontes et présentant des épines très piquantes. Leurs pattes possèdent des griffes noires pointues et piquantes,

- les adultes de 3-4 ans et de plus de 4 ans (>1 an après mue terminale); ils sont caractérisés par la présence d'épibiontes sur leur carapace et par une usure plus ou moins importante au niveau des griffes et des épines de la carapace.

1.1.5. Migration

Les migrations de l'araignée de mer ont été étudiées par différentes méthodes telles que l'analyse des changements spatio-temporels de structure de population, les marquages-recaptures (Le Foll, 1993), et par l'utilisation de puces électroniques et de systèmes télémétriques (González-Gurriarán et Freire, 1994; Hines et al., 1995; Smith et al., 2000; González-Gurriarán et al., 2002).

Les araignées adultes migrent vers le large au début de l'automne pour gagner des fonds de 40 à 80 mètres sur des substrats durs (basses rocheuses, coraux, cailloutis) où elles restent jusqu'à la fin de l'hiver (De Kergariou, 1971). Elles entreprennent ensuite une migration de retour vers la côte dès le début du printemps, où elles se regroupent tantôt dans les champs de laminaires, tantôt sur des fonds sableux entre 0 et 20 m (De Kergariou, 1971).

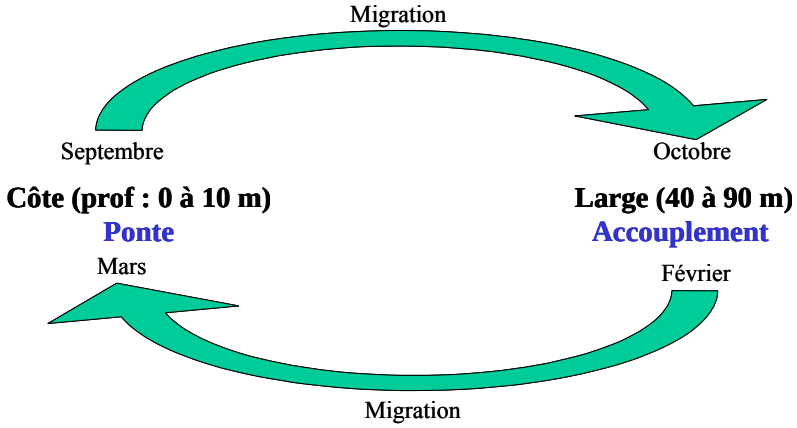

Figure 5 : Migrations saisonnières chez l'araignée de mer.

Aucune différence de comportement migratoire n'a été observée entre mâles et femelles (Latrouite et Le Foll, 1989; Le Foll, 1993). Les raisons de ces déplacements migratoires ne sont pas connues (nourriture, température…).

En ce qui concerne les juvéniles, aucun comportement migratoire n'est observé (González-Gurriarán et Freire, 1994). Ils resteraient cachés l'hiver près des côtes (enfouissement dans le sédiment ou dans les herbiers) jusqu'au printemps.

Il est important de noter que la saisonnalité des migrations en fonction des secteurs géographiques. Dans le secteur « Nord Finistère », les individus adultes sont présents à la côte de mars à août, et les juvéniles se découvrent à la même période. En revanche, en Baie de Seine, les adultes et les juvéniles ne sont présents que de mai à août. Cette différence peut s'expliquer par une différence de régime thermique entre les deux secteurs (Le Foll, 1993).

1.1.6. Reproduction

La mue de puberté correspond à l'atteinte de la maturité sexuelle, c'est à dire au début du développement gonadique chez les femelles et les mâles. On peut distinguer quatre stades de développement des gonades chez les individus femelles (González-Gurriarán et al., 1993) :

I = gonades non développées de couleur blanche ou crème très claire. Oocytes immatures et petits (< 264 µm). Le nucleus est parfaitement visible.

II = gonades développées de couleur crème ou orange pâle. La taille maximale des oocytes est de 453 µm. Le nucleus est toujours bien visible

III = la masse des gonades augmente et commence à remplir la cavité céphalothoracique. Les gonades sont de couleur orange, de taille maximale 673 µm. Le nucleus n'est pas visible.

IV = Les gonades sont complètement matures de couleur orange vif, elles remplissent totalement la cavité céphalothoracique. Les oocytes sont larges et bien développés, de taille maximale 845 µm.

En Galice, la mue de puberté a lieu en été ou début automne (González-Gurriarán et al., 1993), et les femelles commencent leur développement gonadique en septembre (stades I et II). En décembre, les premiers individus matures (stade IV) apparaissent. La maturation des gonades marque le début du cycle de reproduction.

L'accouplement de l'araignée de mer a lieu en automne ou au début de l'hiver suite à une attirance du mâle par des phéromones émises par la femelle. De nombreux auteurs ont montré que des mâles durs se reproduisent avec des femelles dures ou molles (lors de la mue terminale) (De Kergariou, 1971; Stevcic, 1977; Brosnan, 1981; González-Gurriarán et al., 1993; Jones et Hartnoll, 1997; García-Flórez et Fernández-Rueda, 2000). Les araignées femelles ont en outre la capacité de stocker le sperme pendant plusieurs mois dans une « spermathèque » au niveau des récepteurs séminaux, permettant plusieurs pontes sans nouvel accouplement (Carlisle, 1957; González-Gurriarán et al., 1993, 1996, 1998).

Selon González-Gurriarán et al. (1993), la période d'incubation des œufs sous l'abdomen de la femelle varie de 34 à 62 jours en fonction de la température du milieu (juillet et septembre : moyenne 18,4°C→ incubation moyenne 40 jours ; mai, juin, octobre et novembre : moyenne 15,8°C→ incubation moyenne 52 jours). Chaque femelle pond de 45000 à 400000 œufs selon

la taille de l'animal (De Kergariou 1971). Trois stades de développement des œufs ont été identifiés par González-Gurriarán et al. (1993) :

A = œufs jaunes-oranges, récemment pondus, d'un diamètre inférieur à 0,3 mm, sans pigmentation,

B = œufs oranges-rouges, avec une légère pigmentation,

C = œufs gris foncés, d'un diamètre de 0,5-0,6 mm, avec une pigmentation totale (appelés « eyed eggs » par les Anglais).

Après éclosion des œufs, les larves sont pélagiques pendant 6 à 8 semaines (août-septembre) (Martin, 1983, 1985), période pendant laquelle elles passent par différents stades morphologiques dits « zoés » et « mégalopes ».

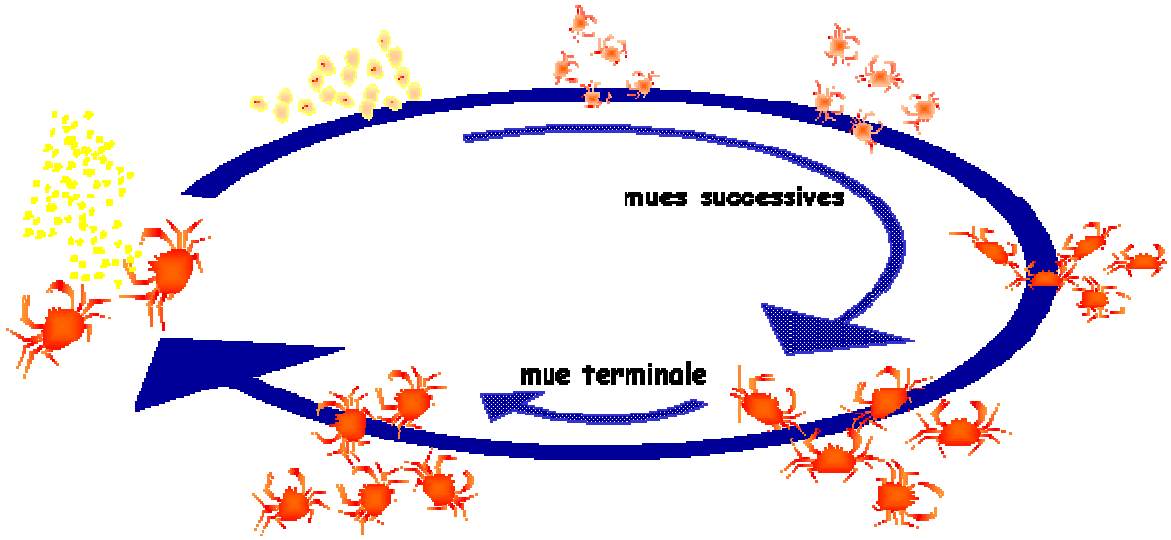

Figure 6 : Cycle biologique de l'araignée de mer.

Il est important de noter que la période de reproduction ainsi que le nombre de pontes des femelles peut varier en fonction des secteurs géographiques (Le Foll, 1993). Cette différence peut s'expliquer par une différence de régime thermique. Sur les côtes de la Manche, la plupart des femelles sont œuvées de mai à août et pondent une seule fois. En Baie de Morlaix, elles le sont de mai à septembre et pondent deux fois successivement. La première ponte survient au début du mois de mai ; l'éclosion des œufs s'étale sur la seconde quinzaine de juin et la première de juillet, soit deux mois plus tard. Trois ou quatre jours après cette éclosion, se produit la deuxième ponte ; les œufs éclosent au cours de la seconde quinzaine d'août, soit après un mois et demi. La maturation des œufs, plus rapide que lors de la première incubation,

est due à l'élévation progressive de la température des eaux à partir d'avril (De Kergariou, 1971).

D'autres études mettent également en évidence cette variabilité géographique. Selon Hartnoll (1965), la période de reproduction sur les côtes anglaises commence en mai, et l'éclosion des œufs de *Maja brachydactyla* se produit en septembre. Sur la côte ouest de l'Irlande, les femelles ovigères sont présentes de mars à septembre et ne pondent qu'une fois (Brosnan, 1981). En Galice, quelques femelles ovigères peuvent être trouvées occasionnellement en décembre, mais la majorité apparaît entre janvier et septembre, période pendant laquelle une femelle peut pondre trois fois de suite (González-Gurriarán et al., 1993).

1.1.7. Régime alimentaire et prédation

Différents auteurs ont étudié le régime alimentaire de *Maja brachydactyla* soit par des observations en milieu naturel ou en aquarium, soit par l'analyse des contenus stomacaux (Carlisle, 1957; Stevcic, 1967, 1968b, De Kergariou, 1974; Brosnan, 1981; Bernárdez et al., 2000) (Tableau 1). Ces proies sont des organismes sessiles ou peu mobiles. L'araignée de mer aurait donc un régime alimentaire omnivore-opportuniste, c'est-à-dire qu'elle adapte son comportement prédateur aux ressources disponibles dans le milieu où elle vit.

Le poulpe (*Octopus vulgaris*) et le homard (*Homarus gammarus*) sont les prédateurs les plus dangereux pour l'araignée de mer (Baal, 1953; Carlisle, 1957; Stevcic, 1968b). Celle-ci se défend directement avec ses pinces et/ou indirectement par le camouflage, l'enfouissement et l'agrégation (Lo Bianco, 1909; Baal, 1953; Carlisle, 1957). De nombreux poissons sont également prédateurs des petits juvéniles d'araignée. Par ailleurs, un comportement cannibale de cette espèce a été observé en bassin sur les individus mous, c'est-à-dire juste après la mue (Latrouite, comm. pers.).

Tableau 1 : Etude bibliographique du régime alimentaire de *Maja brachydactyla* (pour chaque référence, les espèces sont classées par ordre décroissant d'abondance)

Références	**Types d'étude**	**Régime alimentaire de *Maja brachydactyla***
Carlisle, 1957	Observations *in situ* *Côtes anglaises*	Algues vertes (*Enteromorpha sp.*) Algues rouges (*Corallina sp., Heterosiphonia sp., Griffithsia sp.*) Bryozoaires et hydraires fixés sur les algues
Stevcic, 1967 et 1968	Observation *in vivo* et analyse des contenus stomacaux *Mer Adriatique*	Echinodermes (Echinidés, Ophiuroidés, Astéridés) Mollusques (Gastéropodes, Pélécypodes) Crustacés (Anomoures, Brachyoures, Isopodes) Polychètes Algues
De Kergariou, 1974	Observations *in situ* et analyse des contenus stomacaux *Manche (St Brieuc, Roscoff) et Atlantique (Ile d'Yeu)*	Algues rouges (*Corallina sp.*) Algues brunes (*Laminaria sp.*) Pélécypodes (moules, modioles…) Gastéropodes (de l'helcyon jusqu'au buccin) Cirripèdes (*Balanus sp.*) Isopodes Amphipodes Décapodes (macroures tels que *Upogebia* ; anomoures tels que *Eupagurus* ; brachyoures) Etoiles de mer (*Asterias sp., Marthasterias sp.*) Oursins Protozoaires (*Alveolina sp.*) Cnidaires (famille des sertularidés) Annélides (famille des aphroditidés) Bryozoaires (*Cellaria sp.*) Chitons Poissons
Brosnan, 1981	Analyse des contenus stomacaux *Côtes irlandaises*	Etoiles de mer (*Asterias sp., Marthasterias sp.*) Pélécypodes (*Mytilus sp.)* Crabes (*Carcinus sp.*)
Bernárdez *et al.*, 2000	Analyse des contenus stomacaux *Côtes de Galice*	Algues brunes (*Laminaria sp.*) Algues rouges (*Corallina sp.*) Holothuries (*Aslia lefevrei*) Ascidies Echinidés (*Paracentrotus sp.*) Brachyoures et Anomoures Gastéropodes (*Littorina sp., Hinia sp.,* Trochidae, *Gibbula sp., Patella sp.…*) Pélécypodes (*Mytilus sp.*) Cirripèdes (*Balanus sp.*) Ophiures Chitons (*Acanthochitona sp.*)

1.2. Le tourteau ou crabe dormeur *Cancer pagurus* (Linnaeus, 1758)

Embranchement : Crustacea
Classe : Eumalacostraca
Sous-classe : Eucarida
Ordre : Decapoda
Sous-ordre : Brachyura
Famille : Cancridae
Genre : Cancer
Espèce : pagurus

1.2.1. Répartition géographique et habitat

Le tourteau se rencontre sur la côte est de l'Océan Atlantique, du nord de la Norvège jusqu'au Maroc, et plus rarement en Méditerranée (Quéro et Vayne, 1998 ; D'Udekem d'Acoz, 1999). Il fréquente les fonds meubles ou rocheux, de la zone intertidale à une profondeur d'environ 200 m, sa répartition varie en fonction du sexe et de la saison. Il semble en particulier que les femelles aient besoin de fonds sablo-vaseux en période de ponte et d'incubation.

1.2.2. Caractères distinctifs

Le tourteau est un crabe roux virant au brun selon les influences de l'environnement dans lequel il vit ; sa taille maximale (Lc) est de 25 cm environ (Figure 7). La distinction mâle/femelle se fait, comme pour *Maja brachydactyla*, par l'examen de la forme de la languette abdominale. Large et ovale chez la femelle, elle est plus étroite et a la forme d'un rectangle allongé chez le mâle.

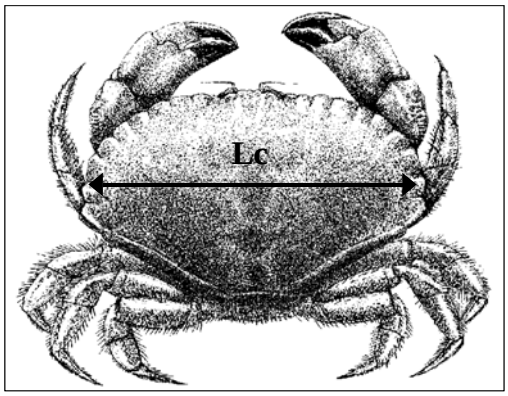

Figure 7 : Mesure de référence de la taille du tourteau.

1.2.3. Croissance

A l'issue de la phase pélagique, les tourteaux effectuent leur métamorphose et débutent leur vie benthique en zone côtière où ils passent les trois à quatre premières années de leur vie. Pendant la phase juvénile, le schéma de croissance est semblable pour les deux sexes et conduit à une taille de l'ordre de 12 à 14 cm vers 3-4 ans (Latrouite et Morizur, 1988 ; Anon., 2005). Après la maturité sexuelle, le taux de croissance diminue pour les deux sexes mais la croissance des mâles reste plus rapide que celle des femelles dont une plus grande partie des ressources énergétique est mobilisée pour la reproduction. Les mâles atteignent une taille maximale de l'ordre de 25 cm et les femelles de 21 cm. La longévité de l'espèce est encore du domaine conjectural mais une estimation à une quinzaine d'années semble communément admise.

1.2.4. Migration

En dépit de son surnom de « dormeur », *Cancer pagurus* est un migrateur qui parcourt parfois plus d'un kilomètre par jour. Grâce à la technique de marquage, différents auteurs ont mis en évidence un comportement migratoire des tourteaux adultes femelles en lien avec le cycle de reproduction, tandis que les mâles seraient davantage sédentaires (Fahy et al., 2004).

Latrouite et Le Foll (1989) ont montré que le sens de ces déplacements va à l'opposé de la dérive résiduelle des courants de surface dans lesquels évoluent les larves pendant la phase pélagique. Ils ont émis l'hypothèse que le déplacement des femelles compense la dérive que subissent les larves pélagiques et ainsi participent au maintien biogéographique de l'espèce.

1.2.5. Reproduction

L'accouplement a lieu en été lorsque la carapace de la femelle est molle, soit juste après la mue (Brown et Bennett, 1980). Cependant, elles ont également la capacité de stocker le sperme, leur permettant de produire des larves viables au cours de la saison reproductrice suivante, sans nécessité de mue ou d'accouplement (Naylor et al., 1999). La taille de maturité à partir de laquelle les individus sont aptes à se reproduire a été estimée à 14 cm pour la Manche-Mer du Nord et la partie sud de la Bretagne (Latrouite et Noël, 1993).

La ponte a lieu en hiver (Thompson et al., 1995), et le nombre d'œufs pondus dépend de la taille de la femelle (0,25 à 3 millions d'œufs) (Bennett, 1995). Les femelles ovigères portent les œufs pendant 6 à 9 mois sous l'abdomen, période pendant laquelle elles ne s'alimentent pas, restant enfouies dans une dépression creusée dans le sédiment ou sous les roches.

Les éclosions ont lieu à partir d'avril et peuvent s'étaler jusqu'en septembre. La larve vit dans le plancton pendant 7 à 8 semaines et passe par différents stades morphologiques dits « zoés » et « mégalopes ». La dernière métamorphose intervient à la taille de 2,5 mm et donne au tourteau sa forme définitive, marquant ainsi le début de sa vie benthique.

1.2.6. Régime alimentaire et prédation

Cancer pagurus est un grand crabe typique des fonds meubles ou rocheux. C'est un prédateur actif qui consomme des crustacés (i.e *Carcinus maenas*, *Porcellana platycheles*, *Pisidia longicornis*, *Pilumnus hirtellus*, *Galathea squamifera*…) (Lawton, 1989), des mollusques (*Nucella lapillus*, *Littorina littorea*, *Ensis spp*., *Mytilus edulis*, *Cerastoderma edule*, *Ostrea edulis*) (Lawton et Hughes, 1985; Mascaro et Seed, 2001 ; Hall et al., 1991), ainsi que des vers et des holothuries. Il peut attraper les proies mobiles, les emprisonner sous son abdomen et les écraser avec ses chélipèdes (Lawton, 1989). Il peut également fouiller le sédiment pour accéder aux mollusques bivalves tels qu'*Ensis spp.* et *Lutraria lutraria* (Hall et al., 1991).

1.3. L'étrille *Necora puber* (Linnaeus, 1767)

Embranchement : Crustacea
Classe : Eumalacostraca
Sous-classe : Eucarida
Ordre : Decapoda
Sous-ordre : Brachyura
Famille : Portunidae
Genre : Necora
Espèce : puber

Des synonymes de *Necora puber* sont également utilisés tels que : *Liocarcinus puber* et *Portunus puber.*

1.3.1. Répartition géographique et habitat

Cette espèce septentrionale largement distribuée se rencontre dans l'Océan Atlantique de la Norvège au Sahara occidental, et en Méditerranée sur les côtes espagnole et française (Golfe du Lion) (Quéro et Vayne, 1998 ; D'Udekem d'Acoz, 1999). D'un point de vue bathymétrique, elle se trouve principalement dans la zone intertidale et jusqu'à 80 mètres environ. En journée, *Necora puber* se cache sous les roches ou dans des failles, son activité étant plus intense pendant la nuit.

1.3.2. Caractères distinctifs

L'étrille est un crabe de petite taille atteignant jusqu'à 10 cm de large (Figure 8). Les deux pattes postérieures aplaties, en forme de rame lui permettent de nager sur de courtes distances. La carapace est marquée sur le bord antérieur par de nombreux denticules entre les yeux et par cinq dents de part et d'autre des yeux. Elle est recouverte, de même que les pattes, par une pilosité courte et dense retenant les particules de vase qui lui donne une couleur brune et d'aspect sale. Les pinces sont bleues, les pattes avec des rayures longitudinales bleues ou violettes et les yeux rouges.

La distinction mâle/femelle se fait, comme chez l'araignée de mer et le tourteau, par l'examen de la forme de la languette abdominale, qui, chez les femelles, est large et ovale alors que chez le mâle, elle est étroite et a pratiquement la forme d'un rectangle allongé.

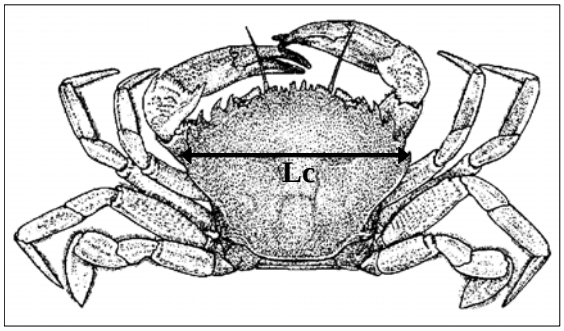

Figure 8 : Mesure de référence de la taille de l'étrille.

1.3.3. Croissance

L'étrille est une espèce à croissance rapide qui, à l'âge d'un an, mesure environ 4,5 cm pour les mâles (65 g) et 4 cm pour les femelles (40 g). La taille maximale, plus grande chez les mâles que chez les femelles, est vraisemblablement atteinte vers 3 ans (Wilhelm, 1985).

1.3.4. Reproduction

Pendant la période de reproduction qui a lieu en été, le mâle capture la femelle et la transporte sous lui en attendant qu'elle mue. La fécondation est interne, le mâle transférant le sperme à l'aide de ses stylets copulateurs. La proportion de femelles ovigères est maximale de janvier à mars (Wilhelm, 1985). Les œufs sont incubés pendant deux à quatre mois selon la température et le nombre est fonction de la taille de l'individu : une étrille de 50 mm pond environ 200000 œufs (Wilhelm, 1985). L'éclosion a lieu à un stade larvaire avancé, libérant des larves planctoniques de 1 mm qui subiront différentes modifications morphologiques jusqu'à leur forme définitive d'étrilles juvéniles benthiques.

1.3.5. Régime alimentaire et prédation

D'après des études de contenus stomacaux, González-Gurriarán (1978) et Freire et González-Gurriarán (1995) montrent que l'étrille est un crustacé omnivore, très agressif qui se nourrit principalement de crustacés anomoures (*Pisidia longicornis*) et brachyoures, de

mollusques bivalves (*Mytilus sp.*) et gastéropodes (*Nassa sp.*), d'échinodermes (*Psammechinus miliaris*) et de poissons. D'autres espèces telles que les phanérogames (*Zostera sp.*), les éponges et les polychètes sont également des proies potentielles, mais à un moindre degré.

1.4. La langoustine *Nephrops norvegicus* (Linnaeus, 1758)

Embranchement : Crustacea
Classe : Eumalacostraca
Sous-classe : Eucarida
Ordre : Decapoda
Sous-ordre : Astacidae
Famille : Nephropidae
Genre : Nephrops
Espèce : norvegicus

1.4.1. Répartition géographique et habitat

Nephrops norvegicus est largement distribuée dans l'Atlantique nord-est, de l'Islande jusqu'au Maroc. Elle se trouve également en Méditerranée, et est très abondante en mer Adriatique. Elle vit à des profondeurs de 15 m à 800 m, sur des substrats vaseux et sablo-vaseux. La répartition de cette espèce est davantage déterminée par la nature du fond et la température de l'eau que par la profondeur.

Les mœurs de la langoustine la conduisent à vivre en solitaire dans un terrier qu'elle creuse dans la vase. Ce terrier peut atteindre 10 cm de diamètre, plus d'un mètre de long et jusqu'à 20-30 cm de profondeur (Rice et Chapman, 1981). Des expériences en laboratoire ont également montré que les grands mâles sont moins enclins à creuser des terriers que les femelles et les petits mâles (Farmer, 1974a, 1974b). Cachée dans son terrier le jour, *Nephrops norvegicus* le quitte durant les périodes de faible éclairement (aube et crépuscule) pour rechercher sa nourriture. Cependant, Chapman et Rice (1971) ont remarqué un comportement inversé de la langoustine dans les eaux très profondes, à savoir la période d'activité en journée.

1.4.2. Caractères distinctifs

Nephrops norvegicus est une espèce de petite taille, de couleur orange pâle, pouvant atteindre une longueur totale maximum de 18-20 cm (Figure 9). La tête et le thorax ont une couverture non segmentée (la carapace) tandis que l'abdomen est clairement segmenté avec une large queue en éventail. Les trois premières paires de pattes possèdent des pinces, la première étant longue et ovale avec des arêtes longitudinales et épineuses.

Le mâle et la femelle se distinguent par l'emplacement des orifices sexuels, ainsi que par une différence de forme de la première paire de pléopodes qui sont rigides et modifiés en organe copulateur chez le mâle et beaucoup plus fins et souples chez la femelle.

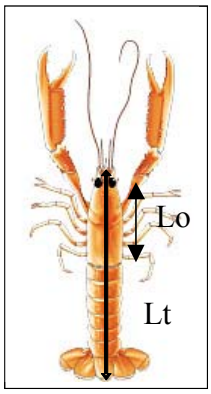

Figure 9 : Mesure de référence de la taille de la langoustine ; Lt = longueur totale, Lo = longueur orbitaire.

1.4.3. Croissance

La croissance chez *Nephrops norvegicus* varie géographiquement et, est négativement corrélée avec la densité de terriers (Tuck et al., 1997). Elle est également liée à la disponibilité de nourriture, à la température de l'eau, et au type du sédiment (Tuck et al., 1997 ; Talidec, 2003). En mer Celtique, les mâles et les femelles muent plusieurs fois par an avant l'acquisition de la maturité sexuelle. Après ce stade, le nombre de mues annuelles diminue, les femelles par exemple ne muant plus qu'une fois par an en mai. Thomas (1965a) a estimé un taux de croissance moyen de 5,7% pour les mâles et de 6,2% pour les femelles. Dans le Golfe de Gascogne, les mâles après leur maturité sexuelle muent en moyenne deux fois par an tandis que les femelles ne muent qu'une seule fois.

1.4.4. Migration

La langoustine est sédentaire, elle n'effectue aucune migration (Marine Institute, 2001). Elle peut cependant se déplacer si des facteurs défavorables agissent sur son habitat, tels que la mise en suspension de la vase lors d'une tempête.

1.4.5. Reproduction

La taille ou l'âge de la maturité sexuelle varie selon la zone géographique en relation avec les conditions du milieu (nourriture et température), ainsi qu'en fonction du sexe (Tuck et al., 2000). Dans le Firth of Clyde (ouest Ecosse), l'âge de la maturité est de 4-4,5 ans pour les mâles (Lo = 21-34 mm) et de 3-3,5 ans pour les femelles (Lo = 29-46 mm) (Tuck et al., 2000). Dans le Golfe de Gascogne, les mâles acquièrent la maturité sexuelle pendant leur deuxième année à 19,5 mm de longueur orbitaire (Lo) et les femelles en fin de deuxième année à 25 mm (Talidec, 2003).

La reproduction est annuelle (Marine Institute, 2003), l'accouplement ayant toujours lieu lorsque les femelles sont « molles », c'est à dire directement après la mue (Farmer, 1975). Les œufs sont fécondés au moment de leur émission et se collent sous l'abdomen. Dans le Golfe de Gascogne, la période de ponte commence en avril et se termine en août, et la durée d'incubation des œufs est de 7 mois (Talidec, 2003).

Le nombre d'œufs émis croît proportionnellement avec la taille de la femelle. Une femelle de 22 à 25 mm de longueur orbitaire pond environ 650 œufs, et une femelle de 40 mm environ 4000 œufs (Talidec, 2003). A l'éclosion les larves sont pélagiques pendant un mois, puis après métamorphose, les juvéniles de langoustine gagnent le fond et leur croissance est alors très rapide, au rythme d'une mue par mois.

1.4.6. Régime alimentaire et prédation

Le régime alimentaire de *Nephrops norvegicus* est très varié. La plupart des études indiquent que *Nephrops norvegicus* s'alimente principalement de crustacés mais également de mollusques et à un moindre degré de polychètes et d'échinodermes (Parslow-Williams et al., 2002). Thomas et Davidson (1962) ont étudié les classes de taille des proies de *Nephrops norvegicus*, démontrant une taille minimum des particules alimentaires de 1 mm et un maximum de 5 mm. Les différences observées dans le régime alimentaire de la langoustine

semblent être dues davantage à des changements de l'abondance des proies qu'à une quelconque préférence de proies (Parslow-Williams et al., 2002), indiquant que cette espèce est un prédateur opportuniste.

De nombreux poissons sont des prédateurs de la langoustine. En Ecosse, une étude de contenus stomacaux de la morue (*Gadus morhua*) a mis en évidence la présence de *Nephrops norvegicus* dans 80% des estomacs de morues étudiés (Thomas, 1965b). *Nephrops norvegicus* a été également trouvé dans environ 50% d'estomac de raies bouclées, *Raja clavata* (Thomas, 1965b), et de petites roussettes, *Scyliorhinus canicula* (Gordon et De Silva, 1980).

2. Les crustacés décapodes : aspects commerciaux

2.1. La pêche

Les débarquements de crustacés représentent, en France, environ 5% des apports en poids de la pêche fraîche, mais leur contribution en valeur est plus forte en raison de leur prix unitaire élevé (OFIMER, 2003). La langoustine est au premier rang d'entre eux, en tonnage comme en valeur, suivie du tourteau et de l'araignée. Les modes de pêche et les zones varient selon l'espèce (Tableau 2), mais plus des trois quarts de la production globale sont assurés par les flottilles bretonnes : principalement de Saint-Malo à Paimpol pour l'araignée, de Morlaix à Camaret pour le tourteau et de Loctudy à Penmarc'h pour la langoustine. La production d'étrille est plus éclatée géographiquement avec des pôles principaux en Baie de Seine, dans le Morbihan et dans le secteur du Croisic.

Tableau 2. Caractéristiques de la pêche aux crustacés

	Araignée	Tourteau	Etrille	Langoustine
Secteur	Manche et Atlantique (70% en Bretagne nord)	Manche et Atlantique (70% en Bretagne, 20% en Basse-Normandie)	Manche et Atlantique (50% en Bretagne, 50% en Normandie	Atlantique (90% en Bretagne sud)
Saison	Novembre à juin	Mai à novembre		
Production (tonnes/an)	5000	6000-7000	200-300	8000-9000
Taille minimale de débarquement	CL ≥ 120 mm	CL ≥ 140 mm au nord du 48°N CL ≥ 130 mm au sud du 48°N	CL ≥ 50 mm	TL ≥ 70 mm
Engins principaux	casier / filet	casier	casier / chalut	chalut

2.2. La consommation humaine

En France, les produits aquatiques frais représentent 2% des produits consommables par l'homme (OFIMER, 2003), parmi lesquels la consommation de crustacés (à domicile ou en restauration) a été évaluée à 15% de l'ensemble des produits de la pêche et de l'aquaculture (OFIMER, 2003). Les tableaux 3 et 4 présentent les chiffres de cette consommation à domicile.

Tableau 3 : Consommation française à domicile de produits aquatiques frais en 2003 (OFIMER, 2003)

	Poissons	Coquillages et céphalopodes	Crustacés	Total produits frais
Poids (tonnes)	128 884	80 732	36 386	246 002
Valeur (x10^6 euros)	1 337	394	391	2 122

Tableau 4 : Consommation française à domicile de crustacés frais en 2003 (OFIMER, 2003)

	Crevette	Langoustine	Tourteau + Araignée + Etrille	Langouste + Homard
Poids (tonnes)	21 312	5 075	8 201	1 150
Valeur (x10^6 euros)	243	58	46	35

Si les débarquements nationaux sont suffisants pour couvrir la consommation française en crabes (tourteau, araignée, étrille) et en langoustines, il n'en va pas de même pour les homards, langoustes et crevettes dont la plus grande part provient de l'importation.

L'évolution des ventes dans les grandes et moyennes surface, où se font plus des deux tiers des ventes de produits de la mer, montre une modification des habitudes alimentaires avec une diminution de la consommation des crustacés vivants au bénéfice des crustacés cuits ou transformés (OFIMER, 2003).

3. Les isotopes stables

3.1. Généralités

Les éléments principaux en biologie (carbone, azote, oxygène, hydrogène...), comme tous les autres éléments, existent sous plusieurs formes isotopiques stables qui possèdent un même nombre de protons et diffèrent par leur nombre de neutrons. Deux isotopes d'un même

élément n'ont donc pas la même masse : les isotopes légers sont distingués des isotopes lourds.

Le ou les neutrons supplémentaires de certains isotopes leur confèrent une instabilité énergétique. Le retour à une forme isotopique stable se fait par l'émission d'une particule : ce sont les isotopes radioactifs. D'autres isotopes ont une configuration constante : ce sont les isotopes stables.

Pour un même élément peuvent cohabiter des formes stables et radioactives. Les isotopes se distinguent par des variations dans leur pourcentage d'abondance naturelle, l'isotope le plus léger étant généralement le plus abondant. Le carbone, par exemple, a trois isotopes : ^{12}C, abondant (98,9%), léger et stable ; ^{13}C, rare (1,1%), lourd et stable et ^{14}C rare ($< 10^{-10}$%), lourd et radioactif. L'azote a, lui, 12 isotopes dont deux formes stables : ^{14}N, abondant (99,6%) et léger, et ^{15}N, lourd et rare (0,4%).

Les rapports des isotopes stables sont mesurés à l'aide d'un spectromètre de masse de rapport isotopique à flux continu couplé à des analyses élémentaires (IRMS, Isotope Ratio Mass Spectrometer ; cf Chapitre 3, paragraphe 3) (Lajtha et Michener 1994; Peterson 1999).

Les rapports isotopiques des échantillons sont exprimés en termes de déviation (δ) en ‰ par rapport à l'étalon de valeur théorique :

$$\delta\ (‰) = (R_{échantillon} / R_{référence} - 1) \times 1000$$

avec R = rapport de l'isotope lourd (rare) sur le léger (abondant)

Ces étalons sont utilisés internationalement, normalisés par l'Agence Internationale de l'Energie Atomique et choisis dans le réservoir terrestre le plus abondant de l'élément mesuré. Pour le carbone, il s'agit du V-PDB (Pee-Dee Belemnite), rostre de bélemnite fossile (*Belemnita americana*). Les teneurs isotopiques en azote sont, quant à elles, exprimées par rapport à l'azote atmosphérique N_2 (Mariotti, 1995). La précision de la mesure est de 0,2‰ pour le carbone et l'azote.

3.2. Isotopes stables et réseaux trophiques

3.2.1. Fractionnement isotopique au sein du réseau trophique

Les atomes constitutifs des êtres vivants proviennent des atomes de leur nourriture : il existe par conséquent une relation entre la composition isotopique de la nourriture et celle du consommateur. De Niro et Epstein (1978) ont montré que la composition isotopique d'un

animal reflétait la composition isotopique de sa nourriture, avec un enrichissement moyen en $\delta^{13}C$ de 0,8 ± 1,1‰. Des études similaires (De Niro et Epstein 1981; Minagawa et Wada 1984) ont été menées sur le devenir de la signature $\delta^{15}N$ dans les réseaux trophiques, révélant un enrichissement en $\delta^{15}N$ de 3,4 ± 1,1‰ à chaque niveau trophique. Les rapports isotopiques stables du carbone ($^{13}C/^{12}C$, $\delta^{13}C$) et de l'azote ($^{15}N/^{14}N$, $\delta^{15}N$) reflètent donc la composition isotopique alimentaire (Dufour et Gerdeaux, 2001).

Cet « outil » isotopes stables utilisé comme traceur des flux de matière au sein des réseaux trophiques est basé sur une partition métabolique sélective (fractionnement isotopique). En effet, les légères différences de masse entre les isotopes d'un même élément engendrent des propriétés physico-chimiques différentes (densité, volume molaire,….). De même, la vitesse des réactions et les constantes d'équilibre sont influencées par la composition isotopique. Ainsi, au cours des réactions physiques, chimiques ou biologiques, un fractionnement isotopique s'opère. Il en résulte des différences de composition isotopique entre réactifs et produits formés.

Le fractionnement isotopique conduit à une perte préférentielle des isotopes légers au cours des processus naturels tels que la respiration et l'excrétion (De Niro et Epstein, 1978; Rau et al., 1983). En effet, le CO_2 respiré est appauvri en ^{13}C bien que le degré de déplétion soit relativement faible dans la majorité des organismes (De Niro et Epstein, 1978). De même, la balance isotopique de l'azote est conservée par l'appauvrissement en ^{15}N des produits d'excrétion azotée : l'enrichissement en ^{15}N du prédateur est en fait compensé par l'excrétion préférentielle de ^{14}N au cours des processus de transamination et désamination des protéines (Minagawa et Wada 1984).

3.2.2. Utilisation des isotopes stables au sein des réseaux trophiques des milieux aquatiques

Les variables continues de $\delta^{15}N$ sont de plus en plus utilisées en écologie des réseaux trophiques en tant qu'indicateurs et quantificateurs du positionnement trophique des organismes aquatiques (Vander Zanden et Rasmussen, 1999; Hobson et al., 2002; Vizzini et Mazzola, 2002). Les taux d'enrichissement trophique du carbone ($\delta^{13}C$) trouvent, quant à eux, leur application principale dans la détermination des différentes sources de carbone primaire dans les écosystèmes aquatiques et dans l'évaluation des voies du flux de carbone des producteurs primaires jusqu'aux consommateurs tertiaires (Gu et al., 1996).

- Signature isotopique des sources de matière organique

Les sources de matière organique à la base des réseaux trophiques (producteurs primaires) possèdent des signatures isotopiques différentes (Ostrom et Fry, 1993) résultant de la composition isotopique des éléments minéraux nutritifs et des fractionnements isotopiques associés aux cycles biochimiques utilisés au cours de la synthèse de la matière organique. Le tableau 5 présente les compositions isotopiques typiques en carbone et azote des principaux producteurs primaires en milieu marin.

Tableau 5 : Rapports isotopiques stables du carbone et de l'azote des principaux producteurs primaires en milieu marin (Ostrom et Fry, 1993 ; Riera et al., 2002 ; Riera et Hubas, 2003)

	δ^{13} C	δ^{15}N
Microphytobenthos	-17 à -11	7 à 9
Phytoplancton marin	-24 à -18	-2 à 12
Macrophytes benthiques	-27 à -10	-1 à 10
Phanérogames marines	-16 à -4	0 à 6

Ainsi, le δ^{13}C qui varie de façon importante entre les différents producteurs primaires, est particulièrement efficace pour caractériser l'origine de la nourriture (terrestre/marine, benthique/pélagique) (Michener et Schell, 1994).

- Ligne de base isotopique des réseaux trophiques aquatiques

Le producteur primaire utilisé comme ligne de base des réseaux trophiques aquatiques est le plus souvent le phytoplancton, mais ce choix pose quelques difficultés pour les analyses isotopiques stables :

- lors des prélèvements, il est difficile d'isoler le phytoplancton ou les algues benthiques des autres particules (bactéries, ciliés, détritus, matière minérale) (Perga, 2004). Dans la plupart des études, la composition isotopique du phytoplancton, reflétant en fait celle de la matière organique particulaire en suspension (MOP), est donc particulièrement hétérogène (Del Giorgio et France, 1996; Grey et al., 2000).

- la composition isotopique des producteurs primaires varie rapidement sous l'effet de facteurs environnementaux (changements saisonniers de production primaire, apports en nutriments du bassin versant…) (Zohary et al., 1994; Post, 2002; Cole et al., 2004). Le temps de renouvellement isotopique, c'est à dire le délai nécessaire pour que la composition isotopique d'un organisme soit à l'équilibre avec celui de sa nourriture, dépend directement

du taux de renouvellement cellulaire de l'organisme et donc de la taille de l'organisme considéré (Cabana et Rasmussen, 1996). Il est de l'ordre de quelques jours pour le microplancton (Cabana et Rasmussen, 1996) à quelques mois pour le tissu musculaire des adultes de crustacés décapodes ou de poissons (Hesslein et al., 1991, 1993). La comparaison des compositions isotopiques relatives doit être réalisée dans la mesure du possible à des échelles d'intégration similaires (O'Reilly et Hecky, 2002).

L'utilisation d'organismes intégrateurs, tels que les consommateurs primaires, à longue durée de vie, à donc été proposée par différents auteurs pour l'étude de la structure des réseaux trophiques (Cabana et Rasmussen, 1996 ; Post et al., 2000 ; Post, 2002). Au sein des écosystèmes benthiques, les mollusques suspensivores sont utilisés comme des organismes intégrateurs de la signature phytoplanctonique (ligne de base pélagique) et les gastéropodes brouteurs ceux de la signature périphytique (ligne de base benthique) (Post, 2002).

3.3. Avantages et limites de la méthode des isotopes stables

Jusqu'à présent l'étude du régime alimentaire d'une espèce se faisait par des observations directes *in situ* ou au laboratoire, l'analyse des contenus stomacaux, ou l'utilisation de traceurs radioactifs (^{14}C ou ^{3}H). Cependant, ces trois méthodes présentent de nombreux inconvénients. L'analyse des contenus stomacaux nécessite une très bonne connaissance taxonomique des organismes et procure la composition spécifique du bol alimentaire d'un individu, c'est-à-dire la nourriture ingérée à un instant donné. Elle n'apporte donc des informations fiables que dans le cas d'espèces dont le régime alimentaire est stable ou si l'analyse est répétée de façon saisonnière (Grey et al., 2000). Les observations directes au laboratoire des relations proies/prédateurs peuvent introduire des artéfacts dus aux systèmes artificiels. Enfin, les techniques radioactives nécessitent une mise en œuvre particulièrement lourde pour des analyses en routine.

En se basant sur l'enrichissement moyen observé (1 ‰ pour le carbone et 3-4 ‰ pour l'azote), la comparaison des signatures isotopiques des sources potentielles de nourriture et des organismes permet de mieux comprendre la structure des réseaux trophiques. Outre l'avantage de caractériser la composition isotopique moyenne de la nourriture assimilée par un organisme, cette méthode nécessite des techniques d'échantillonnage et de préparation relativement simples, et les analyses sont rapides et peu coûteuses. Elle permet également l'étude d'organismes de niveaux trophiques très variés.

Cependant, des précautions sont à prendre quant à l'utilisation des isotopes stables, notamment dans le cas des réseaux trophiques côtiers où la grande diversité des sources de nourriture rend complexe l'interprétation des résultats. De plus, s'il a été prouvé que la nourriture est le premier déterminant de la composition isotopique globale d'un animal, il existe de nombreux autres facteurs de variabilité isotopique (Peterson, 1999) :

- la durée d'intégration du signal environnemental exerce une grande influence sur la composition isotopique des compartiments tissulaires d'un organisme. Cette durée dépend de l'activité métabolique de chaque tissu et de l'âge de l'organisme (Lorrain 2002 ; Lorrain et al., 2002). Les tissus avec un temps d'enregistrement long, comme le muscle, intègrent la signature isotopique alimentaire sur plusieurs mois. Les teneurs en isotopes des tissus avec un temps d'enregistrement court, comme les gonades ou l'hépatopancréas, reflètent le message alimentaire sur une période plus courte (de l'ordre de la semaine ou du mois).

- la composition biochimique des tissus influe également sur la composition isotopique d'un organisme. L'enrichissement trophique dépend des fractions alimentaires (protides, glucides, lipides) et des différentes voies de biosynthèse (Dufour et Gerdeaux, 2001). Ainsi, la composition en isotopes stables du carbone des protéines est proche de celle de la nourriture tandis que celle des lipides est significativement appauvrie en éléments lourds (De Niro et Epstein, 1977). Peu d'acides aminés étant synthétisés *de novo* dans les tissus du prédateur, ils proviennent essentiellement de la nourriture : leur composition isotopique est conservative. Au contraire, la majeure partie des lipides des tissus d'un organisme provient de nombreuses voies de néosynthèses, conduisant à leur appauvrissement en ^{13}C (De Niro et Epstein, 1977). La proximité de composition isotopique en carbone des tissus d'un prédateur et de ceux des proies dépend donc de leurs compositions biochimiques ; en particulier, les tissus les moins gras auront une composition isotopique proche de celle de la nourriture.

- enfin, l'analyse des isotopes stables ne fournit pas, par elle seule, des informations relatives aux relations directes prédateurs-proies, sauf dans des écosystèmes à faible biodiversité et à réseaux trophiques très simples (Kling et al., 1992).

4. Les contaminants organohalogénés

Les contaminants organohalogénés sont des dérivés organiques dans lesquels un ou plusieurs atomes d'hydrogène ont été remplacés par des atomes d'halogènes. Les

organohalogénés étudiés, tous issus de l'activité humaine, font partie de la « liste noire » des polluants halogénés classés comme Polluants Organiques Persistants (POP).

Les POP se caractérisent par leur toxicité, leur persistance dans l'environnement (faible biodégradabilité) et leur bioaccumulation dans les organismes, dû à leur caractère lipophile. Dans l'atmosphère, les POP peuvent être transportés sur de grandes distances sous forme de gaz volatils ou liés à des particules de poussières. Les émissions anthropiques, qu'elles proviennent de sources ponctuelles ou diffuses, sont associées à des procédés industriels, à l'utilisation et à l'application de pesticides ou de certains produits, à l'élimination de déchets, à des fuites et à des déversements, ainsi qu'à la combustion de produits pétroliers et de déchets. Les principales voies de transport vers le milieu marin côtier comprennent le transport à grande distance dans l'air ou les océans, le ruissellement de surface et les rejets de sources ponctuelles. Ils sont transportés dans l'eau, en général, liés à des particules organiques (sédiments et matières en suspension) ou fixés dans les tissus adipeux des organismes.

Au niveau réglementaire, le protocole d'Aarhus (juin 1998) et la convention de Stockholm (mai 2001), dont le but est de contrôler, réduire ou éliminer les émissions de ces substances dans l'environnement, ont établi une liste nominative de POP répartis en trois catégories :

- les substances produites non intentionnellement par des activités humaines (Dioxines/Furannes, Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques HAP, Hexachlorobenzène HCB, Hexachlorocyclohexane HCH).
- les substances issues de la fabrication et de l'utilisation de produits chimiques (Polychlorobiphényles PCB, HCB).
- les substances utilisées comme pesticides (HCB, Endrine, Aldrine, Dieldrine, Toxaphène, Mirex, Chlordane, Chlordécone, Heptachlore, Dichlorodiphényltrichloroéthane DDT, Hexabromobiphényle).

Parmi ces POP, on s'intéressera plus particulièrement au cours de cette étude aux dioxines et furannes (PCDD/F), aux polychlorobiphényles (PCB), ainsi qu'aux polybromodiphényles éthers (PBDE), composés présentant des propriétés physico-chimiques et des comportements dans l'environnement comparables à ceux des POP.

4.1. Les Dioxines

4.1.1. Structure chimique

Par le terme "dioxines", on désigne les polychlorodibenzo-*p*-dioxines (PCDD) et les polychlorodibenzofuranes (PCDF) qui sont des composés aromatiques tricycliques chlorés. Ces deux termes regroupent deux grandes familles, les PCDD et les PCDF qui, bien que distincts, sont très proches par leur structure moléculaire et leurs propriétés physico-chimiques.

- Les PCDD appartiennent au groupe de la dibenzo*[1,4]*dioxine ou dibenzo-*para*-dioxine (dibenzo-*p*-dioxine) dont la structure renferme deux atomes d'oxygène.

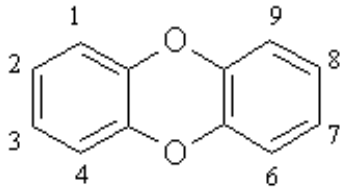

Figure 10 : Structure générale des PCDD (Polychlorodibenzo-*p*-dioxines).

- Les PCDF sont elles rattachées au dibenzo[*b*-*d*]furanne dont la structure ne comporte qu'un seul atome d'oxygène.

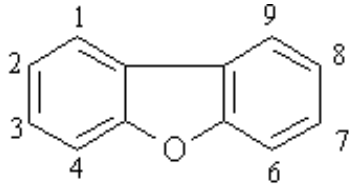

Figure 11 : Structure générale des PCDF (Polychlorodibenzofurannes).

Les positions numérotées des cycles aromatiques peuvent être occupées par des atomes d'hydrogène ou de chlore, ces derniers étant au maximum au nombre de huit. En fonction du nombre et de la position des atomes de chlore dans la structure de base, on dénombre 75 congénères théoriques de PCDD et 135 de PCDF (Tableau 6).

Tableau 6: Nomenclature des PCDD et PCDF.

Nombre de chlore	1	2	3	4	5	6	7	8
Préfixe	Mono (M)	Di (D)	Tri (Tr)	Tétra (T)	Penta (Pe)	Hexa (Hx)	Hepta (Hp)	Octa (O)
Nombre d'isomères PCDD	2	10	14	22	14	10	2	1
Nombre d'isomères PCDF	4	16	28	38	28	16	4	1

4.1.2. Synthèse et origine

Voies de synthèse des PCDD/F :

Contrairement à la plupart des contaminants chimiques organohalogénés, les PCDD/F sont des composés produits non intentionnellement. Ce sont des sous-produits indésirés formés à l'état de traces lors de processus de combustions naturelles et industrielles, et en particulier des procédés faisant intervenir de fortes températures (incinération, métallurgie…). Ils sont également formés lors de la synthèse chimique de dérivés aromatiques chlorés ainsi qu'au cours de processus biologiques et de réactions photochimiques naturels. Les PCDD/F sont produits majoritairement sur les cendres d'incinération lors du refroidissement des fumées. Ces cendres apportent tous les éléments essentiels à cette synthèse, structures carbonées résiduelles, chlore et catalyseurs. Cette voie de synthèse est nommée **synthèse « de novo »**. Elle est fortement dépendante de la présence de chlore inorganique dans le milieu réactionnel. L'acide chlorhydrique et les dérivés métallochlorés comme le chlorure cuivrique ($CuCl_2$) en sont les principales sources. Le cuivre est également l'un des catalyseurs les plus actifs des réactions d'halogénation des composés aromatiques. L'oxygène est, bien entendu, indispensable au processus de combustion des structures carbonées et à la synthèse des PCDD et des PCDF. La synthèse de novo est aujourd'hui reconnue comme étant la principale voie de production des PCDD/F

Cependant des PCDD/F peuvent également se former à partir de molécules organiques. Cette seconde voie de synthèse est appelée **« voie des précurseurs »**. Les PCDD et les PCDF se forment ici selon une réaction de condensation/cyclisation des précurseurs monocycliques. Les PCB génèrent principalement des furannes par combustion.

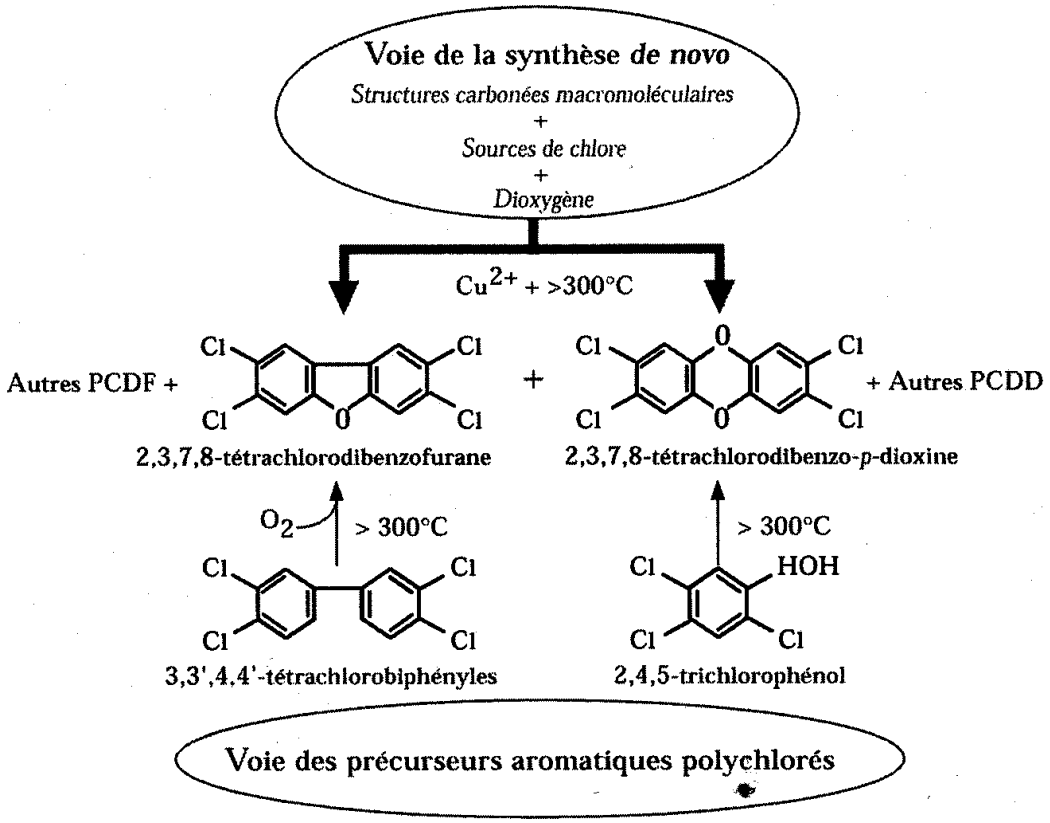

Figure 12 : Mécanismes de formation des PCDD et PCDF

Principaux réservoirs et sources d'émission de dioxines

Les principales émissions de PCDD/F sont le plus souvent diffuses et résultent essentiellement des activités humaines industrielles et domestiques. Les processus d'incinération des boues et des déchets (ménagers, hospitaliers, industriels), de combustion (charbon de bois, combustions accidentelles des PCB des transformateurs, cigarettes) ainsi que les rejets de certaines industries (sidérurgie, industries des métaux non ferreux, production de pâte à papier, de chlore et de polychlorure de vinyle) et gaz d'échappement de véhicules à moteur (diesel et essence) sont des sources d'émission de PCDD/F dans l'environnement. D'autres sources plus ponctuelles de PCDD/F et tristement célèbres, sont également à évoquer :

- Un accident très connu est celui survenu à Seveso (Milan) en Italie le 10 juillet 1976. L'usine produisait du 2,4,5-trichlorophénol. Une augmentation anormale de la température du réacteur chimique fut à l'origine de cet accident et se traduisit par la libération de 1 à 5 kg de 2,3,7,8-TCDD (dioxine de Seveso).

- Formation de dioxines lors de synthèses organiques de chlorophénols (produits utilisés pour la protection du bois) et de nombreux herbicides. La production de mélanges techniques PCB entraîne la formation de traces de PCDF (transformateurs, condensateurs)
- L'Agent Orange : Cet herbicide (mélange d'acides 2,4-dicholorophenoxyactétique et 2,4,5-trichlorophénoxy-acétique) a été largement utilisé par les Américains pendant la guerre du Vietnam (de 1962 à 1972) pour défolier les forêts et détruire les récoltes ennemies. Au total, 25000 tonnes de 2,4-D et 20000 tonnes de 2,4,5-T ont été répandues. Ces produits contenaient des impuretés dont environ 170 kg de 2,3,7,8-TCDD.

Dans les années soixante, l'émission de PCDD/F était principalement liée aux activités industrielles impliquant la synthèse de dérivés chlorés (pesticides, PCB, PCP...) et de chlorures de polyvinyle (PVC) ainsi que la fabrication de la pâte à papier. La production de PCDD/F résultant de ces activités a été fortement réduite à la suite de l'interdiction d'utiliser certains produits, ou par une amélioration des procédés technologiques.

A partir des années soixante-dix, la formation des dioxines au cours des processus de combustion a été mise en évidence. Les centrales thermiques (énergie électrique) ainsi que les fours et les chaudières (chauffage et procédés industriels) émettent des PCDD/F. Ils en produisent d'autant plus qu'ils utilisent des combustibles de substitution (recyclage, valorisation de déchets). La métallurgie et la sidérurgie sont les industries les plus concernées. Durant les vingt dernières années ce sont les incinérateurs de déchets ménagers ou industriels qui ont été les principaux émetteurs de PCDD/F. De nos jours, les technologies développées pour limiter le passage des PCDD et PCDF dans les fumées sont très efficaces. L'amélioration substantielle des procédés et une rationalisation des activités d'incinération en Europe ont récemment réduit cette source de production de PCDD/F.

La formation « naturelle » de dioxines fait encore l'objet de discussions. Les PCDD et PCDF ont été décelées dans des matériaux d'origine très ancienne comme des sédiments profonds lacustres (Czuckwa et Hites, 1986) ou océaniques (Hashimoto et al., 1995) et même dans des tissus prélevés au Chili sur des momies vieilles de 2800 ans (Ligun et al., 1989). Certains auteurs ont affirmé que les dioxines à l'état de traces sont produites dès lors qu'il y a combustion (éruptions volcaniques, feux de forêts), et qu'ainsi, leur présence d'origine humaine serait concomitante à la maîtrise et à l'utilisation du feu. Cependant, il est clairement établi par des mesures sur des échantillons de sols ou d'herbages de l'époque pré-industrielle que leurs niveaux de présence dans l'environnement se sont considérablement élevés avec l'industrialisation dès le 18ème siècle (Kjeller et al., 1991).

Les données obtenues en France montrent que les secteurs les plus exposés aux émissions de dioxines sont les usines d'incinération d'ordures ménagères ainsi que la sidérurgie-métallurgie (Tableau 7).

Tableau 7 : Distribution des émissions de dioxines en France (ADEME, 1996)

	Emissions totales (gTEQ/an)	Distribution (%)
Usines d'incinération d'ordures ménagères	400	43,1
Usines d'incinération de déchets industriels	2	0,2
Combustions industrielles (bois, charbon, fuel)	23	2,5
Sidérurgie-métallurgie	270-2300 *(500)*	53,9
Circulation routière	1-5	0,3

4.1.3. Propriétés physico-chimiques

Les caractéristiques physico-chimiques des PCDD/F sont étroitement liées au degré de chloration des structures aromatiques. Ce sont des composés peu volatils, peu solubles dans l'eau mais solubles dans les lipides. Cette lipophilie leur permet de traverser les membranes cellulaires et de s'accumuler dans les tissus gras de l'organisme.

Les PCDD/F ont une durée de vie de l'ordre de plusieurs décennies, voir de l'ordre du siècle. Elles sont stables jusqu'à 800°C et leur destruction n'est totale qu'à partir de 1300°C. Dans l'environnement, la photolyse est l'une des rares voies de dégradation de ces molécules, la plus importante étant la photodéchloration.

La stabilité biochimique est également très importante, en particulier pour les composés les plus chlorés. Néanmoins, plusieurs études menées sur la biodégradabilité de ces polluants environnementaux montrent que certains micro-organismes (bactéries, levures, champignons) sont capables de les métaboliser.

4.1.4. Toxicité

Mécanismes d'action

En matière de toxicité, les dioxines se caractérisent tout d'abord par une activité à très faible dose, ensuite par la grande variété de leurs effets toxiques, connus ou soupçonnés.

Dans chaque cellule de l'organisme, le noyau est protégé afin d'empêcher les molécules « étrangères » de pénétrer et d'interférer avec l'ADN (acide désoxyribonucléique). Dans le

cytoplasme cellulaire, la dioxine se lie à une molécule naturellement présente dans toutes les cellules, le récepteur intracellulaire Aryl hydrocarbone (Ah), ce complexe se liant lui-même à une protéine dite de "translocation". C'est ce complexe dioxine-récepteur Ah-Arnt qui va activer des zones de l'ADN nucléaire, entraînant la production d'ARN messagers codant pour des protéines diverses dans le cytoplasme cellulaire. Ces produits, secondairement induits par la présence de dioxine, vont entraîner une réponse toxique. La cellule peut s'intoxiquer ou intoxiquer ses voisines en fabriquant des protéines toxiques; elle émet des messages biochimiques anarchiques vers d'autres organes dont le fonctionnement et/ou le développement seront altérés. On parle alors de toxicité chronique, puisque l'action des dioxines est continue tout au long de la vie.

L'action des dioxines est donc indirecte. Selon la zone d'ADN activée, et le type de cellule atteinte, la réponse biochimique de l'organisme à une même substance peut être différente. Cette suite de réactions en cascade peut mener à une pathologie, une anomalie de développement ou tout autre effet sur la santé encore peu compris.

Exposition aiguë

La toxicité des différentes dioxines et furannes est très variable. Les 17 congénères toxiques comportent un minimum de quatre atomes de chlore occupant les positions 2,3,7,8. Le plus toxique est la 2,3,7,8 tetrachlorodibenzodioxine (TCDD ; l'agent toxique de Seveso), En cas d'intoxication accidentelle, le symptôme principal chez l'homme est la chloracné, une affection cutanée, et chez les animaux de laboratoire, le foie est l'organe généralement le plus atteint. Au Vietnam, après l'utilisation de l'agent orange, un défoliant contaminé à la dioxine, le lien a pu être fait entre la contamination par la dioxine des parents et la fréquence des malformations chez les enfants.

Exposition à long terme

Des essais menés sur des animaux laissent aujourd'hui supposer que les dioxines sont nocives pour le système immunitaire et le système nerveux, qu'elles ont des effets similaires aux effets hormonaux et qu'elles sont cancérogènes (IARC, 1997). Le Centre International de Recherche contre le Cancer (CIRC) a classé en 1997, la 2,3,7,8-TCDD dans le groupe des substances cancérigènes pour l'homme (groupe 1). Les autres formes de dioxines restent dans le groupe 3 (substances non classifiables en ce qui concerne leur cancérogénicité).

Unité d'expression

Les propriétés cumulatives et toxiques des dioxines sont étroitement dépendantes de leur structure chimique, c'est-à-dire du nombre et de la position des atomes de chlore des deux cycles benzéniques. Parmi les 210 congénères théoriquement présents dans l'environnement, les 17 composés substitués en position 2,3,7,8 (7 congénères PCDD et 10 congénères PCDF) font l'objet d'une bioaccumulation intense dans les organismes vivants où ils subissent une dégradation biologique lente, variable en fonction de la nature du congénère (plus rapide pour les PCDF que pour les PCDD).

En outre, ces 17 congénères possèdent une conformation stérique qui favorise leur fixation au récepteur Ah. L'affinité de ces 17 congénères pour ce récepteur est variable : elle est maximale pour la 2,3,7,8-TCDD et 10 à 10000 fois plus faible pour les congénères les plus chlorés (comme l'OCDD) dont l'encombrement stérique limite la fixation au récepteur. Ces 17 congénères sont considérés comme les plus toxiques. La toxicité diminue quand le nombre d'atomes de chlore croît (au-delà de 5 atomes de chlore, la toxicité chute brutalement). La potentialité toxique de ces congénères peut être exprimée en référence au composé le plus toxique, par l'intermédiaire de facteur d'équivalence toxique (ou de toxicité équivalente à la 2,3,7,8-TCDD) (TEF, Toxic Equivalent Factor). Celui-ci a été développé à partir de 1977 pour évaluer le potentiel toxique d'un mélange de composés chimiquement proches et ayant le même mécanisme d'action, c'est-à-dire actifs sur le même récepteur. Défini à partir de résultats in vitro modulés par les données in vivo, le TEF est réévalué fréquemment en fonction des acquis dans ce domaine. Ce concept a d'abord été appliqué aux PCDD/PCDF puis étendu à d'autres membres de la famille des hydrocarbures aromatiques polycycliques halogénés, dont les 12 PCB « dioxine-like » (cf Chapitre 2, paragraphe 4.2.4 ; Tableau 8). Pour les PCDD/PCDF et PCB « dioxine-like », le congénère de référence est la 2,3,7,8-TCDD qui a la plus forte affinité pour le récepteur intracellulaire Ah. Ainsi, le TEF se définit de la façon suivante :

$$TEF = \frac{\text{potentialité toxique d'un composé individuel}}{\text{potentialité toxique de la 2,3,7,8-TCDD}}$$

Tableau 8 : Facteurs d'équivalence de toxicité (TEF) des PCDD, PCDF et PCB « dioxine-like » (Van den Berg et al., 1998).

Congénères	TEF	Congénères	TEF
PCDD		**PCB non-ortho**	
2,3,7,8-TCDD	1	3,3',4,4'-TCB (CB77)	0,0001
1,2,3,7,8-PeCDD	1	3,3',4,5-TCB (CB81)	0,0001
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0,1	3,3',4,4',5-PeCB (CB126)	0,1
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0,1	3,3',4,4',5,5'-HxCB (CB169)	0,01
1,2,3,7,8,9-HxCDD	0,1	**PCB mono-ortho**	
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0,01	2,3,3',4,4'-PeCB (CB105)	0,0001
OCDD	0,0001	2,3,4,4',5-PeCB (CB114)	0,0005
PCDF		2,3',4,4',5-PeCB (CB118)	0,0001
2,3,7,8-TCDF	0,1	2',3,4,4',5-PeCB (CB123)	0,0001
1,2,3,7,8-PeCDF	0,05	2,3,3',4,4',5-HxCB (CB156)	0,0005
2,3,4,7,8-PeCDF	0,5	2,3,3',4,4',5'-HxCB (CB157)	0,0005
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0,1	2,3',4,4',5,5'-HxCB (CB167)	0,00001
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0,1	2,3,3',4,4',5,5'-HpCB (CB189)	0,0001
1,2,3,7,8,9-HxCDF	0,1		
2,3,4,6,7,8-HxCDF	0,1		
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0,01		
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0,01		
OCDF	0,0001		

Dans un échantillon, la concentration en 2,3,7,8-PCDD/F peut être convertie en une valeur d'équivalent toxique international (I-TEQ, International toxic equivalent quantity) égale à la somme des produits des concentrations mesurées pour chaque composé et du TEF correspondant.

$$TEQ = \Sigma (c_i \times TEF_i)$$

Ainsi, le TEQ correspond à la quantité de 2,3,7,8-TCDD nécessaire pour produire le même effet toxique que celui susceptible d'être induit par les congénères étudiés à la dose mesurée.

Depuis 1997, l'ensemble des 2,3,7,8-PCDD/F ainsi que les PCB « dioxine-like » sont pris en compte dans le calcul du TEQ d'un échantillon. Le TEQ ne prend pas en compte les autres PCB (non « dioxine-like ») qui sont pourtant les plus abondants, mais ne présentent pas ces mécanismes de toxicité.

4.1.5. Réglementation

Concernant les émissions de dioxines au niveau européen, la directive 2000/76/CE, portant sur l'incinération des déchets, fixe une valeur limite à l'émission pour les PCDD/F de 0,1 ngTEQ/Nm^3. Au niveau français, ces dispositions sont d'ores et déjà en vigueur pour les nouvelles usines d'incinération d'ordures ménagères (UIOM) et entreront en vigueur en décembre 2005 pour les UIOM existantes.

Concernant l'exposition de l'homme aux dioxines, il est admis que l'exposition moyenne des populations se fait à plus de 95 % par voie alimentaire, en particulier par ingestion de graisses animales (lait et produits laitiers, viandes, poissons). L'apport le plus important est dû aux produits d'origine bovine (lait et dérivés, viande et abats) (INSERM, 2000). Les poissons et produits aquatiques représentent des sources d'importance variable, dépendant de la répartition géographique et des habitudes alimentaires des populations.

Plusieurs études ont montré que la quantité totale de dioxines ingérées par voie alimentaire à l'âge adulte était d'environ 150 à 300 pg TEQ/jour entre 1980 et 1990, ce qui correspondait à une valeur médiane de 2,3 pg TEQ/kg de poids corporel/jour et une valeur maximale de 4 pg TEQ/kg/j.

Afin d'évaluer le risque d'exposition de l'homme aux dioxines, des normes correspondant à la Dose maximum Journalière Admissible (DJA) ont été établies. Une DJA représente la dose d'une substance que l'on peut ingérer quotidiennement pendant toute une vie, sans risque d'effets nuisibles. L'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) a établi en 1990 une DJA de 10 pg TEQ-dioxine par kilo de poids corporel. Cette norme est aujourd'hui fortement critiquée au regard des nouvelles données scientifiques. Elle a en effet été établie en se limitant principalement aux effets cancérigènes des dioxines, sans considérer les effets hormonaux par exemple, et sans tenir compte de la sensibilité particulière de l'embryon et du fœtus in utero. La toxicité des dioxines, notamment via la chaîne alimentaire, a amené l'OMS, le 3 juin 1998, à recommander une DJA de 1 à 4 pg I-TEQ/kg de poids corporel. En juin 2001, le comité expert de la FAO/OMS (Food and Agricultural Organization / Organisation Mondiale de la Santé) a spécifié la valeur de 70 pg par kg de poids corporel et par mois.

4.2. Les Polychlorobiphényles (PCB)

4.2.1. Structure chimique et synthèse

Le terme de PCB (Figure 13) désigne une famille de composés organochlorés de haut poids moléculaire de formule chimique $C_{12}H_{(10-n)}CL_n$, dans laquelle le nombre d'atomes de chlore (n) peut varier entre 1 et 10.

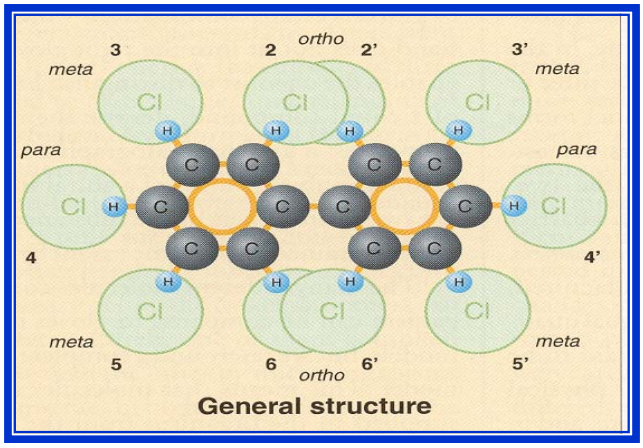

Figure 13 : Structure générale des PCB (Bernes, 1998).

Les polychlorobiphényles sont produits par chloration du biphényle (Figure 14). Ils sont fabriqués en deux étapes avec tout d'abord la synthèse du noyau biphényle par déshydrogénation de deux molécules de benzène à 800°C, puis la chloration progressive du noyau biphényle par apport de chlore sous forme de vapeur de chlore anhydre à une température de 150°C environ, en présence de catalyseurs spécifiques (chlorure ferrique ou limaille de fer).

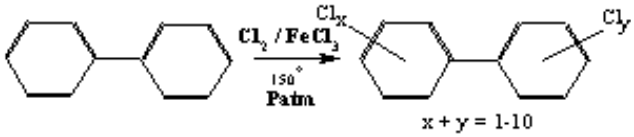

Figure 14 : Production des polychlorobiphényles par chloration catalysée du biphényle. Le nombre d'atomes de chlore peut varier de 1 à 10.

Au cours du processus de chloration, un à dix atomes de chlore vont donc pouvoir se substituer aux atomes d'hydrogène. Dix groupes d'isomères sont ainsi obtenus (Tableau 9). Cette réaction peut produire en théorie 209 congénères qui se distinguent par le nombre et la position des atomes de chlore fixés sur la molécule (chloro-homologues ou isomères de composition) (Figure 15). Ce sont des caractéristiques structurales qui déterminent les

propriétés physico-chimiques de chaque congénère de PCB (solubilité, pression de vapeur, coefficient de partage octanol-eau) ainsi que leur pouvoir toxique.

Tableau 9 : Nombre d'isomères possibles de PCBs

Substitutions chlorées	Nombre d'isomères
Mono-	3
Di-	12
Tri-	24
Tetra-	42
Penta-	46
Hexa-	42
Hepta-	24
Octa-	12
Nona-	3
Deca-	1

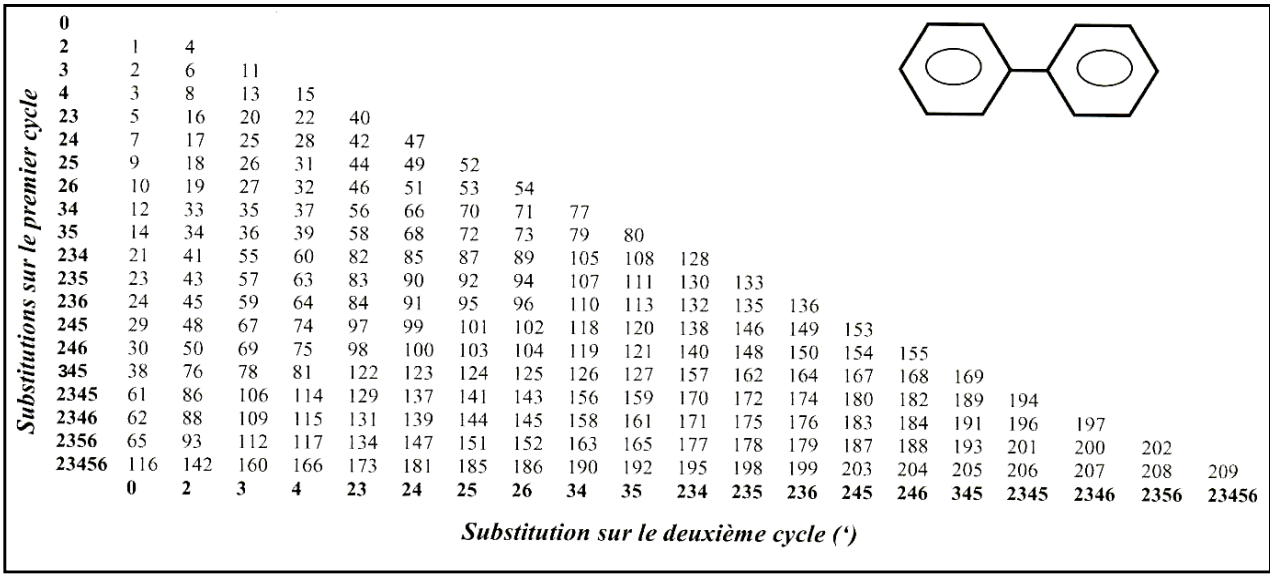

Figure 15 : Les 209 congénères de PCB désignés selon la nomenclature systématique (Ballschmiter et Zell, 1980)

Les PCB commerciaux sont des mélanges techniques de PCB, habituellement désignés par leur pourcentage en poids de chlore. Ils sont connus sous différents noms selon leur pays d'origine : Aroclor (Monsanto, Etats-Unis), Clophen (Bayer, Allemagne), Phénoclor ou Pyralène (Prodelec, France), Kaneclor (Kanegafuchi, Japon), Fenclor (Caffaro, Italie), Sovol (Caffaro, Russie), Pyroclor (Monsanto, Grande Bretagne) et Delor (Chemo, Tchécoslovaquie).

4.2.2. Propriétés physico-chimiques

Les propriétés physico-chimiques des PCB dépendent du degré de substitution par le chlore mais aussi par leur positionnement sur le biphényle. Ce sont des molécules très stables, non hydrolysables, qui ne réagissent pas avec les bases et les acides, et résistent à la chaleur (stabilité thermique jusqu'à 1300°C environ), à l'oxydation, et ne sont pas siccatifs. Ils ont de bons pouvoirs adhésifs et plastifiants, et leurs caractéristiques diélectriques sont excellentes. Enfin, ils ne sont pas solubles dans l'eau, mais ils le sont dans les solvants organiques (hydrocarbures, dérivés halogénés, alcools, esters, éthers) ainsi que les huiles végétales.

4.2.3. Utilisations

Les molécules de PCB sont d'origine anthropique uniquement. Elles ont été synthétisées pour la première fois en 1881, leur production industrielle commençant en 1929 aux Etats-Unis. La production mondiale cumulée est estimée entre 1,2 et 1,5 millions de tonnes depuis cette date (Tanabe et Tatsukawa 1986)

En raison de leurs caractéristiques, les mélanges techniques de PCB ont été utilisés dans le cadre d'une multitude d'applications, limitées aux systèmes clos à partir des années 70.

Les domaines d'application des PCB sont présentés ci-dessous en distinguant leur mode d'utilisation : systèmes fermés, partiellement fermés ou ouverts. Ces désignations se réfèrent à la facilité avec laquelle les PCB contenus dans un produit peuvent « s'échapper » dans l'environnement :

→ Les systèmes d'utilisation fermés sont ceux dans lesquels les huiles ou fluides chargés en PCB ne sont pas en contact avec l'environnement, les PCB pouvant difficilement s'en échapper.

- Transformateurs électriques
- Condensateurs électriques : dans les systèmes de distribution électrique, les ballasts pour l'éclairage, les condensateurs de démarrage (par exemple dans les réfrigérateurs, systèmes de séchage, la climatisation, les sèche-cheveux, etc), les condensateurs dans des équipements électroniques (y compris les postes de télévision et les fours micro-ondes)
- Moteurs électriques (utilisation mineure dans quelques moteurs utilisant le refroidissement par fluides)

→ Les systèmes d'utilisation partiellement fermés (Tableau 10) sont ceux dans lesquels les huiles PCB ne sont pas directement en contact avec l'environnement, mais sont susceptibles de le devenir périodiquement pendant leur utilisation normale. Ces types d'utilisation peuvent conduire à des émissions de PCB dans l'air ou dans l'eau.

Tableau 10 : Utilisation des PCB dans des systèmes partiellement fermés (UNEP, 1999).

Applications	**Lieux typiques**
Fluides caloporteurs	Composés inorganiques, produits organiques, plastiques et matériaux de synthèse, ainsi que les raffineries de pétrole
Liquides hydrauliques	Equipement pour les mines; industries de transformation de l'aluminium, du cuivre, de l'acier, et du fer
Pompes à vide	Usines de composants électroniques ; applications de laboratoires, de recherche et d'instrumentation ; les sites de décharge des eaux usées
Commutateurs[1]	Distribution électrique
Régulateurs de tension[1]	Distribution électrique
Câbles électriques avec liquide[1]	Distribution électrique, et équipements de génération privée (par exemple, installations militaires)
Disjoncteur à liquide[1]	Distribution électrique

[1] Au départ, ces applications n'étaient pas sensées contenir des PCB, mais elles ont par la suite pu avoir été contaminées lors d'opérations d'entretien et de service.

→ Les systèmes d'utilisation ouverts sont les applications dans lesquels les PCB ont un contact direct avec l'environnement et, de ce fait, peuvent être aisément transférés dans cet environnement :

- Lubrifiants : huiles d'immersion pour microscopes ; plaquettes de freins ; huiles de coupe ; huiles lubrifiantes
- Traitements de surface : peintures ; textiles ; papier autocopiant ; agents ignifuges ; contrôle de poussière (liants ; asphalte ; gazoducs de gaz naturel)
- Adhésifs
- Plastifiants : mastics pour joints d'étanchéité ; remplissage pour joints de béton ; PVC (polychlorure de vinyle) ; joints en caoutchouc
- Encres : teintures ; encres d'impression
- Autres applications : matériaux isolants ; pesticides (utilisation de déchets de liquide de transformateurs comme ingrédients dans des formulations de pesticides)

Le tableau 11 présente l'évolution des domaines principaux d'utilisation des PCB en France de 1973 à 1984. Les agents diélectriques, systèmes d'utilisation fermés, restent les principales applications des PCB.

Tableau 11 : Utilisations des PCB en France de 1973 à 1984 (chiffres exprimés en tonnes). Source : OCDE (1973, 1982).

	1973	1976	1981	1984
Agents diélectriques : - transformateurs	2940	2286	989	732
- condensateurs	1300	429	327	34
Fluides caloporteurs et hydrauliques	150	5	0	0
Huiles de lubrification et de coupe	222	0	0	0
Plastifiants	557	0	0	0
Autres usages	115	0	0	0
TOTAL	5284	2720	1316	766

4.2.4. Toxicité

Toxicité aigue :

La toxicité aiguë des PCB est faible pour l'homme : une exposition accidentelle de courte durée aux PCB n'a pas de conséquence grave. Les doses létales pour 50% des individus (DL50) sont de l'ordre du gramme par kilogramme de poids (Millischer, 1987). Une exposition aigue à forte dose est associée à des irritations de la peau (chloracné) et plus rarement des infections hépatiques, neurologiques, des bronchites chroniques, des maux de tête, des vertiges, des dépressions, des troubles de la mémoire et du sommeil, de la nervosité et de la fatigue, et de l'impuissance (Environnement Canada, 1985). Ces troubles sont, pour certains, réversibles. De tels effets ont notamment été observés lors de l'accident de Yusho (Japon) en 1968.

Toxicité chronique :

Les PCB peuvent être divisés en deux catégories qui ont des caractères toxiques différents : les composés « coplanaires » présentant au maximum un atome de chlore en position ortho, et les composés « globulaires » possédant au minimum deux atomes de chlores en position ortho. L'étude des relations structure / activité (Boon et al., 1989) suggère que les composés coplanaires, dits PCB « dioxine-like » (PCB-DL) sont capables d'adopter une configuration plane et de se comporter de la même manière que le composé hautement toxique 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD). Ils présentent notamment une certaine affinité pour le

récepteur Ah et induisent des effets toxiques comparables à ceux de la dioxine (cf Chapitre 2, paragraphe 4.1.4).

Figure 16 : Structures voisines des dioxines et des PCB « dioxine-like ».

Les congénères globulaires n'ont pas d'affinité pour le récepteur Ah mais se lient au récepteur CAR (Constitutive Androstane Receptor) impliqué dans l'induction du cytochrome P450 2B. Ces congénères peuvent avoir une affinité relative pour les mêmes récepteurs ou cibles que les congénères PCB-DL (à l'exception du récepteur Ah). Ils présentent néanmoins une certaine spécificité d'action, en particulier comme promoteurs de cancérogenèse et comme inducteurs d'effets neurotoxiques et neurocomportementaux (Ahlborg et al., 1994).

4.2.5. Réglementation

En Europe, l'utilisation des PCB dans les applications ouvertes telles que les encres d'imprimerie et les adhésifs a été interdite en 1979. La vente et l'acquisition de PCB ou d'appareils contenant des PCB ainsi que la mise sur le marché de tels appareils neufs sont interdites en France depuis le décret du 2 février 1987.

Le décret du 18 janvier 2001 (suite à la directive 96/99/CE) concernant l'élimination des PCB prévoit leur destruction de manière contrôlée par des entreprises agréées, d'ici 2010.

La voie d'exposition de l'homme aux PCB est à 90% d'origine alimentaire (Pompa et al., 2003). Pour cette raison et surtout pour le caractère toxique de ces composés, différentes normes ont été adoptées.

En 1998, l'OMS a inclus les PCB "dioxine-like" (CB77, 81, 105, 114, 118, 123, 126, 156, 157, 167, 169 et 189) dans la DJA concernant les dioxines et furannes fixée à 1-4 pg TEQ/kg p.c./j. En 2001, le JECFA (the FAO/WHO Joint Committee on Food Additives) a fixé une dose mensuelle admissible provisoire (DMAP) pour les dioxines et furanes et les PCB "dioxine-like" à 70 pg TEQ OMS /kg p.c./mois (soit une DJA de 2,33 pg TEQ/kg p.c./j). Enfin, en mai 2001, le Comité scientifique européen pour l'alimentation humaine a adopté un

avis dans lequel il fixait une dose hebdomadaire tolérable provisoire (DHTP) de 14 pg TEQ/kg p.c./sem pour les dioxines et furannes et les PCB "dioxine-like".

En 2002, l'OMS a proposé de fixer une DJA pour l'ensemble des PCB à 0,02 µg/kg p.c./j en équivalent Aroclor 1254, fondée sur des études chez le singe basé sur les effets neurocomportementaux et immunologiques. L'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA, 2003) a proposé une DJA de 0,01 µg/kg p.c./j pour la somme des 7 PCB indicateurs (CB 28, 52, 101, 118, 138, 153 ET 180), considérant que dans les aliments ces composés représentent au moins 50% des PCB totaux.

4.3. Les Polybromodiphényles éthers (PBDE)

4.3.1. Structure chimique et synthèse

Le terme de PBDE (Figure 17) désigne une famille de composés organohalogénés de haut poids moléculaire de formule chimique $C_{12}H_{(10-n)}Br_nO$, dans laquelle le nombre d'atomes de brome (n) peut varier entre 1 et 10. La numérotation des atomes de brome est la même que celle des PCB et les congénères sont identifiés selon le même système.

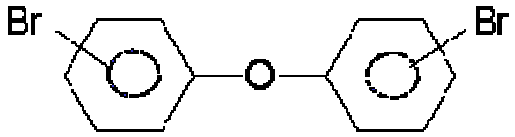

Figure 17 : Structure générale des PBDE.

Les polybromodiphényles éthers sont produits par bromation des diphénylethers en présence d'un catalyseur (Sellström, 1996). Dix groupes d'isomères sont ainsi obtenus (Tableau 12), soit en théorie 209 congénères, qui se distinguent par le nombre et la position d'atomes de brome fixés sur la molécule. Ce sont des caractéristiques structurales qui déterminent les propriétés physico-chimiques de chaque congénère de PBDE (solubilité, pression de vapeur, coefficient de partage octanol-eau) ainsi que leur pouvoir toxique.

Tableau 12 : Nombre d'isomères possibles de PBDE

Substitutions bromées	Nombre d'isomères
Mono-	3
Di-	12
Tri-	24
Tetra-	42
Penta-	46
Hexa-	42
Hepta-	24
Octa-	12
Nona-	3
Deca-	1

Les PBDE ne se retrouvent pas naturellement dans l'environnement; ils sont généralement synthétisés sous la forme de mélanges, appelés pentabromodiphényléther commercial (ComPeBDE, qui sont surtout des mélanges de Tetra-, Penta- et Hexa-BDE), octabromodiphényléther commercial (ComOcBDE, qui contient principalement de l'Hepta-, Octa- et Hexa-BDE et d'éventuelles faibles quantités de Penta-, Nona- et Deca-BDE) et décabromodiphényléther commercial (ComDeBDE, dont les préparations actuelles contiennent presque entièrement du Deca-BDE et une faible quantité de Nona-BDE) (PISSC, 1994). Ces familles sont les plus communément produites ; en 1999, elles représentaient respectivement 6%, 12% et 82% de la production globale.

4.3.2. Utilisations

Les PBDE sont utilisés comme retardateurs de flamme (BFR), et comme produits ignifugeants. Le domaine d'application des retardateurs de flamme bromés (BFR) est aujourd'hui extrêmement large et varié :

→ Transport (voitures, bus, avions) : parties électriques et électroniques, revêtements textiles comme les housses de sièges

→ Construction : polystyrène, polyuréthane, peinture, mastic, éclairages, plastique utilisé pour l'isolation des tuyaux, isolation des toits

→ Industrie : dans divers produits de la chimie, fibres synthétiques, polymères, résines, colles, mousse de polyuréthane pour les meubles et les garnitures intérieures

→ Textiles : textiles de toute sorte, tapis, meubles tels que canapés, matelas,…

→ Equipements électroniques : boîtiers et circuits imprimés d'ordinateurs, de télévisions, de chaînes HI-FI, de téléphones, de sèche-cheveux

Le DeBDE commercial est surtout utilisé dans le polystyrène résistant aux chocs faisant partie des boîtiers de l'équipement électronique, c'est également le seul PBDE commercial utilisé comme produit ignifuge dans les textiles servant au rembourrage. L'OcBDE commercial est principalement utilisé dans l'acrylonitrile-butadiène-styrène comme produit ignifuge dans l'enveloppe de l'équipement de bureau. Le PeBDE commercial est utilisé presque exclusivement dans la mousse souple de polyuréthane qui sert de capitonnage dans les meubles rembourrés (Wenning, 2002).

Dans les années 1990, la production annuelle de retardateurs de flamme était estimée à 600000 tonnes, dont un quart attribuable aux BFR (150000 tonnes) (Manchester-Neesvig et al., 2001). Près d'un tiers des BFR correspondent à des PBDE (50000 tonnes). Ces produits sont majoritairement recherchés en Amérique du Nord (40%), en Orient (30%), et en Europe (25%). Huit industries fournissent le marché mondial des PBDE ; elles sont situées en France, en Grande Bretagne, en Israël, au Japon, aux Pays-Bas, et aux Etats-Unis.

4.3.3. Propriétés physico-chimiques

Les PBDE sont des molécules très stables, non hydrolysables. Ils présentent notamment une grande résistance aux acides et aux bases, à la lumière, et aux réactions d'oxydoréduction.

Lorsque les PBDE sont soumis à la chaleur, ils sont susceptibles d'engendrer la formation de composés tels que les polybromodibenzofurans (PBDF) et de polybromodibenzodioxines (PBDD), dont la structure est proche de celle des polychlorodibenzodioxines (PCDD) et des polychlorodibenzofurannes (PCDF) réputés toxiques et potentiellement cancérigènes (Bieniek et al., 1989) (Figure 18).

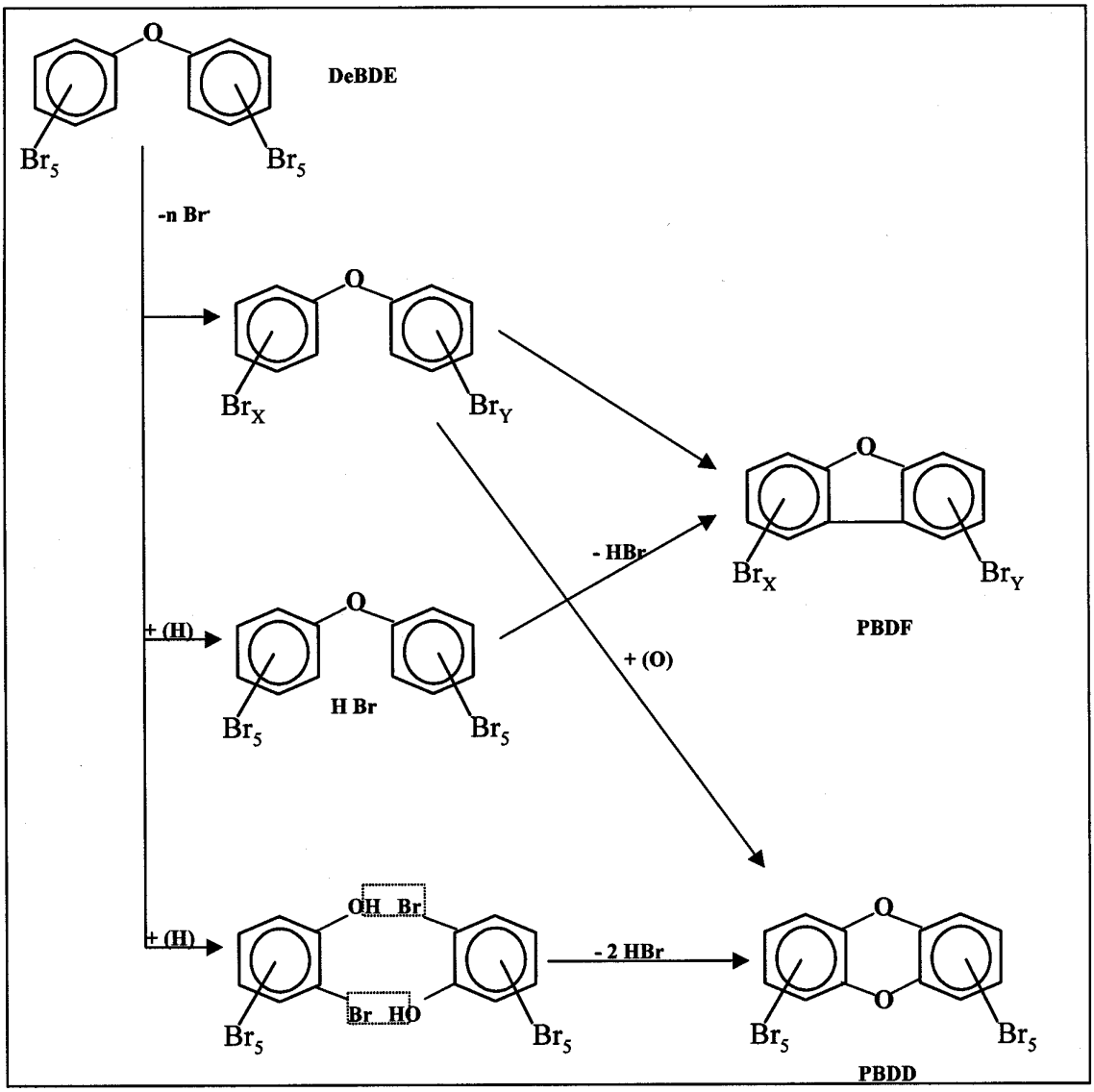

Figure 18 : Mécanisme de formation de polybromodibenzofurannes (PBDF) et de polybromodibenzodioxines (PBDD) à partir du DecaBromo DiphenylEther (Bieniek et al., 1989).

4.3.4. Toxicité

Toxicité aigue :

Comme pour les PCB, la toxicité aiguë des PBDE, en particulier des mélanges ComPeBDE, ComOcBDE et ComDeBDE, est faible pour l'homme : les doses létales pour 50% des individus (DL50) sont supérieures à 1 gramme par kilogramme de poids corporel (De Boer et al., 2000).

Toxicité chronique :

En raison de leur similitude chimique avec les dioxines et les PCB, un large et croissant effort de recherche est réalisé concernant les aspects toxiques et la présence de PBDE dans l'environnement. Contrairement aux dioxines et aux PCB, les PBDE ne sont pas de forts inducteurs de l'activité « aryl hydrocarbon hydroxylase receptor » (Manchester-Neesvig, 2001). Ils ont cependant des conséquences sérieuses sur la santé tels que des effets au niveau des fonctions hépatiques, thyroïdiennes et oestrogéniques, ils sont également susceptibles de générer des perturbations au niveau du développement neuronal (De Boer et al., 2000). Ces substances sont, par ailleurs, reconnues comme étant d'importants perturbateurs endocriniens (De Boer et al., 2000).

4.3.5. Réglementation

Les importantes concentrations en PBDE mesurées dans les organismes et les tissus humains, ainsi que les risques toxiques que représentent ces substances pour l'homme, ont amené plusieurs gouvernements et entreprises à limiter l'utilisation et la production de ces produits. Dès le début des années 1990, l'Europe a commencé à réduire de façon volontaire l'usage de PBDE. Depuis 2004, deux des trois formes commerciales de PBDE (penta- et octa-BDE) sont bannies par l'Union européenne.

Comme dans le cas des PCB et des dioxines, la voie principale d'exposition de l'homme à ces contaminants est l'alimentation (Domingo, 2004). Cependant, aucune norme n'existe encore en Europe quant aux doses maximales admissibles pour les populations. Au Canada, une norme a été établie pour le PentaBDE, basée sur les effets neurocomportementaux observés chez des souris nouvellement nées : la dose maximale admissible pour l'homme est de 0,8 $mg.kg^{-1}$ de poids corporel par jour

4.4. Bioconcentration / bioaccumulation / bioamplification des contaminants organohalogénés

Différents termes sont employés pour désigner les processus qui définissent le devenir des contaminants dans les différents compartiments de l'environnement (physique ou biologique) :

- la bioconcentration est définie comme le processus par lequel une substance se trouve présente dans un organisme vivant à une concentration supérieure à celle de son milieu

aquatique environnant. Le facteur de bioconcentration (FBC) est défini par le rapport de la concentration d'une substance à l'intérieur d'un organisme à sa concentration dans l'eau, compte tenu seulement de l'absorption provenant du milieu ambiant (Veith et al., 1979; Ramade, 1992).

- la bioaccumulation est le processus par lequel un organisme vivant absorbe une substance à une vitesse plus grande que celle avec laquelle il l'excrète ou la métabolise. Elle désigne donc la somme des absorptions d'une substance à partir de l'eau et de l'alimentation (Ramade, 1992).
- la bioamplification correspond au processus selon lequel la concentration d'un composé chimique dans un organisme est supérieure à celle de la proie qu'il consomme (Gobas et Morrison, 2000). Le facteur de bioamplification (FBA) peut être défini comme une constante issue du rapport de la concentration d'une substance dans le prédateur sur la concentration dans la proie.

En général, la contamination d'une espèce résulte de l'équilibre entre l'assimilation et l'élimination d'une substance chimique. Le processus de transfert représente le flux de contaminants entre les différents compartiments abiotiques et biotiques. L'accumulation représente la quantité stockée dans chacun des compartiments. La bioaccumulation est donc le résultat des processus par lesquels le contaminant entre dans l'organisme, et les processus de décontamination ou élimination de cette substance (excrétion, biotransformation) (Ribeyre et Boudou, 1989).

En milieu aquatique, la capacité d'une substance à pouvoir être bioconcentrée par les organismes peut être appréhendée à partir du coefficient de partage octanol-eau (Kow) ce qui correspond au rapport entre la concentration d'une substance dans l'octanol et sa concentration dans l'eau. Il fournit une estimation de l'affinité d'une substance pour la matière organique (lipides des organismes vivants par exemple).

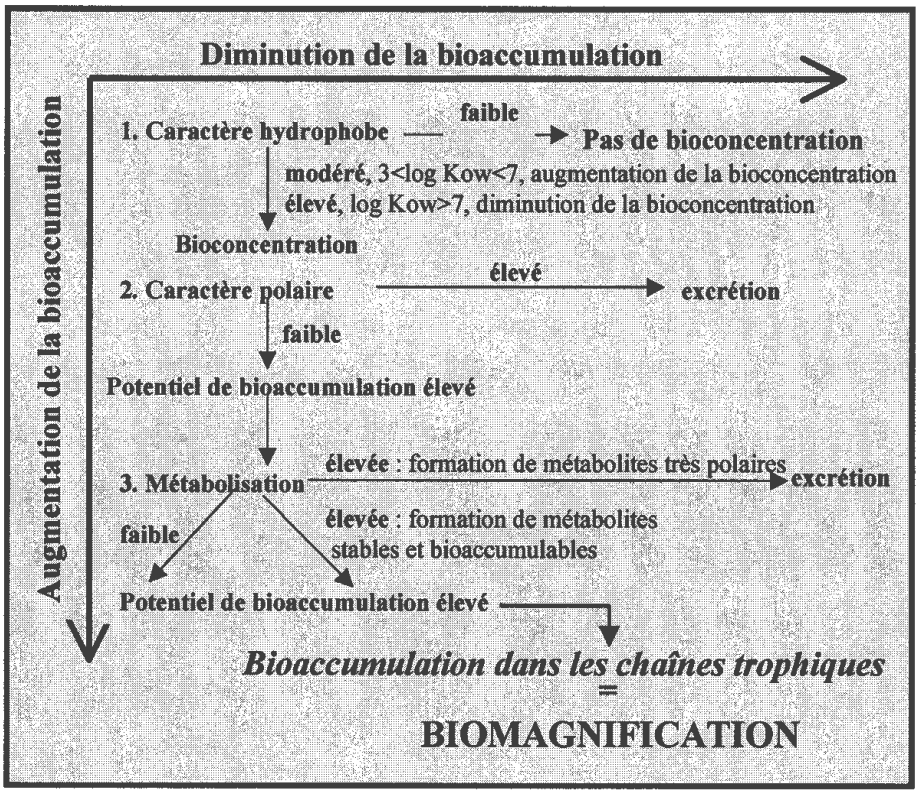

Figure 19 : Propriétés physico-chimiques des contaminants agissant sur leur bioaccumulation (Norstrom et Letcher, 1996).

Dans l'environnement marin, l'intégration des contaminants au cycle de la matière vivante se fait par adsorption des substances dissoutes aux matières en suspension, inertes ou planctoniques (Harding, 1986). Ce processus, phénomène de surface, est d'autant plus important que les particules sont de taille réduite (Brown et al., 1982). L'adsorption dépend également de la nature des particules, de leur teneur en matière organique et en lipides. Enfin, l'adsorption augmente avec le caractère hydrophobes des composés (coefficient octanol-eau élevé (logKow>3). La bioconcentration dépend donc des caractéristiques physico-chimiques des contaminants. Les organismes vont absorber ces particules et les composés les plus hydrophobes seront stockés dans des tissus riches en lipides où ils auront tendance à s'accumuler en raison de leur caractère persistant. Si les contaminants sont lentement métabolisés, ils vont également pouvoir s'accumuler à chaque niveau de transfert entre proie et prédateur. Les grandes fonctions biologiques, comme la respiration, l'alimentation, la croissance et la reproduction peuvent influer sur la contamination et l'élimination des contaminants organohalogénés des organismes.

Chapitre II : Matériel et méthodes

Ce chapitre traite du protocole d'échantillonnage des crustacés et autres organismes marins ainsi que des différentes techniques analytiques employées tout au long de ce travail.

1. Protocole d'échantillonnage

1.1. Contamination des crustacés décapodes exploités par les composés organohalogénés (Articles 1 et 2)

L'objectif de cette première partie était d'étudier les niveaux et empreintes de contamination par les PCB, dioxines, et PBDE chez différents crustacés décapodes (araignée de mer, tourteau, étrille et langoustine). Cinq zones, correspondant à des ports de débarquement de crustacés, ont été sélectionnées pour cette étude (Figure 20) : Antifer (1), localisé en Baie de Seine (Haute-Normandie), Granville (2) dans le Golfe Normano-Breton (Ouest Contentin), Roscoff (3) en Manche Armoricaine (Nord Bretagne), Le Conquet (4) en Mer d'Iroise (Ouest Bretagne), et Le Guilvinec (5) dans le Golfe de Gascogne (Sud Bretagne). Pour chaque station, les crustacés ont été obtenus auprès de pêcheurs professionnels en février 2003. Le récapitulatif des prélèvements est présenté dans le tableau 13.

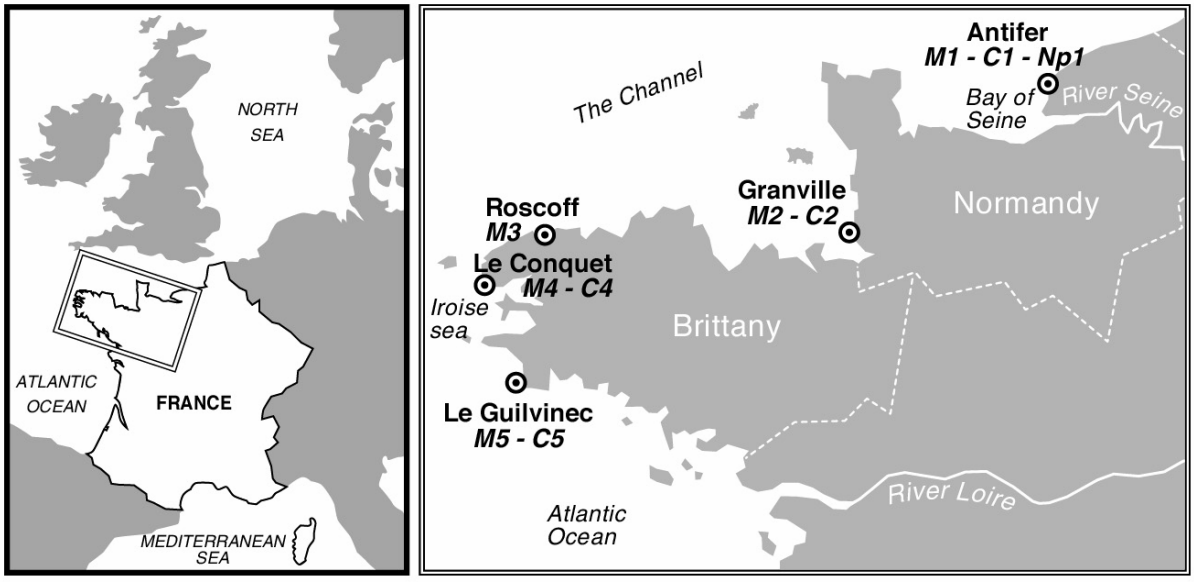

Figure 20 : Carte des stations de prélèvements. M = *Maja brachydactyla* ; C= *Cancer pagurus* ; Np = *Necora puber* ; Nn = *Nephrops norvegicus*.

Tableau 13 : Récapitulatif des échantillons de crustacés prélevés par site (♂ = individus mâles ; ♀ = individus femelles).

	Antifer (49°49'10N; 00°04'03W)	Granville (48°55'22N; 1°52'47W)	Roscoff (48°46'N; 4°03'W)	Le Conquet (48°04'04N; 4°57'59W)	Le Guilvinec (47°35'N; 4°11'W)
Araignée de mer	4 ♂ + 4 ♀	3 ♂ + 3 ♀	3 ♂ + 3 ♀	10 ♂ + 10 ♀	3 ♂ + 3 ♀
Tourteau	3 ♂ + 3 ♀	3 ♂ + 3 ♀	×	5 ♂ + 1 ♀	3 ♂ + 3 ♀
Etrille	1 pool ♂ (n=10) 1 pool ♀ (n=10)	×	×	×	×
Langoustine	×	×	×	×	1 pool ♂ (n=20) 1 pool ♀ (n=30)

Les dissections des crustacés ont été réalisées au débarquement dès l'obtention des échantillons. L'hépatopancréas, le muscle et les gonades ont été prélevés sur chaque individu (excepté dans le cas des langoustines où seul le muscle de l'abdomen a été analysé), et conservés à -20°C dans des piluliers en verre (grillés et tarés). Les analyses de dioxines, PCB (marqueurs et dioxine-like) et PBDE ont été réalisées par le laboratoire d'analyse de traces CARSO (cf Chapitre 3, paragraphe 4.2) sur des pools de muscle uniquement. D'autres congénères de PCB (16 PCB) ont été analysés au laboratoire DCN-BE-CO (Ifremer Brest) en distinguant les principaux organes (muscle, hépatopancréas, gonades) ; ces analyses, nécessitant moins de matière, ont pu être réalisées sur chaque individu. Le tableau récapitulatif des analyses effectuées est présenté ci dessous (tableau 14).

Tableau 14 : Récapitulation des analyses réalisées (p = pool).

	Araignée	Tourteau	Etrille	Langoustine
Dioxines, PCB et PBDE	muscle (5×p)	muscle (4×p)	muscle (1×p)	muscle (1×p)
PCB	muscle (n=36) gonades (n=36) hépatopancréas (n=36)	muscle (n=28) gonades (n=28) hépatopancréas (n=28)	muscle (2×p) gonades (2×p) hépatopancréas (2×p)	muscle (1×p)

1.2. Influence de facteurs ontogéniques sur la contamination en PCB et les signatures isotopiques du carbone et de l'azote chez l'araignée de mer (Articles 3 et 4)

La bioaccumulation des PCB et les signatures isotopiques du carbone et de l'azote sont influencées par différents facteurs physiologiques et écologiques (croissance, reproduction, migration). Afin d'appréhender ces processus, ces paramètres ont été suivis pendant deux ans

(2003-2004) sur deux populations d'araignées de mer, l'une prélevée à Antifer (Baie de Seine) et l'autre en Mer d'Iroise (Figure 21).

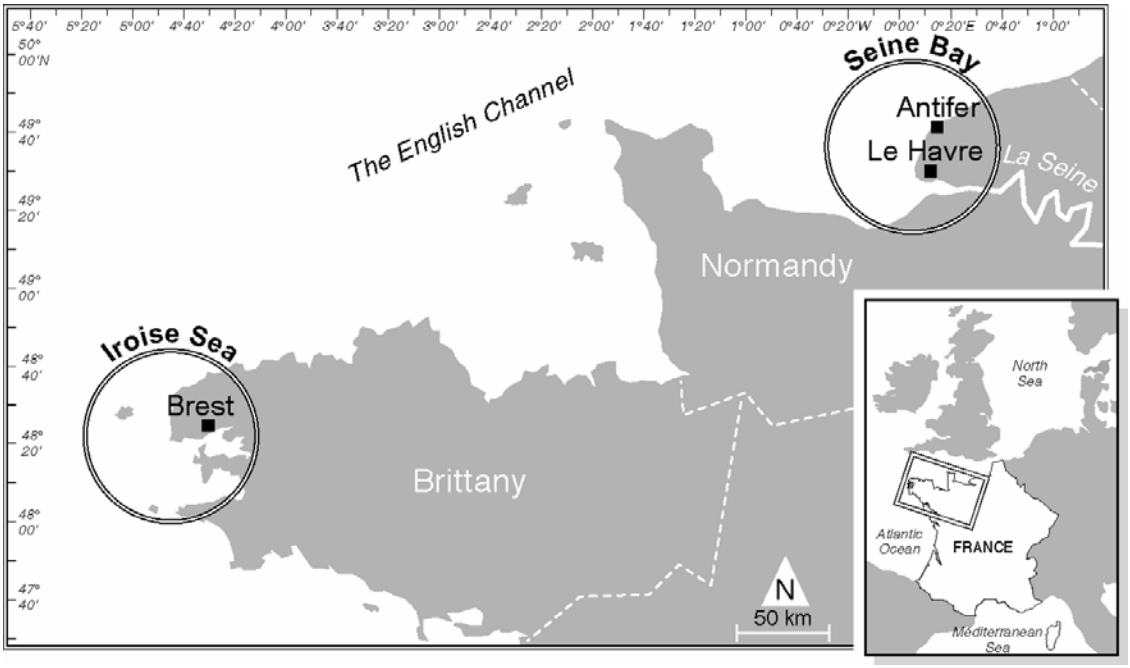

Figure 21 : Zones d'échantillonnage des deux populations d'araignées de mer étudiées.

1.2.1. Description des populations de *Maja brachydactyla*

- *Maja brachydactyla* en Mer d'Iroise

Au cours des deux premières années de leur vie, correspondant à la phase juvénile, les araignées se cantonnent dans des « petits fonds » par 5 à 15 mètres de profondeur à proximité de la côte. En Mer d'Iroise, l'anse de Bertheaume (AB, Figure 22) abritée des plus fortes houles d'ouest et sud-ouest est l'un de ces secteurs qualifiés de nourricerie. Un herbier de *Zostera marina* s'y développe sur quelques hectares et constitue la zone centrale de cette nourricerie. Les juvéniles de première et deuxième années y passent l'hiver à demi enfouis dans le sable au milieu des rhizomes. Au cours du printemps, les mues se succèdent et les individus se déplacent alors vers les substrats mixtes de sables et roches.

Après leur mue terminale, les nouveaux adultes (2-3 ans) rejoignent les secteurs occupés par les adultes plus âgés revenus à la côte pour la ponte. Le Rocher du Corbin (RC, Figure 22) est un de ces sites côtiers où les adultes de *Maja brachydactyla* se rencontrent au printemps-été par des profondeurs de 10 à 15 mètres. Secteur peu abrité, il est caractérisé par des substrats rocheux, et par un peuplement riche avec une abondante faune endogée de polychètes et de sipunculiens notamment ; une épifaune composée de nombreuses espèces

carnivores (crabes, étoiles de mer..) y trouve une nourriture abondante et facile d'accès. Cette zone est également caractérisée par de vastes champs de macrophytes telle les laminaires.

En automne-hiver les araignées adultes migrent vers les eaux du large et les échantillons nécessaires à cette étude ont été prélevés près de l'île de Sein (ZL, Figure 22). Au cours de cette migration les araignées traversent les fonds sédimentaires et espèces associées très diversifiés de la Mer d'Iroise. D'abord une large bande de graviers sableux hétérogènes qui par 30 à 60 mètres fait le lien avec le vaste plateau rocheux prolongeant à l'ouest la Presqu'île de Crozon ; la roche y est dépourvue de macroalgues, la faune fixée est abondante, et les crustacés suspensivores (*Pisidia longicornis*) et carnivores ainsi que les oursins herbivores sont les groupes d'invertébrés mobiles dominants. Enfin, les araignées vont passer l'hiver sur des fonds d'environ 60 mètres au nord ouest du plateau rocheux de l'île de Sein où les sédiments caractéristiques sont les graviers propres et les graviers biogènes. Sur ces fonds une épifaune sessile fixée sur les plus gros graviers et débris coquilliers se surimpose à la faune de l'interface et à l'endofaune riche en bivalves. La chaussée rocheuse de Sein semble être la limite Sud de l'espace migratoire de cette population. Ainsi au cours d'un trajet entre la nurserie à la côte et la zone d'hivernage au large, les araignées vont rencontrer au moins six biotopes différents avec, évidemment, des proies différentes. Les espèces mais également les groupes trophiques de ces proies vont ainsi varier au cours des saisons et plus largement de la vie des individus de la population de la Mer d'Iroise.

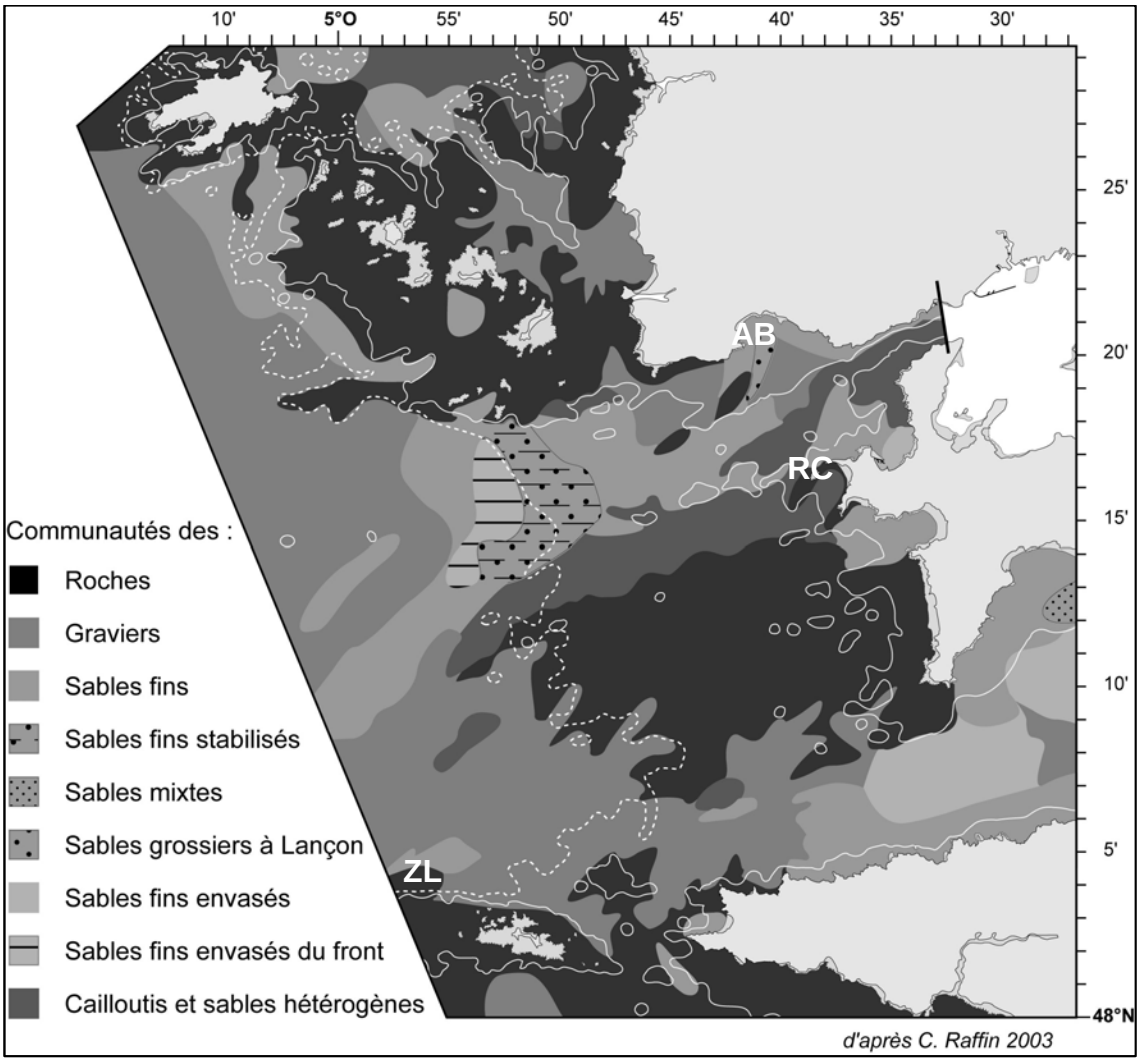

Figure 22 : Faciès sédimentaire et communautés benthiques associées en Mer d'Iroise (Raffin, 2003). AB = Anse de Bertheaume, nourricerie des araignées de mer juvéniles ; RC = Rocher du Corbin correspondant à la zone côtière des adultes ; ZL = zone au large des adultes.

- *Maja brachydactyla* en Baie de Seine

En Baie de Seine, la population d'araignée se situe plus particulièrement dans la partie orientale, au Nord-Ouest de la côte joignant le Cap de la Hève au Cap d'Antifer. La phase juvénile s'y effectue à la côte sur des fonds de moins de 10 mètres, principalement dans le Nord immédiat du terminal pétrolier d'Antifer (ZCJ, Figure 23). Les fonds biosédimentaires de ce secteur ont été décrits par Gentil (1976). Les éléments ci-dessous sont adaptés de la carte actualisée publiée par Gentil et Cabioch (1997). Il s'agit de sédiments fins sableux envasés auxquels est associée une macrofaune benthique dont l'espèce leader est le petit bivalve *Abra alba*. Le reste de la communauté est composé essentiellement par une faune

endogée de polychètes tubicoles et errantes (*Nephthys hombergii*), d'échinodermes (*Echinocardium cordatum, Acrochnida brachiata*), de bivalves et de crustacés, espèces qui sont des proies potentielles pour les araignées.

Dès que les fonds atteignent 20 mètres, les sédiments deviennent légèrement plus hétérogènes mais restent sous influence pélitique, le flux de particules fines issues de l'Estuaire de la Seine restant encore très fort. Cependant, à la hauteur d'Antifer, il s'agit plutôt d'une étroite bande de transition de peu d'importance nutritionnelle pour l'araignée en cours de migration. En effet très rapidement le sédiment change radicalement, devenant très grossier, à la fois vers le large au Nord Ouest et le long de la côte au Nord Est. Il s'agit d'une communauté de cailloutis et graviers, unité biosédimentaire majeure qui occupe la plus grande partie des fonds de la Manche centrale, au Nord du Cotentin. C'est dans cet ensemble que la population d'araignées adultes va séjourner aussi bien pendant sa phase côtière (ZCA, profondeur 10-20 mètres), que celle au large (ZLA, profondeur 30-40 mètres). L'espèce dominante, accessible également aux araignées est l'échinoderme *Ophiothrix fragilis*, et des petits crustacés comme *Pisidia longicornis*. Des gastéropodes constituent une fraction importante de l'épifaune mobile (*Gibbula tumida, Buccinum undatum*), mais l'épifaune sessile est également diversifiée. Une large bande de graviers plus ou moins ensablés s'étend à l'Ouest de ces cailloutis. L'ophiure *Ophiothrix fragilis* y est toujours dominante, le reste du peuplement présentant une forte affinité avec la communauté des cailloutis plus ou moins graveleux.

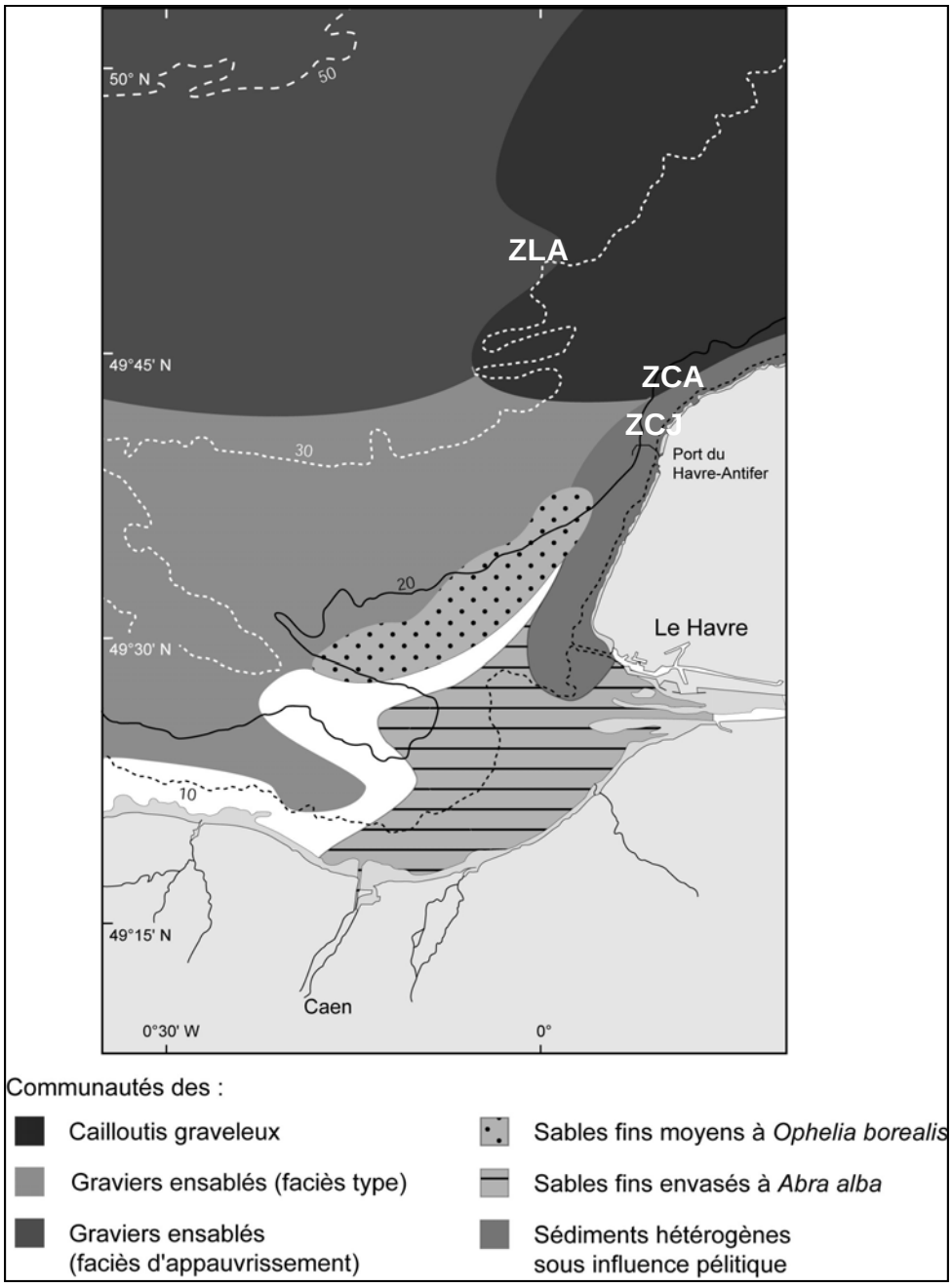

Figure 23 : Faciès sédimentaire et communautés benthiques associées en Baie de Seine (Gentil et Cabioch, 1997). ZCJ = zone côtière des araignées de mer juvéniles, correspondant à la nourricerie ; ZCA = zone côtière des adultes ; ZLA = zone au large des adultes.

1.2.2. Stratégie d'échantillonnage

Au printemps-été 2003 et 2004, des araignées juvéniles mâles et femelles ont été prélevées tous les mois en Mer d'Iroise et en Baie de Seine. Concernant les individus adultes, des échantillonnages ont été réalisés régulièrement à fois au large et à la côte pour les deux secteurs géographiques (Tableaux 15 et 16)

Tableau 15 : Récapitulation des prélèvements réalisés en Mer d'Iroise en 2003 et 2004 (♂ = individu mâle ; ♀ = individu femelle) : AB = Anse de Bertheaume ; RC = Rocher du Corbin ; ZL = zone au large)

	Mois de prélèvement	Nombre d'individus	Type de prélèvement
Individus juvéniles	Mars (AB)	13 ♂ + 10 ♀	Plongée scaphandrier
	Avril (AB)	3 ♂ + 5 ♀	Plongée scaphandrier
	Mai (AB)	10 ♂ + 9 ♀	Plongée scaphandrier
	Juin (AB)	14 ♂ + 12 ♀	Plongée scaphandrier
	Juillet (AB)	7 ♂ + 12 ♀	Plongée scaphandrier
	Septembre (AB)	2 ♂ + 5 ♀	Plongée scaphandrier
Individus adultes	Février (ZL)	15 ♂ + 13 ♀	Pêche au casier/filet
	Avril (RC)	10 ♂ + 12 ♀	Plongée scaphandrier
	Juin (RC)	8 ♂ + 14 ♀	Plongée scaphandrier
	Août (RC)	10 ♀	Plongée scaphandrier
	Décembre (ZL)	7 ♂ + 3 ♀	Pêche au casier/filet

Tableau 16 : Récapitulation des prélèvements réalisés en Baie de Seine en 2003-2004 (♂ = individu mâle ; ♀ = individu femelle). (ZCJ = zone côtière des araignées de mer juvéniles, correspondant à la nourricerie ; ZCA = zone côtière des adultes ; ZLA = zone au large des adultes).

	Mois de prélèvement	Nombre d'individus	Type de prélèvement
Individus juvéniles	Mai (ZCJ)	5 ♂ + 6 ♀	Plongée scaphandrier
	Juin (ZCJ)	5 ♂ + 2 ♀	Plongée scaphandrier
	Juillet (ZCJ)	2 ♂ + 1 ♀	Plongée scaphandrier
	Août (ZCJ)	5 ♂ + 7 ♀	Plongée scaphandrier
	Septembre (ZCJ)	4 ♂ + 5 ♀	Pêche au casier/filet
Individus adultes	Mars (ZLA)	6 ♂ + 6 ♀	Pêche au casier/filet
	Avril (ZCA)	4 ♂ + 4 ♀	Plongée scaphandrier
	Mai (ZCA)	4 ♂ + 7 ♀	Plongée scaphandrier
	Juin (ZCA)	3 ♂ + 11 ♀	Plongée scaphandrier
	Juillet (ZCA)	1 ♂ + 4 ♀	Plongée scaphandrier
	Août (ZCA)	6 ♂ + 2 ♀	Plongée scaphandrier
	Novembre (ZLA)	5 ♂ + 7 ♀	Pêche au casier/filet

Pour chaque individu, le sexe, l'âge, la taille (Lc en cm), le poids frais (en g) ainsi que le stade de maturité ont été déterminés. L'hépatopancréas, le muscle, les gonades (individus femelles adultes uniquement) ont été systématiquement prélevés et stockés à -20°C dans des piluliers en verre (grillés/tarés) avant analyses. L'analyse de 16 congénères de PCB a été réalisée sur le muscle, l'hépatopancréas et les gonades (femelles) de chaque individu (laboratoire DCN-BE-CO, Ifremer centre de Brest). Des mesures isotopiques ont été faites sur

le muscle, l'hépatopancréas et les gonades de certains individus (laboratoire Scottish Crop, Ecosse).

1.3. Le réseau trophique de l'araignée de mer *Maja brachydactyla* (Article 6)

L'objectif de cette partie était d'étudier le devenir des PCB dans le réseau trophique complexe qui aboutit à l'araignée de mer. Les proies potentielles de *Maja brachydactyla* établies sur la base des travaux publiés de divers auteurs (cf Chapitre 1, paragraphe 1.1.7) ont été échantillonnées en mars-avril 2004 sur les sites de Baie de Seine et de Mer d'Iroise (Tableau 17). Des analyses d'isotopes stables du carbone et de l'azote ont été réalisées sur chacune d'entre elles. Seules les espèces dont les signatures isotopiques confirmaient leur appartenance au régime alimentaire de *Maja brachydactyla* et dont la quantité de matière était suffisante, ont été analysées en PCB.

Concernant les crabes verts (*Carcinus maenas*) et les étrilles (*Necora puber*), le muscle a pu être disséqué. Les autres organismes (polychètes, mollusques, échinodermes et certains crustacés) ont été préalablement mis dans de l'eau de mer filtrée oxygénée pendant 6 h afin de permettre l'épuration de leur tube digestif. Les tissus mous des mollusques et des bernard-l'ermite (excepté l'abdomen) ont été disséqués. Pour les organismes de petite taille comme certains crustacés (amphipodes, crevettes, isopodes), les polychètes, les échinodermes et les mollusques, les analyses des PCB et des isotopes stables du carbone et de l'azote ont porté sur les individus entiers. Enfin, les échantillons d'algues et de phanérogames ont été préalablement rincés, afin d'éliminer les épibiontes.

Tableau 17. Description de l'échantillonnage : nom, mode de nutrition et effectif des proies potentielles de l'araignée de mer prélevées en Baie de Seine (Antifer) et en Mer d'Iroise (Corbin = zone côtière de prélèvements des adultes ; Bertheaume = nourricerie)

Espèce	Mode de nutrition	Baie de Seine (Antifer)	Mer d'Iroise	
			Corbin	Bertheaume
sediment -OM		2		4
Algue-Phanérogame				
Laminaria digitata		4	5	
Corallina officinalis		3	4	
Zostera marina				4
Polychète				
Glycera rouxii	carnivore			4
Nephtys hombergii	carnivore	5		3
Notomastus latericeus	déposivore		2	4
Owenia fusiformis	déposivore	3		
Bivalve				
Chamelea striatula	suspensivore			5
Clausinella fasciata	suspensivore		2	
Dosinia exoleta	suspensivore	1	5	
Glycymeris glycymeris	suspensivore		4	
Mytilus edulis	suspensivore	8	10	3
Spisula solida	suspensivore	2		
Tellina tenuis	déposivore		1	5
Gastéropode				
Gibbula umbilicalis	brouteur	10		6
Hinia reticulata	nécrophage	9	3	10
Patella vulgata	brouteur	9	6	
Echinoderme				
Asterias rubens	carnivore	4	5	4
Echinocardium cordatum	déposivore	5		5
Echinus esculentus	brouteur		2	
Marthasterias glacialis	carnivore		5	
Ophiotrix fragilis	suspensivore		4	
Ophiura textura	carnivore		8	
Crustacé				
Balanus sp.	suspensivore	8	4	
Carcinus maenas	carnivore	2		
Corystes cassivelaunus	carnivore	3		
Liocarcinus holsatus	carnivore			1
Macropodia deflexa	carnivore			5
Necora puber	carnivore	1		1
Pagurus bernhardus	carnivore	5	6	5
Pisidia longicornis	suspensivore		5	

2. Préparation des échantillons avant analyses des contaminants et des isotopes stables du carbone et de l'azote

2.1. Lyophilisation

La lyophilisation permet l'élimination de l'eau présente dans les échantillons par processus de sublimation sous vide. Ce procédé a été réalisé à l'aide d'un lyophilisateur pendant 24 à 72 h en fonction de la masse de l'échantillon. Le pourcentage en eau de chaque espèce a été évalué : on désigne par TF le tissu frais et TS le tissu sec, la teneur en eau (W %) est donnée par la formule :

$$W = 100 \times [1\text{-poids (TS)/poids (TF)}]$$

2.2. Broyage et homogénéisation

Chaque matrice a ensuite été broyée afin d'obtenir une poudre fine et homogène, et stockée à l'abri de la lumière et de l'humidité. Pour l'analyse des isotopes stables, les échantillons ont été broyés encore plus finement à l'aide d'un broyeur à bille.

3. Protocole d'analyse des isotopes stables du carbone et de l'azote

3.1. Prétraitements

Les mesures des rapports isotopiques sont réalisées par spectrométrie de masse de rapport isotopique à flux continu (IRMS). Un prétraitement à l'acide chlorhydrique 10 % a été effectué sur l'ensemble des échantillons, excepté le muscle de certains crustacés (araignée de mer, crabe vert et étrille) avant l'analyse isotopique, afin d'éliminer les traces de carbone inorganique pouvant fausser le résultat du $\delta^{13}C$.

Les isotopes stables du carbone et de l'azote pouvant être influencés par la teneur en lipides de l'échantillon (cf Chapitre 2, paragraphe 3.3.), une étude a été menée sur l'effet de la délipidation de différents tissus d'araignée de mer sur les $\delta^{13}C$ et $\delta^{15}N$ (Article 3). Pour cela, des échantillons de muscle, gonades et hépatopancréas ont été analysés avant et après

l'extraction au Soxtec de la matière lipidique (matière extractible à l'hexane-acétone) (cf Chapitre 3, paragraphe 4.2.1.).

3.2. Analyse par spectrométrie de masse isotopique couplée à un analyseur élémentaire (IRMS-EA)

Principe :

Les rapports des isotopes stables sont mesurés à l'aide d'un spectromètre de masse isotopique à flux continu couplée à un analyseur élémentaire C, N (Lajtha et Michener 1994; Peterson, 1999). Ce procédé permet de mesurer le rapport des isotopes lourds sur les isotopes légers de l'azote et du carbone dans un échantillon et les compare à un étalon de composition connue.

Un aliquote d'environ un milligramme de chaque échantillon a été pesé, puis placé dans une capsule en étain (3 x 5 mm). Un analyseur élémentaire C, N réalise automatiquement la combustion des échantillons biologiques à haute température sous atmosphère oxydante, et les produits gazeux de cette combustion (CO_2 et N_2) sont séparés par chromatographie en phase gazeuse. Ils sont ensuite ionisés dans le spectromètre de masse isotopique. Les ions ainsi séparés sont collectés, générant un signal électrique dépendant de la quantité d'ions dans chaque collecteur (Ghashghaie et al., 2001). Les rapports isotopiques des échantillons sont ensuite exprimés en termes de déviation (δ) en ‰ par rapport à l'étalon de valeur théorique (cf Chapitre 2, paragraphe 3.1.) :

Détermination du niveau trophique par mesure du $\delta^{15}N$:

La détermination du niveau trophique (TL) des organismes par la mesure du $\delta^{15}N$ repose sur les mécanismes de fractionnement isotopique et ses conséquences sur les rapports isotopiques entre les aliments et leurs consommateurs (Minagawa et Wada, 1984). En se basant sur un taux d'enrichissement moyen en $\delta^{15}N$ entre les proies et leurs prédateurs, le niveau trophique d'un organisme peut être calculé par la formule suivante (Hobson et Welch, 1992):

$$TL = \lambda + (\delta^{15}N \text{ organisme n} - \delta^{15}N \text{ organisme ligne de base})/X$$

où λ est le niveau trophique du matériel biologique utilisé comme ligne de base et X représente le taux moyen d'enrichissement par niveau trophique dans le réseau trophique considéré.

4. Protocole d'analyse des contaminants organohalogénés

D'une manière générale, l'analyse des contaminants organiques dans les différentes matrices se fait selon un protocole incluant plusieurs étapes : l'extraction des composés recherchés dans l'échantillon, la purification de l'extrait et finalement la détermination instrumentale. L'analyse des contaminants organochlorés est réalisée selon un protocole simplifié dérivé du protocole établi et validé au laboratoire (Jaouen-Madoulet et al., 2000) Toute la verrerie utilisée est au préalable passée au four à 450°C pendant 12 heures de façon à éliminer toutes traces de matière organique susceptible de perturber le bon déroulement du protocole ou de fausser les résultats. L'analyse est réalisée sur du matériel sec et finement broyé (cf Chapitre 3, paragraphe 2).

4.1. Analyse des PCB par chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à capture d'électrons (GC-ECD)

4.1.1. Protocole expérimental

Seize congénères de PCB ont été analysés, il s'agit des composés : CB28, 52, 101, 105, 110, 118, 128, 132, 138, 149, 153, 156, 170, 180, 187, et 194. Parmi ces congénères de PCB qui constituent ceux systématiquement suivis au laboratoire (DCN-BE-CO, Ifremer Brest), on retrouve les 7 composés marqueurs de contamination par les PCB auxquels ont été ajoutés deux composés de type dioxine-like (CB105 et 156). D'autres congénères ont été mesurés parce qu'ils peuvent apporter des éléments d'information sur le comportement des PCB dans l'environnement marin littoral (CB110, 132 et 149 composés partiellement biotransformés par certains organismes vivants ; CB170, 187, et 194, composés persistants).

La figure 24 résume par un schéma les différentes étapes du protocole pour la détermination et la quantification de ces composés.

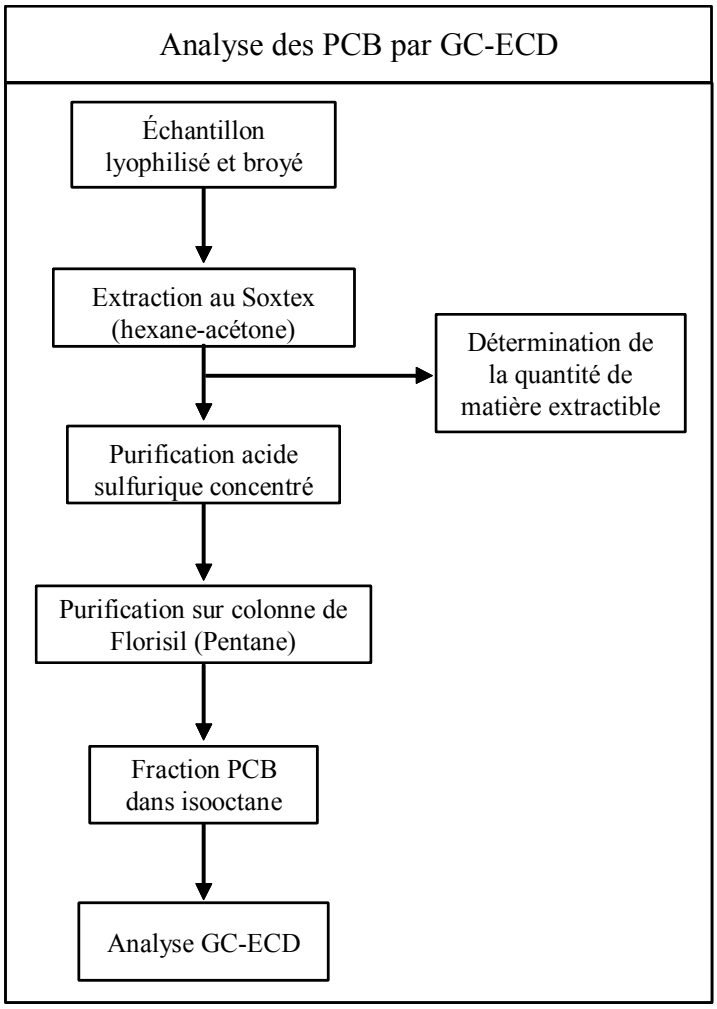

Figure 24 : Protocole d'analyse des PCB par GC-ECD

Extraction des contaminants

L'extraction des composés hydrophobes a été réalisée à l'aide d'un appareil Soxtec, selon une méthode dérivée de la méthode Soxhlet (cf Chapitre 3, paragraphe 4.2). Il permet l'extraction en continu de six échantillons, préalablement lyophilisés, par un mélange de solvants à chaud (hexane/acétone = 40 :10, v/v) dans des cartouches en cellulose. L'extraction est réalisée sur une prise d'essais de 0,5 à 2,5 g de poids sec selon le matériel à analyser et comprend deux étapes :

- une étape d'extraction pendant laquelle les cartouches de cellulose contenant le lyophilisat sont plongées dans le mélange de solvant en ébullition pendant deux heures,

- une étape de rinçage à reflux pendant une heure.

L'extrait organique ainsi obtenu est évaporé à sec, puis pesé de manière à déterminer la quantité de matière extractible à l'« hexane-acétone », et finalement repris dans 5 ml d'hexane.

Purification des extraits

L'étape de purification a pour but d'éliminer tout le matériel co-extrait autres que les contaminants recherchés, celui-ci pouvant interférer lors de l'analyse instrumentale finale (contamination des colonnes chromatographiques, problèmes de co-élution avec les contaminants organiques étudiés, saturation du détecteur). Deux étapes successives de purification ont été utilisées pour l'analyse des PCB :

1/ Elimination du matériel co-extrait par hydrolyse à l'acide sulfurique concentré : Cette méthode est adaptée et efficace dans le cas de composés chimiquement stables tels que les PCB (Kannan et al., 1993, Wells et Echarri 1994). Pour cela, 2 ml de H_2SO_4 concentré sont ajoutés à l'extrait. Après agitation au vortex, l'émulsion obtenue est laissée à décanter pendant au minimum 12 heures à l'abri de la lumière. Le surnageant organique (S1) contenant les composés hydrophobes (PCB) est récupéré. Une seconde extraction du culot (phase aqueuse) est réalisée par 3 ml d'hexane. Après agitation au vortex, l'émulsion est centrifugée pendant 1 heure à 3000 $tr.min^{-1}$, le surnageant récupéré (S2) est combiné avec l'extrait précédent (S1). Cet extrait est ensuite évaporé à sec, puis repris par 500 µl d'hexane.

2/ Purification par chromatographie d'adsorption sur colonne : Cette étape permet d'éliminer les composés polaires restants, et les traces d'eau. La purification est réalisée sur des colonnes de Florisil (co-précipité de Magnésie et de Silice: 16% MgO + 84% SiO_2 ; Taille 60/100 mesh soit 0,15/0,25 cm). Des colonnes chromatographiques en verre (hauteur 16 cm ; diamètre 3 mm) contenant 2,35 g de Florisil, activé à 400°C pendant une nuit puis désactivé par 3% d'eau, sont ensuite lavées avec 25 ml de pentane. Sur chaque colonne, on dépose 500 µl d'échantillon élué avec 20 ml de pentane. Le solvant est récupéré dans un ballon puis évaporé à sec sous jet d'azote. L'extrait purifié est repris dans 500 µl d'une solution contenant de l'isooctane ainsi qu'un étalon interne, le tétrachloronaphtalène (TCN), puis transvasé dans un flacon de 2 ml adapté au passeur automatique d'échantillons du chromatographe.

Analyse des PCB par chromatographie en phase gazeuse

La quantification des PCB dans un échantillon a été réalisée par chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à capture d'électrons (GC-ECD). Les caractéristiques et conditions opératoires du chromatographe sont présentées dans le tableau 18.

Tableau 18 : Caractéristiques et conditions opératoires du chromatographe.

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

4.1.2. Validation et qualification du protocole

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

Blanc :

Parallèlement à l'analyse des échantillons réels, des blancs analytiques ont été systématiquement mesurés tous les 12 échantillons. L'ensemble de ces vérifications n'a pas mis en évidence de problème de contamination au cours du protocole susceptible d'entacher la mesure des contaminants recherchés.

Justesse :

La fiabilité de l'étape de purification a été validée à l'aide d'un échantillon certifié d'huile de foie de morue (CRM349 ; Bureau Communautaire de Référence Commission Européenne). Les concentrations en PCB obtenues ont été comparées aux valeurs certifiées (Tableau 19). Les taux de récupération varient entre 77 et 115%, excepté pour le composé CB105 probablement dû à un problème de co-élution avec un autre composé lors de l'analyse. Le protocole utilisé lors de cette étude permet donc l'obtention de résultats en accord avec les valeurs de référence certifiées et les données complémentaires publiées (Schantz et al., 1993).

Tableau 19 : Comparaison des concentrations mesurées et certifiées, et taux de récupération des PCB dans le CRM349. (ET = écart-type ; CV = coefficient de variation ; Taux de récupération = moyenne expérimentale / valeur certifiée × 100).

	Valeurs certifiées	ET	CV	Moyenne expérimentale (n=6)	ET	CV	Taux de récupération
	($ng.g^{-1}$)	($ng.g^{-1}$)	(%)	($ng.g^{-1}$)	($ng.g^{-1}$)	(%)	(%)
CB28	68	7	10,3	54,6	10,1	18,5	80,3
CB52	149	20	13,4	116,0	16,4	14,2	77,8
CB101	370	17	4,6	300,5	13,5	4,5	81,2
CB110	175[a]			157,6	18,9	12,0	87,6
CB149	284[a]	55	19,4	228,0	12,5	6,0	80,3
CB118	454	31	6,8	412,9	15,5	3,8	91,0
CB153	938	49	5,2	990,7	66,5	6,7	105,6
CB132				65,5	11,2	17,1	
CB105	51[a]			109,3	21,2	19,4	218,6
CB138	765[a]	74	9,7	881,9	52,5	6,0	115,3
CB187	276[a]	14	5,1	222,9	12,5	5,6	80,8
CB128	104[a]	9	8,7	90,2	8,0	8,8	86,8
CB156	40[a]			39,0	6,3	16,2	97,6
CB180	280	22	7,9	243,5	13,3	5,5	87,0
CB170	149[a]	15	10,1	137,8	11,2	8,1	92,5
CB194				26,7	3,1	11,5	

[a] Concentrations non certifiées

Précision :

La répétabilité de la méthode a été testée en dosant les PCB dans 6 réplicats (prises d'essais de 1g) d'un échantillon d'araignée prélevé en Mer d'Iroise. Les résultats obtenus montrent une reproductibilité satisfaisante de la méthode pour l'ensemble des congénères (tableau 20), les coefficients de variation oscillant entre 4 et 13%. Le congénère CB28 était systématiquement en-dessous de la limite de détection (0,3 $pg.\mu l^{-1}$).

Tableau 20 : Test de reproductibilité sur un échantillon d'hépatopancréas d'araignée de Mer d'Iroise (n=6). (ET = écart-type ; CV = coefficient de variation).

	Ech1 ($ng.g^{-1}$)	Ech2 ($ng.g^{-1}$)	Ech3 ($ng.g^{-1}$)	Ech4 ($ng.g^{-1}$)	Ech5 ($ng.g^{-1}$)	Ech6 ($ng.g^{-1}$)	Moyenne ($ng.g^{-1}$)	ET ($ng.g^{-1}$)	CV (%)
CB52	5,1	5,1	4,6	4,1	4,3	5,0	4,7	0,4	9
CB101	0,4	0,3	0,5	0,4	0,3	0,4	0,4	0,0	13
CB110	0,3	0,2	0,3	0,2	0,2	0,2	0,2	0,0	13
CB149	0,9	0,9	0,8	0,8	0,8	1,0	0,9	0,1	7
CB118	5,4	4,9	5,4	4,5	5,6	6,0	5,3	0,5	10
CB153	30,2	31,4	31,7	29,0	31,1	32,0	30,9	1,1	4
CB132	0,8	0,6	0,8	0,8	0,7	0,8	0,7	0,1	10
CB105	1,8	1,3	1,6	1,6	1,6	1,7	1,6	0,2	11
CB138	10,5	10,0	9,8	8,8	10,2	11,5	10,1	0,9	9
CB187	6,0	6,0	5,8	5,8	5,9	6,5	6,0	0,3	4
CB128	0,9	1,1	1,0	0,8	0,9	1,0	0,9	0,1	9
CB156	1,1	1,2	1,1	1,0	1,1	1,2	1,1	0,1	6
CB180	8,1	8,5	8,2	7,5	8,2	9,1	8,3	0,5	6
CB170	3,9	4,4	4,6	4,5	4,1	4,9	4,4	0,4	8
CB194	2,3	2,6	2,5	2,9	2,3	2,7	2,5	0,2	9

4.2. Analyse des dioxines, PCB et PBDE par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse (GC-MS)

Les analyses ont été réalisées par le laboratoire d'analyse de traces CARSO à Lyon. Ce laboratoire est agréé par le ministère de l'Environnement pour le contrôle des eaux naturelles, eaux de rejets industriels ou urbains (polluants organiques et métaux dans les eaux et sédiments).

Dix-huit congénères de PCB ont été analysés, à savoir les sept composés indicateurs (PCB-M) actuellement mesurés dans les programmes de surveillance (PCB 28, 52, 101, 118, 138, 153 et 180), ainsi que les 12 PCB dioxine-like (PCB-DL) (PCB 77, 81, 105, 114, 118, 123, 126, 156, 157, 167, 169 et 189). Concernant les PCDD/F, les concentrations de chacun des dix-sept congénères substitués en position 2,3,7,8 ont été déterminées. Enfin, treize PBDE, sélectionnés en fonction de leur forte présence dans l'environnement et leur toxicité, ont également été analysés (PBDE 17, 28, 47, 66, 71, 85, 99, 100, 138, 153, 154, 183 et 190). Toutes les analyses ont été réalisées selon la méthode de dilution isotopique, dont les différentes étapes du protocole sont décrites sur la figure suivante (US EPA Method 1613, 1994).

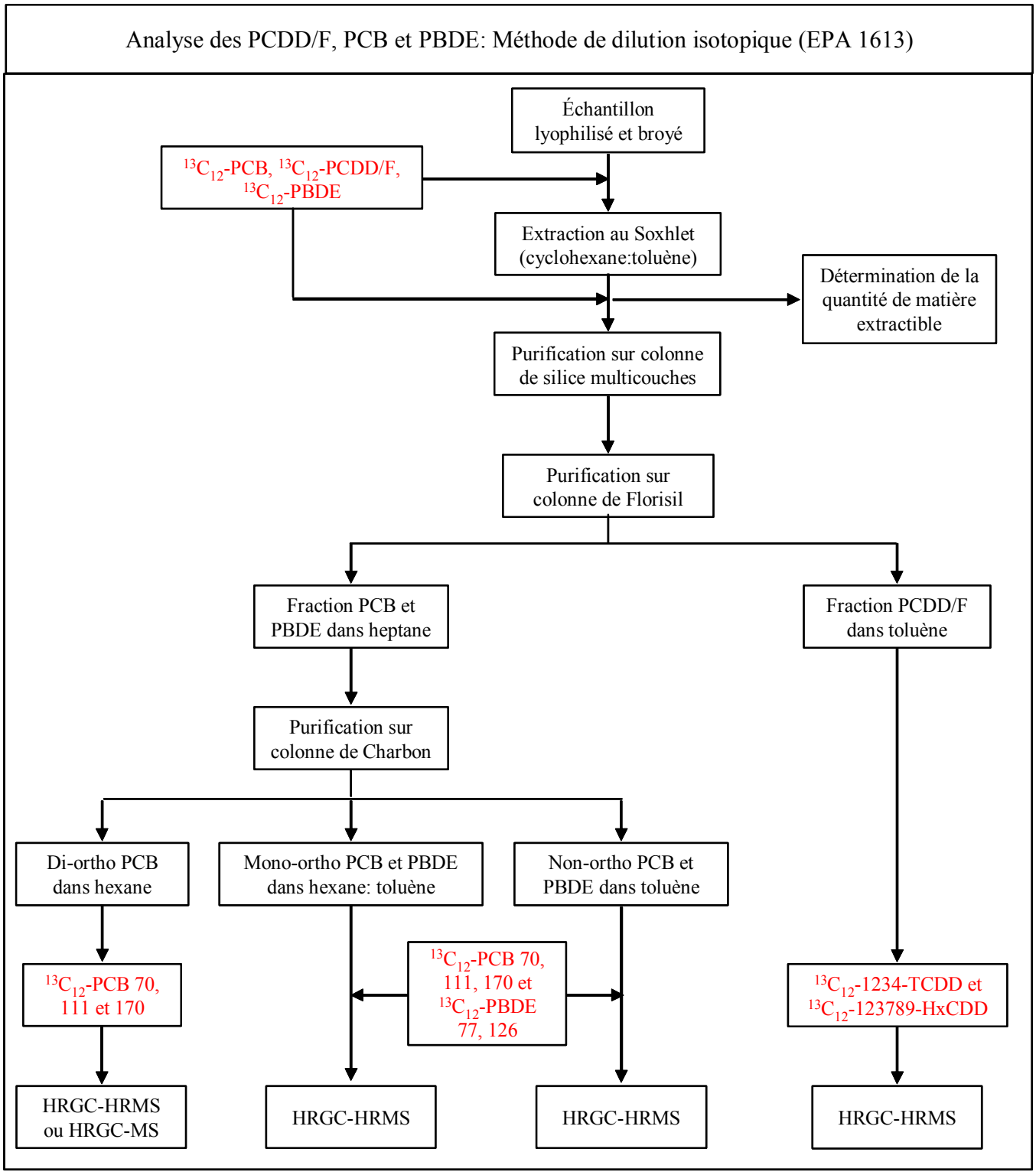

Figure 25 : Protocole d'analyse des dioxines, PCB et PBDE par GC-MS.

Extraction des contaminants

Chaque échantillon est extrait par la méthode au Soxhlet (Figure 26). Il s'agit d'une extraction solide-liquide. Le corps de l'extracteur, contenant une cartouche de cellulose (28 x 80 mm) remplie de solide (> à 10g de matière sèche), est fixé sur un réservoir de solvant

(ballon) et surmonté d'un réfrigérant. L'échantillon est extrait grâce à un mélange de solvants toluène-cyclohexane (50:50) pendant 12 heures. Le solvant est maintenu en ébullition à reflux ; les vapeurs se recondensent, et le solvant chaud retombe de façon continu sur le matériel à extraire entraînant un enrichissement du solvant en matières grasses et contaminants associés. En fin de l'étape d'extraction, les extraits sont évaporés à sec et pesés afin de déterminer la quantité de matière extractible au « toluène-cyclohexane ».

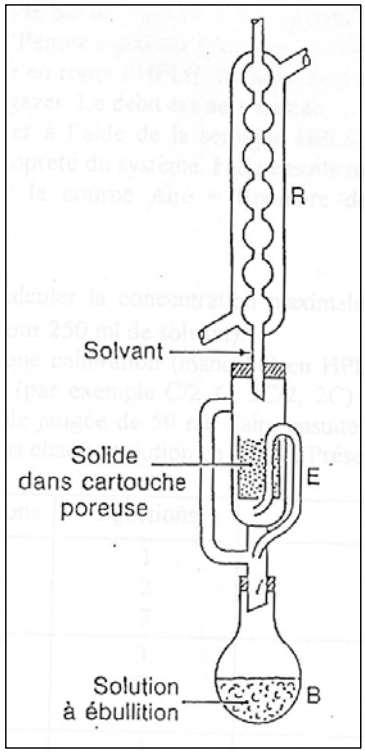

Figure 26 : Procédé d'extraction au Soxhlet (B = ballon chauffé ; E = extracteur ; R = réfrigérant).

Purification des extraits

L'étape de purification permettant d'éliminer tout le matériel co-extrait autres que les PCB recherchés, est réalisée en plusieurs étapes successives :

Dans un premier temps, le matériel co-extrait est éliminé par sulfonation grâce à un mélange d'hexane et d'acide sulfurique à 95% (50 : 50) dans des ampoules à décanter. Si la décantation n'est pas complète, l'extrait est centrifugé. Après la sulfonation, l'extrait est neutralisé par ajout d'eau désionisée. Le surnageant est alors récupéré et séché par l'ajout de sulfate de sodium anhydre.

Puis, une étape de purification par chromatographie d'adsorption est réalisée. Cette étape permet d'une part de séparer les contaminants organiques des interférences co-extraites et d'autre part de les isoler en groupes de composés. Elle est réalisée sur une colonne

multicouche de silice (de bas en haut : 1g silice neutre, 2g silice basique, 1g silice neutre, 4g silice acide et 1g silice neutre). L'échantillon, repris dans 1 ml d'hexane, est déposé en tête de colonne, après conditionnement de celle-ci avec 30 ml d'hexane. L'échantillon contenant les PCDD/F, PCB et PBDE est ensuite élué avec 60 ml d'hexane.

Une seconde purification par chromatographie d'adsorption est réalisée dans le but de séparer la fraction contenant les dioxines de celle contenant les PCB et PBDE. Cette étape est réalisée sur une colonne de Florisil (maille 60-100, activée à 600° pour 18 heures au minimum, réhydraté à 3%). La colonne de Florisil de 6 g est éluée avec 50mL d'heptane. L'échantillon, repris dans 1 ml d'hexane, est déposé en tête de colonne. Les PCB et le PBDE sont élués avec 60mL d'heptane, puis les PCDD/F avec 60mL de toluène.

La première fraction (PBDE et PCB) est alors fractionnée sur une colonne de Carbopack B (mélange de 2g Carbopack + 2g de Celite B). Les PCB sont séparés en trois fractions : les PCB di-ortho dans la 1ère fraction (élution avec de l'hexane), les PCB mono-ortho et PBDE dans la 2éme (élution avec un mélange d'hexane-toluène) et les PCB non-ortho et PBDE dans la 3éme (élution avec du toluène).

Analyse instrumentale des dioxines, PCB et PBDE

La quantification de ces contaminants est obtenue par la méthode de dilution isotopique. A cette fin les échantillons sont dopés avant extraction ou dans la matière grasse avec les homologues marqués des contaminants à déterminer : 16 $^{13}C_{12}$-PCDD/F, 18 $^{13}C_{12}$-PCB et 9 $^{13}C_{12}$-PBDE. Ces étalons internes permettent la quantification des composés dans les matrices analysées.

La méthode d'étalonnage interne est utilisée pour la quantification du 17éme congénère 123789-PCDD c'est à dire ajout des étalons $^{13}C_{12}$-123478-HxCDD et $^{13}C_{12}$-123678-HxCDD juste avant purification.

Une fois purifiées les différentes fractions sont concentrées et dopées avec des étalons de récupération : 2 $^{13}C_{12}$-PCDD/F ($^{13}C_{12}$-1234-TCDD + $^{13}C_{12}$-123789-HxCDD), 3 $^{13}C_{12}$-PCB ($^{13}C_{12}$-TeCB70 + $^{13}C_{12}$-PeCB111 + $^{13}C_{12}$-HpCB170) et 2 $^{13}C_{12}$-PBDE ($^{13}C_{12}$-TeBDE77 + $^{13}C_{12}$-PeBDE126).

Les PCDD/F, PCB-DL et PBDE sont analysés par HRGC-HRMS (WATERS Autospec ; résolution de 10 000, colonne DB-5) alors que les PCB indicateurs sont analysés par HRGC/MS basse résolution (AGILENT GC/MSD ; colonne HT-8).

Contrôles de qualité

Les analyses ont été réalisées au Laboratoire CARSO à Lyon, laboratoire accrédité pour les analyses de dioxines dans les produits alimentaires. Tous les critères de qualité requis pour les analyses de contaminants (US EPA Method 1613, 1994) ont été satisfaits. Les taux de récupération variaient entre 80 et 110%, exceptés pour l'OCDD et l'OCDF (> 40%). La linéarité a été systématiquement vérifiée. Les limites de détection de la méthode se situaient entre 1 et 20 $pg.g^{-1}$ de lipides pour les PCB dioxine-like, les PCDD/F et PBDE ; elles étaient de 1 $pg.g^{-1}$ de lipides pour les PCB indicateurs. Des blancs, réalisés régulièrement, ont été vérifiés, démontrant l'absence d'interférences avec les composés recherchés. Enfin, la justesse du protocole a été estimée par l'analyse d'échantillons certifiés (poudre de lait, BCR-CRM 607).

Chapitre III : Synthèse

1. Contamination des crustacés décapodes exploités par les composés organohalogénés (Articles 1 et 2)

Les deux articles suivants portent sur l'évaluation des niveaux et profils de contamination par différentes classes de contaminants organohalogénés de quatre crustacés décapodes exploités : l'araignée de mer, le tourteau, l'étrille et la langoustine (cf Chapitre 1, paragraphe 1). La première étude (Article 1) a été dédiée aux contaminants organochlorés tels que les PCB, l'hexachlorobenzène (HCB) et le dichlorodiphényldichloroéthylène (*pp'*-DDE) ; la deuxième (Article 2) a élargi la recherche à différentes familles d'organohalogénés, à savoir les dioxines, les PCB (dont les PCB dioxine-like) et les PBDE. Cinq zones de prélèvement correspondant à des ports de débarquement de crustacés ont été sélectionnées, (cf Chapitre 2, paragraphe 1.1) : Antifer (Baie de Seine), Granville (Ouest Contentin), Roscoff (Nord Bretagne), Le Conquet (Mer d'Iroise, Ouest Bretagne) et Le Guilvinec (Sud Bretagne).

L'HCB et le *pp'*-DDE sont des pesticides organochlorés. L'HCB est un sous-produit de plusieurs procédés industriels de chloration, souvent associés aux usines de production de chlore et de soude caustique, et utilisé comme fongicide. L'exposition de l'homme à l'hexachlorobenzène est associée à des effets dermiques, neurotoxiques et cancérigènes. Le *pp'*-DDE est un des produits de dégradation du DDT (dichlorodiphényltrichloroéthane), substance chimique développée dans les années 1940 et utilisée comme insecticide. Le DDT ainsi que ses métabolites sont toxiques pour l'homme : une exposition à ces substances peut affecter les systèmes immunitaire et reproducteur ; ils sont considérés comme cancérigènes pour l'homme. En Europe, la commercialisation et l'utilisation du HCB et du DDT sont interdites, respectivement depuis 1988 et 1972. Cependant, le DDT est encore largement employé dans les pays en développement, qui l'utilisent dans la lutte contre les maladies parasitaires, telles que la malaria. L'HCB et le *pp'*-DDE peuvent être mesurés par GC-ECD selon le même protocole analytique que les PCB, raison pour laquelle, la contamination des crustacés décapodes par ces deux composés a été abordée en parallèle de celle des PCB (Article 1). Cependant, au vu des très faibles niveaux observés, ils n'ont plus été étudiés au cours des travaux suivants.

1.1. Synthèse bibliographique de la contamination des crustacés par les PCB, dioxines et PBDE

Aucune donnée concernant la contamination de l'araignée de mer (*Maja brachydactyla*), du tourteau (*Cancer pagurus*), de l'étrille (*Necora puber*) et de la langoustine (*Nephrops norvegicus*) n'étant disponible dans la littérature, la recherche bibliographique s'est étendue à l'ensemble des crustacés décapodes des différentes mers et océans (Tableau 21).

En ce qui concerne les PCB, des concentrations très disparates ont été relevées dans la littérature. Les niveaux maxima en CB153 (500-2000 $ng.g^{-1}$p.f.) ont été mesurés dans l'hépatopancréas du crabe bleu, *Callinectes sapidus*, aux Etats-Unis (Baie de Chesapeake et Georgie) et les minima, de l'ordre de 5 à 70 $ng.g^{-1}$p.f., chez le crabe nageur, *Liocarcinus holsatus*, (individu entier) prélevé dans l'Estuaire de l'Escaut (Pays-Bas). A l'inverse, des niveaux assez homogènes de dioxines et PBDE sont observés dans les tissus de crustacés provenant de divers points du monde. Par exemple, des concentrations en 2,3,7,8-PCDD/F inférieures à 15 $pg.g^{-1}$p.f. ont été mesurées chez deux espèces de crustacés du Japon (*Charybdis japonica* et *Crangon sp.*), soit approximativement 5 fois moins que celles mesurées chez le crabe des neiges, *Chionoecetes opilio*, et le crabe bleu en Amérique du Nord et au Canada (50-70 $pg.g^{-1}$p.f.). Concernant les PBDE, des concentrations en BDE47 faibles et homogènes ont été mesurées chez différentes espèces (muscle ou individu entier) provenant aussi bien d'Europe que d'Amérique de Nord. Le même constat peut être fait pour les niveaux observés dans l'hépatopancréas ou l'abdomen de crustacés.

Ces données sont cependant à considérer avec précaution d'une part à cause des différences de régime alimentaire des espèces, d'autre part à cause de l'absence d'unité comparable et de composés de référence, et enfin du fait de l'hétérogénéité des tissus analysés (muscle, hépatopancréas, individu entier).

Tableau 21 : Synthèse bibliographique concernant les niveaux de contamination mesurés chez des crustacés décapodes des différentes mers et océans. [a] congénères BDE28, 47, 99, 100, 153.

Espèce	Tissu	Situation géographique	Contaminants	Niveaux	Référence
Crevette grise *(Crangon sp.)*	individu entier	Baie de Sendai (Japon)	PCB-DL ($pg.g^{-1}$p.f.)	308	Okumura et al., 2004
			TEQ PCB-DL ($pg.g^{-1}$p.f.)	0,4	
Crabe nageur (*Liocarcinus holsatus*)	individu entier	Estuaire de l'Escaut (Europe)	CB153 ($ng.g^{-1}$p.f.)	5,4-68	Voorspoels et al., 2004
Crevette grise *(Crangon crangon)*	individu entier	Baie de Seine (France)	CB153 ($ng.g^{-1}$p.s.)	140-172	Loizeau et al., 2001
Crevette blanche *(Palaemon longirostris)*				86-106	
Crabe (*Chasmagnathus granulata*)	muscle	Argentine	CB153 ($ng.g^{-1}$lipides)	40-52	Menone et al., 2000
Crabe bleu *(Callinectes sapidus)*	hépatopancréas	Georgie (USA)	CB153 ($ng.g^{-1}$p.f.)	540-1780	Kannan et al., 1998
Crevette grise *(Crangon crangon)*	individu entier	Mer Baltique		80	Kannan et al., 1995b
Crabe bleu *(Callinectes sapidus)*	hépatopancréas	Baie de Chesapeake (USA)	PCB ($ng.g^{-1}$p.s.)	410-2100	Mothershead et al., 1991
Crevette grise *(Crangon sp.)*	individu entier	Baie de Sendai (Japon)	2378-PCDD/F ($pg.g^{-1}$p.f.)	6,6	Okumura et al., 2004
			TEQ 2378-PCDD/F ($pg.g^{-1}$p.f.)	1,1	
Tourteau *(Cancer pagurus)*	muscle	Fjords du Groenland (Norvège)		3,5	Knutzen et al., 2003
		Norvège	2378-PCDD/F ($pg.g^{-1}$p.f.)	15-34	Oehme et al., 1990
Crevette grise *(Crangon crangon)*	individu entier	Mer du Nord	TEQ 2378-PCDD/F ($pg.g^{-1}$p.f.)	0,66-1,1	Karl et al., 2002
Crevette rose *(Pandalus borealis)*	individu entier	Norvège		0,25	
		Groenland		0,12	
Crabe (*Charybdis japonica*)	muscle	Baie de Tokyo (Japon)	2378-PCDD/F ($pg.g^{-1}$p.f.)	12	Sakurai et al., 2000
			TEQ 2378-PCDD/F ($pg.g^{-1}$p.f.)	2,6	
Crabe vert *(Carcinus aestuarii)*	individu entier	Lagons de Venice/Orbettello (Italy)	2378-PCDD/F ($pg.g^{-1}$p.f.)	9-152	Jimenez et al., 1998
			TEQ 2378-PCDD/F ($pg.g^{-1}$p.f.)	1,1-5,2	
Homard (*Hommarus americanus*)	muscle	Baie de Casco (USA)		0,8	Wade et al., 1997
Crabe dormeur (*Cancer magister*)	muscle	Colombie Britannique (Canada)		<8	Hagen et al., 1997
Crabe des neiges *(Chionoecetes opilio)*	individu entier	Estuaire du St Laurent (Canada)	2378-PCDD/F ($pg.g^{-1}$p.f.)	50-70	Brochu et al., 1995
		Fjord du Saguenay (Canada)		31-61	
Crabe bleu *(Callinectes sapidus)*	muscle	Baie de Netwark/Raritan (USA)		55-60	Cai et al., 1994

Tableau 22 : (suite)

Espèce	Tissu	Situation géographique	Contaminants	Niveaux	Référence
Crevette grise *(Crangon crangon)*	individu entier	Estuaire de l'Escaut (Europe)	PBDE[a] ($ng.g^{-1}$p.f.)	0,2-8,3	Voorspoels et al., 2003
		Mer du Nord		0,02-0,08	
Crabe nageur *(Liocarcinus holsatus)*	individu entier	Estuaire de l'Escaut (Europe)		1,2-30	Voorspoels et al., 2003
		Mer du Nord		0,4-1,4	
Crevette rose *(Pandalus borealis)*	muscle	Estuaire du St Laurent (Canada)	BDE47 ($ng.g^{-1}$p.f.)	0,17	Law et al., 2003
Crabe dormeur (*Cancer magister*)	hépatopancréas	Colombie Britannique (Canada)	BDE47 ($ng.g^{-1}$lipides)	3-210	Ikonomou et al., 2002
Bernard-l'hermite *(Pagurus bernhardus)*	abdomen	Mer du Nord	BDE47 ($ng.g^{-1}$lipides)	8-118	Boon et al., 2002
Crevette	individu entier			35-39	

1.2. Niveaux de contamination en PCB, dioxines et PBDE chez les crustacés décapodes prélevés sur les côtes françaises

- Variabilité géographique

La variabilité géographique de la contamination des araignées par les PCB, dioxines et PBDE (Figure 27 ; Article 2) a été appréhendée via le prélèvement, en février 2003, d'individus adultes sur chacun des sites d'étude. Pour chacune des trois familles de contaminants, les concentrations les plus élevées ont été mesurées chez des individus provenant d'Antifer (Baie de Seine), confirmant ainsi l'importante pollution chimique chronique de cette zone due aux apports de la Seine (Abarnou et al., 2002a, 2002b ; Johansson et al., 2004) ; à l'inverse les niveaux les plus faibles ont été enregistrés à Granville et à Roscoff.

Des concentrations relativement élevées ont été mesurées dans les araignées de mer pêchées en Mer d'Iroise (Le Conquet, Bretagne Ouest). Elles résultent probablement des rejets de la Rade de Brest, et plus particulièrement de la rivière de l'Elorn, où une forte contamination chimique avait déjà été mise en évidence antérieurement (Marchand et al., 1983). Enfin, les niveaux plus élevés en CB153 et BDE47 mesurés dans les individus du Guilvinec, malgré l'absence de source directe de contamination, résultent probablement de l'influence du panache de la Loire jusqu'à la pointe de la Bretagne (Lazure et Jegou, 1998). En effet, le Réseau National d'Observation en France (RNO) a mis en évidence une importante contamination en PCB des moules, *Mytilus edulis,* collectées à l'embouchure de l'Estuaire de la Loire ([CB153]>100 $ng.g^{-1}$p.s.).

La comparaison entre les niveaux de contamination mesurés dans les crustacés des côtes françaises et ceux relevés dans la littérature (Tableau 21) met en évidence une contamination par les PCB très élevée dans la Baie Seine malgré leur interdiction depuis les années 80. Ce constat coïncide avec les résultats obtenus pour d'autres organismes vivants de niveaux trophiques variés en Estuaire de Seine, estuaire qui est considéré comme l'un des plus contaminés d'Europe (Abarnou et al., 2000). En revanche, une faible contamination des crustacés des eaux côtières françaises par les dioxines et PBDE a été mise en évidence.

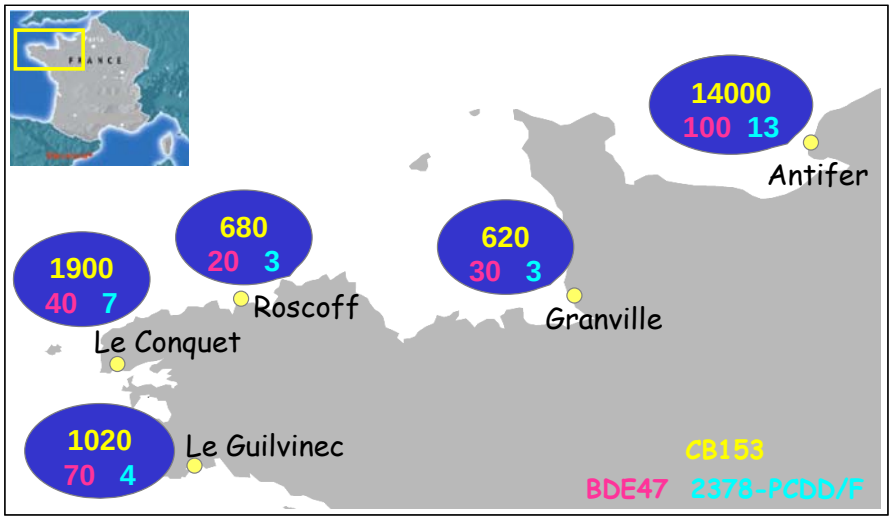

Figure 27. Niveaux de contamination (pg.g^{-1}p.s.) en CB153 (jaune), 2,3,7,8-PCDD/F (turquoise) et BDE47 (rose) mesurés dans le muscle d'araignées de mer adultes prélevées en février 2003 en Normandie (Antifer, Granville) et Bretagne (Roscoff, Le Conquet, Le Guilvinec).

- Variabilité inter-espèces

Pour chaque famille de contaminants et chaque secteur de prélèvement, des concentrations du même ordre de grandeur ont été mesurées dans le muscle de quatre espèces de crustacés. Les étrilles à Antifer et les langoustines au Guilvinec présentaient des niveaux plus élevés que ceux mesurés chez l'araignée de mer et le tourteau (Article 2). Tous les individus analysés au cours de cette étude étant des crustacés adultes mâles, les légères différences observées sont donc probablement dues à des différences de régime alimentaire, de mode de vie (habitat, migration) entre espèces, et/ou d'âge entre individus.

- Organotropisme

Dans le cas de la contamination des crustacés par les PCB (Article 1), une corrélation positive a été mise en évidence entre la teneur en lipides des différents tissus des crustacés (hépatopancréas, gonades, muscle) et les concentrations en CB153, reflétant le caractère liposoluble de ces substances chimiques. Par exemple, l'hépatopancréas d'araignée de mer (teneur en lipides = 40-60%), est approximativement 40 à 60 fois plus contaminé que le muscle (teneur en lipides = 1-3%), et 6 à 10 fois plus que les gonades (teneur en lipides = 10-20%).

- Contamination chimique et sécurité sanitaire

Les crustacés sélectionnés pour cette étude étant des espèces consommées par l'homme, nos résultats ont été comparés aux normes sanitaires actuelles pour évaluer le risque de contamination par les dioxines et PCB encouru par les populations qui les consomment. Par référence à ces normes, aucun problème sanitaire n'apparaît lié à la consommation du muscle de crustacés, organe le plus consommé (Article 1 et 2). L'hépatopancréas et les gonades étant également appréciés par certains consommateurs, des analyses de PCB marqueurs et une estimation des concentrations en PCB dioxine-like ont également été réalisées (Article 1). Seuls les crustacés provenant de Baie de Seine présentent des teneurs en contaminants dans ces tissus supérieures aux normes de sécurité sanitaire.

1.3. Empreintes de contamination par les PCB, dioxines et PBDE chez les crustacés décapodes prélevés sur les côtes françaises

Un des objectifs de ce travail était tout d'abord d'étudier la variabilité géographique des empreintes de contamination en PCB, dioxines et PBDE chez les quatre crustacés décapodes cibles (Article 1 et 2). Dans un second temps, les profils de contamination de l'araignée de mer ont été comparés à ceux mesurés chez la moule (*Mytilus edulis*) et le bar (*Dicentrarchus labrax*) pour contribuer à une meilleure connaissance des facteurs influençant la distribution de ces familles de contaminants chez les crustacés (Article 2). La moule a été choisie en tant que « bon bioindicateur » de la contamination du milieu aquatique du fait de sa capacité à accumuler les particules en suspension, ainsi que de sa capacité limitée à biotransformer les contaminants (Claisse, 1989). A l'inverse le bar, dont le régime alimentaire diffère de celui de l'araignée, est un organisme de niveau trophique plus élevé et possède de fortes capacités de métabolisation des contaminants organiques (Goerke et Weber, 2001 ; Stapleton et al., 2004a, 2004b ; Opperhuizen et Sijm, 1990).

- Variabilité géographique

Malgré des niveaux de contamination distincts entre les secteurs d'étude, des empreintes de PCB et PBDE similaires ont été observées le long des côtes de Bretagne et Normandie (Articles 1 et 2). En ce qui concerne les PCB, six congénères majeurs ont été identifiés aussi bien dans le muscle que dans l'hépatopancréas : CB153, CB118, CB180 et CB138. Ils représentent 80-90% de la somme des congénères de PCB analysés, le CB153 contribuant pour 40%. En raison de leurs coefficients de partage octanol-eau (Kow) élevés et de la

position de leur atomes de chlore, ces congénères sont accumulés par les organismes marins, ne sont pas métabolisables, et sont bioamplifiés le long des chaînes trophiques (Kannan et al., 1995b ; Bright et al., 1995). Dans le cas des PBDE, les composés majoritaires sont les BDE47, BDE99, BDE100 et BDE28 ; ils représentent 85-95% de la somme des PBDE analysés. Ces congénères constituent les composés prédominants retrouvés dans l'ensemble du biota (Ikonomou et al., 2002 ; Law et al., 2003 ; Bragigand, 2005).

En ce qui concerne les dioxines, deux profils distincts ont été mis en évidence. D'une part un « profil général » observé dans le muscle de crustacés de Bretagne et de l'Ouest Contentin, d'autre part un « profil Antifer » (Figure 28). Ce dernier est caractérisé par la prédominance des PCDF par rapport aux PCDD, notamment de la 2,3,7,8-TCDF qui représente 45-55% de la somme des congénères substitués en positions 2,3,7,8. A l'inverse, le « profil général » est dominé par les PCDD comparés aux PCDF, l'OCDD représentant le composé majoritaire (30-50% de la somme des PCDD/F 2,3,7,8-substitués). Cette différence de profil observée en Baie de Seine par rapport aux autres secteurs d'étude est une conséquence de l'importante contamination de l'Estuaire et de la Baie de Seine par les polychlorobiphényles. En effet, la production de mélanges techniques PCB peut entraîner la formation de traces de PCDF par des processus de combustion, impliquant la dominance de ces composés par rapport aux PCDD (Wakimoto et al., 1988 ; Baker et Hites, 2000).

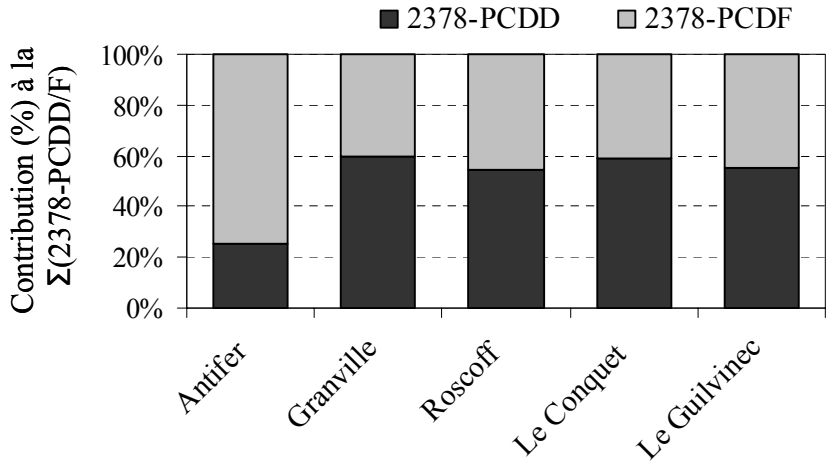

Figure 28. Empreintes de contamination des dioxines dans le muscle d'araignées de mer prélevées en Bretagne et Normandie : contribution (%) des 2,3,7,8-PCDD et 2,3,7,8-PCDF à la somme des 2,3,7,8-PCDD/F.

- Variabilité inter-espèces

Pour un secteur donné, des profils très similaires de PCB, dioxines et PBDE ont été observés chez les quatre espèces de crustacés. Les empreintes de contaminants chez *Maja*

brachydactyla ont donc été comparées à celles mesurées chez *Mytilus edulis* et *Dicentrarchus labrax*. Cette comparaison a été réalisée sur des individus provenant d'Antifer (Baie de Seine) et du Conquet (Mer d'Iroise) (Article 2).

L'étude des empreintes de PCB a mis en évidence, chez les trois espèces, la prédominance des congénères CB153, CB101, CB118, CB138, et CB180, mais distribués de façon différente (Figure 29A). Chez *Dicentrarchus labrax* provenant d'Antifer et du Conquet, ces composés étaient présents dans l'ordre décroissant suivant : CB153 (40% de la somme des PCB analysés), CB138 (15-20%), CB118 (10-15%), CB101 (10-15%), CB180 (5-10%). Un profil similaire a été observé chez *Mytilus edulis*, prélevée à Antifer et au Conquet. Quelle que soit la station de prélèvement, les empreintes de PCB chez *Maja brachydactyla* (CB153 > CB118 > CB180 > CB138 > CB101) se distinguent donc de celles mesurées chez la moule et le bar. Des différences de profil ont également été observées pour des congénères de PCB plus faiblement présents dans les matrices biologiques. Par exemple, les composés non substitués en position para tels que le CB52 et CB101 sont présents en proportions inférieures chez l'araignée de mer. A l'inverse, les congénères substitués en positions ortho et para tels que le CB77, CB105, CB118 et CB156 sont très faiblement présents chez le bar comparés aux deux autres espèces. Ces différences d'empreintes de PCB entre la moule, l'araignée de mer et le bar résultent de leur différence de régime alimentaire, de leur mode de vie (habitat, migration) et de leur niveau trophique, mais elles dépendent plus probablement de leurs capacités spécifiques respectives de métabolisation. Le cytochrome P-450, système enzymatique jouant un rôle fondamental dans la métabolisation des composés endogènes et des xénobiotiques, possède plusieurs isoformes présentes chez la plupart des espèces mais différemment actives. Au vu des nos résultats et de la bibliographie, les crustacés possèdent le cytochrome P-450 2B, responsable de la métabolisation des congénères de PCB non substitués en position para (Brown et John, 1992 ; Goerke et Weber, 2001), alors que le bar, comme la majorité des poissons, possède le cytochrome P-450 1A, agissant sur la métabolisation des congénères substitués en positions ortho et para (Brown et John, 1992 ; Van der Oost et al., 2003).

En ce qui concerne les empreintes de PBDE, l'étude a révélé, chez les trois espèces, la prédominance des congénères BDE47, BDE99, BDE100 et BDE28, mais distribués de façon différente (Figure 29B). Chez *Dicentrarchus labrax* provenant d'Antifer et du Conquet, le BDE47 représente 80% de la somme des PBDE analysés, suivi par le BDE100 (15%). Le BDE99 apparaît comme étant très faiblement présent dans le muscle du bar. Chez l'araignée de mer et la moule, les congénères prédominants sont le BDE47 (50-60% de la somme des

PBDE analysés), suivi du BDE99 et BDE100 distribués dans des proportions différentes (10% et 4-8% chez *Maja brachydactyla* ; 20-25% et 10% chez *Mytilus edulis*). Une étude bibliographique a montrée une forte capacité de la moule à bioaccumuler les congénères BDE47 et BDE99 (Gustafsson et al., 2004), alors que certains poissons tels que *Cyprinus carpio* possèdent des capacités élevés de débromation des BDE99 et BDE153 en BDE47 (Stapleton et al., 2004a, 2004b). Au vu de ces résultats, l'araignée de mer possède donc certaines capacités de métabolisation du BDE99.

Quel que soit le secteur de prélèvement, l'étude des empreintes de contamination par les PCDD/F a mis en évidence un profil type « moule » dominé par les 2,3,7,8-PCDD (60% de la somme des PCDD/F substitués en positions 2,3,7,8), et un profil type « bar », où les PCDF sont les composés majoritaires (75% de la somme des PCDD/F substitués en positions 2,3,7,8) (Figure 29C). Ces différences de distribution des 2,3,7,8-PCDD/F dans des tissus de bar et de moule s'expliquent par les différences de régime alimentaire et de niveau trophique entre ces deux espèces, mais également de la durée d'exposition et de leur capacités métaboliques. Chez les poissons, une efficacité d'absorption des PCDD plus faible comparée aux PCDF (Berge et Brevik, 1996), ainsi que des capacités de biotransformation des PCDD/F par l'activation du CYP1A (Hektoen et al., 1994) expliquent les différences d'empreintes observées entre le bar et la moule. En ce qui concerne l'araignée de mer, le profil de PCDD/F observé chez les individus du Conquet est similaire à celui de la moule, tandis qu'à Antifer, il est plus proche de celui du bar. Cette inversion de profil entre les deux stations de prélèvement n'a été notée ni chez *Mytilus edulis*, ni chez *Dicentrarchus labrax*. Elle peut être expliquée par une plus grande biodisponibilité des contaminants associés au sédiment en faveur des espèces strictement benthiques (c'est-à-dire se nourrissant d'autres espèces benthiques), telles que les crustacés. En particulier la prédominance de composés 2,3,7,8-PCDF mesurés dans le muscle d'araignées provenant d'Antifer, résulte probablement d'une exposition plus importante de cette espèce à la contamination chronique élevée en PCB et aux traces de PCDF associées, dues à l'influence de la Seine.

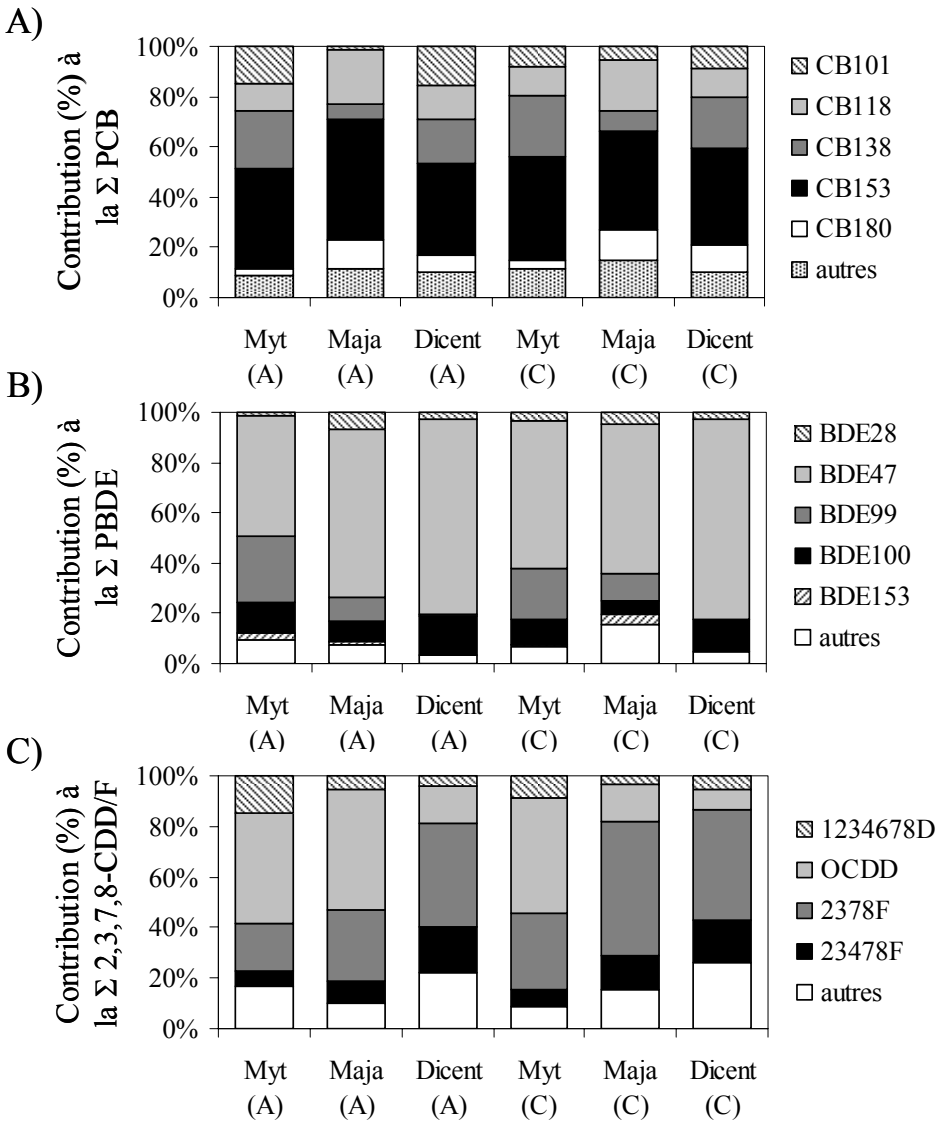

Figure 29. Empreintes de contamination par les PCB (A), les PBDE (B) et les 2,3,7,8-PCDD/F (C) observées chez *Mytilus edulis* (Myt), *Maja brachydactyla* (Maja) et *Dicentrarchus labrax* (Dicent), à Antifer (A) et au Conquet (C). Contribution (%) des différents congénères par rapport à la somme des PCB, PBDE et 2,3,7,8-PCDD/F analysés.

1.4. Conclusion

Les principaux résultats de cette première partie peuvent donc être résumés ainsi :

- Les crustacés décapodes de Baie de Seine présentent des niveaux de contamination en PCB, dioxines et PBDE plus élevés que ceux mesurés chez les individus de Bretagne et d'Ouest Contentin. Les niveaux les plus faibles ont été observés dans le Golfe Normano-Breton.

- La comparaison entre les concentrations mesurées en Baie de Seine et celles relevées dans la littérature montre une contamination des crustacés relativement forte en PCB. A l'inverse, de très faibles niveaux en dioxines et PBDE ont été observés, dénotant une faible contamination des eaux côtières françaises par ces substances.
- Les quelques différences de niveaux de contamination entre les crustacés traduisent la diversité de comportement et de régime alimentaire de ces espèces. L'étude de l'organotropisme des trois familles de contaminants révèle des concentrations supérieures dans l'hépatopancréas, organe plus riche en lipides que les gonades ou le muscle.
- Les empreintes globales de contamination des PCB et PBDE restent plus ou moins inchangées quels que soient la situation géographique et les niveaux de contamination. Elles sont par contre « espèce-dépendante », c'est-à-dire très influencées par le régime alimentaire, le mode de nutrition et les capacités de métabolisation de l'espèce. Les crustacés décapodes, en comparaison du bar et de la moule, possèdent un fort potentiel de métabolisation des PCB et certaines capacités de biotransformation des PBDE.
- Les profils de contamination des dioxines sont également « espèce-dépendants » au regard des résultats obtenus chez la moule et le bar. Les crustacés possèdent cependant de très faibles capacités de métabolisation des dioxines. La distribution des PCDD/F chez ces espèces dépend davantage des sources de contamination (au niveau qualitatif, quantitatif et en terme de proximité). Les crustacés décapodes peuvent donc être utilisés en tant qu'espèces bioindicatrices dans le cadre de programmes de surveillance de la pollution aquatique par les dioxines.

2. Isotopes stables du carbone et de l'azote chez l'araignée de mer *Maja brachydactyla* (Articles 3 et 4)

L'analyse des rapports isotopiques stables du carbone ($\delta^{13}C$) et de l'azote ($\delta^{15}N$) constitue un outil particulièrement efficace pour l'étude des interactions trophiques, notamment en milieu aquatique. Elle est cependant soumise à différents facteurs de variation (cf Chapitre 2, paragraphe 3). Dans un premier temps, la variabilité tissulaire des signatures isotopiques du carbone et de l'azote a été appréhendée (Article 3). L'influence de facteurs physiologiques (âge, taille, sexe) et écologiques (habitat) sur ces rapports isotopiques au sein de deux populations distinctes d'araignée de mer a ensuite été étudiée (Article 4).

2.1. Variabilité tissulaire des rapports isotopiques du carbone et de l'azote (Article 3)

Il est admis que les lipides sont appauvris en ^{13}C comparés aux protéines (De Niro et Epstein, 1977 ; Griffiths, 1991). Ainsi, plus un tissu sera riche en lipides, plus sa valeur de rapport isotopique du carbone sera faible par rapport à un tissu pauvre en lipides. L'objectif de ce travail est d'étudier l'influence d'un prétraitement de délipidation sur les signatures isotopiques du carbone et de l'azote d'échantillons plus ou moins gras. Pour cela, le muscle d'araignée a été choisi comme tissu de référence de par sa faible teneur en lipides (2-3%), alors que les gonades (teneur en lipides = 6-10%) et l'hépatopancréas (teneur en lipides = 40-60%) constituent des matrices plus grasses.

Le muscle, les gonades et l'hépatopancréas d'araignées de mer analysés présentent des signatures isotopiques du carbone et de l'azote significativement différentes. Les valeurs de $\delta^{13}C$ et $\delta^{15}N$ obtenues sont d'autant plus faibles que l'organe analysé est riche en lipides. Une relation logarithmique significative entre les valeurs de $\delta^{13}C$ et $\delta^{15}N$ et la teneur en lipides des échantillons a été obtenue.

Les différentes matrices ont ensuite été délipidées par une extraction au Soxtec (cf Chapitre 2, paragraphe 4.1.1) puis analysées en isotopie stable. Des valeurs significativement supérieures en $\delta^{13}C$ et $\delta^{15}N$ après délipidation ont été obtenues pour l'hépatopancréas (Figure 30) ; à l'inverse ce prétraitement n'a eu aucun effet sur les signatures isotopiques du carbone et de l'azote dans le cas du muscle d'araignée de mer. Enfin, pour les gonades d'araignées femelles, qui présentent une teneur en lipides intermédiaire entre le muscle et l'hépatopancréas, la délipidation n'a eu d'effet que sur le $\delta^{13}C$.

Après la délipidation, des différences significatives entre les tissus sont encore observées, le muscle présentant des valeurs de $\delta^{13}C$ et $\delta^{15}N$ supérieures à celles mesurées dans les gonades et l'hépatopancréas. Enfin, des corrélations significatives entre la teneur lipidique de l'échantillon et la différence de rapport isotopique avant et après délipidation ont été obtenues à la fois pour l'azote et le carbone (Figure 31).

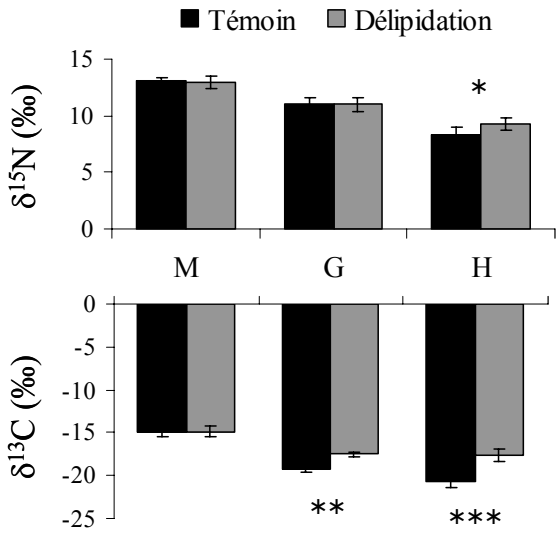

Figure 30 : Effet de la délipidation (extraction au Soxtec) sur les rapports isotopiques du carbone et de l'azote dans le muscle (M), les gonades (G) et l'hépatopancréas (H) d'araignée de mer. (✶ = différence significative, $p < 0,05$; ✶✶ = différence significative, $p < 0,01$; ✶✶✶ = différence significative, $p < 0,001$).

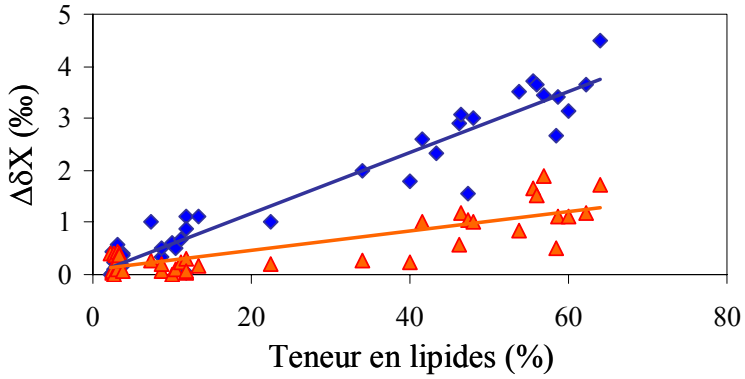

Figure 31 : Relation entre la différence de rapport isotopique avant et après délipidation (ΔδX, ‰) et la teneur en lipides des échantillons (%) chez l'araignée de mer (n = 46). ΔδX correspond à $\Delta\delta^{13}C$ (◆) et $\Delta\delta^{15}N$ (▲). Les relations linéaires obtenues sont significatives (Pearson, $p<0,001$) : $\Delta\delta^{13}C = 0.0588 \times$ (lipides %) et $\Delta\delta^{15}N = 0.0210 \times$ lipides %).

L'enrichissement trophique d'un tissu varie selon les fractions alimentaires (protides, glucides, lipides) et dépend des différentes voies de biosynthèse (cf Chapitre 1, paragraphe 3). La composition en isotopes stables des protéines est dite conservative, alors que celle des lipides, molécules très remaniées lors des transferts trophiques est significativement appauvrie en éléments lourds. Ainsi, les tissus présentant les teneurs en lipides les plus faibles, tel que le muscle de l'araignée de mer, possèdent des signatures isotopiques plus élevées que celles des

tissus gras (gonades, hépatopancréas) (Pinnegar et Polunin, 1999 ; Lorrain et al., 2002).

Suite au prétraitement de délipidation, une augmentation des valeurs de $\delta^{13}C$ a été observée dans les gonades et l'hépatopancréas, expliquée par l'extraction des lipides appauvris en ^{13}C (Pinnegar et Polunin, 1999 ; Sotiropoulos et al., 2004) . En ce qui concerne le $\delta^{15}N$, la délipidation n'a eu d'effet que sur l'hépatopancréas. Ce tissu est composé de lipides neutres (ou lipides de réserve), qui ont été extraits lors du traitement à l'hexane, et de lipides de structure. Ces derniers sont des molécules polaires, associées aux protéines. Le mélange de solvants « hexane-acétone » utilisé lors de la délipidation peut entraîner une extraction accidentelle de ces lipides de structure, appauvris en ^{13}C, et ainsi conduire à l'enrichissement de la signature isotopique en azote de l'hépatopancréas (Sotiropoulos et al., 2004).

La méthode automatique d'extraction au Soxtec permet donc de s'affranchir de l'influence des lipides lors d'analyses isotopiques stables. Des équations mathématiques issues de la corrélation entre la teneur en lipides et la différence de rapport isotopique avant et après délipidation, ont également été établies (Article 3). Ces équations permettent d'estimer les valeurs de $\delta^{13}C$ et $\delta^{15}N$ normalisées par rapport aux lipides, dans le cas de crustacés décapodes.

2.2. Influence de variations ontogéniques sur les signatures isotopiques du carbone et de l'azote chez *Maja brachydactyla* (Article 4)

Les isotopes stables du carbone et de l'azote ont été utilisés dans le but d'identifier d'éventuels changements du comportement alimentaire de *Maja brachydactyla* en relation avec son cycle de vie. Deux populations d'araignée de mer ont été étudiées : l'une en Mer d'Iroise, l'autre en Baie de Seine (cf Chapitre 2, paragraphe 1.2.). Les mesures des rapports isotopiques du carbone et de l'azote ont été réalisées sur le muscle d'araignée de mer.

- Influence de l'âge et de la taille

En Mer d'Iroise, l'étude des variations des rapports isotopiques du carbone et de l'azote dans le muscle d'araignée de mer a mis en évidence une augmentation des valeurs avec l'âge et la taille des individus (Figures 32 et 33). Ces valeurs plus élevées de $\delta^{13}C$ et $\delta^{15}N$ chez les araignées les plus âgées et de grande taille par rapport aux plus jeunes et de petite taille suggèrent un changement d'habitude alimentaire de l'espèce. Cependant les variations mesurées ne correspondent pas à un changement trophique significatif (Parker et al. 1989; Yokoyama et al. 2005), impliquant que l'araignée de mer reste à un même niveau trophique

tout le long de sa vie. L'enrichissement en ^{13}C entre les individus de petite taille et ceux de grande taille suppose tout de même un régime alimentaire d'affinité de plus en plus benthique (Hobson et al., 1995, Le Loc'h et Hily, 2005). Le comportement alimentaire de l'araignée de mer est donc davantage influencé par la croissance (taille/poids) des individus que par l'âge.

De plus, une diminution des valeurs de $\delta^{15}N$ a été observée entre les individus de 1-2 ans et ceux de 2-3 ans, suivi d'une augmentation du rapport isotopique de l'azote pour les classes d'âge supérieures (Figure 33). Cette diminution correspond au passage de l'araignée de la phase juvénile à la phase adulte (mue terminale), les individus de 2-3 ans atteignant leur maturité sexuelle et migrant pour la première fois vers les eaux plus profondes. En Mer d'Iroise, la nourricerie des araignées juvéniles, située dans l'anse de Bertheaume, correspond à un herbier à zostères caractérisé par des fonds sableux (cf Chapitre 2, paragraphe 1.2.1). A l'inverse, l'habitat côtier plus profond des araignées de mer adultes correspond à une forêt de laminaires, caractérisée par des fonds rocheux (Rocher du Corbin). Ce changement de biotope influence les signatures isotopiques des jeunes adultes (2-3 ans), du fait d'un changement quantitatif et qualitatif des proies disponibles (producteurs primaires et secondaires) (Raffin, 2003).

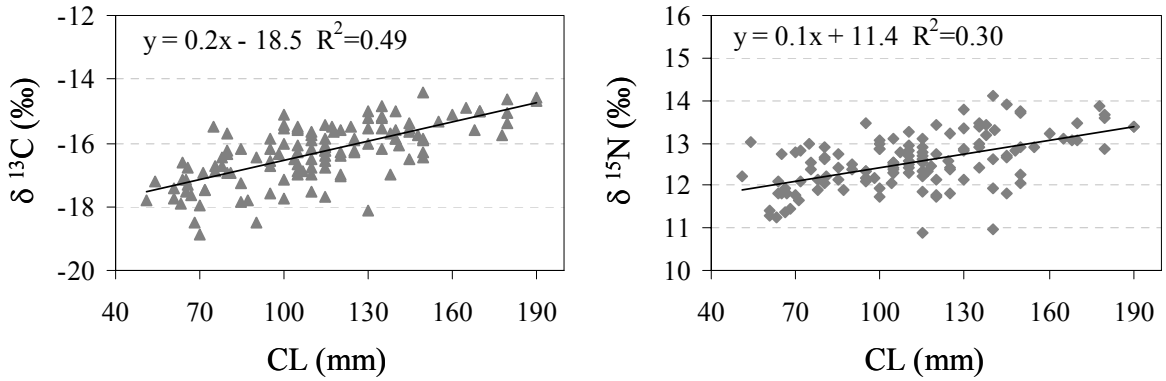

Figure 32 : Evolution des rapports isotopiques du carbone ($\delta^{13}C$) et de l'azote ($\delta^{15}N$) en fonction de la taille du céphalothorax (CL) au sein de la population d'araignée de Mer d'Iroise.

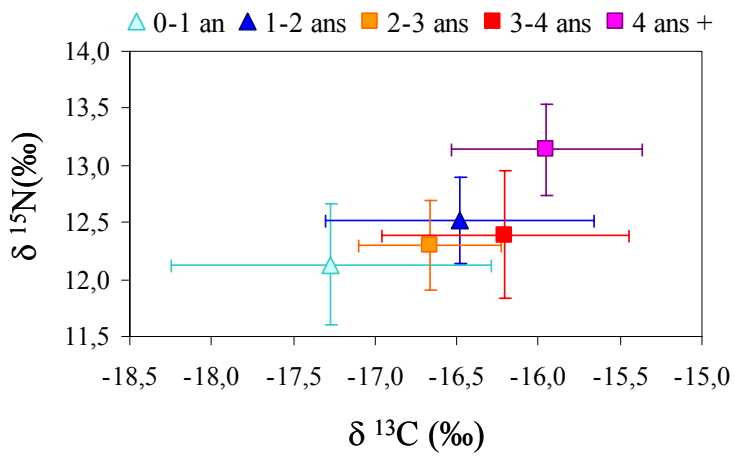

Figure 33 : Evolution des rapports isotopiques du carbone ($\delta^{13}C$) et de l'azote ($\delta^{15}N$) en fonction de l'âge chez la population d'araignée de Mer d'Iroise.

Contrairement à la population de Mer d'Iroise, peu de variations des signatures isotopiques du carbone et de l'azote ont été notées pour les araignées de Baie de Seine. Seules les valeurs de $\delta^{15}N$ augmentent de manière significative avec la taille (Figure 34). Cependant la différence de rapport isotopique de l'azote entre les individus de petite taille et ceux de grande taille est très inférieure à celle observée en Mer d'Iroise et ne correspond à aucun changement de niveau trophique significatif (Parker et al. 1989; Yokoyama et al. 2005). Concernant le facteur âge, aucune différence significative n'a été observée entre les différentes classes d'âge, excepté pour les plus jeunes araignées de mer (0-1 an) dont les valeurs de $\delta^{15}N$ sont significativement inférieures (Figure 35). Cette stabilité des valeurs isotopiques observées en Baie de Seine peut être expliquée par l'homogénéité de l'habitat et des communautés benthiques associées sur l'ensemble de la zone (Gentil, 1976 ; Olivier et Retière, 1998) (cf Chapitre 2, paragraphe 1.2.1).

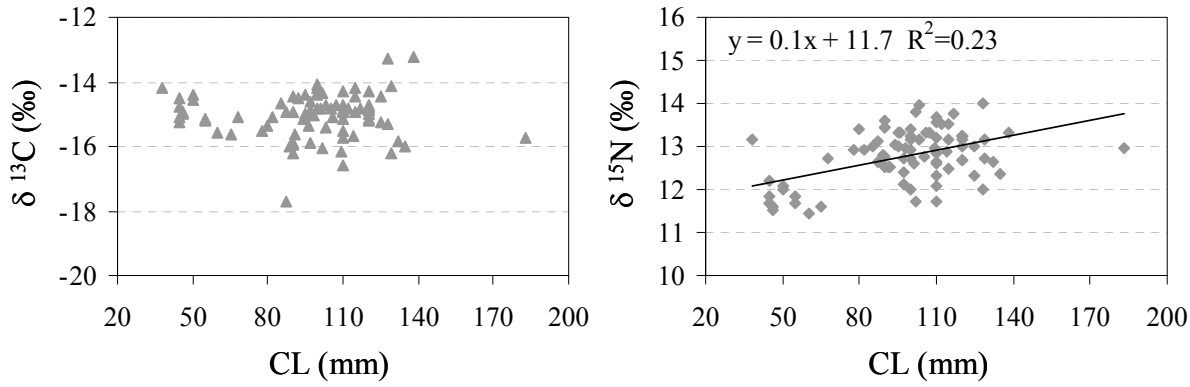

Figure 34 : Evolution des rapports isotopiques du carbone ($\delta^{13}C$) et de l'azote ($\delta^{15}N$) en fonction de la taille du céphalothorax (CL) au sein de la population d'araignée de Baie de Seine.

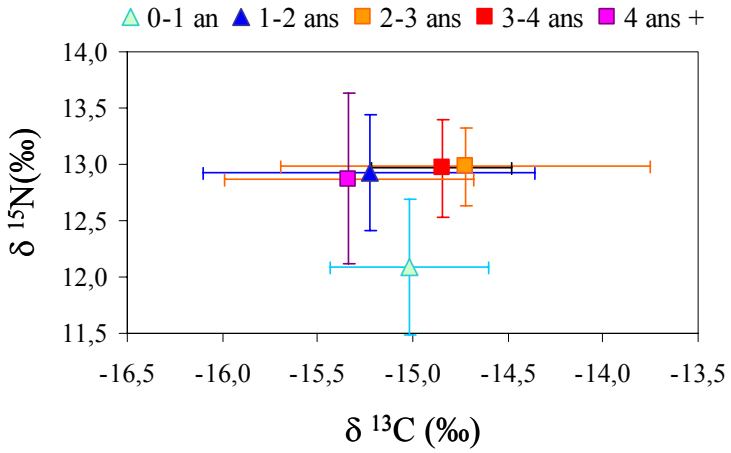

Figure 35 : Evolution des rapports isotopiques du carbone ($\delta^{13}C$) et de l'azote ($\delta^{15}N$) en fonction de l'âge chez la population d'araignée de Baie de Seine.

- Influence du sexe

En Mer d'Iroise et en Baie de Seine, aucune différence significative en $\delta^{13}C$ et $\delta^{15}N$ n'a été observée entre mâles et femelles, et ce quelque soit l'âge, la taille et la période de migration. Cependant, les importants écart-types mesurés chez les araignées des deux sexes reflètent le comportement opportuniste de cette espèce, et masquent probablement les faibles différences de régime alimentaire.

- Influence des migrations saisonnières

En Mer d'Iroise, l'étude des variations des rapports isotopiques du carbone et de l'azote dans le muscle d'araignée de mer a mis en évidence une influence des migrations saisonnières : les individus prélevés en hiver dans les eaux du large présentent des valeurs de $\delta^{13}C$ et $\delta^{15}N$

significativement supérieures à ceux prélevés au printemps-été dans les eaux très côtières (Figure 36). Ces résultats sont expliqués par les différences d'habitat et communautés associées entre les deux biotopes, à savoir la zone côtière (Rocher du Corbin) et l'habitat hivernal situé dans les eaux du large (Raffin, 2003). En effet, ce dernier est caractérisé par l'absence de macrophytes, le régime alimentaire de *Maja brachydactyla* étant seulement basé sur des invertébrés de divers niveaux trophiques (cf Chapitre 2, paragraphe 1.2.1).

A l'inverse, les migrations saisonnières des araignées de Baie de Seine n'ont aucune influence sur les rapports isotopiques du carbone et de l'azote (Figure 35). Ce résultat reflète l'homogénéité de l'ensemble de la zone d'étude, caractérisée par des sédiments de type graviers et sables grossiers, et par une communauté homogène d'invertébrés (Gentil, 1976 ; Olivier et Retière, 1998) (cf Chapitre 2, paragraphe 1.2.1).

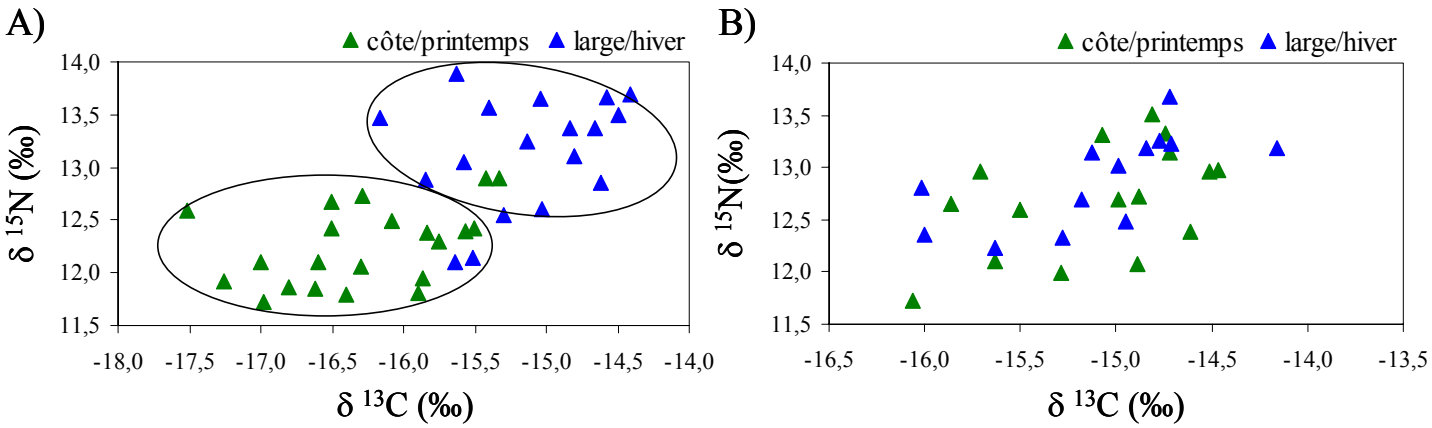

Figure 36 : Variations des rapports isotopiques du carbone ($\delta^{13}C$) et de l'azote ($\delta^{15}N$) en relation avec l'activité de migration de *Maja brachydactyla* en Mer d'Iroise (A) et en Baie de Seine (B).

2.3. Conclusion

Les principaux résultats de cette seconde partie peuvent donc être résumés ainsi :

- Les rapports isotopiques du carbone et de l'azote mesurés dans les tissus sont très dépendants de la teneur en lipides. La délipidation des échantillons avant analyses isotopiques ou l'utilisation d'équation de normalisation des rapports isotopiques du carbone et de l'azote est recommandée, particulièrement dans le cas de tissus gras, ou d'organismes entiers.
- Les deux populations étudiées, celle de Mer d'Iroise et celle de Baie de Seine, se distinguent par un comportement alimentaire différent au long de leur cycle vital :

- En Mer d'Iroise, l'araignée de mer modifie légèrement son régime alimentaire lors de sa croissance (signature isotopique du carbone et de l'azote plus élevée chez les organismes de grande taille) et lors de ses migrations. Ceci est dû à un changement d'habitat et de proies potentielles associées.
- A l'inverse, l'araignée de mer en Baie de Seine, présente un régime alimentaire homogène (peu de variation de sa signature isotopique) dû à une grande stabilité et homogénéité de l'ensemble de l'habitat et des communautés benthiques associées.

3. Bioaccumulation des polychlorobiphényles chez l'araignée de mer *Maja brachydactyla* (Articles 5 et 6)

Les PCB ont été utilisés comme « composés marqueurs » afin d'identifier les processus clés qui agissent sur le devenir des contaminants chez l'araignée de mer. Deux populations ont été étudiées : l'une en Baie de Seine, zone fortement contaminée par les PCB sous l'influence des rejets de la Seine, l'autre en Mer d'Iroise, considérée comme zone peu contaminée par de telles substances.

3.1. Influence de facteurs ontogéniques sur la contamination en PCB chez *Maja brachydactyla* (Article 5)

L'objectif de ce travail était d'établir l'influence de facteurs ontogéniques tels que la croissance, l'âge, le sexe, la reproduction et la migration sur les niveaux et profils de contamination en PCB chez *Maja brachydactyla*.

- Influence de la taille, de l'âge et du sexe

Les concentrations en PCB ont été mesurées dans l'hépatopancréas d'araignées de mer. Ce tissu constitue la réserve lipidique la plus importante de l'organisme, et est également le siège des activités enzymatiques. Seuls les individus prélevés à la côte ont été pris en compte dans cette partie, afin de s'affranchir d'un éventuel effet de la migration.

En Mer d'Iroise et en Baie de Seine, une corrélation positive significative a été observée entre la taille des individus et les concentrations en CB153 mesurées dans l'hépatopancréas, toutes cohortes confondues (Figure 37 ; Tableau 22). Cependant, des coefficients de corrélation supérieurs ont été obtenus lorsque seules les araignées juvéniles étaient prises en

compte. L'araignée de mer a la particularité de ne grandir que pendant sa phase juvénile, jusqu'à sa mue terminale (Le Foll, 1993). Par conséquent, chez cette espèce, une relation taille / âge n'existe que pendant cette phase de vie, et en particulier pendant la première année. Cette particularité de croissance explique la meilleure corrélation obtenue entre les concentrations en CB153 et la taille des individus juvéniles, et suggère que l'âge est probablement un facteur de plus grande importance quant à l'accumulation des PCB chez *Maja brachydactyla*. De plus, au vu des relations linéaires obtenues dans le cas des araignées juvéniles, un coefficient de pente supérieur est observé pour les individus de Baie de Seine (a = 7,22) comparé à celui de Mer d'Iroise (a = 1,71), suggérant une accumulation de PCB plus rapide probablement dû à un environnement plus contaminé.

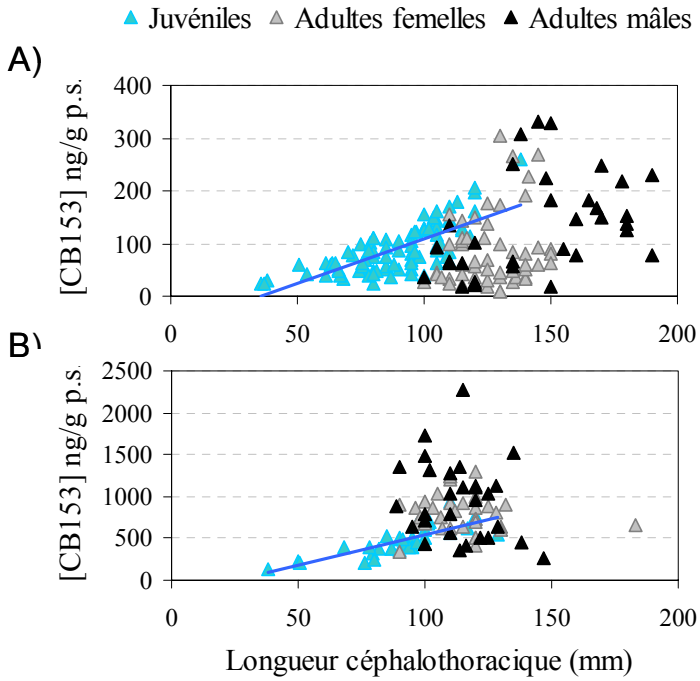

Figure 37 : Relation entre la teneur en CB153 (ng.g^{-1}p.s.) mesurées dans l'hépatopancréas d'araignées de mer juvéniles (symbole turquoise), adultes femelles (symbole gris) et adultes mâles (symbole noir) et la longueur céphalothoracique des individus (mm). A = population de Mer d'Iroise ; B = population de Baie de Seine.

Tableau 23 : Relation entre la taille (longueur céphalothoracique ; LC) des araignées de mer et la concentration en CB153 mesurée dans l'hépatopancréas.

	Mer d'Iroise	**Baie de Seine**
Juvéniles	[CB153] = 1,71×LC - 62,12 r = 0,74 ; p < 0,001	[CB153] = 7,22×LC - 183,17 r = 0,80 ; p < 0,001
Juvéniles + adultes	[CB153] = 0,92×LC - 4,85 r = 0,42 ; p < 0,001	[CB153] = 6,10×LC - 90,69 r = 0,36 ; p < 0,001

En Baie de Seine et Mer d'Iroise, une augmentation des teneurs en CB153 en fonction de l'âge a été mise en évidence, les individus de 4 ans et plus étant 4 à 5 fois plus contaminés que ceux de 0-1 an (Figure 38). De plus, aucune différence significative entre les individus mâles et femelles n'a été observée pour ce congénère, quelle que soit la classe d'âge. Des résultats similaires ont été obtenus pour les congénères CB180, CB187 et CB194. Du fait de leur fort coefficient Kow et de leur faible élimination (composés non métabolisables), les teneurs de ces composés tendent à augmenter avec l'âge, reflétant le temps de l'exposition de l'organisme à de telles substances (Connell, 1987 ; Tuerk et al., 2005).

A l'inverse, les concentrations des congénères ne possédant que des atomes d'hydrogène vicinaux en position méta-, para-, ou bien à la fois en position méta-, para- et ortho-, para- (CB52, 101, 110, 132, 149) ne sont pas reliés à l'âge des araignées de mer. En effet, aucune augmentation significative des teneurs de ces composés en fonction de l'âge des individus n'a été mise en évidence. Comme reporté précédemment, ces congénères sont facilement métabolisés chez les crustacés décapodes, dû à la présence du cytochrome P450 2B, et ne sont donc pas bioaccumulés tout au long de la vie des individus. De plus, comme pour les PCB persistants, aucune différence n'a été observée entre mâles et femelles, supposant que l'activité enzymatique CYP P450 2B n'est pas dépendante du sexe chez *Maja brachydactyla*.

Enfin, concernant les PCB ne possédant que des atomes d'hydrogène vicinaux en position ortho-, méta- (CB105, 118, 128, 138, 156, 170), une différence notable a été observée selon le sexe. Les concentrations de ces composés augmentent avec l'âge des individus chez les mâles, ainsi que chez les femelles juvéniles. A l'inverse, à partir de 2-3 ans, aucune variation des teneurs de ces PCB n'est observée chez les araignées femelles, les concentrations mesurées étant très faibles, inférieures à celles mesurées chez les femelles juvéniles. Différents auteurs ont montré que l'activité enzymatique du cytochrome P450 est influencée par des facteurs biologiques tels que le sexe et le stade de reproduction (Andersson et Förlin, 1992 ; Kennish et al., 1992 ; Kirchin et al., 1992 ; Den Besten, 1998 ; Georgiades et al., sous presse). En particulier, une augmentation du métabolisme stéroïdien associée à la gamétogenèse peut

entraîner chez certaines espèces une élévation de cette activité enzymatique (Georgiades et al., sous presse). Bien que seul le CYP2B ait été rapporté comme métabolisant certains congénères de PCB chez les crustacés, la présence du CYP1A chez ces espèces a également été observée (Kannan et al., 1995b). Ce cytochrome est responsable, entre autres, de la biotransformation des PCB ne possédant que des atomes d'hydrogène vicinaux en position ortho-, méta-. L'absence d'accumulation de ces congénères uniquement chez les femelles adultes prélevées au printemps-été, période de maturation des gonades chez *Maja brachydactyla*, peut donc s'expliquer par une augmentation de l'activité métabolique du CYP1A, permettant l'élimination de ces composés.

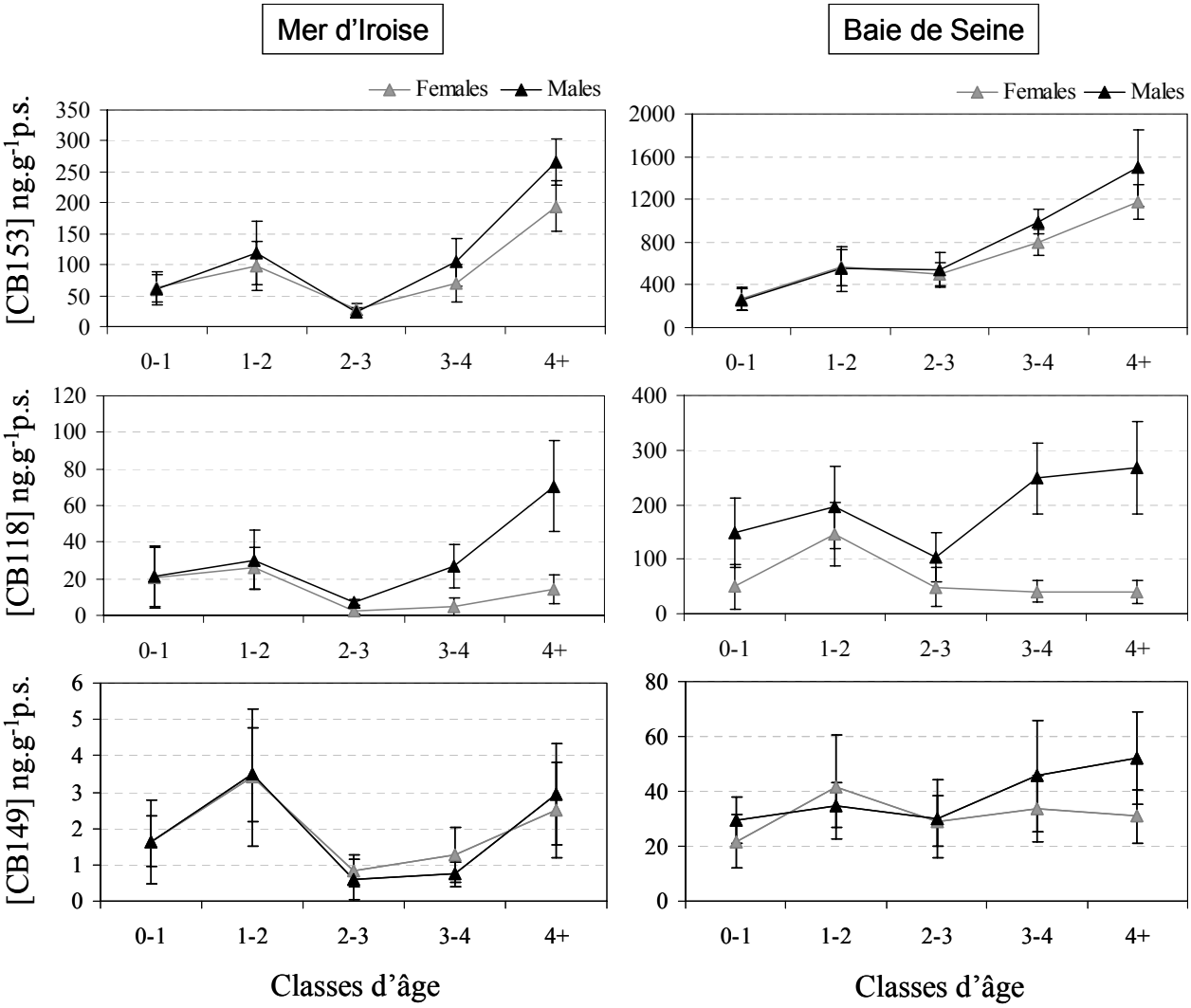

Figure 38 : Evolution des concentrations en PCB ($ng.g^{-1}p.s.$) mesurées dans l'hépatopancréas d'araignées de mer mâles (symbole noir) et femelles (symbole gris), en fonction de l'âge des individus.

- Influence des migrations saisonnières

Le comportement migratoire de *Maja brachydactyla*, en particulier la phase hivernale pendant laquelle les individus vivent dans des eaux du large plus faiblement exposées aux apports de contaminants du littoral, peut influencer les niveaux et profils de contamination chez cette espèce. Pour évaluer l'influence de ces migrations, les PCB ont été analysés dans l'hépatopancréas d'araignées mâles adultes provenant des zones côtières et du large, au cours des années 2003 et 2004. Un nombre limité d'individus d'une même classe d'âge ayant été obtenu au cours de chaque prélèvement, le suivi des variations des concentrations en CB153 a été effectué sur les classes d'âge 3-4 ans et plus de 4 ans. Les importants écart-types observés ne permettant pas d'en déduire de tendances, les coefficients de variation (CV = rapport entre l'écart-type et la moyenne) ont été calculés (Figure 39). Les coefficients de variation les plus élevés ont été observés au printemps-été lorsque les araignées de mer vivent en eaux très côtières, à la fois en 2003 et 2004. Cette variabilité aurait pu résulter d'une plus grande diversité alimentaire à cette période. Cependant lorsque l'on s'affranchit des variations saisonnières liées à la condition de l'animal en normalisant les concentrations en CB153 par rapport à la teneur en lipides (Swackhamer et Hites, 1988) (Figure 40), les coefficients de variation restent constants pendant les deux années de suivi aussi bien pour les individus de Baie de Seine (CV = 40 ± 2%) que ceux de Mer d'Iroise (CV = 52 ± 10%). Les plus faibles variations observées d'une manière générale en Baie de Seine peuvent s'expliquer par l'influence des rejets de la Seine sur l'ensemble de l'écosystème. Ce phénomène entraîne probablement une contamination plus homogène des différentes espèces benthiques des eaux très côtières et des eaux du large.

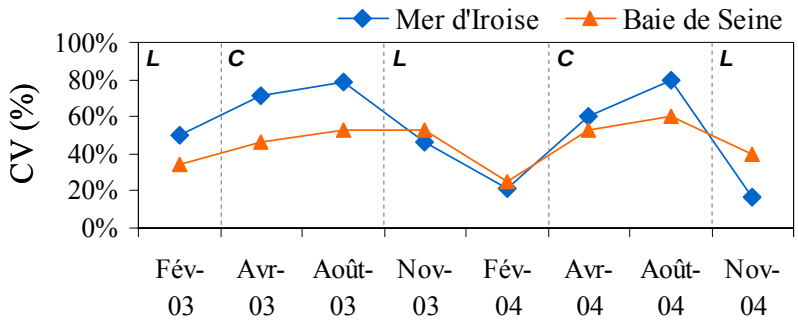

Figure 39 : Variabilité des concentrations en CB153 (ng.g^{-1}p.s.) mesurées dans l'hépatopancréas d'araignées mâles adultes (3-4 ans et 4 + ans) prélevées en 2003-2004 en Baie de Seine (symboles rouges) et Mer d'Iroise (symboles bleus). CV (%) = (écart-type) / (moyenne) × 100 ; C = eaux côtières ; L = eaux du large.

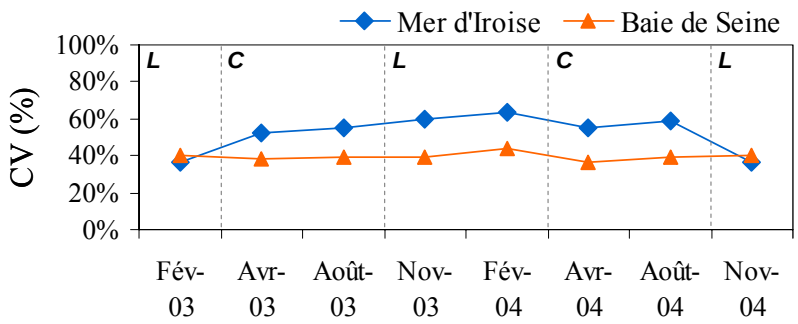

Figure 40 : Variabilité des concentrations en CB153 (ng.g^{-1}lipides) mesurées dans l'hépatopancréas d'araignées mâles adultes (3-4 ans et 4 + ans) prélevées en 2003-2004 en Baie de Seine (symboles rouges) et Mer d'Iroise (symboles bleus). CV (%) = (écart-type) / (moyenne) × 100 ; C = eaux côtières ; L = eaux du large.

L'influence du comportement migratoire de *Maja brachydactyla* sur les empreintes de contamination en PCB a également été abordée. Une différence significative de profils entre les individus prélevés à la côte et ceux prélevés au large n'a été observée qu'en Mer d'Iroise. En particulier, la contribution des congénères ne possédant que des atomes d'hydrogène vicinaux en position méta-, para-, (CB52, 101 et 149) ou bien à la fois en position méta-, para- et ortho-, para- (CB110 et 132) par rapport à la somme des PCB analysés, est supérieure chez les individus prélevés en hiver dans les eaux profondes. Précédemment (Article 4), une différence significative des signatures isotopiques en carbone et azote mesurées dans le muscle d'araignée de mer a été observée en Mer d'Iroise en relation avec le comportement migratoire de l'espèce. Les différences d'empreintes de contamination en PCB peuvent donc résulter d'un changement de la composition du régime alimentaire en relation avec les migrations saisonnières. De plus, les systèmes enzymatiques tels que le cytochrome P450 peuvent être influencés par des facteurs environnementaux tels que la saison et la température (O'Hara et al., 1982 ; Andersson et Förlin, 1992 ; Kirchin et al., 1992 ; Den Besten, 1998). La contribution plus importante des congénères CB52, 101, 110, 132 et 149 en hiver, composés métabolisés par le CYP2B chez les araignées de mer, peut résulter d'une activité métabolique plus faible de ce système enzymatique pendant cette période. Le gradient de température plus fort entre la zone côtière et celle du large en Mer d'Iroise qu'en Baie de Seine peut expliquer que ce phénomène ne s'observe qu'en Bretagne ouest.

- Influence de la reproduction

La reproduction a été rapportée par de nombreux auteurs comme processus permettant l'élimination de certains contaminants hydrophobes, tels que les PCB. En effet, chez les poissons, par exemple, la ponte peut entraîner une décontamination des tissus de la femelle en défaveur des œufs (Guiney et al., 1979 ; Swackhamer et Hites, 1988 ; Loizeau et Abarnou, 1994). Un tel phénomène a été étudié chez *Maja brachydactyla*. Les quantités de PCB mesurées chez les adultes femelles et dans les œufs, de Mer d'Iroise et Baie de Seine, sont présentées dans le tableau 23. Ces résultats correspondent à un transfert de PCB des femelles aux œufs d'environ 12% pour les individus de Mer d'Iroise et 5% pour ceux de Baie de Seine. Cette plus faible perte de contaminants chez les araignées de Baie de Seine peut être expliquée par une recontamination plus rapide des femelles adultes après la ponte, due à l'importante pollution de l'ensemble de l'écosystème. De plus, le nombre de pontes annuelles chez *Maja brachydactyla* diffère entre les deux zones d'étude : en Mer d'Iroise, l'araignée pond au minimum deux fois par an, tandis qu'une seule ponte annuelle a été notée en Baie de Seine (Le Foll, 1993). Les résultats obtenus sont donc à interpréter avec précaution. En effet, le nombre de pontes effectuées par les araignées femelles prélevées en Mer d'Iroise n'ayant pu être déterminé, l'estimation du pourcentage de perte de PCB dû à la ponte peut correspondre :

- soit à une élimination additionnelle de contaminants dans le cas de femelles ayant pondus deux fois successivement,
- soit à une sous-estimation de la décontamination des femelles adultes dans le cas d'individus n'ayant pondu qu'une fois au moment du prélèvement.

Enfin, l'élimination de contaminants engendrée par la ponte est non seulement espèce-dépendant, mais diffère également d'un individu à l'autre. Elle dépend notamment de la croissance de tissus germinaux, du nombre d'œufs par individu, ainsi que de la composition lipidique des organes reproducteurs.

Tableau 24 : Quantités de PCB mesurées dans l'organisme entier et dans les œufs d'araignées femelles adultes de Mer d'Iroise et de Baie de Seine.

	Mer d'Iroise		Baie de Seine	
Classes d'âge	3-4 ans	4 ans et +	3-4 ans	4 ans et +
n	17	8	11	6
Quantité de PCB dans les femelles (µg)	1,91 ± 0,86	6,08 ± 4,10	20,6 ± 10,8	31,8 ± 16,6
Quantité de PCB dans les œufs (µg)	0,21 ± 0,09	0,66 ± 0,21	0,85 ± 0,67	1,52 ± 1,24
Perte due à la ponte (%)	11 ± 6	12 ± 6	4 ± 3	5 ± 4

3.2. PCB et isotopes stables le long de la chaîne trophique de l'araignée de mer *Maja brachydactyla* (Article 6)

La voie trophique constitue la principale voie d'exposition des organismes supérieurs aux contaminants. Le régime alimentaire a notamment été identifié comme l'un des principaux facteurs influençant la bioaccumulation des polluants persistants chez les mammifères marins (Aguilar et al., 1999). L'objectif de ce travail était donc d'étudier ce processus dans le réseau trophique de *Maja brachydactyla*.

Les quelques études concernant le régime alimentaire de l'araignée de mer mettant en évidence un comportement opportuniste de cette espèce, des prélèvements d'un grand nombre de proies potentielles des individus adultes et juvéniles ont été effectués en mars-avril 2004 dans les eaux côtières de Baie de Seine (Antifer) et de Mer d'Iroise (Rocher du Corbin et Anse de Bertheaume) (cf Chapitre 2, paragraphe 1.3).

Dans un premier temps, l'analyse isotopique en carbone et en azote a été réalisée sur chaque espèce. Des valeurs de $\delta^{13}C$ très variables ont été observées chez les consommateurs primaires : les organismes brouteurs et déposivores présentaient un enrichissement en ^{13}C par rapport aux suspensivores. Concernant les consommateurs supérieurs, les crustacés carnivores (*Carcinus maenas*, *Necora puber*) et les échinodermes (*Asterias rubens*, *Masthasterias glacialis*) présentaient des valeurs de $\delta^{13}C$ supérieures à celles des polychètes carnivores (*Glycera rouxii*, *Nephtys hombergii*). De plus, des signatures isotopiques du carbone et de l'azote similaires ont été observées pour les espèces communes aux trois secteurs d'étude (*Hinia reticulata*, *A. rubens*, *Pagurus bernhardus*, *M. brachydactyla*).

Le niveau trophique (NT) des différentes espèces a été calculé à partir de la relation suivante (cf Chapitre 2, paragraphe 3.2) :

$$NT = 2 + (\delta^{15}N_{organisme\ n} - \delta^{15}N_{\textit{mytilus edulis}}) / 3,4$$

La moule *Mytilus edulis,* seul consommateur primaire prélevé sur les trois secteurs d'étude, a été choisie comme organisme de ligne de base de niveau trophique égal à 2 (Riera et al., 1999 ; Post, 2002). Les niveaux trophiques calculés s'étendent de NT = 2 pour les organismes suspensivores à NT = 3,9 pour les crustacés carnivores, les algues et les phanérogames présentant des valeurs inférieures (NT = 1,3 à 1,6).

Parmi les résultats obtenus, certaines espèces ont été analysées en PCB. Elles correspondent aux espèces susceptibles de faire partie du régime alimentaire de *Maja brachydactyla* et pour lesquelles la quantité de matière était suffisante pour permettre l'analyse chimique. Pour chaque secteur d'étude, les plus faibles concentrations en CB153 ont été mesurées dans le sédiment et les algues, suivis des organismes déposivores, nécrophages, brouteurs, suspensivores et finalement les espèces carnivores-omnivores, *Maja brachydactyla* présentant les teneurs en CB153 les plus élevées. Les résultats obtenus ont également mis en évidence des concentrations en CB153, 3 à 60 fois plus élevées chez les espèces prélevées en Baie de Seine que chez celles de Mer d'Iroise. Ceci suggère une contamination en PCB relativement forte d'espèces de niveaux trophiques variés et donc de l'ensemble de l'écosystème de la Baie de Seine, ce en dépit de la restriction sur l'utilisation de ces substances en Europe depuis les années 70. A l'inverse, les teneurs mesurées en Mer d'Iroise montrent une faible contamination en PCB de la zone. Cependant, des concentrations en CB153, 1,5 à 2,5 fois plus fortes ont été mesurées chez les organismes prélevés dans l'anse de Bertheaume, comparés à ceux provenant du Rocher du Corbin. L'anse de Bertheaume, zone abritée des plus fortes houles d'ouest et sud-ouest, se situe à la sortie de la Rade de Brest, et est donc soumise aux rejets industriels et urbains de la ville de Brest (Marchand et al., 1983). A l'inverse, ces apports de contaminants dus à l'influence de la Rade de Brest sont rapidement évacués vers le large au niveau du Rocher du Corbin, secteur très peu abrité, soumis à d'importants courants océaniques.

L'étude des profils de PCB a mis en évidence une augmentation de la proportion des congénères fortement chlorés en relation avec le niveau trophique des espèces (Figure 41). Par exemple, chez les macroalgues (*C. officinalis, L. digitata*) et les phanérogames marines (*Z. marina*), les composés prédominants étaient les penta- et hexachlorobiphényles, et inversement dans le cas du sédiment. Concernant les invertébrés benthiques, des empreintes de contamination similaires ont été observées pour les espèces présentant le même mode

d'alimentation. Les organismes brouteurs (*Echinus esculentus*, *Gibbula umbilicalis*, *Patella vulgata*) sont caractérisés par une empreinte de PCB proche de celle observée dans les algues et phanérogames, tandis que les profils mesurés chez les déposivores correspondent d'avantage à ceux du sédiment. Enfin, les nécrophages (*Hinia reticulata*), ainsi que les carnivores et omnivores sont caractérisés par la prédominance des hexa- puis heptachlorobiphényles. De nombreux auteurs ont également observés une augmentation de ces PCB fortement chlorés en relation avec le niveau trophique des espèces (Ruus et al., 2002 ; Muir et al., 1988 ; Oliver et Niimi, 1988), du fait de leur fort potentiel de bioaccumulation (McFarland et Clarke, 1989).

Aucune différence de profil n'a été notée pour une même espèce entre les trois zones d'étude (Figure 41). Ces résultats confirment ceux précédemment obtenus sur la contamination des crustacés en Bretagne et Normandie (Article 1 et 2) suggérant que les empreintes de PCB restent plus ou moins inchangées quels que soient la zone géographique et les niveaux de contamination mesurés, mais qu'elles sont fortement dépendantes d'une part des propriétés physico-chimiques des composés, et d'autre part de l'espèce étudiée (régime alimentaire, capacités de métabolisation).

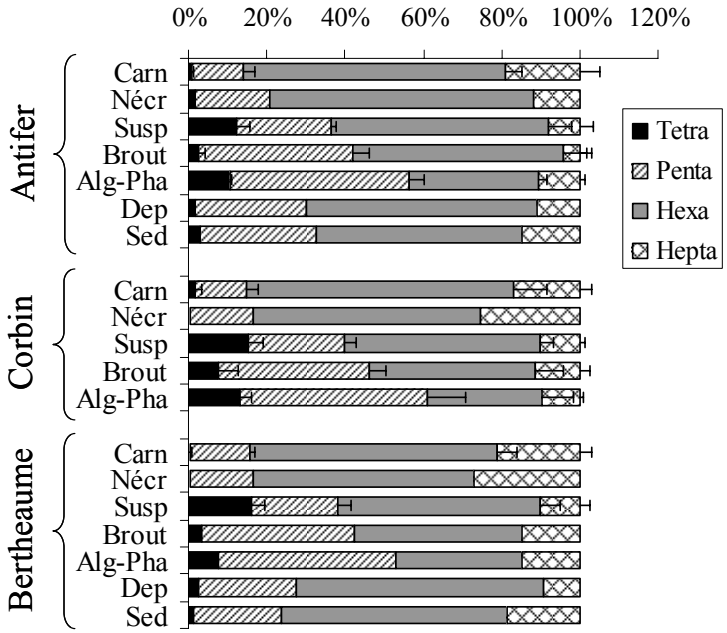

Figure 41 : Contribution des isomères de PCB à la somme des congénères analysés (Σ_{14}PCB) dans les différents maillons de la chaîne trophique de *Maja brachydactyla* en Baie de Seine (Antifer) et en Mer d'Iroise (Rocher du Corbin et anse de Bertheaume). Sed = sédiment ; Dep = déposivores ; Alg-Pha = algues et phanérogames ; Brout = brouteurs ; Susp = suspensivores ; Nécr = nécrophages ; Carn = carnivores-omnivores.

Afin d'étudier le devenir des PCB le long de la chaîne trophique de l'araignée de mer, les concentrations mesurées dans les échantillons et exprimées par rapport à la quantité de lipides ont été reliées au niveau trophique de l'espèce (Figure 42).

Pour chaque secteur d'étude, une corrélation linéaire significative a été mise en évidence entre le niveau trophique des individus et les concentrations en PCB caractérisés par l'absence d'atomes d'hydrogène vicinaux en positions méta-, para et ortho-, méta- (par exemple le CB153), ainsi que ceux présentant seulement des atomes d'hydrogène vicinaux en position ortho-, méta- (par exemple CB118). Ces congénères sont donc bioamplifiés le long de la chaîne trophique de l'araignée de mer (Kannan et al., 1995b). Un facteur de bioamplification (FBCT) correspondant au coefficient de pente des équations obtenues a été déterminé pour les différents PCB (Fisk et al., 2001). Pour les trois secteurs d'étude, les PCB présentant les plus forts FBCT correspondaient aux penta- (CB118), hexa- (CB153) et heptachlorobiphényles (CB170, CB180) substitués en positions 2,4,5. Ces congénères sont très persistants, fortement bioaccumulables et non métabolisables par les organismes (Kannan et al., 1995b). De plus, les valeurs de FBCT les plus fortes pour chaque PCB ont été observées le long de la chaîne trophique du Rocher du Corbin, suivie de celle d'Antifer puis de l'anse de Bertheaume. Ce résultat reflète principalement les différences de niveaux de contamination des espèces de faibles niveaux trophiques (algues, déposivores, brouteurs, suspensivores) entre les secteurs d'étude.

Concernant les PCB ne possédant que des atomes d'hydrogène vicinaux en position méta-, para-, ou bien à la fois en position méta-, para- et ortho-, para- (par exemple CB132 et 149), une relation polynomiale a été observée entre les concentrations de ces congénères et le niveau trophique des espèces. Cependant, après retrait des données concernant les crustacés décapodes (araignée de mer, étrille, tourteau et bernard-l'ermite), des relations linéaires significatives ont finalement été obtenues. Ces résultats confirment ceux déjà avancés dans les articles 1, 2 et 5, à savoir que ces PCB sont fortement métabolisés par les crustacés, dû à la présence du cytochrome CYP2B.

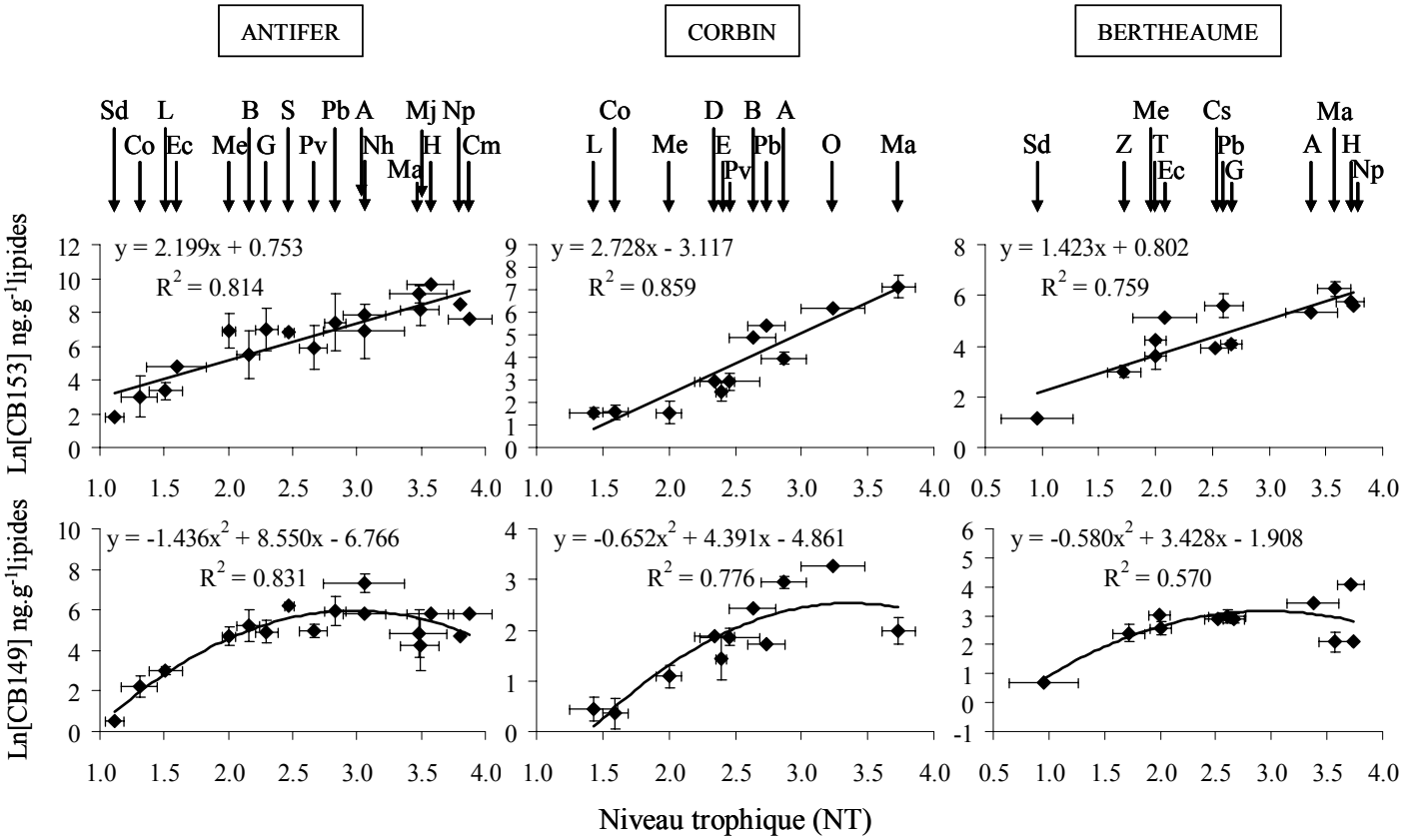

Figure 42 : Relations entre le niveau trophique (NT) et les concentrations en PCB (Ln[CBx]-normalisé par rapport aux lipides) le long de la chaîne trophique de *Maja brachydactyla* en Baie de Seine (Antifer) et en Mer d'Iroise (Rocher du Corbin et anse de Bertheaume). A = *Asterias rubens*; B = *Balanus sp.*; Cm = *Carcinus maenas*; Co = *Corallina officinalis*; Cs = *Chamelea striatula*; D = *Dosinia exoleta*; E = *Echinus esculentus*; Ec = *Echinocardaium cordatum*; G = *Gibbula umbilicalis*; H = *Hinia reticulata*; L = *Laminaria digitata*; Ma = *Maja brachydactyla* (Adultes); Mj = *Maja brachydactyla* (Juvéniles); Me = *Mytilus edulis*; Nh = *Nephtys hombergii*; Np = *Necora puber*; O = *Ophiura textura*; Pb = *Pagurus bernhardus*; Pv = *Patella vulgata*; S = *Spisula solida*; Sd = sediment; T = *Tellina tenius*; Z = *Zostera marina.*

3.3. Conclusion

Les principaux résultats de cette seconde partie peuvent donc être résumés ainsi :

- Chez *Maja brachydactyla*, le régime alimentaire et l'âge des individus constituent les principaux facteurs influençant la bioaccumulation des polychlorobiphényles. La reproduction via la ponte n'entraîne qu'une faible décontamination des araignées

femelles. Enfin, le comportement migratoire de l'espèce n'a pas d'effet direct sur les concentrations en PCB.

- Les empreintes de contamination en PCB varient en fonction du sexe et, uniquement pour les araignées de Mer d'Iroise, du comportement migratoire. L'hypothèse de la variabilité de l'activité enzymatique de cytochrome P450 chez cette espèce, du à des facteurs environnementaux (température du milieu) et biologiques (métabolisme hormonal), a été avancée. Le changement de régime alimentaire lié aux migrations saisonnières des araignées de Mer d'Iroise est également un élément d'explication des variations d'empreintes de PCB observées.

- L'étude de la contamination de la chaine trophique de l'araignée de mer a révélé une augmentation des concentrations en PCB avec le niveau trophique des espèces ; *Maja brachydactyla* présente les plus fortes teneurs en polychlorobiphényles.

- Au sein du réseau trophique de *Maja brachydactyla*, les empreintes de PCB sont caractérisées par une augmentation de la proportion des congénères fortement chlorés en relation avec le niveau trophique des espèces.

- L'utilisation des rapports isotopiques de l'azote en parallèle de la mesure des concentrations en PCB le long de la chaîne trophique de l'araignée de mer a permis d'une part d'identifier les composés bioamplifiés, et d'autre part de confirmer la capacité des araignées de mer et d'autres crustacés décapodes à métaboliser certains composés.

Conclusion et perspectives

Les polluants organiques persistants tels que les PCB, les dioxines et les PBDE font aujourd'hui l'objet d'une préoccupation mondiale. En effet, ces substances chimiques faiblement biodégradables et ubiquitaires, se bioaccumulent dans les tissus adipeux des organismes vivants, et se propagent le long des chaînes alimentaires. Les importantes concentrations mesurées chez les prédateurs supérieurs, ainsi que leur fort potentiel toxique, ont conduit de nombreuses équipes de recherche à s'intéresser au devenir de ces substances dans l'environnement, et en particulier aux processus de bioaccumulation dans les organismes vivants. La voie principale d'exposition de l'homme à ces contaminants organohalogénés ayant été identifiée comme étant la voie alimentaire, les espèces ciblées dans le cadre de ces études constituent des produits consommables par l'homme.

La contamination des crustacés décapodes par des substances organiques n'a été que très peu étudiée jusqu'à présent, et particulièrement en Europe. Ces espèces constituent pourtant une part non négligeable de produits aquatiques consommés par l'homme, notamment en ce qui concerne la population française. Ce sont des organismes benthiques constituant le maillon final de chaînes trophiques complexes, et vivant pour une grande majorité dans les eaux très côtières. Les crustacés décapodes sont donc des espèces potentiellement soumises aux pollutions chimiques organiques, à priori accumulatrices et donc à terme potentiellement menaçantes pour la santé humaine.

L'objet de cette thèse était d'étudier la bioaccumulation des contaminants organohalogénés chez les crustacés décapodes. Deux grandes parties ont été distinguées pour réaliser cette étude : d'une part un état des lieux de la contamination de quatre espèces de crustacés par différentes familles de contaminants (PCB, dioxines et PBDE) et d'autre part, une étude plus approfondie sur les processus biologiques influant sur la bioaccumulation des polychlorobiphényles chez l'araignée de mer *Maja brachydactyla*. Les résultats de ce travail permettent de répondre en partie à ces interrogations.

Cependant plusieurs aspects du taxon choisi sont encore mal connus. Pour atteindre l'objectif fixé il a donc été nécessaire dans un premier temps de réfléchir à la meilleure façon d'aborder le modèle et de l'analyser. Ainsi au niveau des analyses chimiques des tissus des crustacés, il a été mis en évidence une accumulation préférentielle des PCB au sein de l'hépatopancréas, tissu le plus riche en lipides. Cet organe constituant également le siège des activités enzymatiques responsables de la biotransformation des xénobiotiques, a donc été choisi comme tissu cible dans la seconde partie de l'étude portant sur les processus qui

influent sur la bioaccumulation des PCB. Par contre dans la première partie où l'objectif était l'évaluation de la qualité des crustacés mis sur le marché, l'analyse des PCB (marqueurs et dioxine-like), des dioxines et des PBDE s'est focalisée sur le muscle, partie la plus consommée.

La nécessité de mieux connaître le régime alimentaire de l'espèce choisie comme cible dans la seconde partie de l'étude a conduit à utiliser une méthode plus rapide et pertinente que les techniques classiques, peu adaptées à l'espèce. La technique de l'analyse des isotopes stables du carbone et de l'azote a été retenue d'une part pour identifier les niveaux trophiques et analyser les variations d'alimentation de l'araignée de mer, et d'autre part pour comprendre le devenir des contaminants dans le réseau trophique complexe de ce décapode. Les isotopes stables du carbone et dans une moindre mesure ceux de l'azote étant influencés par la teneur en lipides du tissu concerné, la question d'un prétraitement de délipidation avant l'analyse isotopique s'est posée. Les résultats obtenus montrent que ce prétraitement ou l'utilisation d'équations de normalisation des rapports isotopiques du carbone et de l'azote permettent de s'affranchir de façon satisfaisante de cette variabilité. Cependant cette méthode n'est pas toujours nécessaire ou ne peut parfois être appliquée. Ainsi dans le cadre de cette étude, la variation de la composition isotopique stable de l'araignée de mer en fonction de son cycle de vie a été étudiée sur le muscle. Ce tissu possède un temps d'intégration plus long que l'hépatopancréas permettant de s'affranchir des variations dues au caractère opportuniste de l'espèce (l'araignée de mer présente en effet, un régime alimentaire très varié dépendant de la zone de localisation). La très faible teneur en lipides du muscle permet également d'éviter l'étape de délipidation. Enfin, dans des études de réseau trophique faisant appel à un grand nombre d'espèces de taille parfois réduite, la trop faible quantité de matière disponible ne permet pas toujours de réaliser cette délipidation par la méthode d'extraction préconisée ici. C'est le cas dans l'étude du réseau trophique de *Maja brachydactyla*.

L'ensemble de ces travaux a permis de caractériser la contamination des crustacés décapodes marins par les composés organohalogénés de la façon suivante :

➢ Les **niveaux** de contamination sont dépendants de la **zone géographique** étudiée, c'est-à-dire des sources de contamination.

Parmi les secteurs géographiques choisis, la baie de Seine apparaît systématiquement comme zone la plus alarmante. « Déversoir » des rejets de la Seine, elle constitue un milieu fortement contaminé dans lequel les crustacés décapodes qui y vivent sont exposés à diverses

substances chimiques. A l'inverse, une faible contamination caractérise la Bretagne et l'Ouest Contentin, du fait de l'absence de sources majeures de contamination par les PCB, PBDE et dioxines.

Cependant, d'importantes différences en termes de niveaux de contamination ont été observées entre les trois familles de contaminants. Les crustacés d'Atlantique et de la Manche présentent des niveaux élevés et très hétérogènes en PCB (de l'ordre du nanogramme par gramme à la centaine de nanogrammes par gramme de poids sec dans le muscle). A l'inverse, en ce qui concerne les dioxines et PBDE, des niveaux très faibles et moins variables ont été observés, dénotant une faible contamination des eaux côtières par ces substances (de l'ordre de la dizaine à la centaine de picogrammes par gramme de poids sec). Les domaines d'utilisation différents ainsi que les temps de mise sur le marché (dans le cas des PCB et PBDE) très variables entre les trois familles de contaminants expliquent un tel constat

L'analyse de la contamination de l'araignée de mer par les PCB a également confirmé ce résultat. En mer d'Iroise, du fait de la diversité des biotopes dans lesquels *Maja brachydactyla* vit ou traverse lors de ses migrations saisonnières, les araignées de mer sont exposées à des sources de contamination relativement variées. Ainsi, les juvéniles de l'anse de Bertheaume, située à la sortie de la rade de Brest et soumise à des rejets anthropiques, présentent des niveaux de contamination en PCB plus élevés que les jeunes adultes du Rocher du Corbin, zone sous forte influence océanique.

➢ Les **empreintes** de contamination sont dépendantes de **l'espèce**, en particulier de ses capacités de métabolisation.

La comparaison des empreintes de contamination des crustacés décapodes, avec celles du bar et de la moule dans les deux sites étudiés permet de mettre en évidence des différences entre espèces. En ce qui concerne les PCB, un fort potentiel de métabolisation est observé chez les décapodes. En particulier, le système enzymatique cytochrome P450 2B y est responsable de la biotransformation des congénères ne possédant que des atomes d'hydrogène vicinaux en position méta-, para-, ou bien à la fois en position méta-, para- et ortho-, para-. L'étude du réseau trophique de *Maja brachydactyla* a confirmé cette capacité. En effet, seuls ces congénères ont été identifiés comme n'étant pas bioamplifiés le long de la chaîne trophique de l'araignée de mer. Enfin, l'analyse des PCB chez l'araignée de mer a révélé des empreintes de contamination relativement constantes tout au long de la vie de l'espèce. L'importante capacité de métabolisation de ces composés confère donc aux crustacés

décapodes une empreinte de contamination par les PCB « épurée », et ainsi lisse d'éventuelles variations.

En ce qui concerne les PBDE, les crustacés décapodes semblent posséder certaines capacités de biotransformation, qui seraient cependant moins évidentes que chez les poissons. Ces contaminants font l'objet de travaux de recherche depuis peu, et les processus de métabolisation sont encore mal connus. Aucun système enzymatique responsable de la biotransformation des PBDE n'a encore été clairement mis en évidence. Une dégradation d'origine microbienne a notamment été avancée par certaines équipes de recherche.

Enfin, contrairement aux PCB et PBDE, la distribution des dioxines dépend davantage des sources de contamination auxquelles les crustacés sont exposés, impliquant une très faible capacité de métabolisation.

Au vu de l'ensemble de ces résultats, les crustacés décapodes peuvent donc être utilisés en tant qu'espèces **bioindicatrices** dans le cadre de programmes de surveillance de la pollution marine par les dioxines. Par contre, dans le cadre d'une étude d'évaluation de la présence de PCB et PBDE dans le milieu, il devra être tenu compte des capacités de métabolisation plus ou moins importantes de ces décapodes.

Du fait de leur intérêt commercial, et surtout de leur consommation occasionnelle mais non négligeable, il était important d'évaluer la **qualité des crustacés décapodes** mis sur le marché. Ainsi, au regard des normes sanitaires actuelles (DJA, dose journalière admissible) quant à la présence de dioxines et PCB dans les produits de la mer et des concentrations mesurées au cours de ce travail, la consommation de chair de crustacés de Bretagne et Normandie ne pose aucun problème de santé publique. L'hépatopancréas et les gonades étant également appréciés par certains consommateurs, des analyses de PCB marqueurs et une estimation des concentrations en PCB dioxine-like ont été réalisées. Seuls les crustacés provenant de baie de Seine présentent des teneurs en contaminants dans ces tissus supérieures aux normes de sécurité alimentaire.

La seconde partie de ce travail s'est attachée à l'étude des processus biologiques influant sur la bioaccumulation des PCB chez l'araignée de mer *Maja brachydactyla*. Ces processus biologiques, alimentation, âge, taille, reproduction, comportement…, ou physiques comme la

température, peuvent influer à la fois sur la **quantité** de polluants bioaccumulés chez l'animal mais aussi sur la **qualité** de ces contaminants (empreintes), c'est à dire sur la métabolisation.

D'un point de vue quantitatif, le facteur trophique apparaît primordial. La principale voie d'exposition des prédateurs supérieurs aux contaminants organiques est la voie trophique. La plupart des PCB, du fait de leur persistance et de leur caractère lipophile, sont bioamplifiés le long de la chaîne alimentaire de l'araignée de mer conduisant à des niveaux largement supérieurs à ceux des niveaux trophiques inférieurs.

L'âge des individus constitue le second facteur d'influence sur les niveaux de contamination en PCB. En effet, n'étant que faiblement éliminés, ces composés sont accumulés tout au long de la vie de *Maja brachydactyla* conduisant à des niveaux très élevés chez les individus les plus âgés. L'augmentation des concentrations en PCB en fonction de la taille chez les araignées juvéniles, seule phase de vie pendant laquelle taille et âge sont corrélés, confirme également ce résultat.

Parmi les différentes fonctions biologiques, la reproduction constitue un processus important sur le devenir des contaminants. Cette fonction permet l'élimination de quantité de contaminants organiques non négligeables au détriment de la progéniture. Ce phénomène a été démontré chez de nombreuses espèces, tels que les poissons, les mammifères marins et les oiseaux. Chez *Maja brachydactyla*, ce processus a également été mis en évidence, mais dans une moindre mesure. En effet, la ponte des individus femelles adultes entraîne un faible transfert de PCB des tissus mous vers les œufs. Cependant, pour mieux appréhender ce transfert une bonne connaissance du cycle biologique de la population concernée est nécessaire notamment en ce qui concerne le nombre de pontes annuelles qui peut varier géographiquement.

Le point de vue qualitatif est abordé à travers l'étude de l'évolution des empreintes de contamination tout au long de la vie de l'araignée de mer. La reproduction y joue un rôle non négligeable. En effet, des profils de PCB différents ont été observés chez les individus adultes femelles, en période de maturation des gonades, comparé au reste de la population. Plusieurs auteurs ont ainsi démontré chez certaines espèces de poissons et d'échinodermes, l'influence du métabolisme hormonal sur l'activité du cytochrome P450 lors de la gamétogenèse. Un tel processus, en particulier une augmentation de l'activité de l'isoforme CYP 1A, pourrait exister chez l'araignée de mer.

D'autres facteurs peuvent être évoqués tels que des variations de température qui pourraient influer sur l'activité enzymatique du cytochrome P450 2B chez *Maja brachydactyla*. En mer d'Iroise, des différences d'empreintes de PCB chez les araignées adultes mâles ont été observées entre l'habitat très côtier et celui plus au large en relation avec le comportement migratoire de l'espèce. Cependant, la composition isotopique en carbone et azote étant différente entre les araignées prélevées à la côte et au large, l'hypothèse de l'influence d'une variation du régime alimentaire sur les empreintes de contamination ne peut être écartée.

Les résultats obtenus lors de ces travaux ouvrent de nombreuses perspectives et demandent la réalisation d'études complémentaires afin de mieux comprendre certains phénomènes observés.

Le rôle de l'activité du cytochrome P450 a été pressenti tout au long de cette étude. Des dosages de l'activité enzymatique de ce cytochrome, en particulier les isoformes CYP1A et CYP2B, par des techniques immunologiques (méthode ELISA) permettraient de confirmer les capacités de métabolisation des PCB chez l'araignée de mer, et les crustacés décapodes en général. De même, l'étude de la variabilité de ces systèmes enzymatiques en fonction de l'âge, de la reproduction, ainsi que de facteurs environnementaux est à envisager.

Même si l'analyse des isotopes stables du carbone et de l'azote apporte des informations précieuses sur les niveaux trophiques et les variations des régimes alimentaires en fonction du cycle de vie d'une espèce, de nombreuses incertitudes persistent quant à l'interprétation des résultats. Ainsi, l'influence des lipides sur les signatures isotopiques de l'azote et du carbone devrait être approfondie. En particulier, d'autres techniques de délipidation avant analyses devraient être envisagées, testées et comparées sur différentes matrices biologiques, notamment sur divers taxons. De plus, la caractérisation des classes de lipides permettrait de mieux comprendre la variabilité de l'analyse isotopique stable.

Enfin, une autre perspective serait de développer un modèle sur le devenir des contaminants organiques chez l'araignée de mer, qui soit applicable sur différentes zones géographiques, et pour plusieurs familles de contaminants. Les résultats acquis dans cette étude ont permis de mettre en évidence l'importance de fonctions physiologiques telles que l'alimentation, la croissance, la reproduction et la métabolisation sur le devenir des PCB chez *Maja*

brachydactyla. Ainsi le modèle devra paramétrer correctement ces fonctions et prendre en compte les effets potentiels des contaminants sur celles-ci, afin d'être utilisé comme outil prédictif de l'exposition d'une espèce représentative de la zone côtière aux contaminants chimiques.

Pour répondre à cet objectif l'approche intégrée, proposée par Kooijman (2000) dans sa théorie DEB (Dynamic Energy Budgets) semble particulièrement adaptée. En effet, cette approche décrit quantitativement, par des modèles mathématiques réalistes, les grandes fonctions biologiques des organismes (nutrition, digestion, croissance, maintenance et vieillissement) en se basant sur des flux d'énergie. La quantité d'énergie par individu détermine sa survie, sa vitesse de croissance et sa fécondité ; le contaminant est considéré comme perturbateur de l'utilisation de l'énergie en entraînant une déperdition ou une mauvaise gestion de celle-ci. Dans un premier temps, il s'agira donc de comprendre comment, dans le cas de l'araignée de mer, cette énergie issue de l'alimentation est répartie entre les principales fonctions biologiques que sont la croissance, la maintenance et la reproduction. Les résultats obtenus lors de cette étude, ainsi que la particularité de croissance de cette espèce (mue terminale) faciliteront une telle approche. Ensuite, la modélisation des effets des contaminants sur les individus permettra de caractériser non seulement l'importance de ces effets, mais également la cinétique et le mode d'action du contaminant. Pour cela les résultats obtenus dans cette étude, sur les empreintes de contamination, complétés par le développement d'un volet expérimental en milieu contrôlé seront des outils indispensables. Enfin, le passage de l'individu à la population pourra être envisagé à l'aide de bilans énergétiques permettant de prédire les effets des contaminants sur la densité de population et la biomasse.

Références bibliographiques

Abarnou A., Burgeot T., Chevreuil M., Leboulenger F., Loizeau V., Madoulet-Jaouen A., Minier C., 2000. "Les contaminants organiques: quels risques pour le monde vivant?," Fascicule Seine-Aval, 35 pp.

Abarnou A., Fraisse D., 2002a. Dioxins and dioxin-like PCBs in mussels and fishes from the French coastal waters. Organohalogen Compd. 56, 469-472.

Abarnou A., Loizeau V., Le Guellec A-M., Jaouen-Madoulet A., 2002b. Contaminants in marine foodwebs. Revue Méd. Vét. 153, 425-432.

ADEME, 1996. Résumé des conférences de la journée technique : Faut-il avoir peur des dioxines ? Paris, France, 30 pp.

AFSSA, 2003. Avis de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments sur l'existence éventuelle d'une corrélation significative entre les teneurs dans les différents congénères de PCB. Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France section Aliments et Nutrition. Saisine n°2002-SA-0149, France.

Aguilar A., Borrel A., Pastor T., 1999. Biological factors affecting variability of persistent pollutant levels in cetaceans. J. Cetacean Res. Manage. (Special Issue 1) 83-116.

Ahlborg U.G., Becking G.C., Birnbaum L.S., Brouwer A., Derks H.J.G.M., Feeley M., Golor G., Hanberg A., Larsen J.C., Liem A.K.D., 1994. Toxic equivalency factors for dioxin-like PCBs: Report on WHO-ECEH and IPCS consultation, December 1993. Chemosphere 28, 1049-1067.

Andersson T., Förlin L., 1992. Regulation of the cytochrome P450 enzyme system in fish. Aquatic Toxicol. 24, 1-20.

Anon., 2005. Report of the study group on the biology and life history of crabs. ICES CM 2005 / G :10, Ref D, 59 pp.

Baal H.J., 1953. Behaviour of spider crabs in the presence of Octopus. Nature. Lond. 171, 887.

Baker J.I., Hites R.A., 2000. Is combustion the major source of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans to the environment? A mass balance investigation. Environ. Sci. Technol. 34, 2879-2886.

Ballschmiter K, Zell M., 1980. Analysis of polychlorinated biphenyls (PCB) by glass capillary gas chromatography. Fresenius J. Anal. Chem. 302, 20-31.

Bennett D.B., 1995. Factors in the life history of the edible crab (*Cancer pagurus* L.) that influence modelling and management. ICES Mar. Sci. Symp. 199, 89-98.

Berge J.A., Brevik E.M., 1996. Uptake of metals and persistent organochlorines in crabs (*Cancer pagurus*) and flounder (*Platichthys flesus*) from contaminated sediments: Mesocosm and field experiments. Mar. Pollut. Bull. 33, 46-55.

Bernárdez C., Freire J., González-Gurriarán E., 2000. Feeding of the spider crab *Maja squinado* in rocky subtidal areas of the Ría de Arousa (north-west Spain). J Mar Biol Ass UK 80, 95-102.

Bernes C., 1998. Persistent organic pollutants. Monitor 16. Swedish Environmental Protection Agency. ISBN 91-620-1189-8.

Bieniek D., Bahadir M., Korte F., 1989. Formation of heterocyclic hazardous compounds by thermal degradation of organic compounds. Heterocycles 28, 719-722.

Boon J., Eijgenraam F., Everaats J., Duinker J.C., 1989. A structure-activity relationship (SAR) approach towards metabolism of PCBs in marine animals from different trophic levels. Mar. Environ. Res. 27, 159-176.

Boon J.P., Lewis W.E., Tjoen-A-Choy M.R., Allchin C.R., Law R.J., de Boer J., Ten Hallers-Tjabbes C.C., Zegers B.N., 2002. Levels of polybrominated diphenyl ether (PBDE) flame retardants in animals representing different trophic levels of the North Sea food web. Environ. Sci. Technol. 36, 4025-4032.

Bourdon R., 1965. Décapodes. Stomatopodes. In: S. b. d. Roscoff (ed). Inventaire de la faune marine, Roscoff. 45 pp.

Bragigand V., 2005. Recherches écotoxicologiques sur les retardateurs de flamme bromés dans les écosystèmes estuariens (Estuaires de Loire et de Seine). Thèse de doctorat, Faculté de Pharmacie, Nantes, France, 250 pp.

Bright D.A., Dushenko W.T., Grundy S.L., Reimer K.J., 1995. Effects of local and distant contaminant sources: polychlorinated biphenyls and other organochlorines in bottom-dwelling animals from an Arctic estuary. Sci. Total Environ. 160/161, 265-283.

Brochu C., Moore S., Pelletier E., 1995. Polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans in sediments and biota of the Saguenay Fjord and the St Lawrence Estuary. Mar. Pollut. Bull. 30, 515-523.

Brosnan D.M., 1981. Studies on the biology, ecology and fishery of the spider crab *Maia squinado* Herbst (1788) off the West Coast of Ireland. M. Sc. Thesis. University College, Galway.

Brown C.G., Bennett D.B., 1980. Population and catch structure of the edible crab (*Cancer pagurus*) in the English Channel. J. Cons. 39, 88-100.

Brown J., John F., 1992. Metabolic alterations of PCB residues in aquatic fauna: distributions of cytochrome P4501A- and P4502B-like activities. Mar. Environ. Res. 34, 261-266.

Brown M.P., Mc Laughin J.J.A., O'Connor J.M., Wyman K., 1982. A mathematical model of PCB accumulation in plankton. Ecol. Modelling 15, 29-47

Cabana G., Rasmussen J.B., 1996. Comparison of aquatic food chains using nitrogen isotopes. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93, 10844-10847.

Cai Z., Ramanujam V.M.S., Gross M.L., 1994. Levels of polychlorodibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans in crab tissues from the Newark/Raritan Bay system. Environ. Sci. Technol. 28, 1528-1534.

Carlisle D.B., 1957. On the hormonal inhibition of moulting in decapod Crustacea. II. The terminal anecdysis in crabs. J. Mar. Biol. Ass. UK 36, 291-307.

Chapman C.J., Rice A.L., 1971. Some direct observations on the ecology and behaviour of the Norway lobster *Nephrops norvegicus* (L.). Mar. Biol. 10, 321-329.

Claisse D., 1989. Chemical contamination of French coasts: the results of ten years mussel watch. Mar. Pollut. Bull. 20, 523-528.

Cole M.L., Valiela I., Kroeger K.D., Tomasky G.L., Cebrian J., Wigand C., McKinney R.A., Grady S.P., Da Silva M.H.C., 2004. Assessment of a $\delta^{15}N$ isotopic method to indicate anthropogenic eutrophication in aquatic ecosystems. J. Environ. Qual. 33, 124-132

Connell D.W., 1987. Age to PCB concentration relationship with the striped bass (*Morone saxatilis*) in the Hudson River and Long Island Sound. Chemosphere 16, 1469-1474.

Czuczwa J.M., Hites R.A., 1986. Airborne dioxins and dibenzofurans: sources and fates. Environ. Sci. Technol. 20, 195-200.

De Boer J., de Boer K., Boon J.P., 2000. Polybrominated biphenyls and diphenylethers. New Types of Persistent Halogenated Compounds 3, 61-95.

De Kergariou G., 1971. L'araignée de mer *Maia squinado* L. sur le littoral de Bretagne. Bull Inst Pêches Marit 205, 11-19.

De Kergariou G., 1974. Régime alimentaire de *Maja squinado*. ICES CM 1974/K:36, 6 pp.

De Niro M.J., Epstein S., 1977. Mechanism of isotope carbon fractionation associated with lipid synthesis. Science 197, 261-263.

De Niro M.J., Epstein S., 1978. Influence of diet on the distribution of carbon isotopes in animals. Geochim. Cosmochim. Acta 42, 495-506

De Niro M.J., Epstein S., 1981. Influence of diet on the distribution of nitrogen isotopes in animals. Geochim. Cosmochim. Acta 45, 341-351

De Wit C., 2000. Brominated Flame Retardants. Swedish Environmental Protection Agency. Report 5065, 95 pp.

Del Giorgio P.A., France R.L., 1996. Ecosystem-specific patterns in the relationship between zooplancton and POM or microplancton $\delta^{13}C$. Limnol. Oceanogr. 41, 359-365.

Den Besten P.J., 1998. Cytochrome P450 monooxygenase system in echinoderms. Comp Biochem Physiol 121C, 139-146.

Domingo J.L., 2004. Human exposure to polybrominated diphenyl ethers through the diet. J. Chromatogr. 1054A, 321-326.

D'Udekem d'Acoz C., 1999. Inventaire et distribution des crustacés décapodes de l'Atlantique nord-oriental, de la Méditerranée et des eaux continentales adjacentes au nord de 25°N. Collection "Patrimoines Naturels" (Mus. natn. Hist. nat.), Paris, France, 40, 1-383.

Dufour E., Gerdeaux D., 2001. Apports des isotopes stables ($^{13}C/^{12}C$, $^{15}N/^{14}N$, $^{18}O/^{16}O$, $^{36}S/^{34}S$, $^{87}Sr/^{86}Sr$) aux études écologiques chez les poissons. Cybium 25, 369-382

Environment Canada, 1985. Meeting Background Report, Vol. IV. Preparé pour le International Experts Meeting on Persistent Organic Pollutants Towards Global Action, Vancouver, Canada.

Fahy E., Hickey J., Perella N., Hervas A., Carroll J., Andray C., 2004. Bionomics of brown crab *Cancer pagurus* in the south east Ireland inshore fishery. Ir. Fish. Invest. 12, 30 pp.

Farmer A.S.D., 1974a. Field assessments of diurnal activity in Irish Sea populations of the Norway lobster, *Nephrops norvegicus* (L.) (Decapoda: Nephropidae). Estuar. Coast. Mar. Sci. 2, 37-47.

Farmer A.S.D., 1974b. Burrowing behaviour of the Norway lobster *Nephrops norvegicus* (L.) (Decapoda: Nephropidae). Estuar. Coast. Mar. Sci. 2, 49-58.

Farmer A.S.D., 1975. Synopsis of the biological data on the Norway lobster *Nephrops norvegicus* (Linnaeus, 1758). FAO Fish. Synop. 112, 1-97.

Fernández L., Parapar J., González-Gurriarán E., Muiño R., 1998. Epibiosis and ornemental cover patterns of the spider crab *Maja squinado* on the Galician coast, northwestern Spain: influence of behavioral and ecological characteristics of the host. J. Crust. Biol. 18, 728-737.

Fisk A.T., Hobson K.A., Norstrom R.J., 2001. Influence of chemical and biological factors on trophic transfer of persistent organic pollutants in the Northwater Polynya marine food web. Environ. Sci. Technol. 35, 732-738.

Freire J., González-Gurriarán E., 1995. Feeding ecology of the velvet swimming crab *Necora puber* in mussel raft areas of the Ría de Arousa (Galicia, NW Spain). Mar. Ecol. Prog. Ser. 119, 139-154.

García-Flórez L., Fernández-Rueda P., 2000. Reproductive biology of spider crab females (*Maja brachydactyla*) off the coast of Asturias (north-west Spain). J. Mar. Biol. Ass. U.K. 80, 1071-1076.

Gentil F., 1976. Distribution des peuplements benthiques en baie de Seine. Thèse de doctorat, Université Paris VI, France.

Gentil F., Cabioch L., 1997. Les biocénoses subtidales macrobenthiques de la Manche, conditions écologiques et structure générale. In: J-C. Dauvin (ed). Les biocénoses marines et littorales françaises des côtes Atlantique, Manche et Mer du Nord: synthèse, menaces et perspectives. Collection Patrimoines naturels: Série Patrimoine écologique, 28, pp. 68-78,

Georgiades E.T., Temara A., Holdway D.A. Influence of the reproductive cycle on cytochrome P450 levels in the sea star *Coscinasterias muricata*. Mar. Pollut. Bull., Sous presse.

Ghashghaie J., Tcherkez G., Cornic CG., Deleens E., 2001. Utilisation de la spectrométrie de masse isotopique en physiologie végétale. Disponible en ligne à partir de : http://www.isv.cnrs-gif.fr/ebv/ghashghaie.pdf

Gobas F.A.P.C., Morrison H.A., 2000. Bioconcentration and biomagnification in the aquatic environment. In: R.S. Boethling & D. Mackay (eds). Handbook of Property Estimation Methods for Chemicals: Environmental and Health Sciences, Lewis, Boca Raton, Florida, USA, pp. 189-231.

Goerke H., Weber K., 2001. Species-specific elimination of polychlorinated biphenyls in estuarine animals and its impact on residue patterns. Mar. Environ. Res. 51, 131-149.

González-Gurriarán E., 1978. Introduccion al estudio de la alimentation en la necora, *Macropipus puber* L. (Decapoda - Brachyura). Bol. Inst. Espa. Oceano. Tomo IV. Boletin 242, 81-93.

González-Gurriarán E., Fernández L., Freire J., Muiño R., 1996. Reproductive biology of the spider crab *Maja squinado* (Decapoda, Majidae) based on the analysis of seminal receptacles. ICES CM 29, 17 pp.

González-Gurriarán E., Fernández L., Freire J., Muiño R., 1998. Mating and role of seminal receptacles in the reproductive biology of the spider crab Maja squinado (Decapoda, Majidae). J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 220, 269-285.

González-Gurriarán E., Fernández L., Freire J., Muiño R., Parapar J. 1993. Reproduction of the spider crab *Maja squinado* (Brachyura: Majidae) in the southern Galician coast (NW Spain). ICES CM 19, 15 pp.

González-Gurriarán E., Freire J. 1994. Movement patterns and habitat utilization in the spider crab *Maja squinado* (Herbst) (Decapoda, Majidae) measured by ultrasonic telemetry. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 184, 269-291.

González-Gurriarán E., Freire J., Bernárdez C. 2002. Migratory patterns of female spider crabs *Maja squinado* detected using electronic tags and telemetry. J. Crust. Biol. 22, 91-97.

Gordon J.D.M., De Silva S.S., 1980. The fish populations of the west of Scotland shelf. Part I. Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev. 18, 317-366.

Grey J., Jones R.I., Sleep R., 2000. Stable isotope analysis of the origins of zooplankton carbon in lakes of differing trophic state. Oecologia 123, 232-240.

Griffiths H., 1991. Applications of stable isotope technology in physiological ecology. Funct. Ecol. 5, 254-269.

Gu B., Schelske C.L., Hoyer M.V., 1996. Stable isotopes of carbon and nitrogen as indicators of diet and trophic structure of the fish community in a shallow hypereutrophic lake. J. Fish Biol. 49, 1233-1243.

Guiney P.D., Melancon M.J., Lech J.J., Peterson R.E., 1979. Effects of egg and sperm maturation and spawning on the distribution and elimination of a polychlorinated biphenyl in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Toxicol. Appl. Pharmacol. 47, 261-272.

Gustafsson K., Björk M., Burreau S., Gilek M., 2004. Bioaccumulation kinetics of brominated flame retardants (Polybrominated diphenyl ethers) in blue mussels (*Mytilus edulis*). Environ. Toxicol. Chem. 18, 1218-1224.

Hagen M.E., Colodey A.G., Knapp W.D., Samis S.C., 1997. Environmental response to decreased dioxin and furan loadings from British Columbia coastal pulp mills. Chemosphere 34, 1221-1229.

Hall S.J., Basford D.J., Robertson M.R., Raffaelli D.G., Tuck, I., 1991. Patterns of recolonisation and the importance of pit-digging by the crab *Cancer pagurus* in a subtidal sand habitat. Mar. Ecol. Prog. Ser. 72, 93-102.

Harding G.C., 1986. Organochlorine dynamics between zooplankton and their environment, a reassessment. Mar. Ecol. Prog. Ser. 33, 167-191.

Hartnoll R.G., 1965. The biology of spider crabs: A comparison of British and Jamaican species. Crustaceana 9, 1-16.

Hashimoto S., Wakimoto T., Tatsukawa R., 1995. Possible natural formation of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins as evidenced by sediment analysis from the Yellow Sea, the East China Sea and the Pacific Ocean. Mar. Poll. Bull. 30, 341-346.

Hektoen H.; Berge J.A., Ingebrigtsen K., Knutzen J., Oehme M., 1994. Elimination of polychlorinated dibenzofurans and dibenzo-*p*-dioxins from blue mussel (*Mytilus edulis*)

and tissue distribution of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (2,3,7,8-TCDD). Chemosphere 29, 1491-1499.

Hesslein R.H., Capel M.J., Fox D.E., Hallard K.A., 1991. Stable isotopes of sulfur, carbon, and nitrogen as indicators of trophic level and fish migration in the lower Mackenzie River basin, Canada. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 48, 1991.

Hesslein R.H., Hallard K.A., Ramlal P., 1993. Replacement of sulfur, carbon and nitrogen in tissue of growing broad whitefish (*Coregonus nasus*) in response to a change in diet traced by $\delta^{34}S$, $\delta^{13}C$ and $\delta^{15}N$. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 50, 2071-2076.

Hines A.H., Wolcott T.G., González-Gurriarán E., González-Escalante J.L., Freire J., 1995. Movement patterns and migrations in crabs: Telemetry of juvenile and adult behaviour in *Callinectes sapidus* and *Maja squinado*. J. Mar. Biol. Ass. U.K. 75, 27-42.

Hobson K.A., Ambrose W.G., Renaud P.E., 1995. Sources of primary production, benthic-pelagic coupling, and trophic relationships within the Northeast Water Polynya: insights from $\delta^{13}C$ and $\delta^{15}N$ analysis. Mar. Ecol. Prog. Ser. 128, 1-10.

Hobson K.A., Fisk A., Karnovsky N., Hoist M., Gagnon J.M., Fortier M., 2002. A stable isotope ($\delta^{13}C$, $\delta^{15}N$) model for the North Water food web: implications for evaluating trophodynamics and the flow of energy and contaminants. Deep-Sea Res. II 49, 5131-5150.

Hobson K.A., Welch H.E., 1992. Determination of trophic relationships within a high Arctic food web using $\delta^{13}C$ and $\delta^{15}N$ analysis. Mar. Ecol. Prog. Ser. 84, 9-18.

IARC, 1997. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Polychlorinated Dibenzo-para- dioxins and polychlorinated dibenzofurans. IARC, Lyon France.

Ikonomou M.G., Rayne S., Fischer M., Fernandez M.P., Cretney W., 2002. Occurrence and congener profiles of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in environmental samples from coastal British Columbia, Canada. Chemosphere 46, 649-663.

INSERM, 2000. Dioxines dans l'environnement. Quels risques pour la santé? Rapport d'une expertise collective. INSERM (ed), 57 pp.

Jaouen-Madoulet, A., Abarnou, A., Le Guellec, A-M., Loizeau, V., Leboulenger, F., 2000. Validation of an analytical procedure for polychlorinated biphenyls, coplanar polychlorinated biphenyls and polycyclic aromatic hydrocarbons in environmental samples. J. Chromatogr. 886A, 153-173.

JECFA, 2001. Summary of the fifty-seventh meeting of the Joint FAO/WHO Expert committee on Food additives. Rome.

Jensen S., 1966. Report of a new chemical hazard. New Sci. 32, 62.

Jimenez B., Hernandez L.M., Gonzalez M.J., Eljarrat E., Rivera J., Fossi M.C. 1998. Congener specific analysis of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans in crabs and sediments from the Venice and Orbetello logoons, Italy. Environ. Sci. Technol. 32, 3853-3861.

Johansson I., Moisan K., Guiot N., Truquet I., Munschy C., Tronczynski Y., 2004. Levels and trends of organohalogen compounds in mussels from the Seine estuary in 1981-2003. Organohalogen Compd. 66, 1868-1876.

Jones D.R., Hartnoll R.G. 1997. Mate selection and mating behaviour in spider crabs. Estuar. Coast. Shelf Sci. 44, 185-193.

Kannan K., Nakata H., Stafford R., Masson G. R., Giesy J. P., 1998. Bioaccumulation and toxic potential of extremely hydrophobic polychlorinated biphenyl congeners in biota collected at a superfund site contaminated with Arochlor 1268. Environ. Sci. Technol. 32, 1214-1221.

Kannan N., Petrick G., Schultz-Bull D.E., Duinker J.C., 1993. Chromatographic techniques in accurate analysis of chlorobiphenyls. J. Chromatogr. 642 A, 425-434.

Kannan N., Reusch T.B.H., Schulz-Bull D.E., Petrick G., Duinker J.C., 1995b. Chlorobiphenyls: Model compounds for metabolism in food chain organisms and their potential use as ecotoxicological stress indicators by application of the metabolic slope concept. Environ. Sci. Technol. 29, 1851-1859.

Karl H., Ruoff U., Bluthgen, A., 2002. Levels of dioxins in fish and fishery products on the German market. Chemosphere 49, 765-773.

Karlovac O., 1959. Istrazivanja naselja riba i jestivih beskraljeznjaka vucom u otvorenom Jadranu. Exploration of fish stocks and edible invertebrata carried out by trawling in the open Adriatic. Izv. Inst. Oceanogr., Split 5, 203 pp.

Kennish J.M., Bolinger R.A., Chambers K.A., Russell M.L., 1992. Xenobiotic metabolizing enzyme activity in sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) during spawning migration. Mar. Environ. Res. 34, 293-298.

Kirchin M.A., Wiseman A., Livingstone D.R., 1992. Seasonal and sex variation in the mixed-function oxygenase system of digestive gland microsomes of the common mussel, *Mytilus edulis* L. Comp. Biochem. Physiol. 101C, 81-91.

Kjeller L.O., Jones K.C., Johnston A.E., Rappe C., 1991. Increases in the PCDD/F content of soils and vegetation since the 1840's. Environ. Sci. Technol. 25, 1619-1627.

Klamer H.J.C., Leonards P.E.G., Lamoree M.H., Villerius L.A., Ågkerman J.E. Bakker J.F., 2005. A chemical and toxicological profile of Dutch North Sea surface sediments. Chemosphere 58, 1579-1587

Kling G.W., Kipphut G.W., Miller M.C., 1992. The flux of CO_2 and CH_4 from lakes and rivers in artic Alaska. Hydrobiologia 240, 23-36.

Knutzen J., Bjerkeng B., Naes K., Schlabach M., 2003. Polychlorinated dibenzofurans/dibenzo-*p*-dioxins (PCDF/PCDDs) and other dioxin-like substances in marine organisms from the Greenland fjords, S. Norway, 1975-2001: present contamination levels, trends and species specific accumulation of PCDF/PCDD congeners. Chemosphere 52, 745-760.

Kooijman, S.A.L.M., 2000. Dynamic Energy and Mass Budgets in Biology Systems. Cambridge University Press, Cambridge.

Lajtha K., Michener R.H., 1994. Stable isotopes in ecology and environmental sciences. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 315 pp.

Latrouite D., Le Foll D., 1989. Données sur les migrations des crabes tourteau *Cancer pagurus* et araignées de mer *Maja squinado*. Oceanis 15, 133-142.

Latrouite D., Morizur Y., 1988. Observations sur la croissance du tourteau *Cancer pagurus* en Manche et en Golfe de Gascogne. ICES CM 1988/K:34

Latrouite D., Noël P., 1993. Observations sur la maturité sexuelle et la ponte du tourteau *Cancer pagurus* en Manche. ICES CM 1993/K:23.

Law R.J., Alaee M., Allchin C.R., Boon J.P., Lebeuf M., Lepom P., Stern G.A., 2003. Levels and trends of polybrominated diphenyl ethers and other brominated flame retardants in wildlife. Environ. Int. 29, 757-770.

Lawton P., 1989. Predatory interaction between the brachyuran crab *Cancer pagurus* and decapod crustacean prey. Mar. Ecol. Prog. Ser. 52, 169-179.

Lawton P., Hughes R.N., 1985. Foraging behaviour of the crab *Cancer pagurus* feeding on the gastropods *Nucella lapillus* and *Littorina littorea*: comparisons with optimal foraging theory. Mar. Ecol. Prog. Ser. 27, 147-154.

Lazure P., Jegou A-M., 1998. 3D modelling of seasonal evolution of Loire and Gironde plumes on Biscay Bay continental shelf. Oceanol. Acta 212, 165-177.

Le Foll D., 1993. Biologie et exploitation de l'araignée de mer *Maja squinado* Herbst en Manche Ouest. Thèse de doctorat, Université de Bretagne Occidentale, Brest, France, 463 pp.

Le Foll D., Brichet E., Reyss J.L., Lalou C., Latrouite D., 1989. Age determination of the spider crab *Maja squinado* and the European lobster *Homarus gammarus* by $^{228}Th/^{228}Ra$ chronology: possible extension to other crustaceans. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 46, 720-724.

Le Loc'h F., Hily C., 2005. Stable carbon and nitrogen isotope analysis of *Nephrops norvegicus* / *Merluccius merluccius* fishing grounds in the Bay of Biscay (Northeast Atlantic). Can. J. Fish. Aquat. Sci. 62, 123-132

Ligun W.V., Dorn S.B., May R.J., 1989. Chlorodibenzofuran and chlorodibenzo-*p*-dioxin levels in Chilean mummies dated to about 2800 years before the present. Environ. Sci. Technol. 23, 1286-1290

Lo Bianco S., 1909. Notizie biologiche riguardanti specialmente il periodo di maturità sessuale degli animali del golfo di Napoli. Mitt. zool. Sta. Neapel 19, 513-763.

Loizeau V., Abarnou A., 1994. Distribution of Polychlorinated biphenyls in dab *Limanda limanda* from the Baie de Seine Eastern English Channel. Mar. Environ. Res. 382, 77-91.

Loizeau V., Abarnou A., Menesguen A., 2001. A Steady-state Model of PCB Bioaccumulation in the Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*) Food Web from the Seine Estuary (France). Estuaries 24, 1074-1087.

Lorrain A., 2002. Les structures calcifiées des invertébrés marins témoins des fluctuations de l'environnement côtier. Thèse de doctorat, Université de Bretagne Occidentale, Brest, France.

Lorrain A., Paulet Y-M., Chauvaud L., Savoye N., Donval A., Saout C., 2002. Differential $\delta^{13}C$ and $\delta^{15}N$ signatures among scallop tissues: implications for ecology and physiology. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 275, 47-61.

Manchester-Neesvig J.B., Valters K., Sonzogni W.C., 2001. Comparison of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and polychlorinated biphenyls (PCBs) in lake Michigan salmonids. Environ. Sci. Technol. 35, 1072-1077.

Marchand M., Caprais J.C., Cosson-Mannevy M.A., Morinière P., 1983. Apports et distribution des résidus organochlorés à haut poids moléculaire dans la rade de Brest (milieu marin semi-fermé). Oceanol. Acta 6, 269-282.

Marine Institute, 2001. Nephrops biology. Disponible en ligne à partir de : http://www.marine.ie/industry+services/fisheries/fisheries+biology/

Marine Institute, 2003. Irish Sea Nephrops. Disponible en ligne à partir de : http://www.marine.ie/industry+services/fisheries/

Mariotti A., 1995. Les isotopes stables du carbone, traceurs de l'évolution des écosystèmes continentaux et de dynamique des matières organiques des sols. In: J.M. Legay & R. Barbault (eds). La révolution technologique en écologie. Collection d'écologie, Masson, Paris, pp. 37-61.

Martin J., 1983. Période d'éclosion des larves d'araignées (*Maia squinado*, Herbst) en Baie d'Audierne (Bretagne sud) en 1979 et 1980. ICES Shell. Comm. CM 30, 10 pp.

Martin J., 1985. Abondance et distribution des larves d'araignées (*Maia squinado*, Herbst) en Manche en 1983. ICES Shell. Comm. CM 24, 11 pp.

Mascaro M., Seed R., 2001. Foraging behaviour of juvenile *Carcinus maenus* (L.) and *Cancer pagurus* (L.). Mar. Biol. 139, 1135-1145.

McFarland V.A., Clarke J.U., 1989. Environmental occurrence, abundance and potential toxicity of polychlorinated biphenyl congeners: considerations for a congeners-specific analysis. Environ. Health Perspect. 91, 225-231.

Menone M.L., Bortolus A., Botto F., Aizpun de Moreno J.E., Moreno V.J., Iribarne O., Metcalfe T.L., Metcalfe C.D., 2000. Organochlorine contaminants in a coastal lagoon in Argentine: Analysis of sediment, crabs, and cordgrass from two different habitats. Estuaries 23, 583-592.

Michener R.H., Schell D.M., 1994. Stable isotope tracers in marine aquatic food webs. In: K. Lajtha & R.H. Michener (eds). Stable isotopes in ecology and environmental science. Blackwell Scientific, London, 138-157 pp.

Millischer R.J., 1987. Les PCB et leurs produits de décomposition : peut-on évaluer un seuil de toxicité ? Revue générale de l'Electricité 8, 23-37.

Minagawa M., Wada E., 1984. Stepwise enrichment of ^{15}N along food chains: Further evidence and the relation between $\delta^{15}N$ and animal age. Geochim. Cosmochim. Acta 48, 1135-1140

Mothershead R., Hale R.C., Greaves J., 1991. Xenobiotic compounds in blue crabs from a highly contaminated urban subestuary. Environ. Toxicol. Chem. 10, 1341-1349.

Muir D.C.G., Norstrom R.J., Simon M., 1988. Organochlorine contaminants in arctic marine food chains: accumulation of specific polychlorinated biphenyls and chlordane-related compounds. Environ. Sci. Technol. 22, 1071-1079.

Muir D.C.G., Savinova T., Savinov V., Alexeeva L., Potelov V., Svetochev V., 2003. Bioaccumulation of PCBs and chlorinated pesticides in seals, fishes and invertebrates from the White Sea, Russia. Sci. Total Environ. 306, 111-131.

Naylor J.K., Taylor E.W., Bennett D.B., 1999. Oxygen uptake of developing eggs of *Cancer pagurus* (Crustacea: Decapoda: Cancridae) and consequent behaviour of ovigerous females. J. Mar. Biol. Ass. U.K. 79, 305-315.

Neumann V., 1998. A review of the *Maja squinado* (Crustacea: Decapoda: Brachyura) species-complex with a key to the eastern Atlantic and Mediterranean species of the genus. J Nat Hist 32, 1667-1684.

Norstrom R.J., Letcher R.J., 1996. Role of biotransformation in bioconcentration and bioaccumulation. Annex I. In : Sijm, De Bruijn, De Voogt & De Wolf (eds). Biotransformation in environmental risk assessment; a SETAC Workshop Noordwijkerhout, the Nederlands. 28 April-1 May 1996.

OCDE, 1973. Les diphényles polychlorés, leur utilisation et leur contrôle. Paris, 46 pp.

OCDE, 1982. Rapport sur la mise en application par les pays membres de la décision du conseil sur la protection de l'environnement par le contrôle des diphényles polychlorés. Paris, 122 pp.

O'Donovan V., Tully O., 1996. Lipofuscin (age pigment) as an index of crustacean age: correlation with age, temperature and body size in cultured juvenile *Homarus gammarus* L. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 207, 1-14.

Oehme M., Bartonova A., Knutzen J., 1990. Estimation of polychlorinated dibenzofuran and dibenzo-*p*-dioxin contamination of a coastal region using isomer profiles in crabs. Environ. Sci. Technol. 24, 1836-1841.

OFIMER, 2003. Division Observatoire Economique Entreprise "Consommation des produits de la pêche et de l'aquaculture. Bilan annuel 2003," Office National Interprofessionnel des Produits de la Mer et de l'Aquaculture.

O'Hara S.C.M., Corner E.D.S., Forsberg T.E.V., Moore M.N., 1982. Studies on benzo[*a*]pyrene monooxygenase in the shore crab, *Carcinus maenus*. J. Mar. Biol. Ass. UK 65, 113-131.

Okumura Y., Yamashita Y., Kohno Y., 2004. Bioaccumulation of PCDD/Fs and Co-PCBs in lower-trophic-level organisms in Sendai Bay, Japan. Water Air Soil Pollut. 159, 291-312.

Oliver B.G., Niimi A.J., 1988. Trophodynamic analysis of polychlorinated biphenyl congeners and other chlorinated hydrocarbons in the Lake Ontario ecosystem. Environ. Sci. Technol. 22, 388-397.

Olivier F., Retière C., 1998. The role of physical-biological coupling in the benthic boundary layer under megatidal conditions. The case of the dominant species of the *Albra albra* community of the eastern Bay of Seine (English Channel). Estuaries 21, 571-584.

Opperhuizen A., Sijm D.T.H.M., 1990. Bioaccumulation and biotransformation of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans in fish. Environ. Toxicol. Chem. 9, 175-186.

O'Reilly C.M., Hecky R.E., 2002. Interpreting stable isotopes in food webs: Recognizing the role of time averaging at different trophic levels. Limnol. Oceanogr. 47, 306-309.

Ostrom P.H., Fry B., 1993. Sources and cycling of organic matter within modern and prehistoric food webs. In: M.H. Engel & S.A. Macko (eds). Organic Geochemistry. Plenum Press, New York, pp. 785-798.

Parapar J., Fernández L., González-Gurriarán E., Muiño R., 1997. Epibiosis and masking material in the spider crab *Maja squinado* (Decapoda: Majidae) in the Ría de Arousa (Galicia, NW Spain). Cah. Biol. Mar. 38, 221-234.

Parker P.L., Anderson R.K., Lawrence A., 1989. A $\delta^{13}C$ and $\delta^{15}N$ tracer study of nutrition in aquaculture: *Penaeus vannamei* in a pond growout system. In: P.W. Rundel, J.R. Ehleringer & K.A. Nagy (eds). Stable isotopes in ecological research. Springer-Verlag, New York, pp. 288-303

Parslow-Williams P., Goodheir C., Atkinson R.J.A., Taylor A.C., 2002. Feeding energetics of the Norway lobster, *Nephrops norvegicus* in the Firth of Clyde, Scotland. Ophelia 56, 101-120

Perga M.E., 2004. Origines et flux de carbone dans les réseaux trophiques lacustres : étude par analyse de la composition en isotopes stables du carbone et de l'azote du zooplancton et des poissons. Thèse de doctorat, Université de Savoie, France, pp.198

Peterson B.J., 1999. Stable isotopes as tracers of organic matter input and transfer in benthic food webs: A review. Acta Oecol. 20, 479-487.

Pinnegar J.K., Polunin, N.V.C., 1999. Differential fractionation of $\delta^{13}C$ and $\delta^{15}N$ among fish tissues: implications for the study of trophic interactions. Funct. Ecol. 13, 225-231.

PISSC (Programme international sur la sécurité des substances chimiques), 1994. Bromodiphenyléthers. Organisation mondiale de la santé, Genève (Critères d'hygiène de l'environnement 162).

Pompa G., Caloni F., Fracchiolla M.L., 2003. Dioxin and PCB contamination of fish and shellfish: assessment of human exposure. Review of the international situation. Vet. Res. Commun. 27, 159-167.

Post D.M., 2002. Using stable isotopes to estimate trophic position: models, methods, and assumptions. Ecology 83, 703-718

Post D.M., Pace M.L., Hairston, R.G., 2000. Ecosystem size determines food-chain length in lakes. Nature 405, 1047-1049.

Quéro J.C., Vayne J.J., 1998. Les fruits de la mer et les plantes marines des pêches françaises. Delachaux et Niestlé/Ifremer (eds), pp.256.

Raffin C., 2003. Bases biologiques et écologiques de la conservation du milieu marin en mer d'Iroise. Thèse de doctorat, Université de Bretagne Occidentale, Brest, France.

Ramade F., 1992. Précis d'écotoxicologie, Paris.

Rau G.H., Mearns A.J., Young D.R., Olson R.J., Schafer H.A., Kaplan I.R., 1983. Animal $^{13}C/^{12}C$ correlates with trophic level in pelagic food webs. Ecology 64, 1314-1318.

Reyss J.L., Schmidt S., Latrouite D., Floris S., 1996. Age determination of crustacean carapaces using $^{228}Th/^{228}Ra$ measurements by ultra-low-level gamma spectrometry. Appl. Radiat. Isot. 47, 1049-1053.

Ribeyre F., Boudou A., 1989. Trophic chains and experimental ecosystems: study of bioaccumulation and transfer processes. In: A. Boudou & R. Ribeyre (eds). Aquatic Ecotoxicology: Fundamental Concepts and Methodologies, CRC Press, Boca Raton, FL. 1, 3-46.

Rice A.L., Chapman C.J., 1981. Observations on the burrows and burrowing behaviour of two mud-dwelling decapod crustaceans, *Nephrops norvegicus* and *Goneplax rhomboides*. Mar. Biol. 10, 330-342.

Riera P., Hubas C., 2003. Trophic ecology of nematodes from various microhabitats of the Roscoff Aber Bay (France): importance of stranded macroalgae evidenced through $\delta^{13}C$ and $\delta^{15}N$. Mar. Ecol. Prog. Ser. 260, 151-159.

Riera P., Stal L.J., Nieuwenhuize J., 2002. $\delta^{13}C$ versus $\delta^{15}N$ of co-occurring molluscs within a community dominated by *Crassostrea gigas* and *Crepidula fornicate* (Oosterschelde, The Netherlands). Mar. Ecol. Prog. Ser. 240, 291-295

Riera P., Stalb L.J., Nieuwenhuizeb J., 2000. Heavy $\delta^{15}N$ in intertidal benthic algae and invertebrates in the Scheldt Estuary (The Netherlands): Effect of river nitrogen inputs. Estuar. Coast. Shelf Sci. 51, 365-372

Ruus A., Ugland K.I., Skaare J.U., 2002. Influence of trophic position on organochlorine concentrations and composition patterns in a marine food web. Environ. Toxicol. Chem. 21, 2356-2364.

Sakurai T., Kim J-G., Suzuki N., Matsuo T., Li D-Q., Yao Y., Masunaga S., Nakanishi J., 2000. Polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans in sediment, soil, fish, shellfish and crab samples from Tokyo Bay area, Japan. Chemosphere 40, 627-640.

Sampedro M.P., González-Gurriarán E., Freire J., Muiño R., 1999. Morphometry and sexual maturity in the spider crab *Maja squinado* (Decapoda, Majidae) in Galicia, Spain. J. Crust. Biol. 19, 578-592

Schantz M.M., Parris R.M., Kurz J., Ballschmiter K., Wise S.A., 1993. Comparison of methods for the gas-chromatographic determination of PCB congeners and chlorinated pesticides in marine reference materials. Fresenius J. Anal. Chem. 346, 766-778.

Sellström U., 1996. Polybrominated diphenyl ethers in the Swedish environment. Licenciate thesis, ITM-Rapport 1996, 45. Stockholm University, Stockholm, Sweden.

Sheehy M.R.J., 1990. Potential of lipofuscin in situ age-pigment as an index of crustacean age. Mar. Biol. 107, 439-442.

Siddiqi M.A., Laessig R.H., Reed K.D, 2003. Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs): New pollutants-Old diseases. Clinical Med. Res. 1, 281-290

Smith I.P., Collins K.J., Jensen A.C., 2000. Digital electromagnetic telemetry system for studying behaviour of decapod crustaceans. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 247, 209-222.

Sotiropoulos M.A., Tonn W.M., Wassenaar L.I., 2004. Effects of lipid extraction on stable carbon and nitrogen isotope analyses of fish tissues: potential consequences for food web studies. Ecol. Freshwater Fish 13, 155-160.

Stapleton H.M., Letcher R.J., Baker J.E., 2004a. Debromination of polybrominated diphenyl ether congeners BDE 99 and BDE 183 in the intestinal tract of the common carp (*Cyprinus carpio*). Environ. Sci. Technol. 38, 1054-1061.

Stapleton H.M., Letcher R.J., Li J., Baker J.E., 2004b. Dietary accumulation and metabolism of polybrominated diphenyl ethers by juvenile carp (*Cyprinus carpio*). Environ. Toxicol. Chem. 23, 1939-1946.

Stevcic Z., 1967. Le complexe de la nourriture de l'araignée de mer *Maja squinado*. Helgol Wiss Meeresunters 15, 630-636

Stevcic Z., 1968a. L'araignée de mer et le substrat. Rapp. P. V. Reun., Comm. Int. Explor. Sci. Mer. Mediterr., Monaco 19, 151-153.

Stevcic Z., 1968b. Relations interspécifiques de l'araignée de mer. Rapp PV Réun, Comm Int Explor Sci Mer Mediterr, Monaco 19, 147-149

Stevcic Z., 1971. Laboratory observations on the aggregations of the spiny spider crab (*Maja squinado* Herbst). Anim. Behav. 19, 18-25.

Stevcic Z., 1977. Contribution à la connaissance de la reproduction de l'araignée de mer (*Maja squinado*). Rapp. P. V. Reun., Comm. Int. Explor. Sci. Mer. Mediterr., Monaco 24, 177-178.

Swackhamer D.L., Hites R.A., 1988. Occurrence and bioaccumulation of organochlorine compounds in fishes from Siskiwit Lake, Isle Royale, Lake Superior. Environ. Sci. Technol. 22, 543-548.

Talidec C., 2003. Langoustine (*Nephrops norvegicus*) Stock de la mer Celtique (Divisions VIIg, h du CIEM). Disponible en ligne à partir de: http://www.ifremer.fr/francais/produits/poisson/langoustine/lorient_langoustine_mc_2003.pdf

Tanabe S., Tatsukawa R., 1986. Distribution, behavior and load of PCBs in the oceans. In: J.S. Waid (ed). PCBs and the environment Vol. 1. CRC Press Boca Raton, Florida, pp.143-161

Thomas H.J., 1965a. The growth of Norway lobsters in aquaria. Rapp. P. V. Reun., Cons. Int. Explor. Sci. Mer. 156, 209-216.

Thomas H.J., 1965b. The white fish communities associated with *Nephrops norvegicus* (L.) and the by-catch of White fish in the Norway lobster fishery, together with notes on Norway lobster Predators. Rapp. P. V. Reun., Cons. Int. Explor. Sci. Mer. 156, 155-160.

Thomas H.J., Davidson C., 1962. The food of the Norway lobster, *Nephrops norvegicus.* Mar. Res. 3, 3-15.

Thompson B.M., Lawler A.R., Bennett D.B., 1995. Estimation of the spatial distribution of spawning crabs (*Cancer pagurus* L.) using larval surveys of the English Channel. ICES Mar. Sci. Symp. 199, 139-150.

Tuck I.D., Atkinson R.J.A., Chapman C.J., 2000. Population biology of the Norway lobster *Nephrops norvegicus* (L.) in the Firth of Clyde, Scotland II: Fecundity and size at onset of sexual maturity. ICES J. Mar. Sci. 57, 1227-1239.

Tuck I.D., Chapman C.J., Atkinson R.J.A., 1997. Population biology of the Norway lobster, *Nephrops norvegicus* (L.) in the Firth of Clyde, Scotland. I. Growth and density. ICES J. Mar. Sci. 54, 125-135.

Tuerk K.J.S., Kucklick J.R., McFee W.E., Pugh R.S., Becker P.R., 2005. Factors influencing persistent organic pollutant concentrations in the Atlantic white-sided dolphin (*Lagenorhynchus acutus*). Environ. Toxicol. Chem. 24, 1079-1087.

U.S. EPA Method 1613, 1994. Tetra- through octa-chlorinated dioxins and furans by isotopic dilution HRGC-HRMS. Office of Science and Technology, U.S. EPA; U.S. Government Printing Office, Washington, DC.

UNEP, 1999. Guidelines for the identification of PCBs and materials containing PCBs. Geneva, Switzerland, 34 pp.

UNEP, 2001. Convention de Stockholm sur les Polluants Organiques Persistants. Disponible en ligne à partir de : http://www.pops.int/documents/convtext/convtext_fr.pdf

Van den Berg, M., Birnbaum, L., Bosveld, B. T. C., Brunström, B., Cook, P., 1998. Toxic equivalents factors TEF for PCBs, PCDDs, PCDFs for humans and wildlife. Environ. Health Perspect. 106, 775-792.

Van der Oost R., Beyer J., Vermeulen N.P.E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. Environ. Toxicol. Pharmacol. 13, 57-149.

Vander Zanden M.J., Cabana G., Rasmussen J.B., 1997. Comparing trophic position of freshwater fish calculated using stable isotope nitrogen ratios and literature dietary data. Can. J. Fish Aquat. Sci. 54, 1142-1158.

Veith G.D., Defoe D.L., Bergstedt B.J., 1979. Measuring and estimating the bioconcentration factor of chemicals in fish. J. Fish. Res. Bd. Can. 36, 1040-1048.

Vizzini S., Mazzola A., 2002. Stable carbon and nitrogen ratios in the sand smelt from a Mediterranean coastal area: feeding habits and effect of season and size. J. Fish Biol. 60, 1498-1510.

Voorspoels S., Covaci A., Maervoet J., De Meester I., Schepens P., 2004. Levels and profiles of PCBs and OCPs in marine benthic species from the Belgian North Sea and the Western Scheldt Estuary. Mar. Pollut. Bull. 49, 393-404.

Voorspoels S., Covaci A., Schepens P., 2003. Polybrominated diphenyls ethers in marine species from the Belgian North Sea and the Western Scheldt estuary: levels, profiles and distribution. Environ. Sci. Technol. 37, 4348-4357.

Wade T.L., Jackson T.J., Gardinali P.R., Chambers L., 1997. PCDD/PCDF sediment concentration distribution: Casco Bay, Maine, USA. Chemosphere 34, 1359-1367.

Wakimoto T., Kannan N., Ono M., Tatsukawa R., Masuda Y., 1988. Isomer-specific determination of polychlorinated dibenzofurans in Japanese and American polychlorinated biphenyls. Chemosphere 17, 743-750.

Wania F., Axelman J., Broman D., 1998. A review of processes involved in the exchange of persistent organic pollutants across the air-sea interface. Environ. Pollut. 102, 3-23.

Warren N., Allan I.J., Carter J.E., House W.A., Parker A., 2003. Pesticides and other micro-organic contaminants in freshwater sedimentary environments - a review. Appl. Geochem. 18, 159-194.

Wells D.E., Echarri I., 1994. Determination of chlorobiphenyls, with the separation of non-ortho, mono-ortho and di-ortho chloro congeners in fish and sea mammals. Anal. Chim. Acta 286, 431-449.

Wenning R.J., 2002. Uncertainties and data needs in risk assessment of three commercial polybrominated diphenyl ethers: probabilistic exposure analysis and comparison with European Commission results. Chemosphere 46, 779-796.

Wicksten M.K., 1993. A review and a model of decorating behavior in spider crabs (Decapoda, Brachyura, Majidae). Crustaceana 64, 314-325.

Wilhelm G., 1985. L'étrille dans le Mor-Braz. Rapport interne, ENSAR, Rennes, France.

Yokoyama H., Tamaki A., Harada K., Shimoda K., Koyama K., Ishihi Y., 2005. Variability of diet-tissue isotopic fractionation in estuarine macrobenthos. Mar. Ecol. Prog. Ser. 296, 115-128.

Zohary T., Erez J., Gophen M., Berman-Frank I., Stiller M., 1994. Seasonality of stable carbon isotopes within the pelagic food web of Lake Kinneret. Limnol. Oceanogr. 39, 1030-1043.

Annexes

ARTICLE 1

Organochlorinated contaminants in decapod crustaceans from the coasts of Brittany and Normandy (France)

N. Bodin, A. Abarnou*, A-M. Le Guellec, V. Loizeau, X. Philippon

Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer IFREMER, Département Biogéochimie et Ecotoxicologie, Centre de Brest, BP70, 29280 Plouzané, France.

* Corresponding author. Phone: (33) 2 98 22 43 57; Fax: (33) 2 98 22 45 48; e-mail: aabarnou@ifremer.fr

Accepté dans Chemosphere

Abstract

The contamination and distribution of organochlorinated compounds were considered in three crustacean species (edible crab, *Cancer pagurus*; spider crab, *Maja brachydactyla*; velvet swimming crabs, *Necora puber*) from five sites along the coasts of Brittany and Normandy (Western and North-Western France). PCBs (16 single congeners), *pp'*-DDE and HCB were measured in hepatopancreas, gonads and muscle: in all, 175 samples were analysed. The spider crab was the only species found in the five sampling sites, thus enabling comparison between areas. Specimens from Antifer were much more contaminated (Σ_{16}PCBs in hepatopancreas = 2000-4000 $ng.g^{-1}$ dry weight) than those from other sites (50-1000 $ng.g^{-1}$d.w.). Among species, the spider crab appeared more contaminated by PCBs than the edible crab, by a factor 2-3, probably in relation with specific differences in their life cycles. There was no difference due to the gender of the species. Within the different analysed tissues, contamination increased from muscle, gonads and hepatopancreas in relation with the fat content. A very similar PCB composition was observed in all samples, PCB fingerprints being characterised by the relative importance of the more persistent PCB congeners: CB153, 138, 180, 187, and 118. Finally, these results were compared to recent food regulations first of maximum marker PCB intake and secondly of maximum dioxin-like PCB intake. By considering the muscle, all samples were far below the regulatory limits; for hepatopancreas and gonads, however, some samples were unfit for human consumption.

Keywords: Polychlorobiphenyls, crustaceans, Normandy, Brittany, France, human diet.

1. Introduction

Organochlorinated contaminants such as Polychlorobiphenyls (PCBs) are examples of widespread chemical compounds of great environmental and health concern. PCBs have given rise to huge amount of works in the last forty years since they have been discovered at trace levels in environmental samples (Jensen, 1966). Thus, they were the subject of many studies concerning their occurrence in water, sediment and more especially in biota. PCBs are currently followed in pollution monitoring programmes like the Réseau National d'Observation de la qualité du milieu marin (R.N.O.) in France (Claisse, 1989, Beliaeff and Smith, 1996), or the Mussel Watch in the USA (O'Connor, 2004). Moreover, the varying physico-chemical properties of the various PCB congeners, depending on the number and position of the chlorine atoms bound to the biphenyl structure, make them interesting compounds in order to understand and to model the distribution and fate of organic contaminants in the environment and trophic web (Connolly, 1991; Mackay and Fraser, 2000; Loizeau et al., 2001). The toxicity of PCBs results from their chlorination pattern. A number of PCBs, which have two or more chlorine atoms in the ortho-position, express a non-dioxin-like toxicity (marker PCBs or M-PCBs). A smaller group of non-ortho and mono-ortho substituted congeners (dioxin-like PCBs or DL-PCBs) elicits similar toxicological effects as 2,3,7,8-TCDD. As for dioxins, TEFs (Toxicity Factor Equivalent) were given to these DL-PCB congeners (Ahlborg et al., 1994; Van den Berg et al., 1998) to estimate their TEQ (Toxic Equivalent Quantity). Because of their toxic properties, many studies have been carried out to evaluate PCB and dioxin contamination in food and to characterise the human exposure (Focant et al., 2002; Smith and Gangolli, 2002; Baars et al., 2004; Bordajandi et al., 2004).

To our knowledge, there is very little information on the presence of organochlorinated contaminants in large crustaceans from French waters. However, these species are currently exploited and represent an important economical activity in certain French regions such as Brittany and Normandy. Based on a market basket survey, the French food safety agency reported quite high dioxin levels in crustaceans (AFSSA, 2000) compared to other food items. However, as for other products, the results were expressed on a fat content which appears questionable in the case of very lean products like crustacean meat.

Below are presented the results on organochlorinated contaminants (PCBs, *pp'*-DDE and HCB) in large crustaceans. The first objective was to estimate the concentration ranges of these compounds in different edible crustaceans from the French coasts. For that purpose, five areas were selected: the first one in the Seine Bay (Haute-Normandie), the others along the Brittany and Basse-Normandie coasts. According to the results obtained within the French

monitoring programme R.N.O., these areas are assumed to represent very opposite situations: on the one hand, the coasts of Brittany and Basse-Normandie which are very slightly contaminated by such man-made contaminants of industrial origin, on the other hand, the Seine Bay where the highest PCB levels are currently measured in mussels and other species living close to the Seine Estuary (Claisse et al., 1992; Lafite and Romaña, 2001; Abarnou et al., 2002) The second objective of this work was to look for any contamination differences related to species, to gender or to organs, all these factors being able to act either on the contamination levels or on the relative distribution of the PCB congeners. Finally, the health implications of these results were discussed first based upon M-PCBs, and secondly for DL-PCBs using some simplifying assumptions.

2. Experimental section

2.1. Sampling strategy

The crustacean specimens were obtained from five areas along the coasts of Normandy and Brittany (Fig.1): Antifer, Granville, Roscoff, Le Conquet and Le Guilvinec.

Antifer (station 1), localised in the Seine Bay near an oil terminal, is greatly exposed to large contaminant discharges from the Seine River. The Seine River watershed represents about 78,600 km^2 and regroups 30% of the national population (Biger, 1996). Moreover, 40% of the French industrial activity is situated in this catchment area, as well as an important agricultural activity (Tessier, 2003). Conversely, Granville (station 2) and Roscoff (station 3) are characterised by agricultural activity and tourism in summer period; these areas are not influenced by large river discharges or industrial activity. Finally, the Iroise Sea, around Le Conquet (station 4), is situated in Western Brittany, influenced by important oceanic currents from Atlantic ocean and to some extent by local water exchanges with the Rade of Brest. Crustaceans were also obtained from Le Guilvinec (station 5), in Southern Brittany where professional fishing, notably of crustaceans, is of great economical concern.

The selection of the species depended on their availability at the sampling locations. Three crustacean species were chosen: the edible crab (*Cancer pagurus*), the spider crab (*Maja brachydactyla*), and the velvet swimming crab (*Necora puber*). They all represent an important part of the fished and consumed crustacean species in France. All crustaceans were obtained from local fishermen in February 2003. The characteristics of the studied samples are presented in Table 1. Spider crabs were the only species obtained in each of the five sampling areas.

2.2. Sample preparation

Preliminary sample pre-treatment steps were performed as soon as possible on receipt of the crustaceans. They included the determination of gender, the measurement of carapace length (between the union of the frontal spines and the posterior edge of the carapace) and total weight, and the dissection of each specimen to obtain muscle, hepatopancreas and gonads. As for velvet swimming crabs, each organ was analysed within pools that discriminated male and female specimens. All sample tissues were kept at –20°C until freeze drying, and then the dry material was ground to obtain a fine homogeneous powder. The water content was estimated from the weight loss after freeze drying.

2.3. Chemical analysis

A precisely weighed amount of the powdered materiel, typically around one gram, was extracted in a hot Soxhlet extraction apparatus (Soxtec) during three hours with a hexane:acetone mixture (80:20). The solvent was carefully and completely evaporated. The residue was weighed to give the amount of extractible material and thus a crude estimation of the fat content. The extract was taken up by 5 ml hexane. The lipids and co-extractible material were destroyed by adding one millilitre of concentrated sulphuric acid. After one night, the emulsion had separated, and the clear remanant hexane phase was taken up after decantation and centrifugation. This cleaned extract was further purified by adsorption chromatography on a Florisil column (Florisil, 60-100 mesh size, activated during one night at 200°C, desactivated with 3% of demineralised water) eluted with pentane, PCBs, *pp'*-DDE and HCB (Hexachlorobenzene) being all together in the same first elution fraction (volume 25 ml). After evaporation of the solvent, the final extract was taken up by iso-octane, transferred into a chromatographic vial with addition of an internal standard (1,2,3,4-tetrachloronaphtalene), and was then ready for the instrumental analysis. GC-ECD determination is carried out on a HP 5890 series II equipped with a CP-Sil19 column (60 m length, internal diameter 0.25 mm, and 0.15 µm phase film thickness) following optimised conditions described elsewhere (Jaouen-Madoulet et al., 2000).

Among PCBs, the seven indicator PCB congeners were measured (CB28, 52, 101, 118, 138, 153, 180), their sum being given as $\sum_7$PCBs. However, the CB28 was always below the detection limit of 0.3 $pg.\mu l^{-1}$. A few other congeners were also analysed to describe a larger range of chlorination from 3 to 8 chlorine molecules (CB105, 110, 128, 132, 149, 156, 170, 187, 194) to check the appropriate resolution of the gas chromatography system, and because they can highlight underlying mechanisms acting on the distribution of organic contaminants

in biota like bioaccumulation or biotransformation. The sum of all the 16 measured congener concentrations is referred below as $\sum_{16}$PCBs.

2.4. Quality control criteria

The calibration of the system was performed within quite a large range using a multi-point (8) calibration curve to define the linearity range of our detector (ECD) for all contaminants, for example from 4 to 2000 $pg.\mu l^{-1}$ for CB153. The relative precision of the method was checked for this type of samples by the analysis of six aliquots of a homogeneous tissue preparation of crustacean hepatopancreas. The results showed standard deviations less than 10 % for all congeners, which display a satisfactory reproducibility of the method. During the analysis of the real samples, analytical blanks were systematically measured every twelve samples. The blank were about 0.2 $pg.\mu l^{-1}$, twenty times less than the concentrations of the lowest standard of CB153 (i.e., <0.1 $ng.g^{-1}$), and much less for other determinants. Finally, 6 replicates of a reference material, BCR-CRM349 (Cod Liver Oil) were analysed in order to determine the accuracy and precision of the method (Table 2). PCB recoveries varied between 77 and 115%, except for CB105 which might interfere with a co-eluting compound. For HCB and *pp'*-DDE, recoveries were 88 and 120% respectively. The concentrations of the real samples were not corrected for recoveries. Moreover, the RSD values ranged from 3.8 to 19.6%, with a mean of 9.7% for all PCBs. In the case of pesticides, the RSD was of 21 and 10% for HCB and *pp'*-DDE respectively. All these results were in agreement with certified reference values and published complementary data (Schantz et al., 1993).

2.5. Statistical treatment

All data following a non-normal distribution according to the Shapiro-Wilk test ($p>0.05$), a Mann Whitney U-test was used to compare contaminant concentrations and distributions between sampling areas, species and organs. All statistical tests were performed using Statistica Software 6.0.

3. Results and discussion

3.1. Comparison of PCB concentrations and distribution between sampling sites

Results of PCB contamination levels in crustacean hepatopancreas are reported on the dry weight (d.w.) basis (Table 3); water and lipid contents are also given to enable comparison with published data. Among the different crustaceans, the spider crab was the only species obtained in the five sites.

The concentrations of $\sum_{16}$PCBs and CB153 congener in spider crab hepatopancreas showed significant inter-site differences (Mann-Whitney test, $p<0.05$). The specimens from Antifer (M1) were the most contaminated, which confirms a chronic pollution of the whole Seine Bay mainly due to contaminant inputs by the Seine River (Lafite and Romaña, 2001; Abarnou et al., 2002). The $\sum_{16}$PCB concentrations reached 2980 ng.g^{-1}d.w. (Table 3), about 6-, 10-, 30- and 40-fold higher than those measured in the spider crabs from Le Conquet (M4), Le Guilvinec (M5), Roscoff (M3) and Granville (M2) respectively. For these two last areas, there is no significant riverine influence and no large urban and industrial wastes that could alter the water quality. Moreover, high tidal current contributes to the dilution of any terrestrial discharge by mixing into the general circulation (Salomon et al., 1988). These differences of PCB contamination levels in crustaceans from different areas are broadly speaking in agreement with those observed in mussels analysed in the French monitoring programme R.N.O. (Abarnou et al., 2002). The concentrations of CB153 were in the range of 200-500 ng.g^{-1}d.w. in mussels from sites close to the Seine Estuary, whereas in the other areas, they varied from 5 to 50 ng.g^{-1}d.w., mussels from the Northern Brittany coast being the least contaminated. Unexpectedly, in spite of their origin from a presumed very clean area largely exposed to oceanic water circulation, the spider crabs collected around Le Conquet (M4: $\sum_{16}$PCBs=456 ng.g^{-1}d.w.) presented slightly higher contamination than M3, M5 and M2 ($\sum_{16}$PCBs=101, 251, 77 ng.g^{-1}d.w, respectively) (Table 3). The spider crabs from Le Conquet have been fished near the outlet of the Rade of Brest. At ebb tide, this place might be influenced by contaminated water flowing from the Rade which is exposed to surrounding urban and industrial activities. Finally, PCB concentrations measured in the spider crabs from Southern Brittany (M5) were slightly higher than those of M2 and M3. Different studies have pointed out an influence of the plume of the River Loire panache until the sampling area (Lazure and Jegou, 1998), and higher PCB levels ([CB153]>100 ng.g^{-1} d.w.) have been observed in mussels collected at the Loire Estuary (Abarnou et al., 2002). Moreover, Le Guilvinec sampling area is characterised by muddy clay bottoms, which may promote the trapping of contaminants in superficial sediments and further their availability for benthic organisms.

Few studies have been carried out on the crustacean PCB contamination. The comparison of data is not straightforward because of the different modes of expression of the contamination (individual component concentrations or sum of different congeners; fresh weight basis, fat basis or dry mass basis), the type of tissues analysed or the whole specimen, and obviously

the part of biological and environmental variability inherent to such measurements. For example, Kannan et al. (1998) found concentrations of CB153 in the range 540-1780 ng.g^{-1}w.w. in hepatopancreas of *Callinectes sapidus* from Georgia. Levels of this congener were 22 ng.g^{-1}w.w. in *Palaemonetes antennarius* collected from the River Arrone Italy (Bazzanti et al., 1997). *Crangon crangon* from the Southern Baltic Sea presented CB153 concentrations around 80 ng.g^{-1} lipids (Kannan et al., 1995). More recently, in the Belgian North Sea and the Western Scheldt Estuary, CB153 concentration range of 5.4-68 and 0.2-5.2 ng.g^{-1}w.w. were reported in the crab *Lyocarcinus holsatus* and the shrimp *Crangon crangon* respectively (Voorspoels et al., 2004). The concentration ranges measured in crustaceans from the French littoral (Table 3) are in good agreement with all these published data whichever the study area and species.

A comparison of the PCB patterns was carried out in the spider crab hepatopancreas from the five sampling sites (Fig. 2). For that purpose, the concentrations of each congener were normalised to that of CB153 which was the predominant component in all our samples. Similar profiles were observed whatever the geographical area with the predominance of six major congeners: CB153, 138, 180, 187, 118 and 170. Together, they represented 85-90% of the $\sum_{16}$PCBs, and CB153 contributed for 30-40% to this sum. These predominant congeners, except CB118, have 6-7 chlorine atoms by molecule and octanol-water coefficients corresponding to a maximum bioaccumulation tendency. Indeed, they are less hydrophobic than higher chlorinated ones (octa-, nona-, deca-PCBs), but are more readily bioavailable to organisms because they are not so tightly bound to sediment as the highest chlorinated PCBs (McFarland and Clarke, 1989). Moreover, the high proportions of these compounds in crustacean tissues reflect their low rates of biotransformation, and particularly the inability of these species to metabolise congeners with chlorine atoms in positions 2, 4, and 5 in one (CB118 and 138) or both rings (CB153 and 180). The persistence of these PCB congeners have been demonstrated in invertebrates and vertebrates (Bright et al., 1995; Kannan et al., 1995), and their proportions in marine species increased slightly with the trophic levels. Moreover, very lower relative abundance were observed in hepatopancreas of spider crabs for the *m,p*-unsubstituted PCBs (CB52, 101, 110, 132, 149). Different studies have pointed out the presence of cytochrome P-450 2B in crustacean tissues, which plays an important role in the biotransformation of xenobiotic compounds (Brown and John, 1992; Kannan et al., 1995; James and Boyle, 1998; Livingstone, 1998; Goerke and Weber, 2001). For PCBs, congeners with only *m,p* vicinal H-atoms like CB52, 101 and 149 are metabolised by PB-type enzymes (cytochrome P-450 2B subfamily), whereas congeners with both *m,p* and *o,m* vicinal H-

atoms, for example CB110 and 132, are metabolised by both cytochrome P-450 1A and cytochrome P-450 2B isozymes. Similar PCB fingerprints have been observed in other crustacean species (Duinker et al., 1983; Mothershead et al., 1991; Bright et al., 1995; Kannan et al., 1995; Menone et al., 2000; Miao et al., 2000;; Pruell et al., 2000).

3.2. Comparison of pp'-DDE and HCB concentrations between sampling sites

Though the use of *pp'*-DDT has been prohibited for 25 years, *pp'*-DDE is still measured in environmental samples. In spider crab hepatopancreas, levels varied between 2.2 and 24.7 $ng.g^{-1}$d.w., whereas for HCB, they were at lower levels, between 0.33 and 0.83 $ng.g^{-1}$d.w. (Table 3). Specimen from Antifer had the highest *pp'*-DDE concentrations (M1=24.7 $ng.g^{-1}$d.w.). However, as opposed to PCBs, the differences with the other sites were less important since spider crabs from Roscoff, Le Conquet and Le Guilvinec were less contaminated by a factor of five, and even ten times less for that from Granville. For HCB, in spider crabs from Antifer and Le Conquet, the concentrations were lower than in organisms from the other sites. Comparatively, Perugini et al. (2004) measured *pp'*-DDE concentrations varying from 77-676 $ng.g^{-1}$lipid in the Norway lobster, *Nephrops norvegicus*, from the Central Adriatic Sea. In the White Sea Russia, *pp'*-DDE levels between 2.30-4.74 $ng.g^{-1}$w.w. were reported in the spider crab *Hyas araneus* (Muir et al., 2003). Finally, in the Belgian North Sea and the Western Scheldt Estuary, the crab *Lyocarcinus holsatus* and the shrimp *Crangon crangon* had *pp'*-DDE concentrations between 1.3-11 $ng.g^{-1}$w.w. and <0.81 $ng.g^{-1}$w.w. respectively, whereas in these same specimens, HCB concentrations were 0.14-0.84 and 0.08-0.5 $ng.g^{-1}$w.w. (Voorspoels et al., 2004). The concentration ranges measured in crustaceans from the French coastal waters are in the same range than all these published data whatever the study area and species (Table 3).

3.3. PCB concentrations and distribution related to species, gender and organs

3.3.1. Comparison between crustacean species

The contaminant levels and their distribution have been studied in different crustaceans species collected from Antifer (Table 3).

According to measurements in hepatopancreas, PCB concentrations were significantly greater in the spider crabs from Antifer than those in the edible crabs (Mann-Whitney test, $p<0.05$). Levels measured in the velvet swimming crabs from Antifer (Np1; CB153 = 594 $ng.g^{-1}$d.w.) were between those measured in the spider crab (M1; CB153 = 1271 $ng.g^{-1}$d.w.) and in the edible crabs (C1; CB153 = 253 $ng.g^{-1}$d.w.). For HCB and *pp'*-DDE, concentrations

measured in *Necora puber* (Np1) were higher than those of *Maja brachydactyla* (M1) and *Cancer pagurus* (C1). All individuals analysed in this study were male adult crustaceans. The differences of contaminant concentrations between species are probably due to differences in their life cycle (diet, moulting, migratory behaviour, metabolisation capacities). By far, food is the major route of organic contaminant accumulation for organisms, and this food contribution increases with trophic level. Decapod crustaceans have an omnivorous diet, consuming preferentially molluscs, small crustaceans and polychaetes (Cristo, 1998; Bernardez et al., 2000), but they also eat algae, echinoderms and fish carcasses. Moreover, velvet swimming crabs are sedentary species, oppositely to spider crabs and edible crabs. *Necora puber* are found all year long on intertidal rocky substrata in shallow waters (<15m), whereas spider crabs and edible crabs spend winter in deep bottoms (between 40 and 100 m), and migrate to shallow waters in summer for reproduction. Finally, moulting is a biological process specific to crustaceans; *Cancer pagurus* and *Necora puber*, as well as many other crustaceans, grow by successive moults throughout their life until about 20 years. The spider crab does not follow this general scheme as it moults and thus grows only during the first two years of its life. Some studies have suggested that contaminant elimination could happen during moulting (Swift, 1992; Raessler et al., 2005). Thus, all these particular behaviours of the three studied crustacean species can bring out differences on the bioavailability, uptake and elimination of organic contaminants.

A comparison of PCB patterns was carried out in the hepatopancreas of the crustaceans from Antifer (Fig. 3). Similar profiles were observed in all species with six predominant congeners, as previously shown for spider crabs: CB153, 138, 180, 187, 118 and 170. Together, they represented about the same contribution to the $\sum_{16}$PCBs, 90% for spider crabs and velvet swimming crabs, and 85% for edible crabs. However, the contribution of some compounds, including CB132, 138 and 149 appeared different between the three species (Mann-Whitney test, $p<0.05$). In spider crabs, CB149 and 132 represented about 0.8% and 0.4% of the sum of PCBs, so approximately 2-fold lower than in edible crab tissues (1.6% and 0.8% respectively). As related before, decapod crustaceans are able to partially biotransform some PCBs resulting from cytochrome P-450 2B isozyme activity. However, some studies have also pointed out variable metabolic efficiencies among the crustacean species (Brown and John, 1992; James and Boyle, 1998; Goerke and Weber, 2001). Our results highlighted higher metabolic capacities for *Maja brachydactyla* than the two other crustaceans. Moreover, the CB138/CB153 ratio depended on the species, since it was around 0.35-0.45 in spider crabs and 0.70-0.95 in edible crabs and velvet swimming crabs. The CB138 congener is

characteristic of river influence and related to the suspended matter due to its physico-chemical properties (Marchand et al., 1990). The higher contribution of this congener in male adult specimens of *Necora puber* and *Cancer pagurus* reflected their sedentary behaviour (Latrouite and Le Foll 1989), and suggested that they are more representative of the PCB contamination of the studied area than the adult male spider crabs.

3.3.2. Effect of gender

With the aim to characterise a possible influence of gender, a comparison of the PCB levels and distribution was performed in crustaceans collected from Antifer. Female edible crabs had hepatic PCB concentrations (both CB153 and $\sum_{16}$PCBs) significantly greater than male individuals (Mann-Whitney test, $p<0.05$), whereas no sex differences were observed for spider crabs. For HCB and *pp'*-DDE, the highest levels were measured in male spider crabs (Mann-Whitney test, $p<0.05$). The effect of gender in the distribution of individual PCB congeners was also examined. No significant differences were observed for *Cancer pagurus* and *Necora puber*, whereas CB118 was significantly higher in male spider crabs (8 and 1% of the $\sum_{16}$PCBs for male and female respectively) (Mann-Whitney test, $p<0.05$).

3.3.3. Comparison between organs

The physiological functions might act on the distribution of contaminants mainly related to the reproduction status, the metabolic activity or the lipid content in specific organs. The contaminant levels and distribution in different tissues (hepatopancreas, muscle and gonads) have been studied in more details in female crustaceans collected from Antifer and Granville, the most and the least contaminated areas respectively (Table 4).

In all cases, hepatopancreas had the highest PCB, *pp'*-DDE and HCB concentrations, followed by gonads and muscle (Mann-Whitney test, $p<0.05$). These results were in agreement with the lipid content measured in each organ (40-60%, 10-20% and 1-3% for hepatopancreas, gonads and muscle respectively); similar observations are usually made when examining the distribution of persistent hydrophobic compounds in biological tissues. The ratios of CB153 concentration in crustacean hepatopancreas to that in muscle were 56:1 and 36:1 for spider crabs and edible crabs respectively. At Granville, systematically lower hepatopancreas:muscle ratios were obtained, 43:1 and 12:1 respectively. The important PCB levels in biota and in sediment from the Seine Bay (Abarnou et al., 1987; Loizeau and Abarnou, 1994; Goerke and Weber, 2001; Johansson et al., 2004; Munschy et al., 2004), in addition to the strong capacity to accumulate these contaminants in hepatopancreas can

explain such differences between samples from the two sites. Similar results were obtained for the PCB distribution between hepatopancreas and gonads.

A non-parametric Mann–Whitney test ($p<0.05$) enabled us to highlight significant differences in the distribution of individual PCB congeners among organs. As well in Antifer as in Granville, both for spider crabs and for edible crabs, significant lower contributions of the congeners CB52, 132 and 149 were measured in hepatopancreas compared to that in muscle, confirming that the hepatopancreas is the major site of cytochrome P450-dependent biotransformation of PCBs in crustaceans (James and Boyle, 1998; Livingstone, 1998).

One of the aims of this work was to look for any contamination difference related to species, to gender or to organs on the PCB concentrations and distribution in crustaceans. Our results showed that the major variation factor is the type of tissues, in relation with its lipid content. Moreover, some differences were observed in the three crustacean species both for the PCB levels and their distribution. The crustacean life cycle, mainly the diet, the moulting, the migratory behaviour, as well as their different metabolic capacities can explain such results. Finally, gender had very slight effects on the PCB concentrations and distribution. However, in this study, all specimens were sampled in winter period (February), when the female crustaceans are still in period of sexual rest. Complementary studies should be carried out in summer, during the spawning period, to observe a possible difference between males and females.

3.4. PCB contamination and health implications

Depending on their substitution pattern, the PCB components exhibit different toxicity mechanisms, either a dioxin like or a non-dioxin like toxicity type.

Some congeners with two or more chlorine atoms at the ortho positions, the marker congeners (M-PCBs), express a non dioxin-like mechanism; they act on the central nervous system, the thyroid and the endocrine system, but only after a relatively high incidental intake or after continuous accumulation by long-term intake (ATSDR, 2000). Presently, in spite of their high levels in environmental samples and their toxicity, there is a lack of international regulations on the safe limits of M-PCBs in food. In 2002, the World Health Organisation established a maximum total daily intake for those compounds TDI (M-PCBs) of 0.02 $\mu g.kg^{-1}$ body weight per day, PCB concentration being expressed in Aroclor 1254 equivalent (AFSSA, 2003). This TDI was derived from a long-term toxicity experiment on monkey, on the basis of neurobehavioral and immunological effects. By considering that in food and

especially in sea products the 7 indicator PCBs (CB28, 52, 101, 118, 138, 153, 180) represent all together approximately more than half of the PCB concentration expressed in Aroclor 1254 equivalent (or technical mixture of the same chlorination degree), the PCB exposure should be less than 0.01µg/kg b.w. expressed as the sum of the concentrations of indicator congeners (Σ_7PCBs) (AFSSA, 2003). Back to our data, taking into account average concentrations in the different organs from crustaceans and considering a body weight mean of 65 kg, it becomes easy to estimate the maximum amount of crustacean meat that could be eaten before reaching the safety limit. Looking to organisms from Antifer, the orders of magnitude were around 70-120 g for crustacean muscle, whereas, for other consumable tissues, amounts became much smaller, 3-10 g for gonads and 1-2 g for hepatopancreas. As far as the lowest contaminated crustaceans from Granville are concerned, consumable quantities are 30, 20 and 40 times higher in hepatopancreas, muscle and gonads respectively. According to AFSSA (2003), French consume 5 g of crustaceans and molluscs on average per person and per day, to which mussels contribute for the main part. It signifies that globally the consumption of crustaceans is safe, except that of hepatopancreas and gonads of specimens from Antifer that could present a risk for human health.

Oppositely to the indicator PCBs, some congeners which have no or only one chlorine atom at the ortho-position, present the same toxicity mechanisms as 2,3,7,8-TCDD and other 2,3,7,8-substituted PCDD/Fs. These dioxin-like PCBs (DL-PCBs) provoke immuno- and reproductive toxicity, they negatively influence the organism growth and the development of the central nervous system, and they have carcinogenic potency. However, the effects become only manifest above a defined critical body burden (JECFA, 2002). For these reasons, food safety agencies have recently taken the DL-PCBs into account. The EU Directive has established a maximum limit for both groups of contaminants, dioxins and DL-PCBs. For fish and sea food products, the maximum limit is fixed at 4 pg TEQ.g^{-1}w.w., whereas a warning limit is set at 3 pg TEQ.g^{-1}w.w., above which complementary investigations are required to explain and reduce such high levels. This regulation should have come into force since December 2004 (Gallani et al., 2004) but is still under discussion due to the lack of data on DL-PCBs. In a previous study on the contamination of crustaceans (Bodin et al., 2004), preliminary results on dioxins and PCBs (indicators and dioxin-like compounds) were obtained on a limited set of pooled samples from different sites along the French coasts. Contribution of DL-PCBs to the total TEQ was about 50-60% in all samples. Interestingly, CB118 belongs to the group of indicator PCBs and consequently it was measured in the present study, as well as two other mono-ortho PCBs, CB105 and 156. Based on their

composition in crustaceans obtained in Bodin et al. (2004), and because, as shown earlier, PCB composition does not vary to a large extent within similar organisms from a same taxon and within tissues, the composition of one congener or of a specified group of congeners may be used to estimate the total PCB composition or the TEQ (DL-PCBs). This remains true in the case of chronic contamination, when there is no local source of PCB contamination with specified unusual composition. Practically, individual TEQs for CB105, 118 and 156 were calculated from their measured concentrations and from their respective TEFs (Van den Berg et al., 1998). According to previous results (Bodin et al., 2004), these compounds contribute approximately for 10-30% to the TEQ (DL-PCBs). By multiplying the measured TEQ (CB105, 105, 118) by a conversion factor, an estimated TEQ (DL-PCBs) was obtained. This conversion factor was here fixed at 10 to account for an approximate 10% composition of these three congeners, which leads to an over-estimated TEQ (DL-PCBs), and consequently to a safer situation in view of its application for health protection. The estimated TEQ (DL-PCBs) were very different among the various organs (Fig. 4). Most consumers eat the crustacean muscle only; in this case, the estimated TEQ (DL-PCBs) are far below the regulatory limits, whatever the species or their geographical origin. However, some people also appreciate to eat hepatopancreas and gonads. Only the gonads of crustaceans from Antifer were above the maximum limit of 4 pg $TEQ.g^{-1}$w.w., whereas considering hepatopancreas, specimens from Antifer, Le Conquet and spider crabs from Le Guilvinec were unfit for human consumption, without considering the consumed amount. The recent EU regulation (JECFA, 2002) on the maximum intake was set at 70 pg $TEQ.kg^{-1}$b.w. per month, or an average daily intake of 2.33 pg $TEQ.kg^{-1}$b.w. Using a same approach as earlier on M-PCBs, it becomes possible to estimate and compare maximum quantities of hepatopancreas, muscle and gonads that may be eaten safely. This approach, based on TEQ estimation, lead to consumable quantities which were very close to that obtained by the first estimation for M-PCBs.

The directives on food safety we used rely upon very different hypotheses, the first one on M- PCBs and the second one on DL-PCBs. It was completely out of our objectives to discuss the basic knowledge leading to these regulations. We only aimed at comparing concentrations in various crustacean samples to these safety levels. Whichever the approach, very similar results were obtained. They pointed out differences of crustacean tissue contamination and could modify consumption habits, especially in the case of regular consumers. Moreover, based on concentrations, the TEQ (DL-PCBs) approach was much more restricting than the TDI approach, as it excluded more contaminated samples, especially hepatopancreas and

gonads in crustaceans from the most contaminated areas. The estimation of the TEQ (DL-PCBs) is based on the analysis of very few DL-PCBs and on the use of a conversion factor voluntary over-estimated to protect the consumer's health. We are aware of the fact that this simplifying approach should be further investigated. The generalisation of such a conversion factor, to transform PCB data in TEQ data, requires more information on the exact composition of all the DL-PCBs in food. Some among the congeners, particularly CB126, contributes in a significant way to the TEQ because of their high TEF. However, their concentrations in crustaceans are very low, which complicates their measurement. The use of marker PCBs or a few other easily measured congeners could be a simplified method. They could first be used for screening purpose in food quality control, and secondly, in case of results above a defined limit, let say about 2-3 pg "over-estimated" TEQ.g^{-1}, the appropriate analytical protocol should be used for confirmation. This proposed approach might be compared to bioanalytical methods like CALUX assay and US EPA method 4425. Both methods consist in rapid and inexpensive assay. If the CALUX method provides direct information on the TEQ the proposed simplified chemical approach is based on the analysis of M-PCBs and a few mono-ortho PCB congeners and avoids the use of more sophisticated and expensive analytical technique. This confirmation method (HRGC-HRMS) should be used when the calculated approximate values fall close to the safety limits. However, the applicability and interest of such a screening method relies on the validity of the conversion factors and consequently the exact composition of PCBs. This last aspect should be more thoroughly investigated based on a larger data set, including data on very different species from various origins.

Acknowledgments

This work was partially funded by the Regional Council of Brittany. Moreover, we would like to thank fishermen who very kindly offered their help when sampling the crustaceans. We also would like to express our gratitude to Dr. Guillou (IUEM, Plouzané) and Dr. Latrouite (IFREMER, Plouzané) for their advices on the biological aspects of this work and their support all along the study.

References

Abarnou, A., Avoine, J., Dupont, J.P., Lafite, R., Simon, S., 1987. Role of suspended sediments on the distribution of PCB in the Seine Estuary France. Cont. Shelf Res. 7, 1345-1350.

Abarnou, A., Loizeau, V., Le Guellec, A-M., Jaouen-Madoulet, A., 2002. Contaminants in marine foodwebs. Revue Méd. Vét. 153, 425-432.

AFSSA, 2000. Dioxines: données de contamination et d'exposition de la population française. Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France section Aliments et Nutrition, France.

AFSSA, 2003. Avis de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments sur l'existence éventuelle d'une corrélation significative entre les teneurs dans les différents congénères de PCB. Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France section Aliments et Nutrition. Saisine n°2002-SA-0149, France.

Ahlborg, U.G., Becking, G.C., Birnbaum, L.S., Brouwer, A., Derks, H.J.G.M., Feeley, M., Golor, G., Hanberg, A., Larsen, J.C., Liem, A.K.D., 1994. Toxic equivalency factors for dioxin-like PCBs: Report on WHO-ECEH and IPCS consultation, December 1993. Chemosphere 28, 1049-1067.

ATSDR, 2000. Toxicological profile for polychlorinated biphenyls Update. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, US Public Health Service, Atlanta, GA, USA

Baars, A.J., Bakker, M.I., Baumann, R.A., Boon, P.E., Freijer, J.I., Hoogenboom, L.A.P., Hoogerbrugge, R., van Klaveren, J.D., Liem, A.K.D., Traag, W.A., de Vries, J., 2004. Dioxins, dioxin-like PCBs and non-dioxin-like PCBs in foodstuffs occurrence and dietary intake in the Netherlands. Toxicol. Lett. 151, 51-61.

Bazzanti, M., Chiavarini, S., Cremisini, C., Soldati, P., 1997. Distribution of PCB congeners in aquatic ecosystems: A case study. Environ. Int. 236, 799-813.

Beliaeff, B., Smith, P.J., 1996. Estimation of coastal water contamination long term trend using seasonal linear models. Wat. Resour. Bull. 32, 595-603.

Bernardez, C., Freire, J., Gonzalez-Gurriaran, E., 2000. Feeding of the spider crab *Maja squinado* in rocky subtidal areas of the Ría de Arousa north-west Spain. J. Mar. Biol. Ass. U.K. 80, 95-102.

Biger, E., 1996. Mesure du bruit de fond géochimique naturel et mise en évidence de l'influence anthropique en zone rurale: application au bassin de la Seine. Master Degree Report, Université Pierre et Marie Curie, Paris VI, France.

Bodin, N., Abarnou, A., Defour, S., Fraisse, D., 2004. PCBs, PCDD/Fs and PBDEs in crustaceans from different French coastal sites. Organohalogen Compounds 66, 1733-1738.

Bordajandi, R.L., Gomez, G., Abad, E., Rivera, J., del Mar Fernandez-Baston, M., Blasco, J., Gonzalez, M.J., 2004. Survey of persistent organochlorine contaminants PCBs, PCDD/Fs and HAPs, heavy metals Cu, Cd, Zn, Pb and Hg, Arsenic in food samples from Huelva Spain: Levels and health implications. J. Agric. Food Chem. 52, 992-1001.

Bright, D.A., Dushenko, W.T., Grundy, S.L., Reimer, K.J., 1995. Effects of local and distant contaminant sources: polychlorinated biphenyls and other organochlorines in bottom-dwelling animals from an Arctic estuary. Sci. Total Environ. 160/161, 265-283.

Brown, J., John, F., 1992. Metabolic alterations of PCB residues in aquatic fauna: distributions of cytochrome P4501A- and P4502B-like activities. Mar. Environ. Res. 34, 261-266.

Claisse, D., 1989. Chemical concentrations of French coasts: the result of a ten year mussel watch. Mar. Pollut. Bull. 20, 523-528.

Claisse, D., Joanny, M., Quintin, J.Y., 1992. Le Réseau National d'Observation de la qualité du milieu marin (RNO). Analusis 20, 19-22.

Connolly, J.P., 1991. Application of a food chain model to polychlorinated biphenyl contamination of the lobster and winter flounder food chains in New Bedford Harbor. Environ. Sci. Technol. 25, 760-770.

Cristo, M., 1998. Feeding ecology of *Nephrops norvegicus* Decapoda: Nephropidae. J. Nat. Hist. 32, 1493-1498.

Duinker, J.C., Hillebrand, M.T.J., Boon, J.P., 1983. Organochlorines in benthic invertebrated and sediments from the Dutch Wadden Sea; identification of individual components. Neth. J. Sea Res. 17, 19-38.

Focant, J-F., Eppe, G., Pirard, C., Massart, A-C., Andre, J-E., De Pauw, E., 2002. Levels and congener distributions of PCDDs, PCDFs and non-ortho PCBs in Belgian foodstuffs: Assessment of dietary intake. Chemosphere 482, 167-179.

Gallani, B., Verstraete, F., Boix, A., Von Holst, C., Anklam, E., 2004. Levels of dioxins and dioxin-like PCBs in food and feed in Europe. Organohalogen Compounds 66, 1917-1924.

Goerke, H., Weber, K., 2001. Species-specific elimination of polychlorinated biphenyls in estuarine animals and its impact on residue patterns. Mar. Environ. Res. 512, 131-149.

James, M.O., Boyle, S.M., 1998. Cytochromes P450 in crustacea. Comp. Biochem. Physiol. C 121, 157-172.

Jaouen-Madoulet, A., Abarnou, A., Le Guellec, A-M., Loizeau, V., Leboulenger, F., 2000. Validation of an analytical procedure for polychlorinated biphenyls, coplanar polychlorinated biphenyls and polycyclic aromatic hydrocarbons in environmental samples. J. Chromatogr. A 886, 153-173.

JECFA, 2002. Polychlorinated dibenzodioxins, polychlorinated dibenzofurans, and coplanar polychlorinated biphenyls. In: Canady, R., Crump, K., Feeley, M., Freijer, J., Kogevinas, M., Malisch, R., Verger, P., Wilson, J., Zeilmaker, M. (eds), Safety Evaluation of Certain Food Additives and Contaminants. Report of the 57th Meeting of the Joint FAO/WHO Expert Commitee on Food Additives and Contaminants. WHO Fodd Additives Series, vol. 48, World Health Organisation, Geneva, pp. 451-664.

Jensen, S., 1966. Report of a new chemical hazard. New Sci. 32, 62.

Johansson, I., Moisan, K., Guiot, N., Truquet, I., Munschy, C., Tronczynski, Y., 2004. Levels and trends of organohalogen compounds in mussels from the Seine estuary in 1981-2003. Organohalogen Compounds 66, 1868-1876.

Kannan, N., Reusch, T.B.H., Schulz-Bull, D.E., Petrick, G., Duinker, J.C., 1995. Chlorobiphenyls: Model compounds for metabolism in food chain organisms and their potential use as ecotoxicological stress indicators by application of the metabolic slope concept. Environ. Sci. Technol. 29, 1851-1859.

Kannan, K., Nakata, H., Stafford, R., Masson, G.R., Giesy, J.P., 1998. Bioaccumulation and toxic potential of extremely hydrophobic polychlorinated biphenyl congeners in biota collected at a superfund site contaminated with Arochlor 1268. Environ. Sci. Technol. 32, 1214-1221.

Lafite, R., Romaña, L-A., 2001. A Man-altered microtidal estuary: the Seine Estuary France, introduction to special issue. Estuaries 24, 939.

Lazure, P., Jegou, A-M., 1998. 3D modelling of seasonal evolution of Loire and Gironde plumes on Biscay Bay continental shelf. Oceanol. Acta 212, 165-177.

Livingstone, D.R., 1998. The fate of organic xenobiotics in aquatic ecosystems: quantitative and qualitative differences in biotransformation by invertebrates and fish. Comp. Biochem. Physiol. A 120, 43-49.

Loizeau, V., Abarnou, A., 1994. Distribution of Polychlorinated biphenyls in dab *Limanda limanda* from the baie de seine Eastern Channel. Mar. Environ. Res. 382, 77-91.

Loizeau, V., Abarnou, A., Cugier, P., Jaouen-Madoulet, A., Le Guellec, A-M., Menesguen, A., 2001. A Model of PCB Bioaccumulation in the Sea Bass Food Web from the Seine Estuary Eastern English Channel. Mar. Pollut. Bull. 43, 242-255.

Mackay, D., Fraser, A., 2000. Bioaccumulation of persistent organic chemicals: mechanisms and models. Environ. Pollut. 110, 375-391.

Marchand, M., Abarnou, A., Marcaillou-Lebaut, C., 1990. Les Polyclorobiphényles (PCB) en milieu marin. Biogéochimie et écotoxicologie. Rapports scientifiques et techniques de l'Ifremer n°18.

McFarland, V.A., Clarke, J.U., 1989. Environmental occurrence, abundance and potential toxicity of polychlorinated biphenyl congeners: considerations for a congeners-specific analysis. Environ. Health Perspect. 91, 225-231.

Menone, M.L., Bortolus, A., Botto, F., Aizpun de Moreno, J.E., Moreno, V.J., Iribarne, O., Metcalfe, T.L., Metcalfe, C.D., 2000. Organochlorine contaminants in a coastal lagoon in Argentine: Analysis of sediment, crabs, and cordgrass from two different habitats. Estuaries 23, 583-592.

Miao, X-S., Swenson, C., Woodward, L.A., Li, Q.X., 2000. Distribution of polychlorinated biphenyls in marine species from French Frigate Shoals, North Pacific Ocean. Sci. Total Environ. 257, 17-28.

Mothershead, R., Hale, R.C., Greaves, J., 1991. Xenobiotic compounds in blue crabs from a highly contaminated urban subestuary. Environ. Toxicol. Chem. 10, 1341-1349.

Muir, D., Savinova, T., Savinov, V., Alexeeva, L., Potelov, V., Svetochev, V. 2003. Bioaccumulation of PCBs and chlorinated pesticides in seals, fishes and invertebrates from the White Sea, Russia. Sci. Total Environ. 306, 111-131.

Munschy, C., Moisan, K., Tronczynski, Y. 2004. Levels and patterns of PCBs and PCDD/Fs in different tissues of the marine flatfish dab *Limanda limanda* from the English Channel, France. Organohalogen Compounds 66, 1695-1703.

O'Connor, T.P., 2004. Trends in chemical concentrations in mussels and oysters collected along the US coasts from 1986 to 1993. Mar. Environ. Res. 41, 183-200

Perugini, M., Cavaliere, M., Giammarino, A., Mazzone, P., Olivieri, V., Amorena, M. 2004. Levels of polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides in some edible marine organisms from the Central Adriatic Sea. Chemosphere 575, 391-400.

Pruell, R.J., Taplin, B.K., McGovern, D.G., McKinney, R., Norton, S.B. 2000. Organic contaminant distributions in sediments, polychaetes *Nereis virens* and American lobster *Homarus americanus* from a laboratory food chain experiment. Mar. Environ. Res. 49, 19-36.

Raessler, M., Rothe, J., Hilke, I. 2005. Accurate determination of Cd, Cr, Cu and Ni in woodlice and their skins--is moulting a means of detoxification? Sci. Total Environ. 337, 83-90.

Salomon, J.C., Guéguéniat, P., Orbi, A., Baron, Y., 1988. A lagrangian model for long term tidally induced transport and mixing. Verification by artificial radionucleide concentrations. In: J.C. Guary, P. Guéguéniat, R.J. Pentreath (eds), Radionucleides: a Tool for Oceanography. Elsiever, Amsterdam.

Schantz, M.M., Parris, R.M., Kurz, J., Ballschmiter, K., Wise, S.A. 1993. Comparison of methods for the gas-chromatographic determination of PCB congeners and chlorinated pesticides in marine reference materials. Fresenius J. Anal. Chem. 346, 766-778.

Smith, A.G., Gangolli, S.D. 2002. Organochlorine chemicals in seafood: occurrence and health concerns. Food Chem. Toxicol. 40, 767-779.

Swift, D.J. 1992. The accumulation of plutonium by the European lobster *Homarus gammarus* L. J. Environ. Radioactiv. 161, 1-24.

Tessier, L. 2003. Transport et caractérisation des matières en suspension dans le bassin versant de la Seine: identification de signatures naturelles anthropiques. Ph.D. Thesis, Ecole Nationale des Ponts et Chaussée, Paris, France.

Van den Berg M., Birnbaum L., Bosveld A.T.C., Brunström B., Cook P., Feeley M., Giesy J.P., Hanberg A., Hasegawa R., Kennedy S.W., Kubiak T., Larsen J.C., van Leeuwen F.X.R., Liem A.K.D., Nolt C., Peterson R.E., Poellinger L., Safe S., Schrenk D., Tillitt D., Tysklind

M., Younes M., Fredrik Wærn F., and Zacharewski T. 1998. Toxic equivalents factors TEF for PCBs, PCDDs, PCDFs for humans and wildlife. Environ. Health Perspect. 106, 775-792.

Voorspoels, S., Covaci, A., Maervoet, J., De Meester, I., Schepens, P. 2004. Levels and profiles of PCBs and OCPs in marine benthic species from the Belgian North Sea and the Western Scheldt Estuary. Mar. Pollut. Bull. 49, 393-404.

Table and figure list

Table 1. Biological characteristics of the sampled species. For *Necora puber*, a first pool of 11 males, and a second of 10 females were analysed.

Table 2. Measured concentrations and recoveries of PCBs and pesticides in CRM349.

Table 3. Organochlorinated contaminants in the hepatopancreas of male crustaceans from French coastal sites: mean concentrations of CB153 ($ng.g^{-1}$d.w.), sum of the 16 analysed PCBs ($ng.g^{-1}$d.w.), sum of the 7 indicator PCBs ($ng.g^{-1}$d.w.), *pp'*-DDE ($ng.g^{-1}$d.w.) and HCB ($ng.g^{-1}$d.w.). Lipid content (%) is expressed on a dry weight basis.

Table 4. Organochlorinated contaminants in different organs (hepatopancreas, muscle, gonads) of female crustaceans collected at Antifer (A) and Granville (B): mean concentrations of CB153 ($ng.g^{-1}$d.w.), sum of the 16 analysed PCBs ($ng.g^{-1}$d.w.), sum of the 7 indicator PCBs ($ng.g^{-1}$d.w.), pp'-DDE ($ng.g^{-1}$d.w.) and HCB ($ng.g^{-1}$d.w.). Lipid content (%) is expressed on a dry weight basis.

Fig. 43. Map of the studied areas. M = *Maja brachydactyla*; C = *Cancer pagurus*; Np = *Necora puber*.

Fig. 44. PCB average pattern in hepatopancreas of male spider crabs from the five sampling sites (Antifer, Granville, Roscoff, Le Conquet and Le Guilvinec). Concentrations of each congener were normalised to CB153 (100×CBx/CB153). Error bars show the range (minimum and maximum) of relative concentrations among the five sampling sites.

Fig. 45. PCB average patterns in hepatopancreas of male crustaceans from Antifer (M = *Maja brachydactyla*; C = *Cancer pagurus*; Np = *Necora puber*). Concentrations of each congener were normalised to CB153 (100×CBx/CB153). Error bars show the range (minimum and maximum) of relative concentrations for each species.

Fig. 46. Estimated TEQ (DL-PCBs) concentrations in organs (H = hepatopancreas; M = muscle; G = gonads) of various crustacean species (M = *Maja brachydactyla*; C = *Cancer pagurus*; Np = *Necora puber*) from different coastal areas (1-5; see map Fig.1)

Table 3. Biological characteristics of the sampled species. For *Necora puber*, a first pool of 11 males, and a second of 10 females were analysed.

Sites	Species name	Common name	Abbreviation	N		Weight (g)		Lenght (cm)	
				m	f	m	f	m	f
Antifer	*Maja brachydactyla*	spider crab	M1	4	4	560±192	491±118	115±1.8	11.6±0.5
	Cancer pagurus	edible crab	C1	3	3	463±193	432±121	13.8±2.4	14.7±1.5
	Necora puber	velvet swimming crab	Np1	pool (10)	pool (10)	89±15	85±8	4.9±0.3	4.9±0.3
Granville	*Maja brachydactyla*	spider crab	M2	3	3	1177±185	799±70	15±1	14.5±0.1
	Cancer pagurus	edible crab	C2	3	3	543±31	511±48	15±0.5	15±0.5
Roscoff	*Maja brachydactyla*	spider crab	M3	3	3	1089±135	756±59	14.3±0.6	13.8±0.3
Le Conquet	*Maja brachydactyla*	spider crab	M4	5	5	1684±261	802±115	17±1.4	13.9±0.9
	Cancer pagurus	edible crab	C4	5	5	920±129	926±118	17±0.9	19.5±1.1
Le Guilvinec	*Maja brachydactyla*	spider crab	M5	3	3	680±132	702±80	13.2±0.8	13.7±0.3
	Cancer pagurus	edible crab	C5	3	3	1002±159	775±38	17.3±0.3	17.5±0.7

Table 4. Measured concentrations and recoveries of PCBs and pesticides in CRM349.

	Certfied values ($ng.g^{-1}$)	SD[a] ($ng.g^{-1}$)	RSD[b] (%)	Experimental mean (n=6) ($ng.g^{-1}$)	SD[c] ($ng.g^{-1}$)	RSD[d] (%)	Recovery[e] (%)
PCB							
CB28	68	7	10.3	54.6	10.1	18.5	80.3
CB52	149	20	13.4	116.0	16.4	14.2	77.8
CB101	370	17	4.6	300.5	13.5	4.5	81.2
CB110	175[f]			157.6	18.9	12.0	87.6
CB149	284[f]	55	19.4	228.0	12.5	6.0	80.3
CB118	454	31	6.8	412.9	15.5	3.8	91.0
CB153	938	49	5.2	990.7	66.5	6.7	105.6
CB132				65.5	11.2	17.1	
CB105	51[f]			109.3	21.2	19.4	218.6
CB138	765[f]	74	9.7	881.9	52.5	6.0	115.3
CB187	276[f]	14	5.1	222.9	12.5	5.6	80.8
CB128	104[f]	9	8.7	90.2	8.0	8.8	86.8
CB156	40[f]			39.0	6.3	16.2	97.6
CB180	280	22	7.9	243.5	13.3	5.5	87.0
CB170	149[f]	15	10.1	137.8	11.2	8.1	92.5
CB194				26.7	3.1	11.5	
Pesticides							
HCB	42[f]			37.1	8.1	21.9	88.3
pp'-DDE	234[f]			280.1	28.3	10.1	119.7

[a] Standard Deviation of certified values

[b] Relative Standard Deviation of certified values, (SD/mean)*100

[c] Standard Deviation of experimental values

[d] Relative Standard Deviation of experimental values, (SD/mean)*100

[e] Recovery (experimental values / certified values)*100

[f] Non certified concentrations (Schantz et al., 1993)

Table 3. Organochlorinated contaminants in the hepatopancreas of male crustaceans from French coastal sites: mean concentrations of CB153 (ng.g^{-1}d.w.), sum of the 16 analysed PCBs (ng.g^{-1}d.w.), sum of the 7 indicator PCBs (ng.g^{-1}d.w.), *pp'*-DDE (ng.g^{-1}d.w.) and HCB (ng.g^{-1}d.w.). Lipid content (%) is expressed on a dry weight basis.

Site	Species	N	Water content (%)	Lipid content (%)	CB153 (ng.g^{-1}d.w.)	Σ_{16}PCBs (ng.g^{-1}d.w.)	Σ_{7}PCBs (ng.g^{-1}d.w.)	*pp'*- DDE (ng.g^{-1}d.w.)	HCB (ng.g^{-1}d.w.)
Antifer	*Maja brachydactyla*	4	64±4	46.8±6.1	1271±433	2976±905	2335±741	24.7±4.4	0.51±0.21
	Cancer pagurus	3	65±8	45.9±4.3	253±77	817±231	617±169	11.6±1.9	0.28±0.09
	Necora puber	pool	69	40.9	594	1632	1229	36.0	1,13
Granville	*Maja brachydactyla*	3	71±3	48.2±4.3	29±6	77±11	60±9	2.2±0.5	0.67±0.07
	Cancer pagurus	3	68±8	44.1±5.1	24±6	68±15	52±10	2.2±0.2	0.36±0.05
Roscoff	*Maja brachydactyla*	3	64±6	44.8±7.1	38±5	101±4	74±3	4.5±0.5	0.72±0.26
Le Conquet	*Maja brachydactyla*	5	63±3	47.3±4.3	148±21	456±76	320±52	3.9±0.5	0.33±0.13
	Cancer pagurus	5	61±4	46.6±6.1	60±22	209±72	154±42	4.2±1.8	0.46±0.18
Le Guilvinec	*Maja brachydactyla*	3	65±6	51.3±5.9	81±15	251±52	180±34	4.6±1.5	0.83±0.2
	Cancer pagurus	3	68±4	48.8±3.1	24±10	77±28	59±21	2.4±0.6	0.33±0.18

Table 4. Organochlorinated contaminants in different organs (hepatopancreas, muscle, gonads) of female crustaceans collected at Antifer (A) and Granville (B): mean concentrations of CB153 ($ng.g^{-1}d.w.$), sum of the 16 analysed PCBs ($ng.g^{-1}d.w.$), sum of the 7 indicator PCBs ($ng.g^{-1}d.w.$), pp'-DDE ($ng.g^{-1}d.w.$) and HCB ($ng.g^{-1}d.w.$). Lipid content (%) is expressed on a dry weight basis.

(A)

Species	Organs	N	Water content (%)	Lipid content (%)	CB153 ($ng.g^{-1}d.w.$)	Σ_{16}PCBs ($ng.g^{-1}d.w.$)	Σ_{7}PCBs ($ng.g^{-1}d.w.$)	*pp*'-DDE ($ng.g^{-1}d.w.$)	HCB ($ng.g^{-1}d.w.$)
Maja brachydactyla	hepatopancreas	4	63±2	47.1±11.1	1070±216	2256±548	1774±447	18.8±1.2	0.26±0.05
	muscle	4	80±4	1.9±0.1	19±8	52±20	40±16	0.25±0.12	nd
	gonads	4	65±7	11.2±4.1	99±18	253±48	194±38	5.4±0.9	0.15±0.06
Cancer pagurus	hepatopancreas	3	67±5	41.4±8.9	542±67	1762±217	1314±154	17.5±0.6	0.39±0.12
	muscle	3	77±2	2.6±0.2	15±5	42±13	33±11	0.23±	nd
	gonads	3	63±9	15.6±5.3	190±51	623±48	481±42	5.8±1.3	0.21±0.09
Necora puber	hepatopancreas	pool	68	40.9	493	1518	1118	36.8	0.85
	muscle	pool	77	3.1	12	43	35	0.13	nd
	gonads	pool	54	14.2	156	519	374	13.1	0.62

(B)

Species	Organs	N	Water content (%)	Lipid content (%)	CB153 ($ng.g^{-1}d.w.$)	Σ_{16}PCBs ($ng.g^{-1}d.w.$)	Σ_{7}PCBs ($ng.g^{-1}d.w.$)	*pp*'-DDE ($ng.g^{-1}d.w.$)	HCB ($ng.g^{-1}d.w.$)
Maja brachydactyla	hepatopancreas	3	67±4	51.2±8.1	23±7	67±28	52±14	2.3±1.2	0.83±0.23
	muscle	3	82±3	2.2±0.2	0.53±0.08	1.8±0.2	1.3±0.2	nd	nd
	gonads	3	66±2	11.8±3.1	3.6±1.6	11.3±5.9	7.5±3.2	0.16±0.06	0.15±0.06
Cancer pagurus	hepatopancreas	3	71±1	43.3±9.4	12±4	39±14	29±9	1.5±0.5	0.74±0.21
	muscle	3	79±3	3±0.2	0.98±0.13	3.6±0.7	2.5±0.2	0.1±0.01	nd
	gonads	3	73±3	14.1±2.9	4.3±1.5	13±5.2	9.8±3.8	0.43±0.11	0.64±0.18

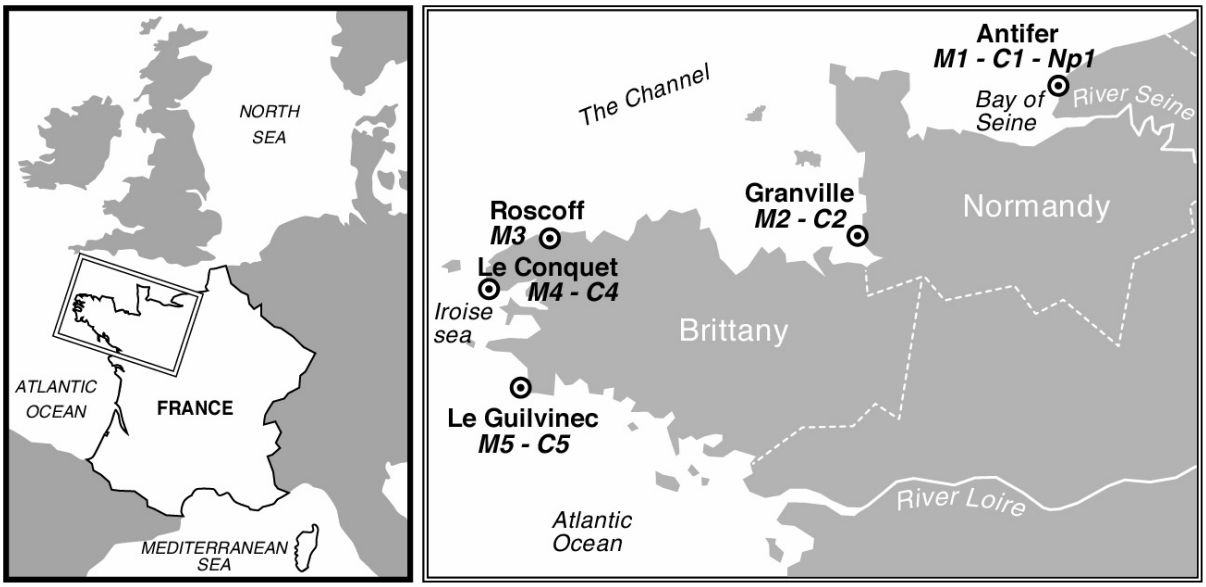

Fig. 47. Map of the studied areas. M = *Maja brachydactyla*; C = *Cancer pagurus*; Np = *Necora puber*.

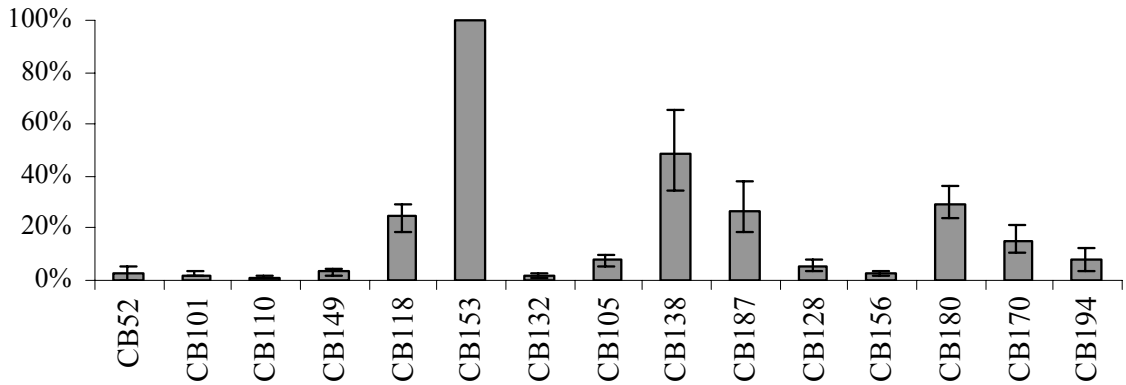

Fig. 48. PCB average pattern in hepatopancreas of male spider crabs from the five sampling sites (Antifer, Granville, Roscoff, Le Conquet and Le Guilvinec). Concentrations of each congener were normalised to CB153 (100×CBx/CB153). Error bars show the range (minimum and maximum) of relative concentrations among the five sampling sites.

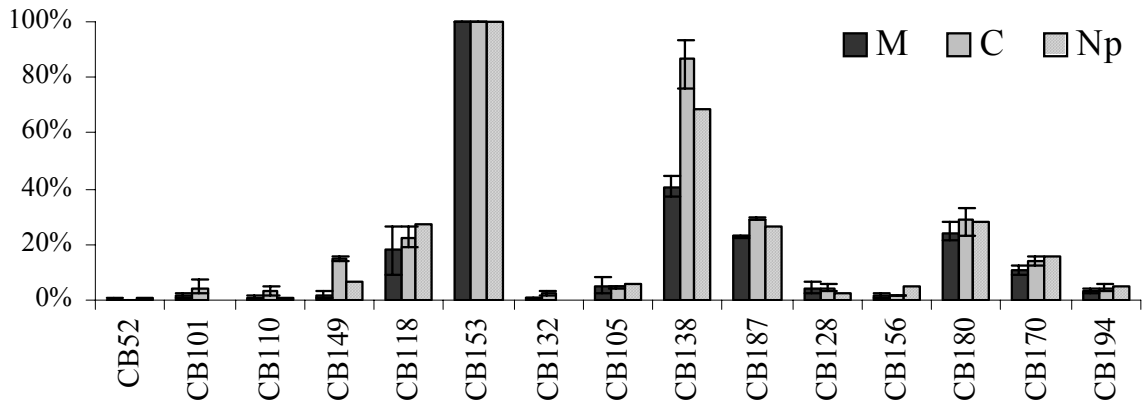

Fig. 49. PCB average patterns in hepatopancreas of male crustaceans from Antifer (M = *Maja brachydactyla*; C = *Cancer pagurus*; Np = *Necora puber*). Concentrations of each congener were normalised to CB153 (100×CBx/CB153). Error bars show the range (minimum and maximum) of relative concentrations for each species.

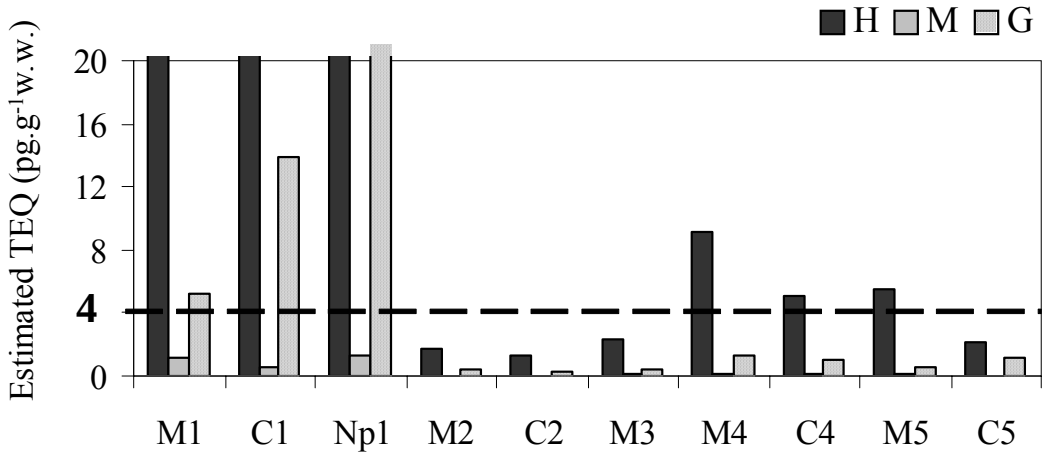

Fig. 50. Estimated TEQ (DL-PCBs) concentrations in organs (H = hepatopancreas; M = muscle; G = gonads) of various crustacean species (M = *Maja brachydactyla*; C = *Cancer pagurus*; Np = *Necora puber*) from different coastal areas (1-5; see map Fig.1)

ARTICLE 2

PCB, PCDD/F and PBDE levels and profiles in crustaceans from the coastal waters of Brittany and Normandy (France)

N. Bodin [a, b], A. Abarnou [* a], D. Fraisse [c], S. Defour [c], V. Loizeau [a], A-M. Le Guellec [a], X. Philippon [a].

[a] IFREMER, Département Biogéochimie et Ecotoxicologie, Centre de Brest, BP70, 29280 Plouzané, France.

[b] Université de Bordeaux, Laboratoire de Physico et Toxico-Chimie des Systèmes Naturels, 1, CNRS, 351 Cours de la Libération, 33400 Talence, France

[c] CARSO, 321 avenue Jean Jaurès, 69362 Lyon Cedex 07, France

[*] Corresponding author: Phone: (33) 5 40 00 22 55; Fax: (33) 5 40 00 22 67; e-mail: n.bodin@lptc.u-bordeaux1.fr

En préparation pour Marine Pollution Bulletin

Abstract

PCBs, PCDD/Fs and PBDEs were analyzed in the muscle of various crustacean species (spider crab, edible crab, velvet swimming crab and Norway lobster) from the Brittany and Normandy coasts. The highest contaminant levels were measured at Antifer (Seine Bay, Normandy), but do not raise any sanitary problems based on the current food safety limits for PCDD/Fs and PCBs. Similar PCB and PBDE patterns were observed in crustaceans from all sites with the predominance of the high chlorinated PCB components (CB153, 138, 118 and 180), and of a few PBDE congeners (BDE 47, 99, 100 and 28). Within dioxins, 2378-TCDF was the major component in crustaceans from the Seine Bay, whereas specimens from the other cleaner areas had higher relative concentrations of OCDD. Finally, the metabolic capacities of the decapod crustaceans were assessed by comparing their contaminant profiles to those observed in mussels and sea bass.

Keywords: Organohalogenated contaminants, crustaceans, metabolization, human diet, France

1. Introduction

Polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans (PCDD/Fs), polychlorinated biphenyls (PCBs) and polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) are widespread contaminants of great concern for the environment and the human health. Because of their capacity for bioaccumulation (Law et al., 2003; Voorspoels et al., 2003; Okumura et al., 2004), PCDD/Fs, PCBs and PBDEs reach higher level consumers, including humans. Dietary intake, especially the consumption of marine organisms, is considered as one of the most important sources of these compounds for human beings (Pompa et al., 2003; Domingo, 2004). The consumers, and thus the food agencies, are particularly aware of the potential health effects associated with eating contaminated food. In order to prevent such hazards and to keep human exposure within safe limits, regulatory actions have been implemented: for instance, from 2001, the Council of the European Union fixed a Maximum Level for dioxins in fish and shellfish of 4 pg WHO-PCDD/F TEQ per gram. The next step is to include dioxin-like PCBs (DL-PCBs) in the estimation of this maximum safe TEQ level (Verstraete, 2002). However, in spite of the huge number of studies available on marker PCBs, information about DL-PCBs in food and more particularly in sea products is quite limited.

Decapod crustaceans like the spider crab (*Maja brachydactyla*), edible crab (*Cancer pagurus*), velvet swimming crab (*Necora puber*) and Norway lobster (*Nephrops norvegicus*) are macrobenthic species living in coastal waters and having an opportunistic diet behaviour. Because of their high trophic level, crustaceans tend to accumulate large amounts of lipophilic contaminants (Jimenez et al., 1998; Voorspoels et al., 2004). The French population greatly appreciates crustaceans; their consumption represents about 10-15% of that of fresh seafood (OFIMER, 2003). Nevertheless, very little information is available on the contamination of crustaceans from the French coast.

The main objectives of this study were first to obtain data for the concentration ranges of PCBs, PCDD/Fs and PBDEs in large crustaceans from the French coasts, and to evaluate the potential sanitary risk for human consumption. Then, contaminant fingerprints in crustaceans were compared to those measured in mussel and sea bass tissues in order to apprehend their metabolic capacities. Sea bass were chosen because they are able to metabolize organic contaminants (Opperhuizen and Sijm, 1990; Goerke and Weber, 2001; Stapleton et al., 2004b); they are at a higher trophic level, feeding on supra-benthic species such as crustaceans (shrimps and mysidaceans) and small fishes (e.g. gobies) (Loizeau et al., 2001). Oppositely, mussels were selected as good bioindicators of aquatic contamination due to their ability to accumulate contaminants from detritic suspended particles and from phytoplankton,

and because of their limited capacities to biotransform them (Claisse, 1989). Moreover, mussels belong to the diet of the studied decapod crustaceans, except Nephrops norvegicus, and of the sea bass (Bernardéz et al., 2000).

2. Experimental section

2.1. Sampling

Five sampling stations, characterized by an important crustacean fishing activity and representing very different situations in term of organic chemical contamination (Abarnou et al., 2002; Bodin et al., accepted), were selected along the coasts of Brittany and Normandy (Fig 1). Antifer (station 1) is located near an oil terminal in the Seine Bay, and is largely exposed to large contaminant discharges from the Seine River. The Seine watershed area is about 78,600 km^2, regrouping approximately 30% of the French population. Moreover, 40% of the national industrial activity takes place in this watershed basin where agricultural activities are also significant (Tessier, 2003). Granville (station 2) on the western side of the Contentin Peninsula, Roscoff (station 3) in Northern Brittany and Le Guilvinec (station 5) in Southern Brittany are mainly characterized by agricultural activities and tourism in the summer period. Finally, Le Conquet is located in the Iroise Sea (station 4) in Western Brittany. The coastal waters near Le Conquet may be exposed to water exchanges flowing out the Rade of Brest, an urban area with about 250,000 inhabitants, and a large naval base also characterized by shipyard and various industrial activities.

The various crustacean species were obtained from these areas on the basis of their availability; mussels (*Mytilus edulis*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*) were only collected at Antifer and Le Conquet (Fig 1). For each species, only male adults of homogeneous size were kept in order to minimize the biological variability of the sampling. All these species are suitable for human consumption.

2.2. Sample preparation

The length, wet body weight and sex of the crustacean specimens were measured before dissection (Supplement information). For each species from each site, muscle was carefully dissected from the inner body to prepare a pooled sample made of 3 to 6 individual specimens for edible and spider crabs, 10 for velvet swimming crabs, and 20 for Norway lobsters. Sea bass were carefully filleted and muscle tissues from 10 fishes were pooled. Mussels were first left to soak overnight in clean aerated sea water to eliminate solid particles from their gut, and then dissected and pooled together (35 to 40 individuals per sample). All samples were kept at

–20°C, then freeze-dried and ground into a fine homogeneous powder. The water content of the samples is reported in supplement information to enable further comparison with published data expressed in wet weight.

2.3. Chemical analysis

Eighteen individual PCB congeners were analyzed, including the set of seven indicators (M-PCBs) currently measured in pollution monitoring programs (PCBs 28, 52, 101, 118, 138, 153 and 180) and the twelve dioxin like-PCBs (DL-PCBs) (PCBs 77, 81, 105, 114, 118, 123, 126, 156, 157, 167, 169 and 189). PCB118 belongs to both sets of congeners. Concerning dioxins and furans, the concentrations of each of the seventeen 2378-substituted congeners were determined. The 2378-TCDD Toxicity Equivalent Quantity was estimated using the corresponding WHO-TEF factors of each 2378 PCDD/Fs and DL-PCBs (Van den Berg et al., 1998). Finally, thirteen PBDE congeners were also analyzed (PBDEs 17, 28, 47, 66, 71, 85, 99, 100, 138, 153, 154, 183 and 190). All analyses were performed by following the isotope dilution method (U.S. EPA Method 1613, 1994).

After addition of known amounts of a standard solution of sixteen $^{13}C_{12}$-PCDD/Fs, eighteen $^{13}C_{12}$-PCBs and nine $^{13}C_{12}$-PBDEs, the samples were extracted with a solvent mixture of toluene-cyclohexane (50:50) for 12 hours in a Soxhlet apparatus. The extracts were evaporated to dryness and weighed. The amount of extractible material estimated the lipid content (Supplement information). The fatty co-extracted material was removed by sulfonation with sulphuric acid: for that purpose, the extract was taken up in 50ml hexane into a separator funnel and partitioned three times against 50mL of sulphuric acid, followed by once against deionised water. The aqueous layers were discarded and the extract was poured through a drying column of anhydrous sodium sulphate. Then, a second purification step was performed on a multi-layer adsorption chromatography column, successively packed from bottom to top with 1g silica gel, 2g basic silica gel, 1g silica gel, 4g acidic silica gel and 1g silica gel. The column was pre-eluted with 30mL of hexane and the stopcock was closed when hexane reached the silica gel layer. Then the concentrated extract was applied to the column and PCDD/Fs, PCBs and PBDEs eluted with hexane. Separation of PCB, PBDE and PCDD/Fs was performed on a Florisil column (60-100 mesh, activated at 600°C for a minimum of 18 hours, deactivated with 3% water) (Malisch et al., 2000). The 6 g Florisil column was pre-eluted with 50mL heptane. The stopcock was closed when the heptane reached the Florisil layer and the concentrated extract was applied. The co-extracted PCBs and PBDEs were eluted with 60mL heptane and PCDD/Fs were eluted with 60mL toluene.

The first fraction (PBDEs and PCBs) was then fractionated on a Carbopack B column (mix of 2g Carbopack B + 2g Celite). PCBs were separated into three fractions of first di-ortho PCBs (elution with hexane), then mono-ortho PCBs (elution with hexane/toluene) and finally non ortho-PCBs; PBDEs were eluted in the two first fractions. After concentration and addition of syringe standards (3 $^{13}C_{12}$-PCBs and 2 $^{13}C_{12}$-PBDEs) to the respective fractions, they were determined by HRGC/HRMS (WATERS Autospec set at a resolution of 10,000; split/splitless injection of 1 or 1.5µL, DB-5 column and/or HT8-PCB column from SGE). After addition of $^{13}C_{12}$-1234-TCDD and $^{13}C_{12}$-123789-HxCDD, the PCDD/F fraction was concentrated to a final volume of 25µL, and determination was performed by HRGC/HRMS (WATERS Autospec set at a resolution of 10,000; split/splitless injection of 1.5µL, DB-5ms column).

2.4. Quality control

All the performance criteria required for the analysis of dioxins (U.S. EPA Method 1613, 1994) were met. Analyte recovery ranged from 80-110%, except for OCDD and OCDF which were therefore higher than 40%. The linearity was checked systematically and the response factors were estimated by running four standard solutions before any real sample series, and repeated in the case of larger sample sets. The detection limits of the method ranged from 1 to 20 pg.g^{-1} lipids for DL-PCBs, PCDD/Fs and PBDEs, whereas they were 1 pg.g^{-1} lipids for M-PCBs. Several procedural blanks were analyzed with the samples, showing very few or no interfering compounds, except in the case of marker PCBs with no effects on the actual concentrations of the true samples. The accuracy of the protocol was assessed by analyzing dioxins in a milk powder certified reference material (BCR-CRM607). The laboratory is accredited for the analysis of trace contaminants in food and feedstuff and has satisfactorily participated in several recent inter-laboratory comparisons on dioxins, DL-PCBs and PBDEs in food (2004 5th round and the 2005 study, Norwegian Institute of Public Health).

3. Results and discussion

3.1. Contamination levels in crustaceans

The concentrations of PCBs, PCDD/Fs and PBDEs are reported on a dry weight (d.w.) basis (Tables 1 and 2).

Crustaceans from Antifer were the most contaminated samples for all contaminant families confirming the chronic pollution of the Seine Bay, mainly due to contaminant inputs by the Seine River (Abarnou et al., 2002; Johansson et al., 2004). For example, the Σ_{18}PCB concentrations in spider crabs M1 reached 30 ng.g^{-1}d.w, respectively about 6-, 12-, 15- and

20- fold higher than those measured in specimen from Le Conquet (M4), Le Guilvinec (M5), Roscoff (M3), and Granville (M2). Le Conquet was slightly more contaminated than the other sites of Brittany and Basse-Normandie, most likely due to the influence of the Rade of Brest discharges (Marchand et al., 1983). Moreover, although Le Guilvinec is characterised by a weak industrial activity like Granville and Roscoff, the PCB concentrations measured in spider crabs M5 were slightly higher than those in M2 and M3, suggesting an influence of the Loire River plume until the Western Brittany (Lazure and Jegou, 1998; Abarnou et al., 2002). All these differences in PCB contamination levels in spider crab muscles correlate well with those observed in spider crab hepatopancreas from the same areas (Bodin et al., accepted).

For each contaminant family and at each sampling area, similar concentration ranges were observed in the different crustacean species. Velvet swimming crabs and Norway lobsters presented the highest levels compared to spider and edible crabs, at Antifer and Le Guilvinec respectively. All individuals analyzed for this study were male adult crustaceans; the slight differences between species on each sampling area are probably due to a difference in their diet or in their way of life (habitat, migration, age) (Bodin et al., accepted).

Concerning the total TEQ, the maximum values were recorded in crustacean muscle collected at Antifer, and especially in velvet swimming crabs. They were 5- to 20-fold higher than those in species from the other sampling sites. Moreover, the contribution of PCBs to the total TEQ decreased from 70% in crustaceans from Antifer to less than 55% at Granville, Roscoff, Le Conquet and Le Guilvinec. These results confirm the major PCB inputs in Antifer are due to higher industrial activity in this region (Abarnou and Fraisse, 2002), and more likely due to the influence of the River Seine, which has been highly contaminated for a long time.

All TEQ values measured in crustacean muscles were under the maximum limit of 4 pg TEQ.g^{-1}w.w. set by the European Community for seafood intended for human consumption, whether considering only the PCDD/F TEQ or DL-PCB TEQ as the total TEQ values. Moreover, based on the Tolerable Monthly Intake set for 2378-PCDD/Fs and DL-PCBs at 2.33 pg TEQ.kg^{-1}b.w. per day (JECFA, 2002), and for the 7 indicator PCBs at 0.01 µg.kg^{-1}b.w. per day (AFSSA, 2003), it is possible to estimate the maximum amount of crustacean flesh that can be eaten before reaching the safety limit. Taking a mean body weight of 65 kg, this limit would be reached by consuming 10-40 g of crustacean muscle (Antifer), in an average daily consumption or one order of magnitude lower (110 g) for specimens from the other sampling stations.

Although no data were found in the literature on the contamination of the same studied

crustacean species, table 3 highlights the PCB, 2378-PCDD/F and PBDE concentrations reported in various similar organisms. As far as PCBs are concerned, the concentrations measured in the crustaceans from the Seine Bay are among the highest reported in the literature. This result is in agreement with high contamination levels found in biota of the Seine Estuary, which is considered to be one of the most contaminated estuaries in Europe (Abarnou et al., 2000). In contrast, this study showed low PCDD/F and PBDE contamination in decapod crustaceans from the French coastal waters of Brittany and Normandy, compared to levels observed in organisms from different countries through the world.

3.2. Contaminant distribution in crustaceans

PCBs

PCB patterns observed in crustaceans were very similar, whatever their origin and their contamination levels (Fig. 2A). Among PCB congeners, the main compounds were CB153, CB118, CB180 and CB138. Together they accounted for 80-90% of the Σ_{18}PCBs, and the CB153 contributes 40-50% of this sum. Due to their high octanol-water coefficients, these major PCB congeners are accumulated by marine organisms, without being metabolized because of substitution positions, and are biomagnified along food webs (Kannan et al., 1995; Bright et al., 1995). Similar PCB profiles were observed in the spider crab hepatopancreas (Bodin et al., accepted), as well as in the flying crab *Lyocarcinus holsatus* (Voorspoels et al., 2004), and the shrimp *Crangon crangon* (Voorspoels et al., 2004; Kannan et al., 1995). However, the contribution of the congeners CB118 and CB138 to the Σ_{18}PCBs appeared to differ slightly among the four examined crustaceans. In spider crabs, CB138 represented only 5-15% of the sum of PCBs, whereas its contribution reached 15-20% in edible crabs, velvet swimming crabs and Norway lobsters. Moreover, CB118 was more present in spider crabs and Norway lobsters than in the two other crustaceans (respectively 20% and 10-15% of the Σ_{18}PCBs). These slight differences among the four crustacean species are probably due to differences in their diet, their habitat and their behavior.

The DL-PCBs, except for CB118, were presented at a much lower level: based on their concentrations they represented altogether less than 15% of the Σ_{18}PCBs. The DL-PCBs also showed a similar pattern in crustaceans whatever the sampling station and the species. Among them, the predominant congeners were CB105, CB156 and CB167 which contributed 35-40%, 20-25% and 15-20% to the sum of the DL-PCBs, without CB118.

As far potential toxicity is concerned, the non-ortho PCBs made up about 70-90% of the DL-PCB TEQ, much more than the mono-ortho congeners. With regards to the non-ortho

PCBs, CB126 was the prevalent congener, accounting for more than 95% of the whole contribution of these four congeners to the TEQ. For the mono-ortho PCBs, the main compounds were the CB118, CB156 and CB105, which together contributed 85-90% to the TEQ carried by this group.

PCDD/Fs

The PCDD/F distribution in crustaceans was characterized by very few congeners, namely OCDD, 2378-TCDF and 23478-PeCDF, which together account on average for 60-85% of the 17 toxic compounds (Fig. 2B). Except for 1234678-HpCDD which characterized samples with low contamination levels, the other congeners were not significantly present in our samples. For instance, 2378-TCDD, the reference compound of the dioxin group, is a very minor component with a contribution of less than 1% of the total 2378-PCDD/Fs.

Two typical patterns were observed depending upon the origin of the samples: the "Antifer pattern" and a "general pattern". The first fingerprint characterized crustaceans from Antifer, irrespective of the species. In these more highly contaminated samples, the major components were 2378-TCDF (40-55% of the Σ2378-PCDD/Fs), OCDD (10-30%) and 23478-PeCDF (10-15%). Conversely, the second PCCD/F pattern was observed in Basse-Normandie and Brittany, and could reflect the distribution in crustaceans from areas not directly exposed to contaminant inputs. This distribution was mainly characterized by the prevalence of OCDD (30-40% of the Σ2378-PCDD/Fs), 2378-TCDF (15-25%), 23478-PeCDF (5-10%) and 1234678-HpCDD. In crustaceans from Brittany and Basse-Normandie, the Σ2378-PCDDs were predominant with respect to Σ2378-PCDFs, and represented approximately 55-70% of the total 2378-PCDD/Fs, oppositely to samples from Antifer, where they only made up 20-40%.The congener patterns found in these crustaceans were quite similar to that found in the green crab from the Venice Lagoon (Jimenez et al., 1998) and in the blue crab and the lobster from Newark Bay and the New York Bight (Rappe et al., 1991). The interpretation of the dioxin fingerprint in crustaceans from this study is very difficult because of the very low levels encountered, and because of the various potential sources of contamination. However, it is known that the OCDD isomer is produced in high proportions in sewage sludge (Baker and Hites, 2000) and in combustion by-products of fuel oil mixtures (Hellou and Payne, 1993). As regards 2378-TCDF and 23478-PeCDF, they principally come from technical PCBs and combustion processes (Baker and Hites, 2000; Wakimoto et al., 1988). The prevalence of these compounds in samples from Antifer could indicate that urban waste incineration is a potential source of contamination, but also results of the high chronic PCB

contamination carried by the Seine River. These contaminants, associated with suspended matter carried by river discharges have settled down onto the superficial sediment, thus becoming a secondary source of contamination for benthic species and their predators.

As regards the contribution of each congener to the PCDD/F TEQ, a similar pattern was observed whatever the sampling station and the crustacean species. The main compounds were the 23478-PeCDF, 2378-TCDF and 12378-PeCDD, these three congeners contributing for 80-95% to the PCDD/F TEQ. Similar observations were made in edible crab from Norway (Knutzen et al., 2003).

PBDEs

Among PBDEs, a very similar pattern was observed in crustaceans from the five sampling stations (Fig. 2C), with the major compounds BDE47, BDE99, BDE100 and BDE28 making up approximately 85-95% of the Σ_{13}PBDEs. Other authors also reported quite similar PBDE patterns in *Pandalus borealis* (Law et al., 2003) and *Crangon crangon* (Voorspoels et al., 2003; Boon et al., 2002). However, the contribution of each congener to the Σ_{13}PBDEs was slightly different depending on the species. In edible crabs from our study, BDE47 represented only 40% of the Σ_{13}PBDEs, contrary to the other species where it accounted for approximately 60%. Moreover, in spider crabs and velvet swimming crabs, the contribution of BDE99 to the Σ_{13}PBDEs appeared to be lower than in edible crab and Norway lobster muscle (10-15% and 20-25%, respectively). These minor differences could result from differences in the crustacean diet, habitat and metabolization capacities.

These observations on the distribution of the three groups of contaminants in crustaceans pointed out differences between the contaminant families. PCB and PBDE congeners varied more or less together, and the global fingerprint remained more or less unchanged whatever the geographical situation and the contamination levels. In contrast, PCDD/Fs which originate as unwanted by-products of a large variety of processes, presented different types of distribution in crustaceans, probably related to the contamination levels and thus the proximity of emission sources.

3.3. Comparison of crustacean, mussel and sea bass contamination

PCBs:

Total PCB contamination levels were higher in sea bass than in mussel and spider crab tissues for the two sampling areas (Table 4). PCB concentrations in sea bass muscle from

Antifer were close to those measured in the sea bass from the Seine Estuary (Loizeau et al., 2001). As regards mussel contamination, PCB levels measured at Antifer and Le Conquet were in agreement with those of the monitoring program RNO (Claisse, 1989). At both stations, DL-PCBs represented approximately 15% of the Σ_{18}PCB congeners in mussels and sea bass, whereas they contributed 30% in the spider crabs. As regards TEQ values, the contribution of non-ortho PCBs to the DL-PCB TEQ was equal to 60-80% in the three species.

In the three species, the main compounds were CB153, CB101, CB118, CB138, and CB180, but they were distributed differently among the species tissues (Fig. 3A). In sea bass from the two sampling stations, the predominant congeners were present in the following decreasing order: CB153 (40% of Σ_{18}PCBs)> CB138 (15-20%)> CB118 (10-15%)> CB101 (10-15%)> CB180 (5-10%), which coincides with previously observed patterns in various fishes (Loizeau et al., 2001; Munschy et al., 2004). Similar patterns were observed in mussels collected at both Antifer and Le Conquet, except for the congener CB180. As described above, the main compounds found in spider crab muscle were: CB153 (40-50% of Σ_{18}PCBs)> CB118 (20%)> CB180 (12%)> CB138 (5-10%)> CB101 (2-5%). As regards DL-PCBs, a similar fingerprint was observed whatever the sampling station and the marine species, except for CB77 which accounted for only 0.5% of the sum of DL-PCBs in sea bass and 1.5 to 1.9% in mussels and spider crabs. The slight differences of PCB pattern between mussels, spider crabs and sea bass result from their diet, way of life and trophic level, and more likely depend on elimination and specific metabolization capacities. The P-450 gene superfamily occurs in a very large number of living organisms where it plays a fundamental role in the oxidative biotransformation of endogenous and xenobiotic compounds. Different authors have pointed out the presence of cytochrome P-450 2B in crustacean tissues (Brown and John, 1992; Goerke and Weber, 2001), and cytochrome P-450 1A in fishes (Brown and John, 1992; Van der Oost et al., 2003). Whereas CYP2B acts on the metabolization of *meta*- and *para*-unsubstituted congeners, like CB52 and CB101 which are present in much lower proportions in crustacean muscle compared to mussel and sea bass, only *ortho*- and *meta*-unsubstitued compounds, like CB77, CB105, CB118 and CB156, can be biotransfromed by CYP1A in fish. Another pattern difference concerns CB138, which was approximately 3 fold-lower in relative proportions in the spider crab than in mussel and sea bass. As this higher chlorinated congener is non-degradable and specifically bound to the smaller fraction of the sediment, it is probably more bioavailable for water-column bivalves than for sediment dwellers like crustaceans (Thompson et al., 1999).

PCDD/Fs:

As regards 2378-PCDD/Fs, the highest concentrations at Antifer were measured in mussels, approximately 10 times higher than those observed in spider crabs and sea bass (Table 4). At Le Conquet, similar 2378-PCDD/Fs levels were recorded in mussels and spider crabs, about 5-fold higher than in sea bass muscle. Munschy et al. (2004) reported close levels in dab muscle from the Seine Estuary. As regards PCDD/F TEQ, the highest values were observed in mussels at both stations, about 2- to 5-fold higher than those measured in spider crabs and sea bass.

Concerning their distribution, a similar PCDD/F pattern was observed in mussels at both stations with the predominance of the 2378-PCDD compounds (60% of the Σ2378-PCDD/Fs) (Fig. 3B). The main congeners were OCDD (45% of the Σ2378-PCDD/Fs), 2378-TCDF (20-30%), 1234678-HpCDD (10-15%) and 23478-PeCDF (5%). The sea bass samples exhibited a similar profile whatever the sampling area, but which differed from that in mussels. In *Dicentrarchus labrax*, 2378-PCDFs (75% of the Σ2378-PCDD/Fs) were predominant compared to 2378-PCDDs; the main compounds were 2378-TCDF (40-45% of the Σ2378 PCDD/Fs), 23478-PeCDF (15-20%) and OCDD (10-15%). Similar results were obtained in dab from the English Channel (Munschy et al., 2004), and in mussels from French coastal waters (Abarnou and Fraisse, 2002). The relative distributions of 2378-PCDD/Fs in sea bass and mussel tissues may be explained by trophic level as well as the duration and extent of exposure and, importantly, by the metabolism. The uptake efficiency of PCDDs in flounder was reported to be less efficient than for PCDFs (Berge and Brevik, 1996). Moreover, capacities to biotransform PCDD/Fs through the activation of the CYP1A have been reported in fishes (Hektoen et al., 1994). With respect to PCDD/Fs in spider crabs, a similar fingerprint to that in mussels was observed in specimens from Le Conquet, whereas, at Antifer, *Maja brachydactyla* and *Dicentrarchus labrax* exhibited the same fingerprint with the predominance of 2378-PCDFs compared to 2378-PCDDs. The inversion of PCDD/F profiles in spider crab tissues between Antifer and Le Conquet was observed in neither mussels nor sea bass. It can be explained by a higher bioavailability of sediment-associated contaminants to crustaceans, and especially 2378-PCDFs at Antifer which could result, as hypothesized above, from the high chronic PCB contamination carried by the Seine River.

PBDEs:

Whatever the species, the organisms collected at Antifer were more contaminated than

those from Le Conquet (Table 4): levels of the Σ_{13}PBDE were about 50-, 6- and 10- fold higher respectively in mussels, spider crabs and sea bass from Antifer. The highest PBDE concentrations were reported in sea bass at both stations. Very few studies exist on the PBDE contamination of marine organisms from French coasts. BDE47 levels in mussels from the Seine Estuary were 420-820 $pg.g^{-1}$d.w. (Bragigand, 2005), which is very close to those measured in this study.

BDE47 was the predominant congener in all samples and it constituted about 50-60% of the Σ_{13}PBDEs in mussels and spider crabs, whereas for sea bass, it reached 80% of the total level (Fig. 3C). In dab muscle from the Belgian North Sea and the Scheldt Estuary, BDE47 accounted for 75% of ΣPBDEs (Voorspoels et al., 2003). As regards PBDE patterns, mussels and spider crabs from the two sampling stations presented similar predominant congeners (BDE47, BDE99, BDE100 and BDE28), but they all contributed in slightly different proportions to the Σ_{13}PBDEs. For example, BDE99, BDE100 and BDE28 respectively made up 20-25%, 10% and 1-3% of the Σ_{13}PBDEs in mussels, which is in agreement with results of Johansson et al. (2004) and Christensen et al. (2002). As regards spider crabs, they represented about 10%, 4-8% and 6-7% of the Σ_{13}PBDEs, respectively. In sea bass, the PBDE fingerprints were quite different, the main compounds being the BDE47 (80% of the Σ_{13}PBDEs) > BDE100 (15%) > BDE154 (2-4%) > BDE28 (2%) > BDE99 (0.5-1%). Similar patterns were observed in pike and roach from the Baltic Sea (Burreau et al., 2004), as well as in the shorthorn sculpin from Greenland (Christensen et al., 2002). Another interesting trend was observed when comparing the ratio between BDE47 and BDE99 in the different biological samples. In mussels, the BDE47:BDE99 ratio was 70:30 for specimens from both Le Conquet and Antifer. In spider crabs and sea bass, the ratios were respectively 85:15 and 99:1. Conversely, the BDE47:BDE100 ratios were similar among all studied species. A laboratory experiment on blue mussels (Gustafsson et al., 2004) found that BDE47 and BDE99, which were predominant in *Mytilus edulis* from both Le Conquet and Antifer, were highly bioaccumulated this species. On the contrary, high bioaccumulation of BDE47 in the common carp *Cyprinus carpio* has been experimentally demonstrated, but not for congeners BDE99 and BDE153, which could be metabolized by debromination processes, resulting in the formation of BDE47 (Stapleton et al., 2004a, 2004b). As regards our results and data from the literature, the sea bass *Dicentrarchus labrax* seems to possess strong PBDE metabolic capacities. Comparing the spider crab PBDE pattern with those of mussels and sea bass revealed its intermediate biotransformation capacities.

To conclude, the comparison of contaminant patterns between species of different trophic levels and feeding behaviours allowed us to assess the metabolic capacities of decapod crustaceans. As regards PCBs, our results have highlighted higher biotransformation in the spider crab than in fish. Considering PCDD/Fs, crustaceans seem to possess very poor metabolic activities, which confirm their potential use as bioindicator species for dioxin marine pollution monitoring. Finally, the study highlighted intermediate biotransformation capacities of PBDE for the spider crab compared to mussel and sea bass.

Acknowledgements

This work was partially funded by the Regional Council of Brittany. We would like to thank the fishermen and professional organizations who kindly provided us with crustacean specimens. We also would like to express our gratitude to Pr. Guillou (IUEM, Plouzané), Dr. Latrouite (IFREMER, Plouzané) and Pr. Budzinski (LPTC, Bordeaux) for their advice and support during this work.

References

Abarnou, A., Burgeot, T., Chevreuil, M., Leboulenger, F., Loizeau, V., Madoulet-Jaouen, A., Minier, C., 2000. "Les contaminants organiques: quels risques pour le monde vivant ?" Fascicule Seine-Aval, 35 pp.

Abarnou, A., Fraisse, D., 2002. Dioxins and dioxin-like PCBs in mussels and fishes from the French coastal waters. Organohalogen. Compd. 56, 469-472.

Abarnou, A., Loizeau, V., Le Guellec, A-M., Jaouen-Madoulet, A., 2002. Contaminants in marine foodwebs. Revue Méd. Vét. 153, 425-432.

AFSSA, 2003. "Avis de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments sur l'existence éventuelle d'une corrélation significative entre les teneurs dans les différents congénères de PCB," Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France section Aliments et Nutrition.

Baker, J.I., Hites, R.A., 2000. Is combustion the major source of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans to the environment? A mass balance investigation. Environ. Sci. Technol. 34, 2879-2886.

Berge, J.A., Brevik, E.M., 1996. Uptake of metals and persistent organochlorines in crabs (*Cancer pagurus*) and flounder (*Platichthys flesus*) from contaminated sediments: Mesocosm and field experiments. Mar. Pollut. Bull. 33, 46-55.

Bernárdez, C., Freire, J., González-Gurriarán, E., 2000. Feeding of the spider crab *Maja squinado* in rocky subtidal areas of the Ría de Arousa (north-west Spain). J. Mar. Biol. Ass. U.K. 80, 95-102.

Bodin, N., Abarnou, A., Le Guellec, A-M., Loizeau, V., Philippon, X., accepted. Organochlorinated contaminants in decapod crustaceans from the coasts of Brittany and Normandy (France). Chemosphere.

Boon, J.P., Lewis, W.E., Tjoen-A-Choy, M.R., Allchin, C.R., Law, R.J., de Boer, J., Ten Hallers-Tjabbes, C.C., Zegers, B.N., 2002. Levels of polybrominated diphenyl ether (PBDE) flame retardants in animals representing different trophic levels of the North Sea food web. Environ. Sci. Technol. 36, 4025-4032.

Bragigand, V., 2005. Recherches écotoxicologiques sur les retardateurs de flamme bromés dans les écosystèmes estuariens (estuaires de Loire et de Seine). Faculté de Pharmacie, Nantes, France, 250 pp.

Bright, D.A., Dushenko, W.T., Grundy, S.L., Reimer, K.J., 1995. Effects of local and distant contaminant sources: polychlorinated biphenyls and other organochlorines in bottom-dwelling animals from an Arctic Estuary. Sci. Total Environ. 160-161, 265-283.

Brochu, C., Moore, S., Pelletier, E., 1995. Polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans in sediments and biota of the Saguenay Fjord and the St Lawrence Estuary. Mar. Pollut. Bull. 30, 515-523.

Brown, J., John, F., 1992. Metabolic alterations of PCB residues in aquatic fauna: distributions of cytochrome P4501A- and P4502B-like activities. Mar. Environ. Res. 34, 261-266.

Burreau, S., Zebühr, Y., Broman, D., Ishaq, R., 2004. Biomagnification of polychlorinated biphenyls (PCBs) and polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) studied in pike (*Esox lucius*), perch (*Perca fluviatilis*) and roach (*Rutilus rutilus*) from the Baltic Sea Chemosphere 55, 1043-1052.

Cai, Z., Ramanujam, V.M.S., Gross, M.L., 1994. Levels of polychlorodibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans in crab tissues from the Newark/Raritan Bay system. Environ. Sci. Technol. 28, 1528-1534.

Christensen, J.H., Glasius, M., Pecseli, M., Platz, J., Pritzl, G., 2002. Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in marine fish and blue mussels from southern Greenland. Chemosphere 47, 631-638.

Claisse, D., 1989. Chemical contamination of French coasts: the results of ten years mussel watch. Mar. Pollut. Bull. 20, 523-528.

Domingo, J.L., 2004. Human exposure to polybrominated diphenyl ethers through the diet. J. Chromatogr. A 1054, 321-326.

Goerke, H., Weber, K., 2001. Species-specific elimination of polychlorinated biphenyls in estuarine animals and its impact on residue patterns. Mar. Environ. Res. 51, 131-149.

Gustafsson, K., Björk, M., Burreau, S., Gilek, M., 2004. Bioaccumulation kinetics of brominated flame retardants (Polybrominated diphenyl ethers) in blue mussels (*Mytilus edulis*). Environ. Toxicol. Chem. 18, 1218-1224.

Hagen, M.E., Colodey, A.G., Knapp, W.D., Samis, S.C., 1997. Environmental response to decreased dioxin and furan loadings from British Columbia coastal pulp mills. Chemosphere 34, 1221-1229.

Hektoen, H., Berge, J.A., Ingebrigtsen, K., Knutzen, J., Oehme, M., 1994. Elimination of polychlorinated dibenzofurans and dibenzo-*p*-dioxins from blue mussel (*Mytilus edulis*) and tissue distribution of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (2,3,7,8-TCDD). Chemosphere 29, 1491-1499.

Hellou, J., Payne, J.F., 1993. Polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans in cod (*Gadus morhua*) from the Northwest Atlantic. Mar. Environ. Res. 36, 117-128.

JECFA, 2002. Polychlorinated dibenzodioxins, polychlorinated dibenzofurans, and coplanar polychlorinated biphenyls. In Safety Evaluation of Certain Food Additives and Contaminants. Report of the 57th Meeting of the Joint FAO/WHO Expert Commitee on Food Additives and Contaminants; Canady, R., Crump, K., Feeley, M., Freijer, J., Kogevinas, M., Malisch, R., Verger, P., Wilson, J., Zeilmaker, M., Eds.; World Health Organisation, Geneva, 48, 451-664.

Jimenez, B., Hernandez, L.M., Gonzalez, M.J., Eljarrat, E., Rivera, J., Fossi, M.C., 1998. Congener specific analysis of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans in crabs and sediments from the Venice and Orbetello lagoons, Italy. Environ. Sci. Technol. 32, 3853-3861.

Johansson, I., Moisan, K., Guiot, N., Truquet, I., Munschy, C., Tronczynski, Y., 2004. Levels and trends of organohalogen compounds in mussels from the Seine estuary in 1981-2003. Organohalogen. Compd. 66, 1868-1876.

Kannan, N., Reusch, T.B.H., Schulz-Bull, D.E., Petrick, G., Duinker, J.C., 1995. Chlorobiphenyls: Model compounds for metabolism in food chain organisms and their potential use as ecotoxicological stress indicators by application of the metabolic slope concept. Environ. Sci. Technol. 29, 1851-1859.

Karl, H., Ruoff, U., Bluthgen, A., 2002. Levels of dioxins in fish and fishery products on the German market. Chemosphere 49, 765-773.

Knutzen, J., Bjerkeng, B., Naes, K., Schlabach, M., 2003. Polychlorinated dibenzofurans/dibenzo-*p*-dioxins (PCDF/PCDDs) and other dioxin-like substances in marine organisms from the Greenland fjords, S. Norway, 1975-2001: present contamination levels, trends and species specific accumulation of PCDF/PCDD congeners. Chemosphere 52, 745-760.

Law, R.J., Alaee, M., Allchin, C.R., Boon, J.P., Lebeuf, M., Lepom, P., Stern, G.A., 2003. Levels and trends of polybrominated diphenyl ethers and other brominated flame retardants in wildlife. Environ. Int. 29, 757-770.

Lazure, P., Jegou, A-M., 1998. 3D modelling of seasonal evolution of Loire and Gironde plumes on Biscay Bay continental shelf. Oceanol. Acta 21, 165-177.

Loizeau, V., Abarnou, A., Menesguen, A., 2001. A steady-state model of PCB bioaccumulation in the sea bass (*Dicentrarchus labrax*) food web from the Seine Estuary (France). Estuaries 24, 1074-1087.

Malisch, R., Bruns-Weller, E., Knoll, A., Fürst, P., Mayer, R., Wiesmüller, T., 2000. Results of an "emergency quality control study" as confirmation of a PCDD/PCDF-contamination of milk and butter samples. Chemosphere 40, 1033-1040.

Marchand, M., Caprais, J.C., Cosson-Mannevy, M.A., Morinière, P., 1983. Apports et distribution des résidus organochlorés à haut poids moléculaire dans la rade de Brest (milieu marin semi-fermé). Oceanol. Acta 6, 269-282.

Menone, M.L., Bortolus, A., Botto, F., Aizpun de Moreno, J.E., Moreno, V.J., Iribarne, O., Metcalfe, T.L., Metcalfe, C.D., 2000. Organochlorine contaminants in a coastal lagoon in Argentine: Analysis of sediment, crabs, and cordgrass from two different habitats. Estuaries 23, 583-592.

Munschy, C., Moisan, K., Tronczynski, Y., 2004. Levels and patterns of PCBs and PCDD/Fs in different tissues of the marine flatfish dab (*Limanda limanda*) from the English Channel, France. Organohalogen. Compd. 66, 1695-1703.

Oehme, M., Bartonova, A., Knutzen, J., 1990. Estimation of polychlorinated dibenzofuran and dibenzo-*p*-dioxin contamination of a coastal region using isomer profiles in crabs. Environ. Sci. Technol. 24, 1836-1841.

OFIMER, 2003. Division Observatoire Economique Entreprise "Consommation des produits de la pêche et de l'aquaculture. Bilan annuel 2003," Office National Interprofessionnel des Produits de la Mer et de l'Aquaculture.

Okumura, Y., Yamashita, Y., Kohno, Y., 2004. Bioaccumulation of PCDD/Fs and Co-PCBs in lower-trophic-level organisms in Sendai Bay, Japan. Water Air Soil Pollut. 159, 291-312.

Opperhuizen, A., Sijm, D.T.H.M., 1990. Bioaccumulation and biotransformation of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans in fish. Environ. Toxicol. Chem. 9, 175-186.

Pompa, G., Caloni, F., Caloni, F., Pompa, G., Fracchiolla, M.L., 2003. Dioxin and PCB contamination of fish and shellfish: assessment of human exposure. Review of the international situation. Vet. Res. Communications 27, 159-167.

Rappe, C., Bergqvist, P.-A., Kjeller, L., Belton, T., Ruppel, B., Lockwood, K., Kahn, P.C., 1991. Levels and patterns of PCDD and PCDF contamination in fish, crabs, and lobsters from Newark Bay and the New York Bight. Chemosphere 22, 239-266.

Sakurai, T., Kim, J-G., Suzuki, N., Matsuo, T., Li, D-Q., Yao, Y., Masunaga, S., Nakanishi, J., 2000. Polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans in sediment, soil, fish, shellfish and crab samples from Tokyo Bay area, Japan. Chemosphere 40, 627-640.

Stapleton, H.M., Letcher, R.J., Baker, J.E., 2004b. Debromination of polybrominated diphenyl ether congeners BDE 99 and BDE 183 in the intestinal tract of the common carp (*Cyprinus carpio*). Environ. Sci. Technol. 38, 1054-1061.

Stapleton, H. M., Letcher, R. J., Li, J., Baker, J. E., 2004a. Dietary accumulation and metabolism of polybrominated diphenyl ethers by juvenile carp (*Cyprinus carpio*). Environ. Toxicol. Chem. 23, 1939-1946.

Tessier, L., 2003. Transport et caractérisation des matières en suspension dans le bassin versant de la Seine: identification de signatures naturelles anthropiques. Ecole Nationale des Ponts et Chaussée, Paris, France, 344 pp.

Thompson, S., Budzinski, H., Garrigues, P., Narbonne, J.F., 1999. Comparison of PCB and DDT distribution between water-column and sediment-dwelling bivalves in Arcachon Bay, France. Mar. Pollut. Bull. 38, 655-662.

U.S. EPA Method 1613, 1994. Tetra- through octa-chlorinated dioxins and furans by isotopic dilution HRGC-HRMS. Office of Science and Technology, U.S. EPA; U.S. Government Printing Office: Washington, DC.

Van den Berg, M., Birnbaum, L., Bosveld, B.T.C., Brunström, B., Cook, P., 1998. Toxic equivalents factors (TEF) for PCBs, PCDDs, PCDFs for humans and wildlife. Environ. Health Perspect. 106, 775-792.

Van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P.E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. Environ. Toxicol. Pharmacol. 13, 57-149.

Verstraete, F., 2002. Development and implementation of an EC strategy on dioxins, furans and dioxin-like PCBs in food and feed. Environ. Sci. Pollut. Res. 9, 297-299.

Voorspoels, S., Covaci, A., Maervoet, J., De Meester, I., Schepens, P., 2004. Levels and profiles of PCBs and OCPs in marine benthic species from the Belgian North Sea and the Western Scheldt Estuary. Mar. Pollut. Bull. 49, 393-404.

Voorspoels, S., Covaci, A., Schepens, P., 2003. Polybrominated diphenyls ethers in marine species from the Belgian North Sea and the Western Scheldt Estuary: levels, profiles and distribution. Environ. Sci. Technol. 37, 4348-4357.

Wade, T.L., Jackson, T.J., Gardinali, P.R., Chambers, L., 1997. PCDD/PCDF sediment concentration distribution: Casco Bay, Maine, USA. Chemosphere 34, 1359-1367.

Wakimoto, T., Kannan, N., Ono, M., Tatsukawa, R., Masuda, Y., 1988. Isomer-specific determination of polychlorinated dibenzofurans in Japanese and American polychlorinated biphenyls. Chemosphere 17, 743-750.

Table and figure list

Table 5. PCB and 2378-PCDD/F concentrations ($pg.g^{-1}$d.w.), and TEQ values ($pg.g^{-1}$d.w.) in crustacean muscles from French coastal sites.

Table 2. PBDE concentrations ($pg.g^{-1}$d.w.) in crustacean muscles from French coastal sites.

Table 3. Data from literature on crustacean contamination by PCBs, PCDD/Fs and PBDEs.

Fig. 1. Map of the sampling areas. M = *Maja brachydactyla*; C = *Cancer pagurus*; Np = *Necora puber*; Nn = *Nephrops norvegicus*.

Fig. 2. PCB (A), PCDD/F (B) and PBDE (C) patterns in the muscle of crustaceans from Antifer (M1, C1, Np1), Granville (M2, C2), Roscoff (M3), Le Conquet (M4, C4) and Le Guilvinec (M5, C5, Nn5).

Fig. 3. PCB (A), PCDD/F (B) and PBDE (C) patterns in mussels, spider crabs and sea bass from Antifer (Myt 1, Maja 1, Dicentr 1), and Le Conquet (Myt 4, Maja 4, Dicentr 4).

Table 1. PCB and 2378-PCDD/F concentrations ($pg.g^{-1}$d.w.), and TEQ values ($pg.g^{-1}$d.w.) in crustacean muscles from French coastal sites.

	Antifer			Granville		Roscoff	Le Conquet		Le Guilvinec		
	M1	C1	Np1	M2	C2	M3	M4	C4	M5	C5	Nn5
CB28	235	211	844	48	66	51	91	44	91	16	59
CB52	71	129	63	41	44	24	114	20	39	15	75
CB77	175	86	359	12	19	12	27	17	21	7	13
CB81	2.8	1.7	4.5	0.4	0.6	0.4	0.6	0.7	0.6	0.2	0.4
CB101	396	433	177	55	138	33	254	94	74	50	159
CB105	1173	511	3073	62	92	74	181	126	112	40	133
CB114	41	16	96	2.8	2.9	3.0	6.9	6.7	3.8	1.6	3.7
CB118	6264	2760	16494	289	349	277	967	579	389	143	496
CB123	41	26	107	1.2	2.1	2.1	6.0	6.6	4.2	0.8	3.5
CB126	34	20	52	3.2	4.9	3.2	4.5	4.1	3.7	2.1	4.8
CB138	1840	2748	12513	135	491	159	401	657	328	240	998
CB153	13946	7621	26810	622	971	677	1903	1586	1020	459	1976
CB156	736	249	1822	27	33	45	140	71	50	13	73
CB157	199	96	498	11	14	14	34	20	18	7	25
CB167	493	254	1189	25	35	30	86	55	39	16	64
CB169	3.7	1.9	5.9	0.5	0.8	0.6	0.6	0.4	0.5	0.3	1.0
CB180	3487	2012	6833	180	248	285	583	398	295	121	541
CB189	73	37	197	3.7	4.9	6.0	15.1	5.8	6.2	2.1	11.2
Σ_7 PCBs	26239	15914	63734	1369	2306	1505	4313	3378	2236	1045	4303
Σ_{18} PCBs	29138	17176	70942	1514	2511	1689	4798	3686	2489	1134	4625
TEQ DL-PCBs	4.71	2.51	8.54	0.39	0.57	0.39	0.67	0.54	0.42	0.25	0.47
2378D	0.06	0.03	0.18	0.01	0.02	0.02	0.02	0.01	0.02	0.02	0.03
12378D	0.37	0.30	0.45	0.10	0.19	0.11	0.13	0.07	0.16	0.10	0.21
123478D	0.13	0.09	0.23	0.03	0.07	0.04	0.06	0.05	0.07	0.03	0.11
123678D	0.26	0.30	0.83	0.09	0.49	0.11	0.15	0.11	0.19	0.11	0.39
123789D	0.13	0.16	0.30	0.04	0.15	0.05	0.09	0.05	0.10	0.04	0.15
1234678D	0.42	0.43	1.49	0.22	0.58	0.17	0.37	0.31	0.45	0.20	0.86
OCDD	1.90	3.40	3.79	1.32	2.05	1.01	3.33	1.55	1.24	0.68	1.84
2378F	6.82	4.88	17.44	0.65	1.50	0.70	2.00	1.28	0.80	0.49	0.57
12378F	0.03	0.27	1.40	nd	0.20	0.01	0.01	0.15	0.11	0.05	0.25
23478F	1.77	1.38	4.11	0.19	0.51	0.30	0.58	0.45	0.37	0.13	0.52
123478F	0.13	0.11	0.55	0.02	0.08	0.03	0.07	0.08	0.10	0.01	0.16
123678F	0.02	0.05	0.28	nd	0.06	nd	nd	0.05	0.06	0.02	0.09
234678F	0.16	0.11	0.36	0.02	0.10	0.05	0.07	0.06	0.09	0.02	0.11
123789F	nd	nd	0.01	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
1234678F	0.21	0.09	0.47	0.09	0.23	0.05	0.09	0.10	0.18	0.06	0.15
1234789F	0.02	0.05	0.04	nd	nd	nd	nd	nd	0.01	0.01	0.01
OCDF	0.45	0.05	0.49	0.24	0.47	0.13	0.03	0.24	0.10	0.16	0.12
Σ 2378-PCDD/Fs	12.9	11.7	32.4	3.0	6.7	2.8	7.0	4.5	4.1	2.1	5.6
TEQ PCDD/Fs	2.08	1.61	4.77	0.30	0.72	0.38	0.69	0.48	0.52	0.25	0.68
Total TEQ	6.79	4.12	13.32	0.68	1.29	0.77	1.36	1.02	0.94	0.50	1.15

Table 2. PBDE concentrations ($pg.g^{-1}$d.w.) in crustacean muscles from French coastal sites.

	Antifer			Granville		Roscoff	Le Conquet		Le Guilvinec		
	M1	C1	Np1	M2	C2	M3	M4	C4	M5	C5	Nn5
BDE-17	0.3	2.4	0.4	0.2	0.7	0.2	0.2	0.2	1.8	0.1	0.2
BDE-28	8.1	7.6	12.8	2.5	2.6	1.8	4.3	1.1	8.2	0.9	6.7
BDE-47	96.5	83.2	106.3	29.1	55.4	21.8	41.9	18.9	70.7	16.8	108.9
BDE-66	0.3	0.3	0.2	0.2	0.3	0.3	0.1	0.1	0.0	0.1	0.3
BDE-71	3.8	1.6	2.7	0.8	1.0	1.0	1.9	0.1	1.0	0.3	0.2
BDE-85	1.1	0.4	2.2	0.1	0.4	0.5	0.3	0.1	0.6	0.1	0.9
BDE-99	17.6	31.5	21.3	11.3	23.1	7.4	5.8	9.2	25.5	8.2	38.6
BDE-100	9.1	16.4	18.7	4.4	9.6	2.7	5.3	3.7	9.0	3.2	13.7
BDE-138	1.6	0.9	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	nd	0.1	1.0
BDE-153	6.9	3.9	3.0	0.8	3.5	0.5	0.6	1.8	nd	1.4	1.1
BDE-154	4.2	4.4	3.7	0.6	2.6	0.9	0.7	1.1	nd	1.1	0.9
BDE-183	7.2	1.3	3.7	1.2	4.1	1.1	1.3	1.5	3.5	0.8	7.8
BDE-190	6.7	2.1	0.5	0.4	1.5	0.2	0.2	0.2	0.2	0.3	0.7
Σ_{13}PBDEs	163.5	155.9	175.7	51.9	105.0	38.7	62.7	38.3	120.6	33.4	180.9

Table 3. Data from literature on crustacean contamination by PCBs, PCDD/Fs and PBDEs.

Species	Tissues	Location	Contaminants	Levels	References
Brown shrimp (*Crangon sp.*)	whole body	Sendai Bay (Japan)	DL-PCBs (pg.g^{-1}w.w.)	308	Okumura et al., 2004
			DL-PCB TEQ (pg.g^{-1}w.w.)	0.4	
Flying crab (Liocarcinus holsatus)	whole body	Scheldt Estuary (Europe)	CB153 (ng.g^{-1}w.w.)	5.4-68	Voorspoels et al., 2004
Estuarine crab (*Chasmagnathus granulata*)	muscle	Argentina	CB153 (ng.g^{-1}lipid)	40-52	Menone et al., 2000
Brown shrimp (*Crangon crangon*)	whole body	Southern Baltic Sea		80	Kannan et al., 1995
Brown shrimp (*Crangon sp.*)	whole body	Sendai Bay (Japan)	2378-PCDD/Fs (pg.g^{-1}w.w.)	6.6	Okumura et al., 2004
			2378-PCDD/F TEQ (pg.g^{-1}w.w.)	1.1	
Edible crab (*Cancer pagurus*)	muscle	Grenland fjords (Norway)		3.5	Knutzen et al., 2003
		Southern Norway	2378-PCDD/Fs (pg.g^{-1}w.w.)	15-34	Oehme et al., 1990
Brown shrimp (*Crangon crangon*)	whole body	North Sea	2378-PCDD/F TEQ (pg.g^{-1}w.w.)	0.66-1.1	Karl et al., 2002
Shrimp (*Pandalus borealis*)	whole body	Norway		0.25	Karl et al., 2002
		Greenland		0.12	
Rock crab (*Charybdis japonica*)	muscle	Tokyo Bay (Japan)	2378-PCDD/Fs (pg.g^{-1}w.w.)	12	Sakurai et al., 2000
			2378-PCDD/F TEQ (pg.g^{-1}w.w.)	2.6	
Green crab (*Carcinus aestuarii*)	whole body	Venice/Orbettello Lagoons (Italy)	2378-PCDD/Fs (pg.g^{-1}w.w.)	9-152	Jimenez et al., 1998
			2378-PCDD/F TEQ (pg.g^{-1}w.w.)	1.1-5.2	
Lobster (*Hommarus americanus*)	muscle	Casco Bay (USA)		0.8	Wade et al., 1997
Dungeness Crab (*Cancer magister*)	muscle	British Columbia (Canada)		<8	Hagen et al., 1997
Snow Crab (*Chionoecetes opilio*)	whole body	St Lawrence Estuary (Canada)	2378-PCDD/Fs (pg.g^{-1}w.w.)	50-70	Brochu et al., 1995
		Saguenay Fjord (Canada)		31-61	
Blue crab (*Callinectes sapidus*)	muscle	Netwark/Raritan Bay (New Jersey)	2378-PCDD/Fs (ng.g^{-1}w.w.)	55-60	Cai et al., 1994
Brown shrimp (*Crangon crangon*)	whole body	Scheldt Estuary (Europe)	PBDEs[a] (ng.g^{-1}w.w.)	0.2-8.3	Voorspoels et al., 2003
		Belgian North Sea (Europe)		0.02-0.08	
Flying crab (*Liocarcinus holsatus*)	whole body	Scheldt Estuary (Europe)		1.2-30	Voorspoels et al., 2003
		Belgian North Sea (Europe)		0.4-1.4	
Shrimp (*Pandalus borealis*)	muscle	St Lawrence Estuary (Canada)	BDE47 (ng.g^{-1}w.w.)	0.17	Law et al., 2003
Shrimp	whole body	North Sea (Europe)	BDE47 (ng.g^{-1}lipid)	35-39	Boon et al., 2002
Hermit crab (*Pagurus bernhardus*)	abdomen			8-118	

[a] Sum of 6 congeners: BDE28, 47, 99, 100, 153, 154

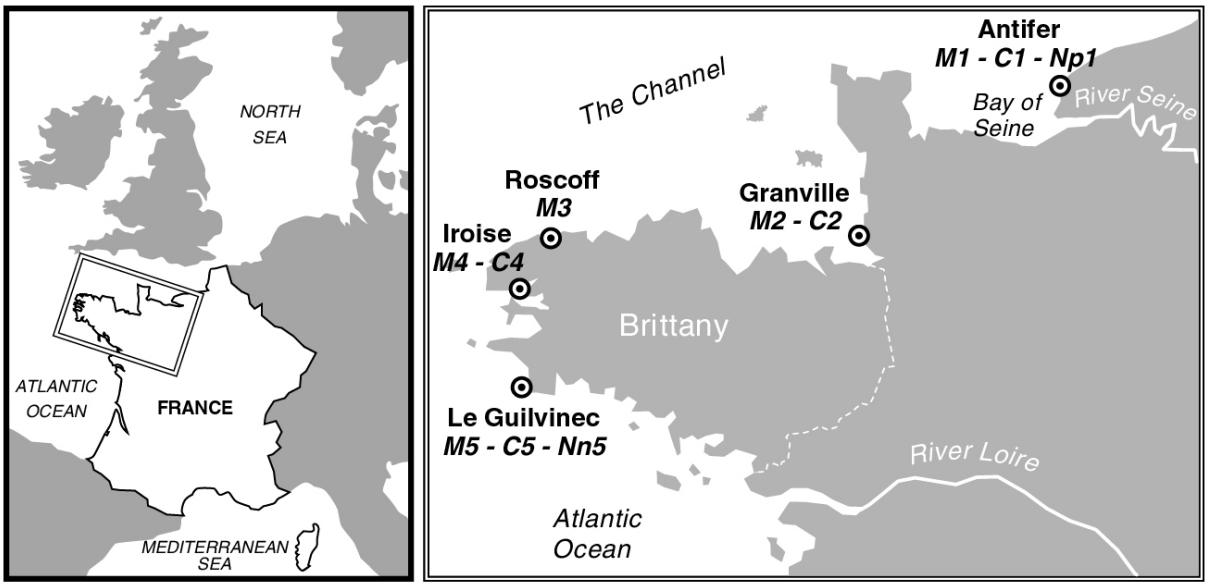

Fig. 1. Map of the sampling areas. M = *Maja brachydactyla*; C = *Cancer pagurus*; Np = *Necora puber*; Nn = *Nephrops norvegicus*.

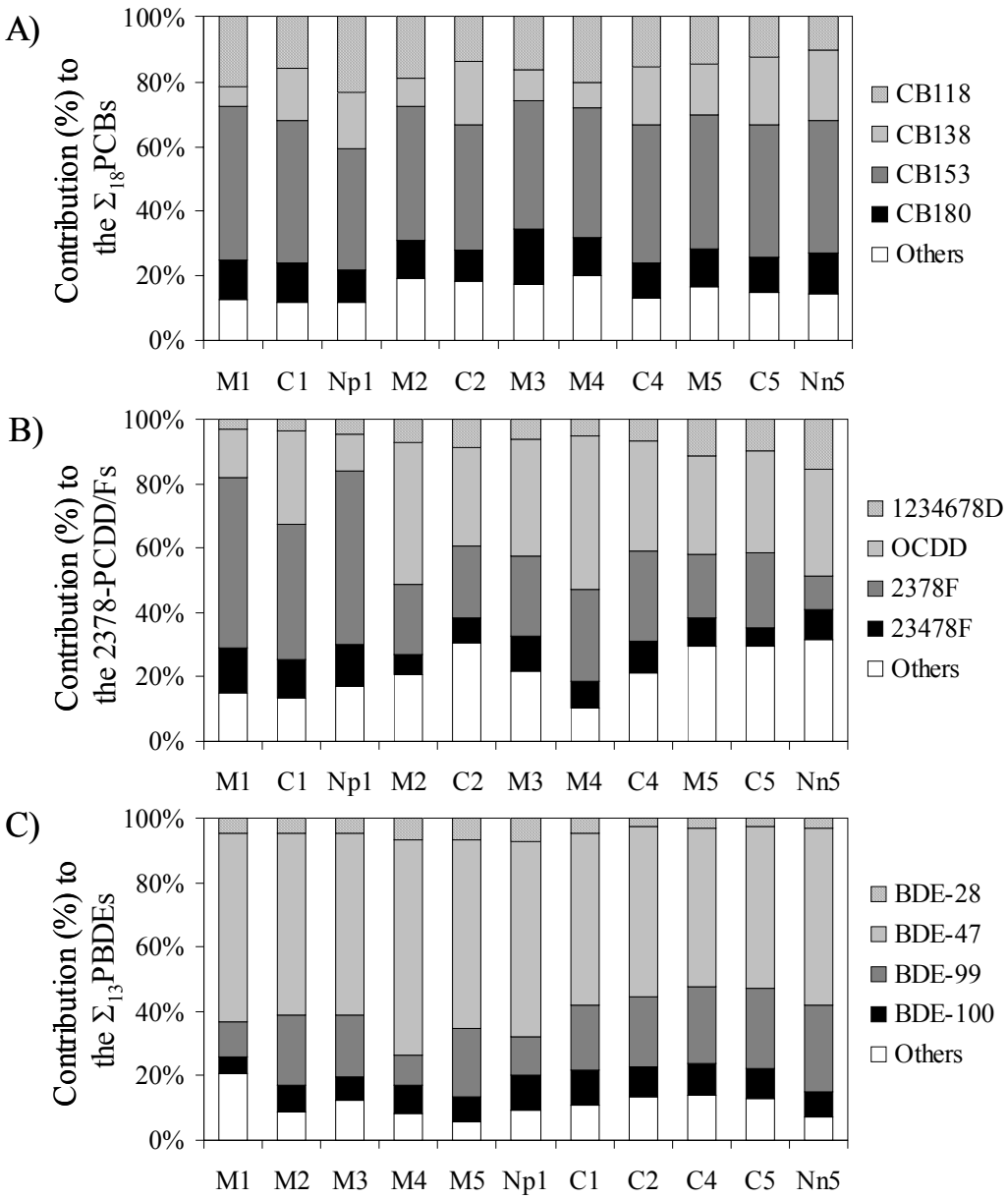

Fig. 2. PCB (A), PCDD/F (B) and PBDE (C) patterns in the muscle of crustaceans from Antifer (M1, C1, Np1), Granville (M2, C2), Roscoff (M3), Le Conquet (M4, C4) and Le Guilvinec (M5, C5, Nn5).

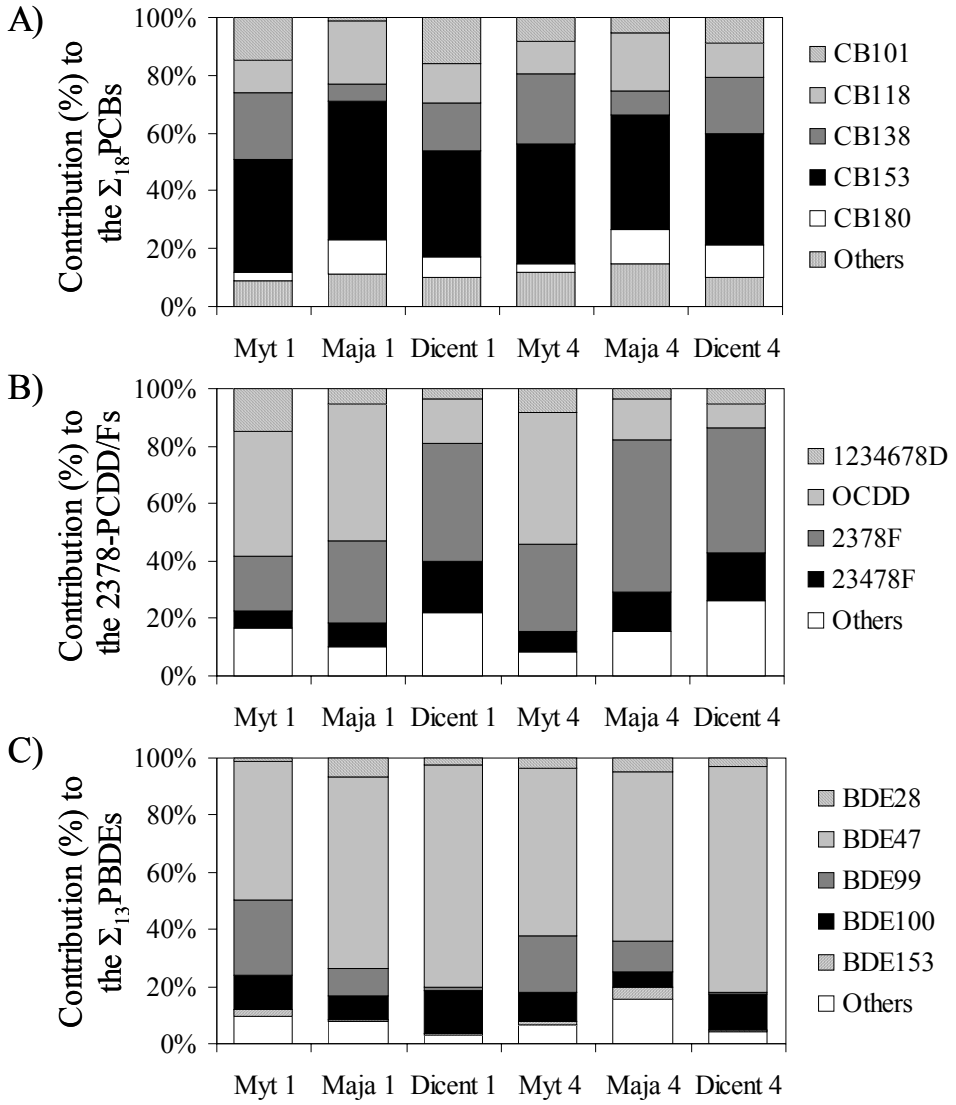

Fig. 3. PCB (A), PCDD/F (B) and PBDE (C) patterns in mussels, spider crabs and sea bass from Antifer (Myt 1, Maja 1, Dicentr 1), and Le Conquet (Myt 4, Maja 4, Dicentr 4).

Supplement Information

Table S1. Biological characteristics of the sampled crustaceans.

Station	Species name	Common name	Abbreviation	N	Body weight (g)	Body size (cm)	Muscle fat content (% of d.w.)	Muscle water content (%)
Antifer	*Maja brachydactyla*	spider crab	M1	4	535 ± 205	11.5 ± 1.8	1.9	80
	Cancer pagurus	edible crab	C1	3	463 ± 284	13.8 ± 2.4	2.6	77
	Necora puber	velvet swimming crab	Np1	10	84 ± 3	6.3 ± 0.6	2.5	77
Granville	*Maja brachydactyla*	spider crab	M2	3	1177 ± 185	15 ± 1.0	2.0	82
	Cancer pagurus	edible crab	C2	3	543 ± 31	14.9 ± 0.5	2.2	79
Roscoff	*Maja brachydactyla*	spider crab	M3	3	1090 ± 135	14.3 ± 0.6	2.3	78
Le Conquet	*Maja brachydactyla*	spider crab	M4	6	1642 ± 423	17.1 ± 1.5	2.3	78
	Cancer pagurus	edible crab	C4	5	921 ± 129	17 ± 0.9	1.9	78
Le Guilvinec	*Maja brachydactyla*	spider crab	M5	3	618 ± 109	12.8 ± 0.4	2.0	78
	Cancer pagurus	edible crab	C5	3	1001 ± 158	17.3 ± 0.3	1.3	78
	Nephrops norvegicus	norway lobster	Nn5	20	20 ± 7	3.0 ± 0.3	2.2	77

ARTICLE 3

Variability of stable isotopes of carbon and nitrogen among decapod crustacean tissues in relation to lipid content

N. Bodin [*,‡,†], F. Le Loc'h [§,¶], C. Hily [**]

[*] IFREMER, DCN-BE, Technopole Brest-Iroise, Pointe du Diable, 29280 Plouzané, France

[‡] LPTC, Université de Bordeaux 1, CNRS, 351 Cours de la Libération, 33400 Talence, France

[§,] IFREMER, DCB-DYNECO, Technopole Brest-Iroise, Pointe du Diable, 29280 Plouzané, France

[¶] IRD, UR 070 RAP, Centre de Recherche Halieutique, Avenue Jean Monnet, B.P. 171, 34203 Sète Cedex, France

[**] LEMAR UMR 6539 CNRS, Institut Universitaire Européen de la Mer, Université de Bretagne Occidentale, Place Copernic, 29 280 Plouzané, France.

[†] Corresponding author. Email: n.bodin@lptc.u-bordeaux1.fr

Soumis à Functional Ecology (Sept. 2005)

Summary

1. The analysis of naturally occurring stable carbon and nitrogen isotope ratios is an important tool to work out trophic relationships, especially in aquatic ecosystems. However, the interpretation of $\delta^{13}C$ and $\delta^{15}N$ results is not always straightforward because of the influence of multiple factors such as the tissue-specific lipid content.

2. Muscle, hepatopancreas and gonads of *Maja brachydactyla* were analyzed for stable isotopes before and after lipid removal, using a derived Soxhlet extraction method.

3. Differences in $\delta^{13}C$ and $\delta^{15}N$ were observed among tissues. Lipid extraction from muscle did not lead to any significant effect on either $\delta^{13}C$ or $\delta^{15}N$. By contrast, ecologically significant shifts (+ 2.9±0.8‰ for $\delta^{13}C$, and + 1.2±0.7‰ for $\delta^{15}N$) were observed for spider crab hepatopancreas. As regards gonads, lipid extraction led to a shift only for $\delta^{13}C$ (+ 1.3 ± 0.3‰).

4. Differences in $\delta^{13}C$ and $\delta^{15}N$ among tissues before pre-treatment may be related to their lipid and amino acid composition. The derived Soxhlet extraction method removed the lipid influence for stable isotopic analysis. We recommend this pre-treatment especially in the case of lipid-rich tissue but also for stable isotope studies on whole organisms.

Key-words: Amino acids, Hepatopancreas, Lipid removal, Muscle, *Maja brachydactyla*

1. Introduction

Stable carbon and nitrogen isotopes are frequently used in ecological studies to trace trophic relationships and food webs (Hobson & Welch 1992; Michener & Schell 1994; Newell *et al.* 1995). This method assumes that a predator contains heavier isotopes (^{15}N and ^{13}C) than its prey, with a mean trophic enrichment in $\delta^{13}C$ ($^{13}C/^{12}C$) and $\delta^{15}N$ ($^{15}N/^{14}N$) of about 0-1‰ and 3-4‰, respectively (De Niro & Epstein 1978; De Niro & Epstein 1981; Minagawa & Wada 1984; Peterson & Fry 1987; Post 2002). Isotopic enrichment also depends on tissue turnover rates, and can vary among a given organism's different tissues (Lee-Thorp *et al.* 1989; Tieszen *et al.* 1983; Lorrain *et al.* 2002). This means that tissues such as muscle, with low turnover rates, integrate diet isotopic signatures corresponding to long periods, while tissues with higher turnover rates (gonads, hepatopancreas) reflect the diet over a short time period (Hesslein *et al*. 1993; Lorrain *et al.* 2002; Rainbow *et al.* 2004; Watanabe *et al.* 2005). So, in any isotopic study, choosing the appropriate tissue to investigate the time window of interest is essential (Tieszen & Boutton 1989; Hobson 1993). However, tissues with high turnover rates such as the gonads and hepatopancreas also serve as important storage reserves. Compared to carbohydrates and proteins, lipids are depleted in ^{13}C (De Niro & Epstein 1977; Griffiths 1991), so variations in tissue lipid content will strongly influence its $\delta^{13}C$ (Lorrain *et al.* 2002). Although the lipid effect on $\delta^{13}C$ has already been investigated (Pinnegar & Polunin 1999), the effect of lipid removal remains unclear on the $\delta^{15}N$ and few studies have dealt with the effects of lipid removal on both carbon and nitrogen isotopic ratios (Sotiropoulos *et al.* 2004), especially in marine organisms.

The aim of this work was first to evaluate the effects of lipid extraction on $\delta^{13}C$ and $\delta^{15}N$ values in muscle, gonads and hepatopancreas of a marine crustacean, the spider crab *Maja brachydactyla*. We then proposed a relationship between lipid content and stable isotope signatures for decapod crustaceans, in order to lipid-normalize the carbon and nitrogen stable isotopic results and thus to avoid variations due to the organism's condition.

2. Material and methods

2.1. Sample origin and preparation

Spider crabs were collected from two populations in the Iroise Sea (Western Brittany) and in the Seine Bay (Eastern English Channel). The sampling was performed in February 2003, in deep water (60-80 depth meters). Both males and females were analyzed, because no significant differences of carbon and nitrogen stable isotope signatures were found by Bodin

et al. (submitted). Immediately after collection, the spider crabs were killed and the hepatopancreas, muscle and gonads of each specimen were carefully dissected from the inner body. All samples were kept at –20°C until analysis. They were then lyophilized and ground up to obtain a fine homogeneous powder. Each sample was divided into two parts: the first one assigned as a control (no lipid extraction) and the second half underwent lipid removal (Lipid-free material).

2.2. Lipid extraction method

Lipids were extracted using a derived Soxhlet extraction method (Manirakiza *et al.* 2001; Schlechtriem *et al.* 2003). Sample extractions were performed for 3 h in a Soxtec 1043 Auto System HT6 (Tecator, Höganäs, Sweden) with 50 ml of a hexane: acetone mixture (40:10). A cellulose thimble containing the sample (Hepatopancreas and gonad = 1 g; Muscle = 2 g) was immersed in the boiling solvent and kept there for 2 h. The thimble was then lifted out of the boiling solvent and the sample rinsed for another hour. The remaining extracted sample was transferred from the thimble to a glass container and dried during 48h in an oven at 40°C. The extracted solvent containing lipid material was transferred in a flask, concentrated by vacuum rotatory evaporation with a temperature controlled bath (40°C), and further dried in an oven at 50°C for 2 h. The residue is weighed to obtain the amount of extractible material and therefore, a crude estimation of the fat content.

2.3. Isotopic analysis

Once dry, all samples were ground to an ultra-fine powder using a ball mill. For stable isotope analysis, 1±0.2 mg of homogenous material was weighed into 4 × 9 mm tin capsules. Samples were analyzed for stable isotope ratios of carbon and nitrogen by CF-IRMS using a Europa Scientific ANCA-NT 20-20 Stable Isotope Analyzer together with an ANCA-NT Solid/Liquid Preparation Module, at the Scottish Crop Institute, Dundee, Scotland. As the samples contained more than 10% nitrogen, the CF-IRMS was operated in dual isotope mode, allowing $\delta^{15}N$ and $\delta^{13}C$ to be measured in the same sample. Isotope ratios are expressed in conventional δ notation as parts per mil (‰) differences from a standard as follows:

$$\delta X_{sample} = [\ (R_{sample} / R_{standard}) - 1\ ]*1000$$

where X is ^{13}C or ^{15}N and R is the corresponding $^{13}C/^{12}C$ or $^{15}N/^{14}N$ ratio. All results are reported with respect to VPDB (cretaceous PeeDee Belemnite) for $\delta^{13}C$ and atmospheric nitrogen for $\delta^{15}N$. The analytical precision was ±0.2‰ for both nitrogen and carbon, as

estimated from standards analyzed together with the samples.

2.4. Statistical analysis

All measured data followed normal distribution as defined by the Shapiro-Wilk test ($p<0.05$). First, Student tests were used to compare lipid contents and stable isotopic signatures between the spider crab tissues, and between specimens from the Iroise Sea and the Seine Bay. Then, the $\delta^{15}N$ and $\delta^{13}C$ values in spider crab tissues before and after removal of lipids were compared using one-way ANOVA. Correlation analyses were also applied to the stable isotope ratios and lipid content, using Pearson's correlation coefficient. Finally, the relationships between $\delta^{13}C$ and lipid content from the literature were applied to spider crabs and compared to our measured data, using a Mann Whitney test due to their non-normal distribution. All statistical analyses were performed using Statistica Software 6.0.

3. Results

Great differences in lipid content were observed among the spider crab tissues (Table 1) (Student test, $p<0.001$). The hepatopancreas lipid content was 50% of dry weight on average, approximately 5- and 15- fold higher than in gonads and muscle, respectively. No significant differences in lipid content between specimens from the two populations were displayed (Student test, $p>0.05$), except for muscle which showed significantly higher levels in individuals from the Iroise Sea (Student test, $p<0.01$). As regards the stable isotopic signatures, similar $\delta^{15}N$ and $\delta^{13}C$ values were observed between the two sampling areas for all spider crabs tissues analyzed (Student test, $p>0.05$).

Carbon and nitrogen stable isotopic ratios were all significantly different among the analyzed tissues (Student test, $p<0.001$). Whatever the geographic sampling area, muscle exhibited enriched $\delta^{15}N$ and $\delta^{13}C$ values compared with gonads, whose stable isotope signatures were higher than those of hepatopancreas (Table 1). The differences in carbon and nitrogen isotopic ratios between the tissues were very close for individuals from the Iroise Sea and from the Seine Bay. They were 5.9 ± 0.6‰ and 4.4 ± 0.6‰ between muscle and hepatopancreas, for $\delta^{13}C$ and $\delta^{15}N$ respectively. The differences between muscle and gonads were lower, 3.7 ± 0.7‰ and 2.2 ± 0.5‰, for $\delta^{13}C$ and $\delta^{15}N$ respectively. Logarithmic relationships between both $\delta^{13}C$ and $\delta^{15}N$ and the lipid content were obtained (Fig. 1), while a linear correlation was highlighted between the C:N ratio and the percentage of lipids (Fig. 2).

The comparison of the same tissues before and after lipid removal gave contrasting results

(Fig. 3). While lipid treatment had no effect on carbon and nitrogen stable isotopic signatures in spider crab muscle, lipid extraction significantly increased $\delta^{15}N$ (ANOVA, $p<0.05$) and $\delta^{13}C$ (ANOVA, $p<0.001$) values in hepatopancreas at both sampling areas. As regards spider crabs from the Seine Bay, these shifts were respectively 3.0 ± 1.0‰ and 1.0 ± 0.8‰ for $\delta^{13}C$ and $\delta^{15}N$. In the Iroise Sea, spider crab hepatopancreas showed an increase of 2.8 ± 0.6‰ and 1.3 ± 0.6‰ after lipid removal, for $\delta^{13}C$ and $\delta^{15}N$ respectively. In comparison with muscle and hepatopancreas, lipid extraction had an intermediate effect on stable isotopic signatures in gonads. Indeed, after the removal of lipids, $\delta^{13}C$ were significantly enriched in ^{13}C compared to control samples at both sampling areas (ANOVA, $p<0.01$). These shifts were 1.6 ± 0.3‰ and 1.1 ± 0.4‰ for spider crab from the Seine Bay and the Iroise Sea, respectively. However, lipid extraction had no effect on nitrogen isotopic ratios, whatever the sampling area.

As concerns the stable isotopic signatures after lipid removal, no differences were observed between the two sampling areas, whatever the tissues analyzed (Student test, $p>0.05$). Moreover, although differences between muscle and the two fat tissues before lipid removal were reduced after the extraction, they remained significant in both sampling areas (Student test, $p<0.001$). On the contrary, no differences of stable isotopic signatures between hepatopancreas and gonads were observed after the lipid treatment, except for $\delta^{15}N$ measured in spider crabs from the Seine Bay, which was still significantly lower in the hepatopancreas (Student test, $p<0.05$). Differences of $\delta^{13}C$ and $\delta^{15}N$ values between control and lipid-free materials ($\Delta\delta^{13}C$ and $\Delta\delta^{15}N$, respectively) were significantly correlated with the lipid content (Fig. 4) (Pearson coefficient, $p<0.001$).

4. Discussion

Whatever the sampling area, muscle tissue in spider crabs exhibited enriched $\delta^{13}C$ and $\delta^{15}N$ values compared to the fattier gonad and hepatopancreas tissues. Pinnegar & Polunin (1999) observed similar results in the Rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. They highlighted higher carbon and nitrogen isotopic signatures in white muscle compared to red muscle, heart and liver. Lorrain *et al.* (2002) also found higher $\delta^{13}C$ values in scallop muscle than in the gonads and digestive gland. Lipids are well known to be depleted in ^{13}C compared to carbohydrates and proteins (De Niro & Epstein 1977; Griffiths 1991), implying that fat tissues tend to be isotopically lighter than lean ones. As regards nitrogen stable isotopes, Gaebler *et al.* (1966) suggested that the relative abundance of different amino acids in tissues explains the variations in $\delta^{15}N$. Muscle tissue contains more non essential amino acids, which are wholly

synthesized or at least partially modified within the body, whereas essential amino acids, which show little change from their isotopic composition in the diet, are more present in the hepatopancreas (Awapara 1962; D'aniello 1980; Wilson & Poe 1974). Moreover, the essential amino acids are less enriched in ^{15}N than the non essential ones due to metabolism, resulting in lower $^{15}N/^{14}N$ ratio in the hepatopancreas than in muscle (Pinnegar & Polunin 1999).

Significant correlations were obtained between the lipid content and, on one hand the C:N ratio, on the other hand both $\delta^{13}C$ and $\delta^{15}N$ values. Lorrain *et al.* (2002) also found a significant negative correlation between $\delta^{13}C$ and the percentage of lipids in the scallop *Pecten Maximus*. McConnaughey & McRoy (1979) established a mathematical equation between lipid content and the C:N ratio applied to a large variety of organisms. Both Lorrain *et al.* (2002) and McConnaughey & McRoy (1979) equations were applied to spider crab lipid contents and results were compared with the measured $\delta^{13}C$ and C:N values. Neither of the equations gave results in agreement with those measured in the spider crab (Mann Whitney test, $p>0.05$), suggesting that relations between tissue lipid content and, both C:N and carbon and nitrogen stable isotope signatures are probably species or/and taxonomic family-dependant.

The lipid removal had no effect on stable isotopic signatures in spider crab muscle. Because of this tissue's very low lipid content (2-4%), it was expected that lipid extraction would not lead to significant increases in $\delta^{13}C$ and $\delta^{15}N$. However, Pinnegar & Polunin (1999) and Sotiropoulos *et al.* (2004) observed significant higher carbon and nitrogen stable isotopic ratios in the muscle of various fish species after lipid removal. These increases were low (0.4-1.0‰ and 0.3-0.5‰ for $\delta^{13}C$ and $\delta^{15}N$, respectively) and can be explained by the higher muscle lipid content in these fish species than in spider crabs. Both Pinnegar & Polunin (1999) and Sotiropoulos *et al.* (2004) maintained fish in tanks for 4 and 8 months, respectively, prior to stable isotopic analyses, feeding them with pelleted food. Pinnegar & Polunin (1999) estimated the mean percentage of lipid composition of white muscle Rainbow trout to be 27%, i.e., approximately 10 times higher than in spider crab muscle.

Inversely, $\delta^{13}C$ increased significantly with lipid removal for both hepatopancreas and gonads in spider crabs, and the increase was all the greater when the tissue was fat (2.9 ± 0.9‰ and 1.3 ± 0.3‰, respectively). The extraction of lipids, which are depleted in heavier carbon isotopes, removed the influence of the lipid content for $\delta^{13}C$. However, even after lipid removal, both hepatopancreas and gonads were still more depleted in $\delta^{13}C$ than muscle, whereas each presented similar carbon isotopic signatures. These results can be explained by

the different ways of biosynthesis between these tissues. Pinnegar & Polunin (1999) found no significant effect of lipid removal on carbon stable isotopic signatures of Rainbow trout liver, because of the significant standard deviations both before and after lipid extraction. To our knowledge, no further studies are available on lipid removal's effects on fatty tissues, so no other comparisons could be made.

For $\delta^{15}N$, lipid removal's only effect was on hepatopancreas stable isotopic signatures, and the increase was slight and more variable compared to $\delta^{13}C$ ($1.1 \pm 0.7‰$). Pinnegar & Polunin (1999) also observed an enrichment of $\delta^{15}N$ in Rainbow trout liver after lipid removal (0.61‰). The hepatopancreas is the most important lipid storage tissue in decapod crustaceans (approximately 50% of dry weight). Among the different lipid classes, some of them are reported as neutral lipids which cover storage compounds (glycerids, cires), sterols, free fat acids, etc. Due to their apolarity, these lipids are extracted from the tissue with hexane. The second class concerns the structural polar lipids (glycolipids, phospholipids, sphingolipids, etc.) which are linked to proteins. These compounds are extracted with a more polar solvent like an acetone-hexane mixture during the lipid removal process, leading to the incidental co-extraction of the associated amino acids. The small $\delta^{15}N$ increase in the hepatopancreas after lipid removal probably results from the extraction of such lipoprotein compounds, which are depleted in ^{15}N due to the presence of attached essential amino acids. A similar hypothesis was put forward by Sotiropoulos *et al.* (2004) who highlighted an enrichment of $\delta^{15}N$ in fatty fish muscle (0.3-0.5‰) after lipid removal using a modified Blight and Dyer extraction method. Neither the muscle nor gonads of spider crabs displayed significant differences in nitrogen isotopic signatures after lipid extraction, probably due to the lower total lipid content of these tissues.

Even though most studies analyze muscle tissue for stable isotope analysis in food webs, whole bodies are also used, especially for small species. Until now, only a decarbonatation pre-treatment was systematically applied in these cases before carbon and nitrogen stable isotope analysis. Our results showed that lipid removal is essential in the case of fatty species to avoid misleading conclusions following the stable isotope results. McConnaughey & McRoy (1979) had already highlighted the need to lipid-normalize carbon stable isotope results for fatty animals. They established a mathematical equation, based on the lipid content and on $\delta^{13}C$ value without pre-treatment, to calculate the lipid-normalized $\delta^{13}C$ of the sample. This equation is currently used in ecological studies (Perga & Gerdeaux 2005; Satterfield IV & Finney 2002) and even for crustacean studies (Schmidt *et al.* 2003). Its application to the

spider crab did not enable us to obtain $\delta^{13}C$ values in accordance with those measured (Mann Whitney test, $p>0.05$). According to the spider crab results, we established equations to lipid-normalize stable isotope values in the case of crustaceans. The adjusted carbon and nitrogen stable isotopic ratios ($\delta^{13}C_{adjusted}$ and $\delta^{15}N_{adjusted}$) can be inferred from both the lipid content and the stable isotopic values without pre-treatment ($\delta^{13}C_{control}$ and $\delta^{15}N_{control}$) using the following equations:

$$\delta^{13}C_{adjusted} = \delta^{13}C_{control} + 0.0588 \times (\% \text{ lipid})$$

$$\delta^{15}N_{adjusted} = \delta^{15}N_{control} + 0.0210 \times (\% \text{ lipid})$$

In conclusion, the lipid content which has an important influence on $\delta^{13}C$ and $\delta^{15}N$ values, must be taken into account in ecological studies using a stable carbon and nitrogen isotope approach. The automatic Soxtec extraction method avoids a lipid influence for stable isotopic analysis, and, contrary to other techniques, presents the advantage of low time and solvent consumption. However, because of the direct correlations between lipid content and both carbon and nitrogen stable isotopic signatures, mathematical equations could be used both to estimate the lipid content of a sample and to lipid-normalize $\delta^{13}C$ and $\delta^{15}N$ values. General equations found in the literature must be used with caution because of the difference in tissue lipid composition of organisms. In this study, formulations for estimated lipid content and lipid-normalized stable isotopic results were proposed for decapod crustaceans, although further investigations should be done to support them.

Acknowledgments

This work was partially funded by the Regional Council of Brittany. We would also like to thank the fishermen who very kindly offered their help in sampling the crustaceans. The authors are also grateful to Audrey Morel and Charlie Scrimgeour (Scottish Crop Institute, Scotland) for running the samples.

References

Awapara, J. (1962) Free amino acids in invertebrates: a comparative study of their distribution. *Amino Acid Pools* (ed J. T. Holden), pp. 158-175. Elsevier, Amsterdam.

Bodin, N., Le Loc'h, F., Hily, C., Caisey, C., Latrouite, L. *et al.* (*Submitted*) Variability of stable isotopes signatures ($\delta^{13}C$ and $\delta^{15}N$) in two spider crab populations (*Maja brachydactyla*) in Western Europe. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology.*

D'aniello, A. (1980) Free amino acids in some tissues of marine crustacea. *Experientia* **36,** 392 -393.

De Niro, M.J. & Epstein, S. (1978) Influence of diet on the distribution of carbon isotopes in animals. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **42**, 495-506.

De Niro, M.J. & Epstein, S. (1981) Influence of diet on the distribution of nitrogen isotopes in animals. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **45**, 341-351.

De Niro, M.J. & Epstein, S. (1977) Mechanism of isotope carbon fractionation associated with lipid synthesis. *Science* **197**, 261-263.

Gaebler, O.H., Vitti, T.G. & Vukmirovich, R. (1966) Isotope effects in metabolism of ^{14}N and ^{15}N from unlabelled dietary proteins. *Canadian Journal of Biochemistry* **44**, 1249-1257.

Griffiths, H. (1991) Applications of stable isotope technology in physiological ecology. Functional Ecology **5**, 254-269.

Hesslein, R.H., Hallard, K.A. & Ramlal, P. (1993) Replacement of Sulfur, carbon and nitrogen in tissue of growing broad Whitefish (*Coregonus nasus*) in response to a change in diet traced by $\delta^{34}S$, $\delta^{13}C$ and $\delta^{15}N$. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **50**, 2071-2076.

Hobson, K.A. (1993) Trophic relationships among high Arctic seabirds: insights from tissue-dependent stable-isotope models. *Marine Ecology Progress Series* **95**, 7-18.

Hobson, K. A., & Welch, H. E. (1992) Determination of trophic relationships within a high Arctic food web using $\delta^{13}C$ and $\delta^{15}N$ analysis. *Marine Ecology Progress Series* 84, 9-18.

Lee-Thorp, J.A., Sealy, J.C. & van der Merwe, N.J. (1989) Stable carbon isotope ratio differences between bone collagen and bone apatite, and their relationship to diet. *Journal of Archaeological Science* 16, 585-599.

Lorrain, A., Paulet, Y-M., Chauvaud, L., Savoye, N., Donval, A. *et al.* (2002) Differential $\delta^{13}C$ and $\delta^{15}N$ signatures among scallop tissues: implications for ecology and physiology. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **275**, 47-61.

Manirakiza, P., Covaci, A. & Schepens, P. (2001) Comparative study on total lipid determination using Soxhlet, Roese-Gottlieb, Bligh and Dyer, and modified Bligh and Dyer Extraction methods. *Journal of Food Composition and Analysis* **14**, 93-100.

McConnaughey, T. & McRoy, C.P. (1979) Food-web structure and the fractionation of the carbon isotopes in the Bering Sea. *Marine Biology* **53**, 257-262.

Michener, R.H. & Schell, D.M. (1994) Stable isotope tracers in marine aquatic food webs. *Stable isotopes in ecology and environmental science* (eds K. Lajtha, & R.H., Michener), pp. 138-157. Blackwell Scientific, London.

Minagawa, M. & Wada, E. (1984) Stepwise enrichment of ^{15}N along food chains: Further evidence and the relation between $\delta^{15}N$ and animal age. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **48**, 1135-1140.

Newell, R.I.E., Marshall, N., Sasekumar, A. & Chong, V.C. (1995) Relative importance of benthic microalgae, phytoplankton, and man-groves as sources of nutrition of penaeid prawns and other coastal invertebrates from Malaysia. *Marine Biology* **123**, 595-606.

Perga, M.E. & Gerdeaux, D. (2005) 'Are fish what they eat' all year round? *Oecologia* **144**, 598-606.

Peterson, B. J. & Fry, B. (1987) Stable isotopes in ecosystem studies. *Annual Review of Ecology and Systematics* **18**, 293-320.

Pinnegar, J.K. & Polunin, N.V.C. (1999) Differential fractionation of $\delta^{13}C$ and $\delta^{15}N$ among fish tissues: implications for the study of trophic interactions. *Functional Ecology* **13**, 225-231.

Post, D.M. (2002) Using stable isotopes to estimate trophic position: models, methods, and assumptions. *Ecology* **83**, 703-718.

Rainbow, P.S., Ng, T.Y-T., Shi, D. & Wang, W-X. (2004) Acute dietary pre-exposure and trace metal bioavailability to the barnacle *Balanus amphitrite*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **311**, 315-337.

Satterfield IV, F.R. & Finney, B.P. (2002) Stable isotope analysis of Pacific salmon: insight into trophic status and oceanographic conditions over the last 30 years. *Progress in*

Oceanography **53**, 231-246.

Schlechtriem, C., Focken, U. & Becker, K. (2003) Effect of different lipid extraction methods on $\delta^{13}C$ of lipid and lipid-free fractions of fish and different fish feeds. *Isotopes in Environmental and Health Studies* **39**, 135-140.

Schmidt, K., Atkinson, A., Stübing, D., McClelland, J.W., Montoya, J.P. *et al.* (2003) Trophic relationships among Southern Ocean copepods and krill: Some uses and limitations of a stable isotope approach. *Limnology and Oceanography* **48**, 277-289.

Sotiropoulos, M.A., Tonn, W.M. & Wassenaar, L.I. (2004) Effects of lipid extraction on stable carbon and nitrogen isotope analyses of fish tissues: potential consequences for food web studies. *Ecology of Freshwater Fish* **13**, 155-160.

Tieszen, L.L. & Boutton, T.W. (1989) Stable isotopes in terrestrial ecosystem research. *Stable isotopes in ecological research* (eds P.W. Rundel, J.R. Ehleringer & K.A. Nagy), pp. 167-195. Springer Verlag, New York.

Tieszen, L.L., Boutton, T.W., Tesdahl, K.G. & Slade, N.A. (1983) Fractionation and turnover of stable carbon isotopes in animal tissues: implications for $\delta^{13}C$ analysis of diet. *Oecologia* **57**, 32 -37.

Watanabe, Y., Seikai, T. & Tominaga, O. (2005) Estimation of growth and food consumption in juvenile Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* using carbon stable isotope ratio $\delta^{13}C$ under laboratory conditions. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **in press**.

Wilson, R.P. & Poe, W.E. (1974) Nitrogen metabolism in channel catfish, *Ictalurus punctatus*. -III. Relative pool sizes of free amino acids and related compounds in various tissue of the catfish. *Comparative Biochemistry and Physiology B* **45**, 545-556.

Table and figure list

Table 1. Mean percentage of lipid content (dry weight basis) and mean $\delta^{15}N$ and $\delta^{13}C$ values without pre-treatment (± standard deviation) among spider crab tissues.

Fig. 1. Relationship between stable isotope ratios (‰) without pre-treatment and the lipid content (%) in the spider crab (n = 46). Both $\delta^{13}C$ (A) and $\delta^{15}N$ (B) were significantly correlated to lipid content (Pearson coefficient, $p<0.001$). The logarithmic relationships were $\delta^{13}C = -2.0702 \times Ln$ (% lipid) - 13.114 and $\delta^{15}N = -1.4001 \times Ln$ (% lipid) - 14.414.

Fig. 2. Correlation between the C:N ratio and lipid content (%) in the spider crab (n = 46). The significant linear relationship was lipid (%) = 5.4185 × (C:N) - 20.005 (Pearson coefficient, $p<0.0001$).

Fig. 3. Stable nitrogen and carbon isotope ratios of control and lipid-free materials from spider crab muscles (M), gonads (G) and hepatopancreas (H), collected from the Seine Bay (SB) and the Iroise Sea (IS). Significance based on ANOVA: one, two or three asterisks indicate the mean differences significant at $p<0.05$, $p<0.01$ and $p<0.001$, respectively.

Fig. 4. Relationship between $\Delta\delta X$ (‰) and the lipid content (%) in the spider crab (n = 46). $\Delta\delta X$ correspond to $\Delta\delta^{13}C$ (◆) and $\Delta\delta^{15}N$ (▲). Both $\Delta\delta^{13}C$ and $\Delta\delta^{15}N$ were significantly correlated to the lipid content (Pearson coefficient, $p<0.001$). Linear relationships were respectively $\Delta\delta^{13}C = 0.0588 \times$ (% lipid) and $\Delta\delta^{15}N = 0.0210 \times$ (% lipid).

Table 1. Mean percentage of lipid content (dry weight basis) and mean $\delta^{15}N$ and $\delta^{13}C$ values without pre-treatment (± standard deviation) among spider crab tissues.

	Iroise Sea				Seine Bay			
	N	% lipid	$\delta^{13}C$ (‰)	$\delta^{15}N$ (‰)	N	% lipid	$\delta^{13}C$ (‰)	$\delta^{15}N$ (‰)
Muscle	11	3.3 ± 0.4	-15.1 ± 0.4	13.2 ± 0.5	6	2.7 ± 0.3	-15.0 ± 0.5	13.1 ± 0.3
Gonads	6	10.5 ± 2.2	-19.5 ± 0.3	10.9 ± 0.6	6	10.6 ± 1.1	-19.2 ± 0.4	8.3 ± 0.8
Hepatopancreas	12	49.1 ± 10.8	-21.1 ± 0.3	9.1 ± 0.7	7	51.0 ± 8.5	-20.6 ± 0.8	11.0 ± 0.7

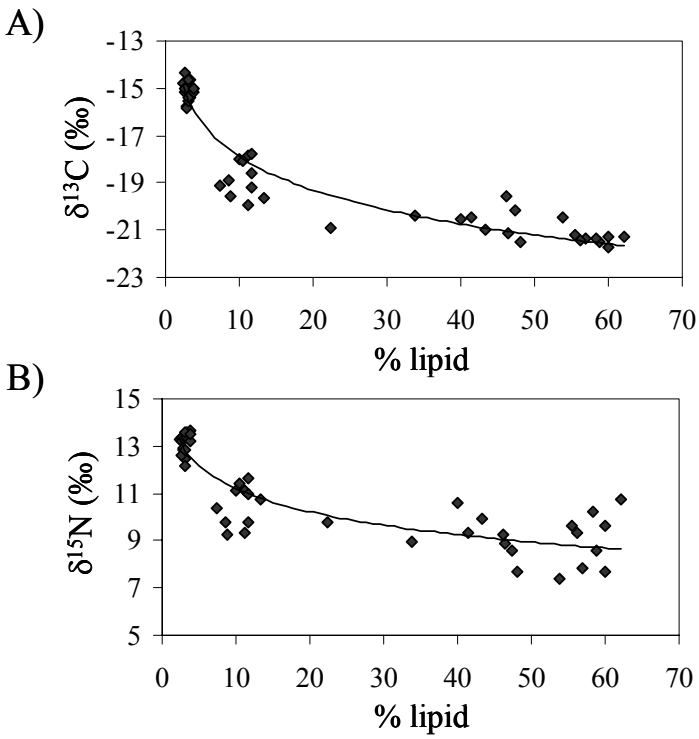

Fig. 1. Relationship between stable isotope ratios (‰) without pre-treatment and lipid content (%) in the spider crab (n = 46). Both $\delta^{13}C$ (A) and $\delta^{15}N$ (B) were significantly correlated to lipid content (Pearson coefficient, $p<0.001$). The logarithmic relationships were $\delta^{13}C = -2.0702 \times Ln$ (% lipid) - 13.114 and $\delta^{15}N = -1.4001 \times Ln$ (% lipid) - 14.414.

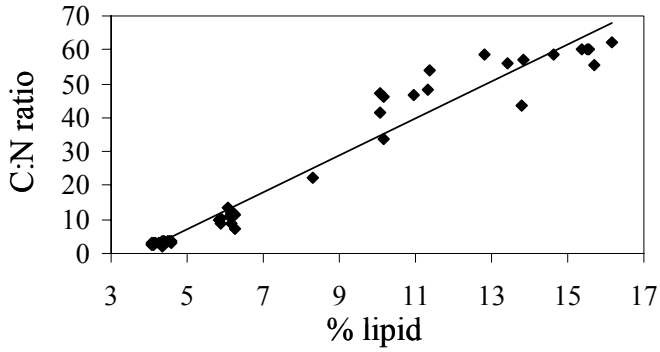

Fig. 2. Correlation between the C:N ratio and lipid content (%) in the spider crab (n = 46). The significant linear relationship was lipid (%) = 5.4185 × (C:N) - 20.005 (Pearson coefficient, $p<0.0001$).

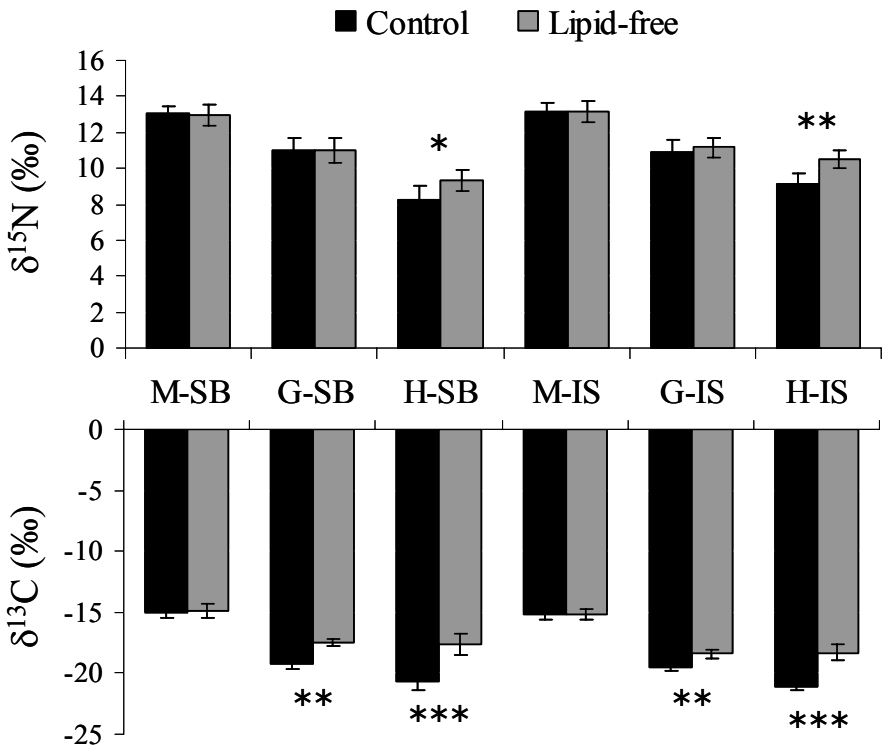

Fig. 3. Stable nitrogen and carbon isotope ratios of control and lipid-free materials from spider crab muscles (M), gonads (G) and hepatopancreas (H) collected from the Seine Bay (SB) and the Iroise Sea (IS). Significance based on ANOVA: one, two or three asterisks indicate the mean differences significant at $p<0.05$, $p<0.01$ and $p<0.001$, respectively.

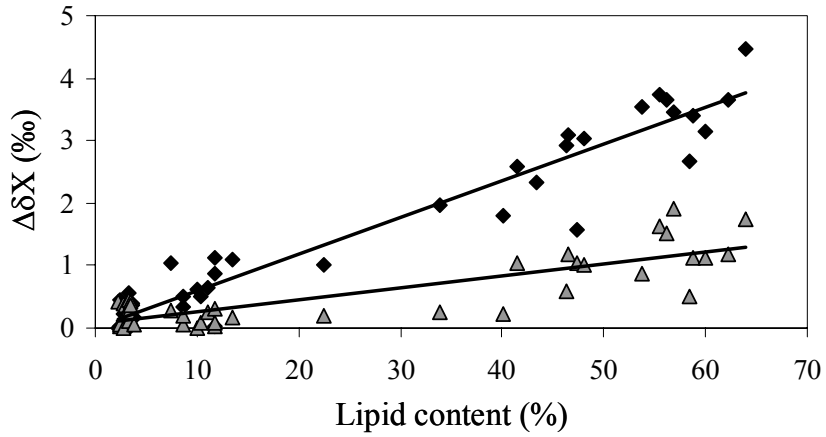

Fig. 4. Relationship between ΔδX (‰) and the lipid content (%) in the spider crab (n = 46). ΔδX correspond to $\Delta\delta^{13}C$ (◆) and $\Delta\delta^{15}N$ (△). Both $\Delta\delta^{13}C$ and $\Delta\delta^{15}N$ were significantly correlated to the lipid content (Pearson coefficient, $p<0.001$). Linear relationships were respectively $\Delta\delta^{13}C = 0.0588 \times$ (% lipid) and $\Delta\delta^{15}N = 0.0210 \times$ (% lipid).

ARTICLE 4

Variability of stable isotopes signatures ($\delta^{13}C$ and $\delta^{15}N$) in two spider crab populations (*Maja brachydactyla*) in Western Europe

Nathalie Bodin [1,2,*], François Le Loc'h [3,4], Christian Hily [5], Xavier Caisey [3], Daniel Latrouite [6], Anne-Marie Le Guellec [1]

[1] IFREMER, BE-LBCO, Technopole Brest-Iroise, Pointe du Diable, 29280 Plouzané, France

[2] LPTC, Université de Bordeaux 1, CNRS, 351 Cours de la Libération, 33400 Talence, France

[3] IFREMER, DYNECO-BENTHOS, Technopole Brest-Iroise, Pointe du Diable, 29280 Plouzané, France

[4] IRD, UR 070 RAP, Centre de Recherche Halieutique, Avenue Jean Monnet, B.P. 171, 34203 Sète Cedex, France

[5] LEMAR UMR 6539 CNRS, Institut Universitaire Européen de la mer, Université de Bretagne Occidentale, Place Copernic, 29 280 Plouzané, France.

[6] IFREMER, STH-UDPP, Technopole Brest-Iroise, Pointe du Diable, 29280 Plouzané, France

[*] Corresponding author. Email: n.bodin@lptc.u-bordeaux1.fr

Soumis à Journal of Experimental Marine Biology and Ecology (Sept 2005)

Abstract

The aim of this study was to test the variability of stable isotopes of nitrogen and carbon with respect to some characteristics of the populations such as sex, size and age of individuals, in two different spider crab (*Maja brachydactyla)* populations of Western Europe living in different biotopes. The Iroise Sea population is localized in Western Brittany and characterized by a seasonal migration occurring on a large bathymetric and habitat gradient while the Seine Bay population, located in the Eastern English Channel, stays in a more homogeneous environment during its migration. In the Iroise Sea population, $\delta^{13}C$ values increased significantly both with body size and age, revealing a shift towards "benthic-component" prey with spider crab growth. On the contrary, neither body size nor ageing gave rise to a significant trophic level change. In this population, the seasonal migrations of *Maja brachydactyla* from coastal waters in summer to offshore habitats in winter involved significant but slight differences in $\delta^{13}C$ and $\delta^{15}N$. In the Seine Bay population, low variations for both carbon and nitrogen were recorded for either sex or size or summer/winter phases. The $\delta^{13}C$ and $\delta^{15}N$ variability appears to be the combination of two components: morphological aptitudes of individuals to feed on prey (individual's size) and the availability and diversity of prey in the different habitats.

Keywords: *Maja brachydactyla*, Carbon, Nitrogen, feeding, stable isotope, migration, growth

1. Introduction

Largely distributed along the Northwest Atlantic coast, the spider crab *Maja brachydactyla* (Crustacea:Decapoda:Majidae) is a species of commercial importance for French fisheries. *Maja brachydactyla*'s life cycle is from 5 to 8 years, consisting of two main periods of growth and reproductive phases separated by a terminal moult. During the growth phase, juvenile spider crabs inhabit shallow areas (depth: <10m) (Le Foll 1993). The juvenile stage lasts approximately two years until a terminal moult, at which time sexual maturity is achieved and no further moulting occurs (Le Foll 1993, González-Gurriarán et al. 1995, Sampedro et al. 1999). The postpubertal adults then undertake an autumn/winter migration from coastal nursery areas to offshore sites (depth: 40-120 m) (De Kergariou 1971, Latrouite & Le Foll 1989). Mating occurs in winter in deep waters, and adult spider crabs come back to shallow waters (<20m) the following spring, where the females will spawn (De Kergariou 1971, Stevcic 1977, González-Gurriarán et al. 1993, Le Foll 1993). In both shallow and deep waters, spider crabs can live either on soft sediment or rocky bottoms.

The make up of *Maja brachydactyla*'s diet remains to be accurately described. Direct observations in the field (Carlisle 1957, De Kergariou 1974), laboratory experiments (Stevcic 1967, 1968, Brosnan 1981) and studies based on gut contents (Stevcic 1967, De Kergariou 1974, Brosnan 1981, Bernárdez et al. 2000) have suggested that the spider crab has an omnivorous diet based on the consumption of prey commonly found in their habitat. Moreover, few studies have focused on the influence of sex, body size and habitat on the diet composition of this species (De Kergariou 1974, Bernárdez et al. 2000).

The measurement of stable isotopes of nitrogen ($^{15}N/^{14}N$) and carbon ($^{13}C/^{12}C$) has recently become a useful tool to trace trophic relationships (Michener & Schell 1994) and food webs (Newell et al. 1995). This method assumes that, during ingestion, there is enrichment in heavy isotopes (i.e., ^{13}C or ^{15}N) compared to the food, which is compensated by the preferential excretion of light isotopes (Peterson & Fry 1987, Olive et al. 2003). The isotopic composition of an animal's tissue therefore reflects that of its prey (Dufour & Gerdeaux 2001), and different authors have suggested for all consumers a mean trophic enrichment in isotopic stable ratios of carbon ($\delta^{13}C$) and nitrogen ($\delta^{15}N$) of about 0-1‰ and 3-4‰, respectively (De Niro & Epstein 1978, 1981, Minagawa & Wada 1984, Peterson & Fry 1987).

The $\delta^{15}N$ ratio is often used as a predictor of the relative trophic level (Vander Zanden et al. 1997, Pinnegar et al. 2002, Post 2002), whereas $\delta^{13}C$ values can be useful in evaluating sources of primary production in marine systems: $\delta^{13}C$ values are typically higher in inshore-

benthic food webs than in plankton-based systems (Hobson et al. 1995, Dauby et al. 1998). Conversely to stomach content analysis or direct observations which reflect the diet composition of an animal at the moment, stable isotope measurements of carbon and nitrogen in an organism's tissue provide a time-integrating method depending of the tissues turnover rates (Hesslein et al. 1993). $\delta^{15}N$ and $\delta^{13}C$ provide an average estimate of an organism's preferred diet which is less subject to temporal bias than gut content analyses. When an animal modifies its feeding and ingests prey with different isotopic composition from the previous intake, its isotopic carbon and nitrogen signature changes progressively (Riera et al. 2000).

The aims of this study were to examine the variability of nitrogen and carbon isotopic compositions in two different spider crab populations, and to test the various parameters which could explain this variability: demographic parameters (sex, age and size) and environmental parameters (geographic area and biotope). The study was carried out on two geographic sampling areas, the Iroise Sea (Western Brittany), and the Seine Bay (Eastern English Channel).

2. Material and methods

2.1. Sampling strategy

The two spider crab populations, one from the Iroise Sea and the other from the Seine Bay (Fig 1) were sampled in 2003-2004. The Iroise Sea, located in Western Brittany, is an important area for spider crab production. Juveniles were collected by scuba diving on sandy bottoms from the Bertheaume Bay nursery (48°21'51 N; 4°39'00 W), a 5-10 meter deep area colonized by a seagrass (*Zostera marina*) bed. In summer adult spider crabs live near the shores on rocky areas; samples were taken by scuba divers at depths of 10-15 m at Corbin Rock (48°17'50 N; 4°37'53 W). During winter, adult specimens were captured by professional fishermen on rocky bottoms in deep waters around 60-80 meters, at approximately 15 nautical miles from the coast (48°04'04 N; 4°57'59 W). In the second sampling area, the Seine Bay, juvenile and adult spider crabs were collected by scuba divers in summer near the Antifer oil terminal on muddy sands 5-10 m depth, with few rocks (49°44'81 N; 00°07'03 E). In winter, professional fishermen captured adult specimens at about 10 nautical miles from shore in deep waters around 30-40 m., on heterogeneous coarse sediments (49°49'10 N; 00°04'03 W).

2.2. Sample preparation.

A total of 131 and 92 spider crabs respectively from the Iroise Sea and Seine Bay were analyzed for their stable isotopic composition. After collection, the crab's gender was determined as well as the total fresh weight (W in g) and the carapace length (CL in mm) measured from the interval between the frontal spines back to the posterior edge of the carapace. Following the method developed by Le Foll (1993), the spider crab age classes were estimated on the basis of the hardness of the carapace, the quality and the abundance of the epibionts covering the carapace, and the wear of the claws and the rostrum. This information allowed us to classify each individual into one of five cohorts: from 0 to 1 year old (0-1), and 1 to 2 years old (1-2) for the juvenile specimens; from 2 to 3 years old (2-3), 3 to 4 years old (3-4) and over 4 years old (4+) for the adults.

For each specimen, the muscle was carefully dissected from the inner body for stable isotope analysis. Yokoyama et al. (2005) have recommended the use of muscle for isotopic analysis in decapod crustaceans because it provides a better measure of diet-tissue fractionation than a whole-body analysis does. Moreover, they have shown that acid treatment on muscle samples is unnecessary, provided that no debris of exoskeletons or any other inorganic carbonates are included in the samples. All sample tissues were kept at –20°C until being freeze dried, and further ground to obtain a fine homogeneous powder. Their water content is estimated from the weight loss during freeze drying.

2.3. Isotopic analysis

1±0.2mg of each dried sample was weighed in clean tin capsules for stable isotopic analysis. The stable isotope ratios of carbon and nitrogen were determined at the Scottish Crop Institute (Dundee, Scotland), by CF-IRMS analysis using a Europa Scientific ANCA-NT 20-20 Stable Isotope Analyser together with an ANCA-NT Solid/Liquid Preparation Module. As the samples contained more than 10% nitrogen, the CF-IRMS was operated in dual isotope mode, allowing $\delta^{15}N$ and $\delta^{13}C$ to be measured in the same sample. Stable isotope ratios were expressed in conventional δ notation as parts per mil (‰) according to the following equation:

$$\delta X_{sample} = [\ (R_{sample} / R_{reference}) - 1\ ]*1000$$

where X is ^{13}C or ^{15}N and R is the corresponding $^{13}C/^{12}C$ or $^{15}N/^{14}N$ ratio. Reference is VPDB (cretaceous PeeDee Belemnite) for $\delta^{13}C$ and atmospheric nitrogen for $\delta^{15}N$. The

analytical precisions were ±0.2‰ for both nitrogen and carbon, as estimated from standards analyzed together with the samples.

2.4. Statistical analysis

All data follow a normal distribution according to the Shapiro-Wilk test ($p<0.05$). First of all, a Student test was used to compare the actual differences in mean $\delta^{13}C$ and $\delta^{15}N$ between spider crabs from the Iroise Sea and the Seine Bay. Then data on body weight, carapace length, $\delta^{13}C$ and $\delta^{15}N$ were subjected to correlation analysis using Pearson's correlation coefficient. Additionally, $\delta^{13}C$ and $\delta^{15}N$ in spider crab muscles from each sampling area were analyzed using ANOVA. If significant differences were found, processing pairs were compared by Tukey's HSD test. Statistical analyses were performed using Statistica Software 6.0.

3. Results

3.1. Comparison of the two populations

While the means were close, the Student test ($p<0.05$) revealed significant differences for both $\delta^{13}C$ and $\delta^{15}N$ measured in the spider crab muscles (all age, sex and sampling localizations mixed) between the two sampling areas. Spider crabs from the Seine Bay exhibited enriched values for both $\delta^{13}C$ and $\delta^{15}N$ compared to specimens from the Iroise Sea (mean ± SE, $\delta^{13}C$ = -15.02 ± 0.69‰ and -16.34 ± 1‰; $\delta^{15}N$ = 12.78 ± 0.62‰ and 12.56 ± 0.63‰, respectively). Stable isotope results are presented in table 1. A Pearson correlation analysis showed a significant correlation between $\delta^{13}C$ and $\delta^{15}N$ in the two populations (Iroise Sea: $r = 0.54$ and $p < 0.01$; Seine Bay: $r = 0.25$ and $p< 0.05$).

3.2. Body size variability

For each population, data on body weight (W) and carapace length (CL) were compared to stable isotopic ratios. For specimens from the Iroise Sea, significant positive correlations were obtained for both $\delta^{13}C$ and $\delta^{15}N$ with carapace length (Pearson coefficient: $r = 0.62$ and $p < 0.01$ for $\delta^{13}C$; $r = 0.53$ and $p < 0.01$ for $\delta^{15}N$) and body weight (Pearson coefficient: $r = 0.68$ and $p < 0.01$ for $\delta^{13}C$; $r = 0.54$ and $p < 0.01$ for $\delta^{15}N$). The smaller individuals (CL = 50-70 mm) presented depleted carbon and nitrogen isotopic values compared to larger ones with CL > 170 mm ($\delta^{13}C$ = -17.58 ± 0.59 and -15.01 ± 0.41‰; $\delta^{15}N$ = 11.92 ± 0.54 and 13.4 ± 0.32‰, respectively) (Fig. 2). As regards spider crabs from the Seine Bay, $\delta^{15}N$ was significantly

correlated with the body weight and the carapace length (Pearson coefficient: $r = 0.34$, $p < 0.01$ and $r = 0.48$, $p < 0.01$, respectively), but no relation was observed with the stable isotopic ratio of carbon.

3.3. Sex and age effects on isotope ratios in spider crabs from coastal waters

A two-way factorial Model I ANOVA was performed on $\delta^{13}C$ and $\delta^{15}N$ data of spider crabs collected in shallow coastal waters (summer period), in order to study the influence of both sex and age (5 age classes were tested) (Table 2). In the Iroise Sea, both nitrogen and carbon isotope ratios were influenced by the spider crab age. In the Seine Bay population, only the $\delta^{15}N$ values were affected by this factor. No significant relation was identified between sex and $\delta^{13}C$, and sex and $\delta^{15}N$ either in the Iroise Sea population or in the Seine Bay population.

In the Iroise Sea, the youngest spider crabs (0-1 year old) exhibited significantly more depleted values than all the other age classes, excepting the 2-3 year old specimens, for both $\delta^{13}C$ and $\delta^{15}N$ (Tukey-Kramer test, $p<0.01$) (Fig. 3). The oldest spider crabs (4 years old and over) had significantly higher $\delta^{13}C$ ratios than the juvenile ones (0-1 and 1-2 years old), and they also exhibited enriched nitrogen values compared to all the other age classes (Tukey-Kramer test, $p<0.05$). In the Seine Bay population, all individuals had similar stable isotopic signatures, except the 0-1 year old juveniles which were significantly depleted in nitrogen (Tukey-Kramer test, $p<0.05$).

3.4. Sex, age and migration effects on isotope ratios in adult spider crabs

A two-way factorial Model I ANOVA was performed on $\delta^{13}C$ and $\delta^{15}N$ data of adult spider crabs, in order to study the influence of sex, age (2 age classes were tested: 3-4 years old and 4 years old and more) and migration (shallow and deep bottoms) (Table 3).

In the Seine Bay, neither the sex, nor the age nor migration had any effect on either the $\delta^{15}N$ or $\delta^{13}C$ values. However, Migration × Age significantly affected the carbon isotopic composition ($p<0.05$). In the Iroise Sea, migration had a significant effect on both $\delta^{13}C$ and $\delta^{15}N$ values, which were lower in specimens collected on shallow bottoms (respectively -16.26 ± 0.62 and 12.20 ± 0.46) than on deep bottoms (respectively -15.15 ± 0.51 and 13.15 ± 0.53) (Tukey-Kramer test, $p<0.0001$) (Fig. 4). Moreover, the nitrogen isotopic ratio was significantly affected by the spider crab's age, with the highest $\delta^{15}N$ values in the oldest specimens (Tukey-Kramer test, $p<0.01$). Finally, the interaction Sex × Age and Migration × Sex × Age significantly affected the nitrogen isotopic composition.

4. Discussion

Maja brachydactyla, like most decapod crustaceans, is opportunistic and consumes whatever range of food is available where it lives (Stevcic 1968, De Kergariou 1974, Bernárdez et al. 2000). Omnivory is a particularly well-suited dietary strategy of migratory crustaceans which are likely to encounter a wide variety of potential food items while crossing different habitats in the course of their seasonal migrations. Originally, the position of such organisms within food webs and their diet composition were based on direct observations, laboratory experiments and/or gut content analysis. However, these classical approaches often remain critical for opportunistic species in deciding whether observations over restricted time periods are representative of their diet in general. For this reason, stable isotope analysis, which reflects the mean composition of the assimilated diet, is particularly appropriate in the case of omnivorous crustaceans.

The results showed slight but significant differences between the Seine Bay and the Iroise Sea spider crab populations in terms of carbon and nitrogen stable isotopic composition. The Seine Bay population had enriched values for both $\delta^{13}C$ and $\delta^{15}N$. Moreover, ontogenic variations in the spider crab muscle stable isotopic composition followed different patterns in the two sampling areas, except for the sex parameter. In spite of the morphological dissimilarity of their chelipeds and their different energetic demands, the males and females in this study did not present any significant differences in isotopic signatures, whatever the age and the migration period, for both spider crabs from the Seine Bay and the Iroise Sea. A similar result was obtained by Bernárdez et al. (2000) in spider crab gut contents from Galicia (Spain), whereas De Kergariou (1974) found a significant sex effect by studying both direct spider crab behaviour in the field and gut contents, for specimens from Brittany (France). The large $\delta^{13}C$ and $\delta^{15}N$ standard deviations observed in males and females of different age classes in both sampling areas confirm the opportunistic behaviour of the spider crab, which probably conceals slight isotopic differences due to sex. However, results of this study highlighted significant differences between the two populations focused on with respect to the influence of ontogenic factors such as age, size and seasonal migration. Indeed, while specimens from the Seine Bay presented low variability both for $\delta^{13}C$ and $\delta^{15}N$, the carbon and nitrogen isotopic signatures in spider crabs from the Iroise Sea were strongly influenced by all these parameters.

Like other *majidae,* but contrary to the majority of decapod crustaceans, *Maja brachydactyla* grows only during its two-year juvenile stages (Le Foll 1993). Therefore, age and body size are correlated only during the juvenile stage, and especially during the first year of life. A spider crab adult aged 4 years and more can be smaller than those of 2-3 or 3-4 years old, and even some juveniles of 1-2 years old (Le Foll 1993). In the Iroise Sea spider crab population, the study of the variations in carbon and nitrogen isotopic ratios in the muscle revealed an increase in the values with size, as well as with the age of the specimens. The $\delta^{13}C$ and $\delta^{15}N$ differences between the youngest (0-1 year old) and the oldest (4 and more years old) were respectively1.3‰ and 1.0‰, while the $\delta^{13}C$ and $\delta^{15}N$ enrichments between the smallest (CL = 50-70 mm) and the largest (CL > 170 mm) specimens were 2.6‰ and 1.5‰, respectively. These $\delta^{13}C$ and $\delta^{15}N$ values in the largest and oldest cohorts which are higher than in the smallest and youngest ones suggest a change in feeding habits. Different authors have suggested that a mean enrichment in $\delta^{13}C$ and $\delta^{15}N$ of about 0-1‰ and 3-4‰ respectively, from a prey to its consumer can be admitted (De Niro & Epstein 1978, 1981, Minagawa & Wada 1984, Peterson & Fry 1987, Post 2002). However, Yokoyama et al. (2005) argued that the fractionation is species- and tissue-specific and that the classical diet-tissue carbon isotopic fractionation is not applicable to all animals and/or ecological systems. In particular, they demonstrated that crustacean muscles have a larger ^{13}C fractionation than the currently accepted fractionation of 0-1‰. For example, ^{13}C fractionations for the callianassid shrimp and prawn muscles were estimated at 2.0-2.2‰ and 1.7‰, respectively (Parker et al. 1989; Yokoyama et al. 2005). Taken these enrichment values into consideration as valid references for the spider crab (2‰ and 3-4‰ for $\delta^{13}C$ and $\delta^{15}N$, respectively), ageing would not lead to any determining trophic shift (for both $\delta^{13}C$ and $\delta^{15}N$) in the Iroise Sea population. It could be deduced that the spider crab remains on one trophic level throughout its life. However, significant ^{13}C enrichment between the smallest and the largest specimens reveals a shift towards "benthic-component" prey (Hobson et al. 1995, Le Loc'h & Hily 2005). Finally, spider crab growth (in term of relative size and weight) seems to be a more important factor for feeding habit changes than ageing.

In literature, no differences with body size in spider crabs' diet were found by Hartnoll (1963) and De Kergariou (1974). On the contrary, during laboratory experiments, inclusion of Rhodophyceae in tanks used for juvenile *Maja brachydactyla* improved survival rates (Le Foll 1993), whereas adult spider crabs have been successfully maintained in aquariums using diets from which plant material was entirely absent (Brosnan 1981). Moreover, Bernárdez et

al. (2000) observed changes in gut contents between juvenile and adult specimens collected in summer in the Ría Arousa. They concluded that diet is slightly diversified for juvenile spider crabs probably due to the demand for certain nutrients required during the moulting period. The stable isotope results obtained in this study confirm those of these previous studies, considering that a diet mainly based on primary producers (macro-algae) will generate a lower mean $\delta^{15}N$ signature than a diet based on secondary producers (polychaetes, molluscs and echinoderms).

Moreover, $\delta^{15}N$ values in spider crab muscles from the Iroise Sea showed a slight decrease between the 1-2 year old and the 2-3 year old classes, followed by an increase up to the oldest age class. The sharpest drop occurred in the year of the pubertal moult, when juvenile spider crabs attain sexual maturity and then migrate to deep bottoms for the first time. In the Iroise Sea, the nursery area and coastal spawning zone of adult spider crabs are two distinct biotopes: the nursery is an infralittoral seagrass habitat in sandy sediment, while the adults are localised on kelp beds in rocky areas. This biotope change influences the isotopic signatures of the newly-moulted adults by a quantitative and qualitative change in available prey (primary and secondary producers).

Offshore, the biotopes in which the adult spider crab population from the Iroise Sea spends the autumn and winter periods are very different in terms of habitat and associated communities. Indeed, *Maja brachydactyla* have no macrophytes available for consumption and its diet is only based on invertebrates from various trophic levels of the coarse sand community present in this area (Raffin, 2003). The $\delta^{13}C$ and $\delta^{15}N$ seasonal differences in adult spider crab muscles between summer/coastal and winter/offshore periods were respectively 1.1‰ and 1.0‰. These significant increases from coastal to offshore bottoms during migration can be explained by diet changes induced by the differences between infralittoral communities and coastal communities. Bernárdez et al. (2000) also found a seasonal difference in the diet of *Maja brachydactyla* from Galicia (Spain), by studying gut contents. If the spider crab is really an opportunistic feeder, then the isotopic values will reflect the levels of the prey which are most accessible and predominant in the biotope. If migration involves one or more biotope changes, the available prey will change and will probably not show the same levels in terms of $\delta^{13}C$ and $\delta^{15}N$. Raffin (2003) identified four different communities over the whole area concerned by the spider crab migration in the Iroise Sea. In addition, differences in $\delta^{13}C$ and $\delta^{15}N$ among coastal and more open-water habitats may result from different C and N inputs and availabilities but also from various

physical processes (ocean currents, wind, tides) of these two marine ecosystems (Riera et al. 2000, Sherwood & Rose 2005).

Contrary to the Iroise Sea population, very slight variations in the carbon and nitrogen stable isotopic signatures were noted in the spider crabs from the Seine Bay. Only $\delta^{15}N$ was found to increase significantly with size. The $\delta^{15}N$ enrichment between the smallest (CL = 35-50 mm) and the largest (CL > 140 mm) specimens was 0.9‰, which corresponds to a slight trophic level increase and is lower than that of the spider crabs from the Iroise Sea. Moreover, all age classes presented similar isotopic ratios, except the youngest spider crabs which had slightly lower but significant $\delta^{15}N$ values compared to the others (difference of 0.85‰). Finally, no significant differences were observed for either carbon or nitrogen between the summer/coastal and the winter/offshore samples. This stability of isotopic values observed in the Seine Bay can be explained by the homogeneity of the habitat and associated communities over the entire area. Indeed, the authors who described the sediments and invertebrate communities of this zone (Gentil, 1976; Olivier and Retière, 1998), showed that the whole area (from inshore to offshore) is composed of gravels and heterogeneous coarse sediment associated with only one community. The only clear change in terms of sediment and community occurs in the very shallow waters where sediments are muddy fine sands, which only concern the first stages of juveniles. The results agree with this point since all age classes presented similar isotopic ratios, except for the youngest spider crabs, living exclusively in these shallow muddy sands, which had slightly lower but significant $\delta^{15}N$ values compared to the others. So the Seine Bay population appears on the whole as being very stable for carbon and nitrogen stable isotopic signatures.

Finally, the differences between the two populations should reveal the strong differences in the two geographic areas in terms of heterogeneity of the biotopes concerned by the benthic life cycle of the spider crabs. These differences between different populations can be masked if the demographic structure is not considered. Indeed, an overall comparison of the two series of samples, even if the statistics showed significant differences, gave much closer results both in term of carbon and nitrogen. Consequently it is strongly recommended to analyze size classes separately.

To our knowledge, very few studies have investigated the ontogenic variations in stable isotopic signatures in benthic decapod crustaceans. For example, Le Loc'h & Hily (2005) studied trends in the carbon and nitrogen isotope signatures with size in the Norway lobster (*Nephrops norvegicus*) and the squat lobster (*Munida sarsi*) from the Bay of Biscay (France).

These two omnivorous crustaceans, like *Maja brachydactyla*, change their diet as they grow. Moreover, Sherwood & Rose (2005) observed significant higher $\delta^{15}N$ values in the brown shrimp (*Pandalus borealis*) and the snow crab (*Chionoecetes opilio*) from offshore habitats (>200 km offshore) of the Newfoundland and Labrador continental shelf ecosystem. They also highlighted lower carbon isotope signatures in *Pandalus borealis* from near-shore areas (<2 km from shore). All these findings reveal that the stable isotope approach has proved successful in investigating trophic behaviour of omnivorous crustaceans, and especially for accurately assessing ontogenic variations in their feeding habits.

Acknowledgements

This work was partially funded by the Regional Council of Brittany. Moreover, we would like to thank fishermen who very kindly offered their help for taking crustacean samples. The authors are grateful to Audrey Morel and Charlie Scrimgeour for running samples and Pierre Bodenes for drawing the map.

References

Bernárdez C, Freire J, González-Gurriarán E (2000) Feeding of the spider crab *Maja squinado* in rocky subtidal areas of the Ría de Arousa (North-west Spain). J Mar Biol Ass UK 80:95-102

Brosnan DM (1981) Studies on the biology, ecology and fishery of the spider crab *Maia squinado* Herbst (1788) off the west coast of Ireland. MSc. Thesis, University College, Galway, Ireland

Carlisle DB (1957) On the hormonal inhibition of moulting in decapod Crustacea. II. The terminal anecdysis in crabs. J Mar Biol Ass UK 36:291-307

Dauby P, Khomsi A, Bouquegneau J-M (1998) Trophic relationships within intertidal communities of the Brittany coasts: a stable carbon isotope analysis. J Coast Res 14:1202-1212

De Kergariou G (1971) L'araignée de mer *Maia squinado* L. sur le littoral de Bretagne. Bull Inst Pêches Marit 205:11-19

De Kergariou G (1974) Régime alimentaire de *Maja squinado*. Int Counc Explor Sea Comm Meet 1974/K:36, 6 pp.

De Niro MJ, Epstein S (1978) Influence of diet on the distribution of carbon isotopes in animals. Geochim Cosmochim Acta 42:495-506

De Niro MJ, Epstein S (1981) Influence of diet on the distribution of nitrogen isotopes in animals. Geochim Cosmochim Acta 45:341-351

Dufour E, Gerdeaux D (2001) Apports des isotopes stables ($^{13}C/^{12}C$, $^{15}N/^{14}N$, $^{18}O/^{16}O$, $^{36}S/^{34}S$, $^{87}Sr/^{86}Sr$) aux études écologiques chez les poissons. Cybium 25:369-382

Gentil F (1976) Distribution des peuplements benthiques en Baie de Seine. Thèse de Doctorat, Université Paris VI, France

González-Gurriarán E, Fernández L, Freire J, Muiño R, Parapar J (1993) Reproduction of the spider crab *Maja squinado* (Brachyura: Majidae) in the southern Galician coast (NW Spain). Int Counc Explor Sea Comm Meet 1993/K:19, 15 pp.

González-Gurriarán E, Freire J, Parapar J, Sampedro MP, Urcera M (1995) Growth at moult and moulting seasonality of the spider crab, *Maja squinado* (Herbst) (Decapoda: Majidae) in experimental conditions: implications for juvenile life history. J Exp Mar Biol Ecol 189:183-203

Hartnoll RG (1963) The biology of Manx spider crabs. Proc Zool Soc Lond 141:423-496

Hesslein RH, Hallard KA, Ramlal P (1993) Replacement of sulfur, carbon and nitrogen in tissue of growing broad whitefish (*Coregonus nasus*) in response to a change in diet traced by $\delta^{34}S$, $\delta^{13}C$ and $\delta^{15}N$. Can J Fish Aquat Sci 50:2071-2076

Hobson KA, Ambrose W. G., Renaud PE (1995) Sources of primary production, benthic-pelagic coupling, and trophic relationships within the Northeast Water Polynya: insights from $\delta^{13}C$ and $\delta^{15}N$ analysis. Mar Ecol Prog Ser 128:1-10

Latrouite D, Le Foll D (1989) Données sur les migrations des crabes tourteau *Cancer pagurus* et araignées de mer *Maja squinado*. Oceanis 15:133-142

Le Foll D (1993) Biologie et exploitation de l'araignée de mer *Maja squinado* Herbst en Manche Ouest. Thèse de doctorat, Université de Bretagne Occidentale, Brest, France

Le Loc'h F, Hily C (2005) Stable carbon and nitrogen isotope analysis of *Nephrops norvegicus* / *Merluccius merluccius* fishing grounds in the Bay of Biscay (Northeast Atlantic). Can J Fish Aquat Sci 62:123-132

Michener RH, Schell DM (1994) Stable isotope tracers in marine aquatic food webs. In: Lajtha K, Michener, R.H. (eds) Stable isotopes in ecology and environmental science. Blackwell Scientific, London, p 138-157

Minagawa M, Wada E (1984) Stepwise enrichment of ^{15}N along food chains: Further evidence and the relation between $\delta^{15}N$ and animal age. Geochim Cosmochim Acta 48:1135-1140

Newell RIE, Marshall N, Sasekumar A, Chong VC (1995) Relative importance of benthic microalgae, phytoplankton, and mangroves as sources of nutrition of penaeid prawns and other coastal invertebrates from Malaysia. Mar Biol 123:595-606

Olive PJW, Pinnegar JK, Polunin NVC, Richards G, Welch R (2003) Isotope trophic-step fractionation: a dynamic equilibrium model. J Anim Ecol 72:608-617

Olivier F, Retière C (1998) The role of physical-biological coupling in the benthic boundary layer under megatidal conditions. The case of the dominant species of the *Albra albra* community of the eastern Bay of Seine (English Channel). Estuaries 21:571-584

Parker PL, Anderson RK, Lawrence A (1989) A $\delta^{13}C$ and $\delta^{15}N$ tracer study of nutrition in aquaculture: *Penaeus vannamei* in a pond growout system. In: Rundel PW, Ehleringer JR, Nagy KA (eds) Stable isotopes in ecological research. Springer-Verlag, New York, p 288-303

Peterson BJ, Fry B (1987) Stable isotopes in ecosystem studies. Annu Rev Ecol Syst 18:293-320

Pinnegar JK, Jennings S, O'Brien CM, Polunin NVC (2002) Long-term changes in the trophic level of the Celtic Sea fish community and fish market price distribution. J Appl Ecol 39:377-390

Post DM (2002) Using stable isotopes to estimate trophic position: models, methods, and assumptions. Ecology 83:703-718

Raffin C (2003) Bases biologiques et écologiques de la conservation du milieu marin en Mer d'Iroise. Thèse de Doctorat, Université de Bretagne Occidentale, Brest, France

Riera P, Montagna, P.A., Kalke, R.D., Richard, P. (2000) Utilization of estuarine organic matter during growth and migration by juvenile brown shrimp *Penaeus aztecus* in a South Texas estuary. Mar Ecol Prog Ser 199:205-216

Riera P, Stalb LJ, Nieuwenhuizeb J (2000) Heavy $\delta^{15}N$ in Intertidal Benthic Algae and Invertebrates in the Scheldt Estuary (The Netherlands): Effect of River Nitrogen Inputs. Estuar Coast Shelf Sci 51:365-372

Sampedro MP, González-Gurriarán E, Freire J, Muiño R (1999) Morphometry and sexual maturity in the spider crab *Maja squinado* (Decapoda, Majidae) in Galicia, Spain. J Crust Biol 19:578-592

Sherwood GD, Rose GA (2005) Stable isotope analysis of some representative fish and invertebrates of the Newfoundland and Labrador continental shelf food web. Estuar Coast Shelf Sci 63:537-549

Stevcic Z (1967) Le complexe de la nourriture de l'araignée de mer *Maja squinado*. Helgol Wiss Meeresunters 15:630-636

Stevcic Z (1968) Relations interspécifiques de l'araignée de mer. Rapp PV Réun, Comm Int Explor Sci Mer Méditerr Monaco 19:147-149

Stevcic Z (1977) Contribution à la connaissance de la reproduction de l'araignée de mer (*Maja squinado*). Rapp PV Réun, Comm Int Explor Sci Mer Méditerr, Monaco 24:177-178

Vander Zanden MJ, Cabana G, Rasmussen JB (1997) Comparing trophic position of freshwater fish calculated using stable isotope nitrogen ratios and literature dietary data. Can J Fish Aquat Sci 54:1142-1158

Yokoyama H, Tamaki A, Harada K, Shimoda K, Koyama K, Ishihi Y (2005) Variability of diet-tissue isotopic fractionation in estuarine macrobenthos. Mar Ecol Prog Ser 296:115-128

Table and figure list

Table 1. Mean $\delta^{13}C$ and $\delta^{15}N$ values (‰) and standard deviation of spider crab muscle tissue from the Seine Bay and the Iroise Sea. CL = carapace length (mm), W = total fresh weight (g).

Table 2. Results of two-way ANOVA on muscle stable isotopes data in spider crabs from the coastal waters. ns = not significant.

Table 3. Results of two-way ANOVA performed on muscle stable isotopes data in adult spider crabs. ns = not significant.

Fig. 1. Map of the two sampling areas: Iroise Sea and Seine Bay

Fig 2. Relationships between carapace length (CL) and spider crab muscle tissue from the Seine Bay (n=92) for $\delta^{13}C$ (A) and $\delta^{15}N$ (B) and from the Iroise Sea (n=131) for $\delta^{13}C$ (C) and $\delta^{15}N$ (D).

Fig. 3. Distribution of carbon and nitrogen stable isotope ratios (mean ± SE) among age groups of spider crabs from the Seine Bay (A) and the Iroise Sea (B), collected in coastal waters. △ = juvenile individuals of 0-1 years old (A: n 16= ; B: n = 28); ▲ = juvenile individuals of 1-2 years old (A: n = 24; B: n = 30); □ = adult individuals of 2-3 years old (A: n = 7; B: n = 8); ▩ = adult individuals of 3-4 years old (A: n = 19; B: n = 29); ■ = adult individuals of 4 years and more (A: n = 6; B: n = 11).

Fig. 4. Distribution of $\delta^{13}C$ and $\delta^{15}N$ in the muscle tissue of male and female adult spider crabs (3-4 years old) collected in deep and shallow waters from the Seine Bay (n = 30) and the Iroise Sea (n = 40).

Table 1. Mean $\delta^{13}C$ and $\delta^{15}N$ values (‰) and standard deviation of spider crabs muscle tissue from the Seine Bay and the Iroise Sea. CL = carapace length (in mm), W = total fresh weight (g).

Sampling area	Sex	Age	Shallow waters					Deep waters				
			n	CL (mm)	W (g)	$\delta^{13}C$ (‰)	$\delta^{15}N$ (‰)	n	CL (mm)	W (g)	$\delta^{13}C$ (‰)	$\delta^{15}N$ (‰)
Seine Bay	Male	0-1	8	55 ± 15	54 ± 43	-15.01 ± 0.48	12.3 ± 0.71					
		1-2	12	95 ± 8	251 ± 106	-15.25 ± 1.02	12.92 ± 0.47					
		2-3	4	126 ± 14	839 ± 312	-14.28 ± 1.15	13.04 ± 0.38					
		3-4	4	115 ± 7	515 ± 117	-14.8 ± 0.25	12.58 ± 0.45	4	111 ± 20	372 ± 299	-15.48 ± 0.48	12.76 ± 0.41
		4+	3	109 ± 9	409 ± 167	-15.27 ± 1.12	12.64 ± 1.28	5	119 ± 16	635 ± 257	-14.79 ± 1.29	13.11 ± 0.7
	Female	0-1	8	54 ± 11	50 ± 32	-15.03 ± 0.4	11.88 ± 0.47					
		1-2	12	101 ± 13	328 ± 104	-15.21 ± 0.78	12.92 ± 0.6					
		2-3	3	105 ± 21	326 ± 206	-15.4 ± 0.74	12.90 ± 0.52					
		3-4	15	114 ± 22	484 ± 375	-14.86 ± 0.41	13.04 ± 0.42	7	111 ± 8	442 ± 99	-15 ± 0.42	13.02 ± 0.34
		4+	3	121 ± 16	701 ± 325	-15.41 ± 0.64	13.12 ± 0.66	4	113 ± 6	445 ± 149	-14.77 ± 0.1	13.18 ± 0.51
Iroise Sea	Male	0-1	14	69 ± 8	109 ± 29	-17.47 ± 1.14	12.04 ± 0.48					
		1-2	15	102 ± 12	272 ± 132	-16.38 ± 0.99	12.63 ± 0.38					
		2-3	4	112 ± 10	483 ± 37	-16.81 ± 0.5	12.23 ± 0.53					
		3-4	7	118 ± 17	541 ± 287	-16.52 ± 0.76	12.47 ± 0.41	8	170 ± 17	1610 ± 367	-15.09 ± 0.33	13.27 ± 0.29
		4+	5	147 ± 14	1099 ± 381	-15.55 ± 0.68	13.29 ± 0.36	6	164 ± 19	1551 ± 509	-15.2 ± 0.61	13.11 ± 0.75
	Female	0-1	14	70 ± 8	104 ± 26	-17.07 ± 0.83	12.22 ± 0.6					
		1-2	15	99 ± 11	247 ± 80	-16.58 ± 0.68	12.4 ± 0.38					
		2-3	4	115 ± 9	485 ± 132	-16.23 ± 0.48	12.53 ± 0.71					
		3-4	22	123 ± 12	580 ± 160	-16.1 ± 0.76	12.37 ± 0.62	7	140 ± 10	806 ± 96	-15.68 ± 0.58	12.53 ± 0.46
		4+	6	124 ± 11	627 ± 191	-16.21 ± 0.43	13.03 ± 0.46	4	138 ± 6	833 ± 107	-15.71 ± 0.4	13.81 ± 0.26

Table 2. Results of two-way ANOVA on muscle stable isotopes data in spider crabs from the coastal waters. ns = not significant.

Sampling area	Effects	*df*	$\delta^{15}N$		$\delta^{13}C$	
			F	*p-value*	*F*	*p-value*
Seine Bay	Sex	1	0.15	ns	1.19	ns
	Age	4	7.95	<0.0001	0.58	ns
	Sex × Age	4	1.30	ns	1.08	ns
Iroise Sea	Sex	1	0.01	ns	0.02	ns
	Age	4	14.16	<0.0001	15.46	<0.0001
	Sex × Age	4	2.39	ns	1.46	ns

Table 3. Results of two-way ANOVA performed on muscle stable isotopes data in adult spider crabs. ns = not significant.

Sampling area	Effects	*df*	$\delta^{15}N$		$\delta^{13}C$	
			F	*p-value*	*F*	*p-value*
Seine Bay	Sex	1	2.62	ns	0.1	ns
	Age	1	0.66	ns	0.01	ns
	Migration	1	0.78	ns	0.1	ns
	Sex × Age	1	0.05	ns	0.34	ns
	Migration × Sex	1	0.58	ns	0.57	ns
	Migration × Age	1	0.23	ns	4.46	<0.05
	Migration × Sex ×Age	1	0.07	ns	0.17	ns
Iroise Sea	Sex	1	0.48	ns	3.40	ns
	Age	1	19.27	<0.0001	0.98	ns
	Migration	1	6.93	<0.05	14.01	<0.0001
	Sex × Age	1	4.71	<0.05	1.86	ns
	Migration × Sex	1	0.30	ns	1.39	ns
	Migration × Age	1	0.38	ns	1.89	ns
	Migration × Sex ×Age	1	7.21	<0.01	2.56	ns

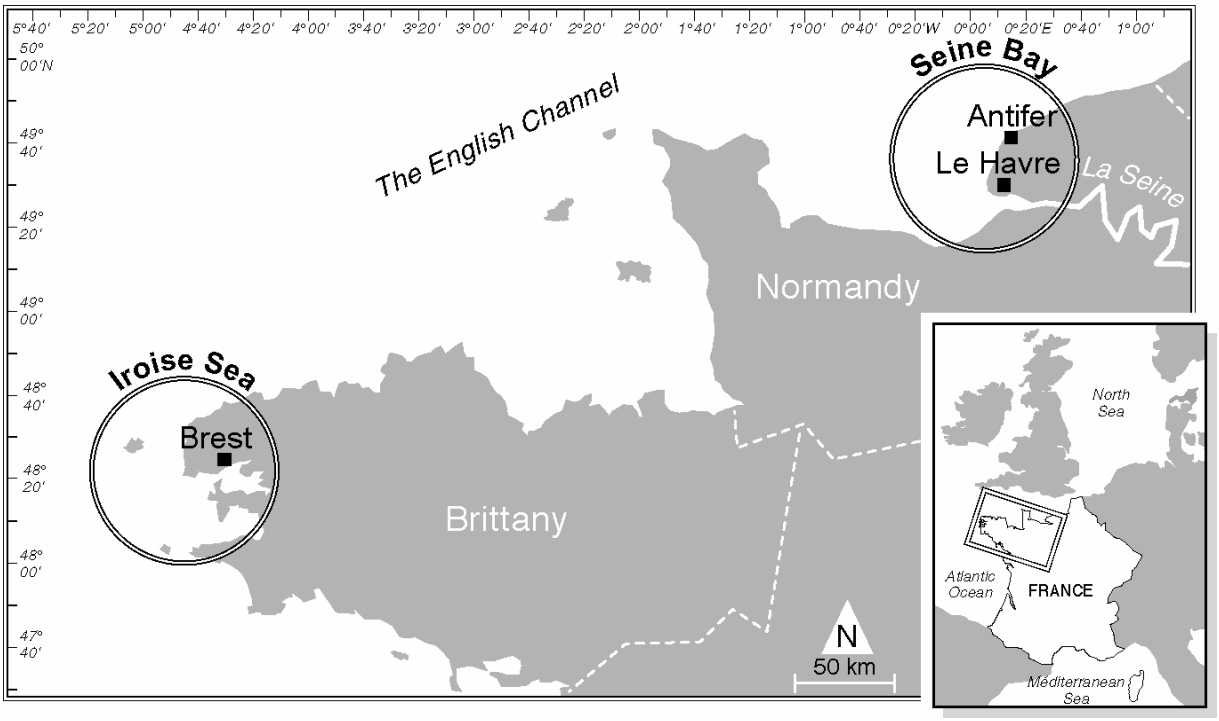

Fig. 1. Map of the two sampling areas: Iroise Sea and Seine Bay

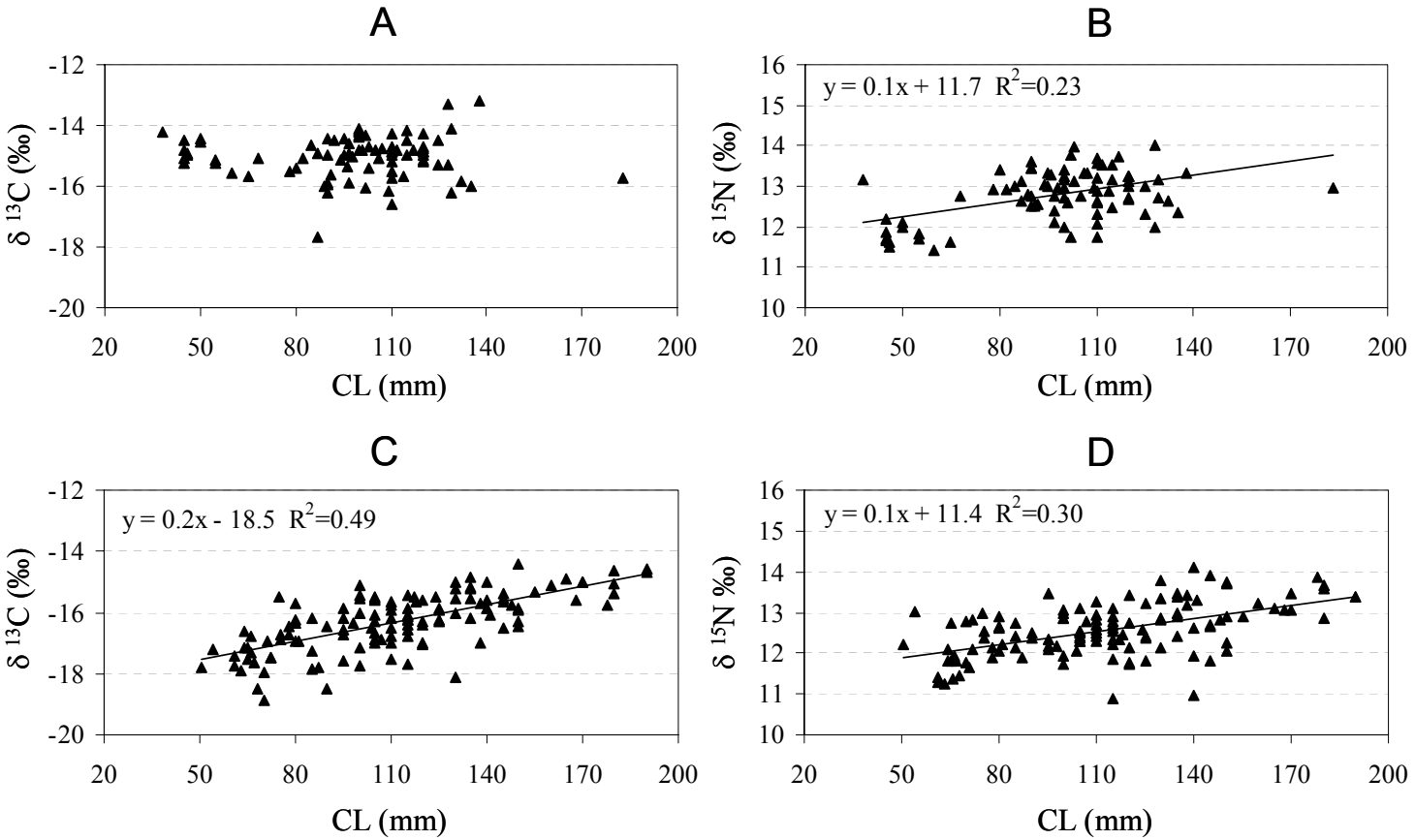

Fig 2. Relationships between carapace length (CL) and spider crab muscle tissue from the Seine Bay (n=92) for $\delta^{13}C$ (A) and $\delta^{15}N$ (B) and from the Iroise Sea (n=131) for $\delta^{13}C$ (C) and $\delta^{15}N$ (D).

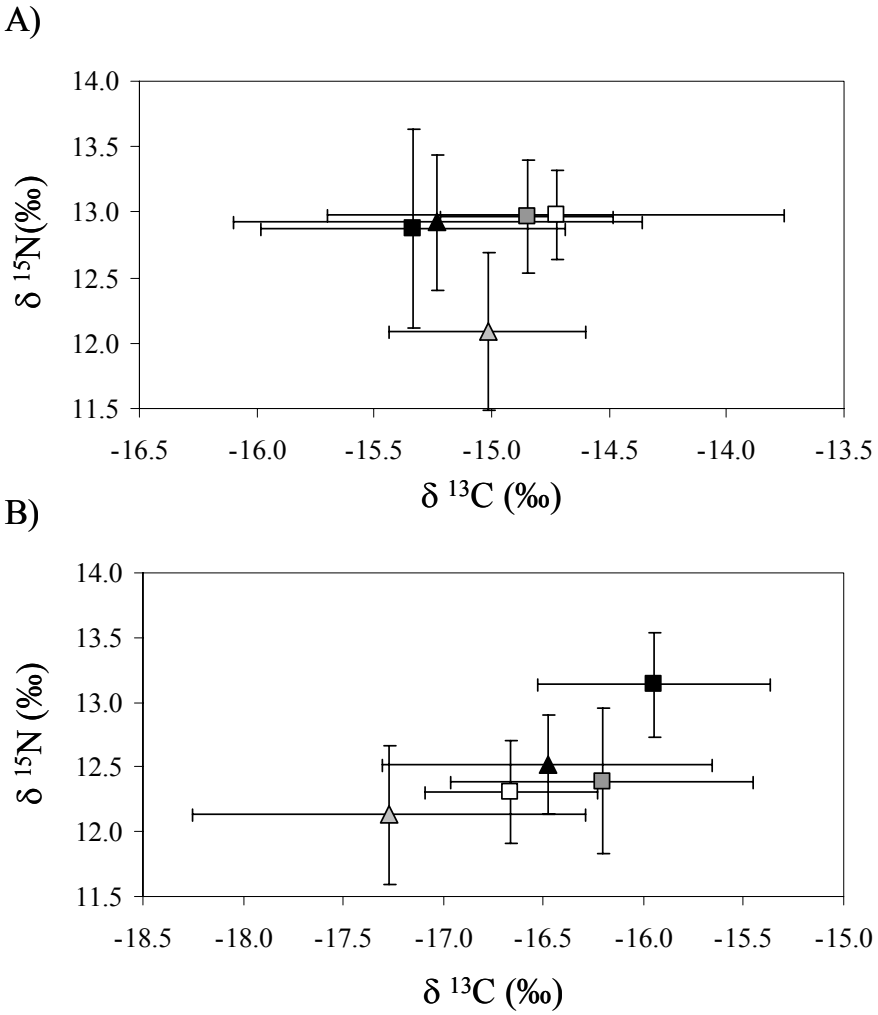

Fig. 3. Distribution of carbon and nitrogen stable isotope ratios (mean ± SE) among age groups of spider crabs from the Seine Bay (A) and the Iroise Sea (B), collected in coastal waters. △ = juvenile individuals of 0-1 years old (A: n = 16; B: n = 28); ▲ = juvenile individuals of 1-2 years old (A: n = 24; B: n = 30); □ = adult individuals of 2-3 years old (A: n = 7; B: n = 8); ▩ = adult individuals of 3-4 years old (A: n = 19; B: n = 29); ■ = adult individuals of 4 years and more (A: n = 6; B: n = 11).

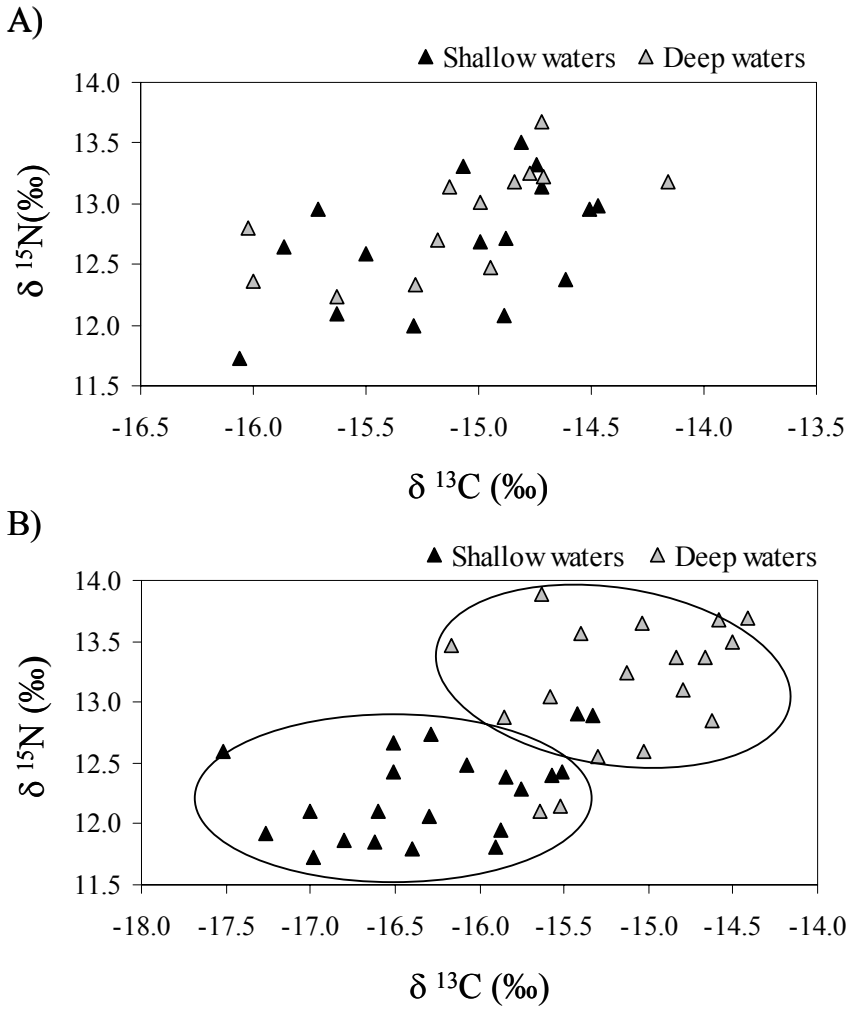

Fig. 4. Distribution of $\delta^{13}C$ and $\delta^{15}N$ in the muscle tissue of male and female adult spider crabs (3-4 years old) collected in deep and shallow waters from the Seine Bay (n = 30) and the Iroise Sea (n = 40).

ARTICLE 5

PCB contamination of the spider crab *Maja brachydactyla*: influence of physiological and ecological processes

Nathalie Bodin [†‡*], Xavier Caisey [†], Alain Abarnou [†], Véronique Loizeau [†], Daniel Latrouite [§], Anne-Marie Le Guellec [†], Monique Guillou [‖]

[†] IFREMER, Département de Biogéochimie et Ecotoxicologie, Technopôle Brest-Iroise, Pointe du Diable, 29280 Plouzané, France

[‡] LPTC, Université de Bordeaux 1, CNRS, 351 Cours de la Libération, 33400 Talence, France

[§] IFREMER, Département Sciences et Technologies Halieutiques, Technopôle Brest-Iroise, Pointe du Diable, 29280 Plouzané, France

[‖] LEMAR UMR 6539 CNRS, Institut Universitaire Européen de la Mer, Université de Bretagne Occidentale, Place Copernic, 29 280 Plouzané, France.

[*] Corresponding author. Email: n.bodin@lptc.u-bordeaux1.fr

Soumis à Environmental Toxicology and Chemistry (Sept 2005)

Abstract— *Maja brachydactyla* is a decapod crustacean widely distributed along the Northeast Atlantic coasts. The main objective of this study was to establish the influence of ontogenic factors like growth, ageing, seasonal migrations and reproduction on the PCB contamination of this species. Two populations were studied: one in the Seine Bay (Eastern English Channel) exposed to highly contaminated discharges from the Seine River, and the other one in the Iroise Sea (Western Brittany) which is not very contaminated by such man-made compounds. In both sampling areas, PCB analysis revealed concentrations in the hepatopancreas which were respectively 10- and 50-fold higher than in gonads and muscle. CB153 levels increased with the age of the spider crabs, whereas their seasonal migrations had no direct effect. No significant sex effect was observed for CB153 levels, but adult females exhibited PCB fingerprint differences from those of males, most likely due to the influence of the reproduction cycle on enzymatic system activity. Finally, spawning gave rise to a higher CB153 decontamination of female body burdens for specimens from the Iroise Sea than those from the Seine Bay.

Keywords— Crustacean, Polychlorinated biphenyls, cytochrome P450, reproduction.

1. Introduction

Polychlorinated biphenyls (PCBs) are a group of synthetic organochlorinated compounds, which have been produced as commercial technical mixtures since the 1920s. They have been used in a wide range of applications, such as coatings, inks, flame retardants and paint, but their major applications were in electric appliances, heat transfer systems and hydraulic fluids. PCB applications in the open were banned in many countries in the 1970s [1], and their use in closed systems (such as capacitors and transformers) has been limited since the 1990s. However, their high lipophilicity and environmental stability make them persist in the environment for long periods, becoming geographically widespread and bioaccumulating in the fatty tissues of living organisms through the food web, especially in aquatic ecosystems [2-4]. Moreover, PCBs elicit a variety of short and long term toxic responses in organisms, including humans [5-7]. Dietary intake, especially the consumption of seafood, is considered as one of the most important sources of PCB exposure for human populations [8, 9].

The decapod crustacean *Maja brachydactyla* is commonly distributed along the Northeast Atlantic coasts, from North Africa to the North Sea, and from the low tide level down to 90m [10, 11]. *Maja brachydactyla* has a life cycle of 5 to 8 years. Its growth consists of a planktonic larval period [12] followed by a benthic juvenile phase [10, 13-15]. Juveniles inhabit shallow rocky and sandy areas (<15m) during two years, where they moult several times. Over this period, they show marked masking behavior, mainly using algae, and they can hide under sediment [10, 16]. The end of the juvenile stage is marked by a terminal moult, at which time sexual maturity is achieved, and obvious morphometric changes occur. Then, postpubertal adults undertake an autumn/winter migration from coastal nursery areas to offshore sites (depths of 40-120 m) [17, 18]. Mating occurs in winter in deep waters and adult spider crabs come back to shallow waters (<20m) the following spring, where the females will spawn [10, 17, 19, 20]. Females keep eggs under their abdomen for incubation during 6 to 8 weeks and larvae are released in summer to autumn in shallow waters [21, 22].

Previous studies have already pointed out the presence of contaminants, especially PCBs, in spider crabs from the Brittany and Normandy coasts (France) [23, 24]. So the objective of this study was to understand the relationships between ontogenic factors and the PCB contamination in spider crab. In particular, we studied the effects of growth, ageing, reproduction, and seasonal migrations on both PCB contamination levels and profiles. CB153 (2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl) was chosen to study the

variations in PCB contamination levels, since it is one of the most recalcitrant chlorobiphenyl congeners with respect to biotransformation and it shows the highest concentration in the spider crab tissues [23, 24]. As regards PCB fingerprints, the concentrations of individual congeners were normalized to the sum of the sixteen analyzed PCBs.

2. Experimental section

2.1. Sampling strategy

Two spider crab populations were sampled in 2003-2004: one from the Iroise Sea and the other from the Seine Bay (Fig 1). The Iroise Sea is located in Western Brittany, an important area for spider crab production. Juveniles were collected on sandy bottoms from the Bertheaume Bay nursery, at a depth of 5-10 meters. The coastal waters of Bertheaume Bay can be exposed to exchanges with water flowing out of the Bay of Brest, since Brest's urban area, with about 250,000 inhabitants, is has important naval base, shipyards and diverse industrial activities. In summer, adult spider crabs came from Corbin Rock, at depth of 10-15 m. During winter, adult specimens were captured by professional fishermen on rocky bottoms in deep water of around 60-80 meters, approximately 15 nautical miles from coasts.

The Seine Bay is located in the Eastern English Channel and is highly exposed to large contaminant discharges from the Seine River. The Seine watershed covers about 78,600 km^2, and holds 30% of the French population [25]. Moreover, 40% of French industrial activity is located in this catchment area, where agricultural activities are also important [26]. Juvenile and adult spider crabs were collected in summer near the Antifer oil terminal at depths of about 5-10 m. In winter, professional fishermen caught adult specimens at about 10 nautical miles from shore, at depths from 30-40 m. In both shallow and deep waters, spider crabs were found on sandy and rocky bottoms.

2.2. Sample preparation

Preliminary sample pre-processing steps were performed as soon as possible after the crustaceans were received. They included determining the gender, measuring the length of the carapace (CL = distance between the point where the frontal spines of the rostrum join and the posterior edge of the carapace) and total body weight. The age class was also determined by visual examination of the wear of the rostrum and the leg claws, as well as the carapace length and covering by epibionts [10]. Five cohorts were

distinguished: 0-1 year old (juvenile specimens with CL<80mm), 1-2 years old (juvenile specimens with CL>80mm), 2-3 years old (adults just after the pubertal moult), 3-4 years old and 4 + years old. For female adult spider crabs, berried individuals were recorded. Then, each specimen was dissected to obtain muscle and hepatopancreas tissues, as well as gonads and eggs for female adult specimens.

All sample tissues were kept at –20°C until they were freeze dried and further ground to obtain a fine homogeneous powder. Their water content was estimated from the weight loss during freeze drying.

2.3. Chemical analysis

PCB analysis was carried out following the protocol described by Bodin et al. [23]. In brief, the sample was extracted in a hot Soxhlet extraction apparatus (Soxtec) for three hours using a hexane:acetone mixture (45:10). The amount of extracted fat was determined by a gravimetric method. Then, two successive cleanings were performed on the extractible material. First, lipids and co-extractible material were destroyed by adding concentrated sulphuric acid. Secondly, the cleaned extract was purified by adsorption chromatography on a Florisil column eluted with pentane. Finally, PCB congeners were analyzed by gas chromatography with an electron capture detector, on a HP 5890 series II equipped with a CP-Sil19 capillary column.

2.4. Statistical processing

The morphometric data follow a normal distribution according to the Shapiro-Wilk test ($p<0.05$). PCB concentration data were non-normally distributed and log-transformed before statistical analysis. First, a Student test was used to compare the actual differences in mean body size and weight between the spider crabs from the Iroise Sea and the Seine Bay. Then, data on body weight, carapace length, and PCB concentrations were subjected to correlation analysis using Pearson's coefficient. Additionally, the influence of age, sex, migration and reproduction on PCB levels and profiles in spider crabs from each sampling area were studying using Student tests. Statistical analyses were performed using Statistica Software 6.0.

3. Results and discussion

3.1. Morphometrics

A total of 112 and 194 spider crabs respectively from the Seine Bay and the Iroise Sea

were analyzed during this study. Their biological characteristics are given in Table 1. Significant relationships between body size (CL, mm) and weight (W, g) were found both for the Iroise Sea ($CL = 0.0003 \times W^{2.9731}$; Pearson coefficient $r = 0.99$, $p<0.001$; data not shown) and the Seine Bay populations ($CL = 0.00007 \times W^{3.3109}$; Pearson coefficient $r = 0.99$, $p<0.001$; data not shown). These relations suggested that the spider crab growth rate is different for the two populations. Moreover, both body size and weight were significantly higher in male and female adults (3-4 and 4+ years old) from the Iroise Sea compared to those from the Seine Bay (Student test, $p<0.05$). As regards Fulton's condition index, which corresponds to the relation between the body weight and the cubic body size of an organism, spider crabs from the Iroise Sea presented a better physiological state than those from the Seine Bay (data not shown).

3.2. CB153 contamination: inter-site and inter-organ comparison

CB153 levels were determined in the different tissues of *Maja brachydactyla* collected in the Iroise Sea and the Seine Bay (Table 2). Specimens from the Iroise Sea presented CB153 concentrations approximately 6-fold higher than those from the Seine Bay, which coincides with previous works [23, 24]. At both sampling areas, the highest CB153 levels were recorded in the hepatopancreas, followed by the gonads, muscle, heart and gills. In particular, the hepatopancreas was respectively about 16 and 50 times more contaminated than the gonads and muscle, at both stations. The concentrations in each tissue vary according to their lipid content. Similar observations have often been made when examining the distribution of persistent hydrophobic compounds in biota. In view of these results, the spider crab hepatopancreas was chosen as the target tissue in order to appraise the possible influence of ontogenic factors on PCB contamination.

3.3. Body size-, age-, and sex-dependent PCB accumulation

Significant positive relationships between body size and CB153 concentrations in the hepatopancreas were observed in spider crabs from the Iroise Sea (Pearson coefficient $r = 0.33$, $p<0.001$) and the Seine Bay (Pearson coefficient $r = 0.47$, $p<0.001$), with all cohorts taken into account (Figure 2). But better correlation coefficients were obtained when only juvenile specimens were considered (Iroise Sea: $r = 0.74$; Seine Bay: $r = 0.86$). Like other majids but contrary to the majority of decapod crustaceans, *Maja brachydactyla* grows only during its juvenile stage, until its terminal moult [10]. Therefore, age and body size are only correlated during the juvenile stages, and

especially during the first year [10]. This growth particularity explained the more significant relationship between PCB concentrations and body size observed for juveniles and suggested that age is probably a more important factor than body size governing PCB accumulation in this species.

CB153 concentrations were found to be significantly related to age (Figure 3). CB153 levels in the hepatopancreas of 0-1 year old spider crabs (Iroise Sea: 62 ± 25 $ng.g^{-1}$d.w.; Seine Bay: 266 ± 94 $ng.g^{-1}$d.w.) were approximately 4- to 5-fold lower than those measured in the oldest ones aged over 4 years old (Iroise Sea: 228 ± 59 $ng.g^{-1}$d.w.; Seine Bay: 1361 ± 344 $ng.g^{-1}$d.w.). Sex had no significant effect on CB153 concentrations whatever the age of the spider crabs or the sampled population (Student test, $p>0.05$). Age is an important parameter that is often related to POP concentrations in marine fishes [27-32] and mammals [33-36]. Due to their bioaccumulative nature and their slow depuration rates, the PCB concentrations in spider crabs tend to increase with age, revealing how long the individuals have been exposed to PCBs in their environment. To our knowledge, no similar approach has yet been carried out on decapod crustaceans.

However, in both populations, a decrease in CB153 levels was observed between individuals aged 1-2 years and those 2-3 years old, followed by an increase as they grew older (Figure 3). The decrease took place in the year of the pubertal moult, when juvenile spider crabs attain their sexual maturity. The lower CB153 levels measured in individuals 2-3 years old probably results from their change in behavior. Whereas juveniles had spent 2 years in their coastal nursery, often buried in the sediment, the newly-moulted adults were collected after their first autumn/winter migration to deeper waters. The lower CB153 concentrations in spider crabs aged 2-3 years could reflect either a difference in their diet or lower contamination of the spider crab's potential prey in adult habitats, or both. Differences between the Iroise Sea and the Seine Bay populations were noted, however. The CB153 concentrations in 2-3 year old spider crabs from the Iroise Sea were two-fold lower than those measured in individuals aged 1-2 years (Student test, $p<0.05$), whereas this decrease was not statistically significant in the Seine Bay population (Student test, $p>0.05$). In the latter area, juvenile and adult spider crabs live in the same coastal area in summer, whereas the nursery (Bertheaume Bay) and spawning zones (Corbin Rock) are quite distinct in the Iroise Sea. Bodin et al. [37] suggested differences in diet composition by analyzing the carbon isotopic

signatures for the 1-2 and 2-3 year age classes, for the Iroise Sea population alone. Moreover, the entire Seine Bay is exposed to contaminant inputs from the Seine River [38, 39]. The addition of all these points can explain the lower influence of changes in spider crab behavior after reaching sexual maturity on the PCB contamination levels for the population in the Seine Bay, compared to that of the Iroise Sea. Age appears to be an important factor for PCB accumulation in the spider crab which reflects the exposure time, but also may help to predict reproductive maturity, feeding and migration behaviors associated with different life phases.

PCB patterns were studied with respect to both the age and sex of spider crabs collected in shallow waters (Figure 4). The various analyzed congeners were grouped on the basis of the presence or absence of vicinal H-atoms [41]: group I (CB153, 180, 187, 194), group II (CB52, 101, 149), group III (CB105, 118, 128, 138, 156, 170), group IV (CB110, 132). At both sampling areas, similar overall fingerprints were observed in all specimens. The major compounds were those lacking *meta-para* (m,p) as well as *ortho-meta* (o,m) vicinal H-atoms (group I) corresponding to non-metabolizable congeners, followed by those with only o,m vicinal H-atoms (group III). Group I and III represented together more than 90% of the $\sum_{16}$PCBs. This corresponds to a "typical crustacean PCB pattern" [23, 41-43]. Crustaceans are known to possess strong metabolic capacities, especially for congeners with only m,p vicinal H-atoms due to the presence of the CYP2B (Phenobarbital-type enzymes) [41, 44-47]. As regards male specimens, similar PCB patterns were observed whatever the age, in both sampling areas. However, an exception was noted for the youngest individuals from the Seine Bay, where congeners of groups I and III respectively represented 42% and 47% of the $\sum_{16}$PCBs in the hepatopancreas, whereas they were 58% and 36% in 1-2 year old spider crabs (Student test, $p<0.05$). In the Seine Bay population, 0-1 year old juveniles were significantly smaller than the older ones (body weight = 86 ± 54 g and 296 ± 112 g, respectively). Differences in PCB fingerprints are probably due to diet changes during the spider crab's growth, as observed by Bodin *et al.* [37]. This result was not observed in the Iroise Sea population because of the slighter body weight difference between the two age classes (body weight of 0-1 year old = 106 ± 7 g; body weight of 1-2 year old crabs = 110 ± 25 g).

In the adult spider crabs, females showed different PCB fingerprints from the male individuals (Student test, $p<0.05$) (Figure 4). In both sampling areas, group III

represented only 20-25% of the $\sum_{16}$PCBs in adult females compared to over 35% in males. This PCB group corresponds to congeners which could be biotransformed by the 3-methylcholanthrene-induced metabolism functions with the CYP1A subfamily of cytochrome P450 enzymes. Such differences could reflect differences in diet between adult female and male spider crabs. However, neither Bernárdez et al. (2000) [48] nor Bodin et al. [37] revealed sex differences in the spider crab's diet by studying variations in gut contents and stable isotope ratios (respectively $\delta^{13}C$ and $\delta^{15}N$). Another hypothesis is the influence of the reproductive cycle on cytochrome P450 activity and, consequently, on the occurrence of PCB congeners. Located in the mitochondria and endoplasmic reticulum, the enzymes of the cytochrome P450 superfamily are involved in critical physiological processes, including the biosynthesis and metabolism of steroids, fatty acids and prostaglandins [65]. The response of the cytochrome P450 has been shown to be influenced by various factors including organism gender, and reproductive status in both marine vertebrates [49, 50] and invertebrates [51-54]. In particular, an increase in P450 levels was recorded in female tissues in *Coscinasterias muricata* [54] and *Oncorhynchus nerka* [50] before spawning occurred. Georgiades et al. [54] suggested that this phenomenon could result from increased steroid metabolism associated with gametogenesis during this period. Differences in PCB patterns, in this study, were observed in adult females collected in shallow waters in summer, the period during which they reached gonad maturity before spawning. On the contrary, no differences in PCB fingerprints were noticed between male and female spider crabs in deep water in winter (data not shown). Decapod crustaceans are known to possess strong metabolic capacities, especially due to the presence of CYP2B. However, even though this enzymatic system was not reported to be active in crustacean tissues, these species also possess CYP1A [41, 44, 45]. The increase in steroid metabolism may influence CYP1A activity in female spider crabs during the reproduction cycle, acting at the same time on the biotransformation of some PCB congeners.

3.4. Influence of seasonal migrations on PCB contamination

In order to be freed from any reproductive effect, the influence of seasonal migrations on the PCB accumulation was studied only on adult male specimens (3-4 and 4+ years old). The variability of CB153 concentrations in spider crab hepatopancreas, defined by the coefficient of variation (CV = ratio between the standard deviation and the mean), was monitored over two years in both sampling areas (Figure 5). The highest variation

coefficients of CB153 levels (expressed in $ng.g^{-1}d.w.$; Figure 5A) were observed in summer and spring when spider crabs live in coastal waters, whereas the lowest variability of crustacean contamination was seen in their deeper winter habitats. The observation of this phenomenon in 2003 and in 2004 at both sites, suggested that it is probably periodic. The higher coefficients of variation in coastal waters compared to deep areas, which correspond to more variable CB153 concentrations in the hepatopancreas of adult male spider crabs, may reflect a larger choice of potential prey for this crustacean. Moreover, specimens from the Iroise Sea exhibited higher coefficients of variation in spring and summer (CV = 60 to 80%) than those from the Seine Bay (CV = 45 to 60%). Due to its topologic characteristics, the Seine Bay offers less benthic habitat diversity than the Iroise Sea [55, 56] leading to less faunal and floral diversity. In addition, as previously reported, the whole Seine Bay is exposed to large scale inputs from the Seine River. All these considerations suggest a lesser influence of the seasonal migrations on the diet composition of the spider crab [37], and consequently on the PCB contamination levels measured in their hepatopancreas.

Because the fat content in organisms fluctuates seasonally due to biological conditions of marine organisms [57, 58], CB153 concentrations in spider crabs hepatopancreas were lipid-normalized in order to reduce this possible source of variability [59]. In both sampling areas, coefficients of variation of CB153 contamination were relatively constant during the two years (CV = 52 ± 10% in the Iroise Sea and 40 ± 2% in the Seine Bay) (Figure 4B). These results suggest that the biological conditions of spider crabs fluctuate according to the season and their habitat, whether coastal or offshore. Therefore, the seasonal migrations of this species do not seem to directly influence PCB contamination levels. The higher variability of PCB concentrations observed in specimens from coastal habitats results from a lower variability of their biological conditions, contrary to those from the wintering offshore areas.

For the migration effect on PCB fingerprints (Table 3), a significant difference was observed only for the Iroise Sea population (Student test, $p<0.05$). In particular, congeners with only m,p vicinal H-atoms (group II: CB52, 101 and 149), and those with both m,p and o,m vicinal H-atoms (group IV: CB110 and 132) were present in higher proportions in specimens collected in deep waters compared to those from the coastal spawning area. Our recent data on the stable isotope variations in *Maja brachydactyla* [37] suggested an effect of this habitat change on diet for the Iroise Sea population, due

to differences in environmental conditions, typological characteristics and associated faunal species between their deeper habitat (60-80 m depth) and their coastal spawning site (10-15 m depth). The differences in PCB fingerprints in the spider crab hepatopancreas could be a consequence of a change in diet quality related to the seasonal migrations of this species. Moreover, the response of enzymatic systems like the cytochrome P450 has been shown to be influenced by environmental factors such as season and temperature [49, 51-53]. The higher proportions, in winter, of the congeners of groups II and IV, metabolized by the CYP2B in decapod crustaceans, could result from a weaker metabolic activity of this enzymatic system due to lower temperatures in this period.

3.5. Effect of spawning on female and egg PCB contamination

For all spider crabs, mating occurs in the wintering habitats, and then females come back to shallow waters in spring for spawning. They keep eggs under their abdomen for incubation during 7-8 weeks. The reproductive process has been reported to decrease the body burden of persistent contaminants in various animals. In aquatic mammals, whereas PCB concentrations positively increased with age in males, they were negatively correlated in females because of elimination of contaminants to their pups during the reproductive process [60]. The elimination of pollutants through spawning also occurs in fish [29; 59; 61], mollusks [62], and copepods [63]. To estimate the amounts of PCBs excreted, female spider crabs were dissected and eggs were separated for analysis. PCB burdens of eggs and whole body spider crabs are shown in table 4. They were 1.9 ± 0.8 and 5.9±3.9 µg in the whole body and 0.2 ± 0.1 and 0.7±0.2 µg in eggs for specimens of 3-4 and 4+ years old from the Iroise Sea, respectively. As regards the Seine Bay population, burdens of PCBs were 21 ± 11 and 32 ± 17 µg in the whole body, and 0.9±0.7 and 1.5±1.2 µg in eggs for specimens of 3-4 and 4+ years old, respectively. These results suggest that the PCB transfer rate from mother to eggs is approximately 12% of female body burdens in spider crabs from the Iroise Sea, whereas for specimens from the Seine Bay, it is only 5%, more than 2-fold lower. Because the spider crabs from the Seine Bay are more subject to high PCB pollution, a hypothesis of a faster recontamination of females after spawning can be put forward. In addition, *Maja brachydactyla* from the Iroise Sea spawns twice in a single spawning season [10], suggesting that the transfer rate of 12% could result from an additional elimination from

each spawning cycle. Oppositely, specimens from the Seine Bay spawn only one time each year, leading to a smaller decrease in contaminants of the spider crab body burden. However, since it is not possible to assert that the sampled female spider crabs from the Iroise Sea had already made their two spawning cycles, the transfer rate of 12% from mother to eggs may be an underestimation. Besides, it is assumed that the transfer rate of contaminants may be different from species and from individuals, which depends on their growth of germinal tissue, number of eggs, spawning, lipid content, and the compositions of reproductive tissues.

4. Conclusion

The two sampling areas represented very opposing situations in terms of PCB contamination of spider crabs, the Seine Bay being the most contaminated site. This study also revealed the influence of both physiological and ecological processes on PCB contamination levels and profiles. The major factors acting on spider crab PCB concentrations were organotropism and ageing. Reproduction, through spawning, led to a slight decontamination of adult female spider crabs, contrary to what happens for fish and, above all, marine mammals. Finally, the winter migrations of *Maja brachydactyla* to deep waters, which are less exposed to contaminant discharges, had no effect on PCB contamination levels. As regards contaminant fingerprints, they were greatly influenced by the sex of the individuals, and especially by the reproduction cycle of female spider crabs, whereas both age and migratory behavior had very few effects. All these results highlighted the need to delineate the sampling variables and reporting them in any chemical contamination study.

Differences in ecological performances between spider crab population from the Iroise Sea and that of the Seine Bay were also highlighted. First, morphometric data suggested that specimens from the Iroise Sea had a higher condition index than those from the Seine Bay, suggesting a better growth strategy. Secondly, a higher reproductive power for this species was reported in the Iroise Sea. Because homogeneous temperatures and large availability of food were reported in the two areas studied, these lower ecological performances of spider crabs from the Seine Bay are probably related to the poor quality of this environment, and especially to organic chemical contamination. Gilliers et al. [64] reported similar observations for juvenile soles (*Solea vulgaris*) from the Eastern English Channel and the Bay of Biscay.

Acknowledgements

This work was partially funded by the Regional Council of Brittany. We would like to thank the fishermen who very kindly offered their help for taking crustacean samples.

References

1. United Nations Environmental Programme Chemicals. 2003. Stockholm Convention on the Reduction and/or Elimination of the Releases of Persistent Organic Pollutants. Geneva, Switzerland.
2. Borgå K, Gabrielsen GW, Skaare JU. 2001. Biomagnification of organochlorines along a Barents Sea food chain. *Environ Pollut* 113:187-198.
3. Fisk AT, Hobson KA, Norstrom RJ. 2001. Influence of chemical and biological factors on trophic transfer of persistent organic pollutants in the Northwater Polynya marine food web. *Environ Sci Technol 35*:732-738.
4. Hoekstra PF, O'Hara TM, Fisk AT, Borgå K, Solomon KR, Muir DCG. 2003. Trophic transfer of persistent organochlorine contaminants (OCs) within an Arctic marine food web from the southern Beaufort-Chukchi Seas. *Environ Pollut* 124:509-522.
5. Fonds M, Casal E, Schweizer D, Boon JP, Van der Veer HW. 1995. Effects of PCB contamination on the reproduction of the dab *Limanda limanda* L. under laboratory conditions. *Neth J Sea Res* 34:71-79.
6. Aoki Y. 2001. Polychlorinated Biphenyls, Polychlorinated Dibenzo-*p*-dioxins, and Polychlorinated Dibenzofurans as Endocrine Disrupters--What We Have Learned from Yusho Disease. *Environ Res* 86:2-11.
7. Ross G. 2004. The public health implications of polychlorinated biphenyls (PCBs) in the environment. *Ecotoxicol Environ Saf* 59:275-291.
8. Johansen HR, Alexander J, Rossland OJ, Planting S, Lovik M, Gaarder PI, Gdynia W, Bjerve KS, Becher G. 1996. PCDDs, PCDFs, and PCBs in human blood in relation to consumption of crabs from a contaminated fjord area in Norway. *Environ Health Perspect* 1996:756-764.
9. Pompa G, Caloni F, Caloni F, Pompa G, Fracchiolla ML. 2003. Dioxin and PCB contamination of fish and shellfish: assessment of human exposure. Review of the international situation. *Vet Res Communications* 27:159-167.
10. Le Foll D. 1993. Biologie et exploitation de l'araignée de mer *Maja squinado* Herbst en Manche Ouest. Thèse de doctorat, Université de Bretagne Occidentale, Brest, France.
11. Neumann V. 1998. A review of the *Maja squinado* (Crustacea: Decapoda: Brachyura) species-complex with a key to the eastern Atlantic and Mediterranean species of the genus. *J Nat Hist* 32:1667-1684.
12. Lebour MV. 1927. Studies of the Plymouth Brachyura. I. The rearing of crabs in captivity, with a description of the larval stages of *Inachus dorsettensis*, *Macropodia longirostris* and *Maia squinado*. *J Mar Biol Soc UK* 14:795-814.
13. Carlisle DB. 1957. On the hormonal inhibition of moulting in decapod Crustacea. II. The terminal anecdysis in crabs. *J Mar Biol Ass UK* 36:291-307.
14. Hartnoll RG. 1963. The biology of Manx spider crabs. *Proceedings of the Zoological Society of London* 141:423-496.
15. Teissier G. 1935. Croissance des variants sexuels chez *Maja squinado* L. *Bull Biol Fr Belg* 67:401-444.
16. Parapar J, Fernández L, González-Gurriarán E, Muiño R. 1997. Epibiosis and

masking material in the spider crab *Maja squinado* (Decapoda: Majidae) in the Ria de Arousa (Galicia, NW Spain). *Cah Biol Mar* 38:221-234.

17. De Kergariou G. 1971. L'araignée de mer *Maia squinado* L. sur le littoral de Bretagne. *Bull Inst Pêches Marit* 205:11-19.

18. Latrouite D, Le Foll D. 1989. Données sur les migrations des crabes tourteau *Cancer pagurus* et araignées de mer *Maja squinado*. *Oceanis* 15:133-142.

19. González-Gurriarán E, Fernández L, Freire J, Muiño R, Parapar J. 1993. Reproduction of the spider crab *Maja squinado* (Brachyura: Majidae) in the southern Galician coast (NW Spain). *Counc. Meet., Int. Counc. Explor. Sea, Copenhagen, Denmark* 19:15 pp.

20. Stevcic Z. 1977. Contribution à la connaissance de la reproduction de l'araignée de mer (*Maja squinado*). *Rapp. P. V. Reun., Comm. Int. Explor. Sci. Mer. Mediterr., Monaco* 24:177-178.

21. Martin J. 1983. Période d'éclosion des larves d'araignées (*Maia squinado*, Herbst) en baie d'Audierne (Bretagne sud) en 1979 et 1980. *ICES Shell Comm CM* 30:10 pp.

22. Martin J. 1985. Abondance et distribution des larves d'araignées (*Maia squinado*, Herbst) en Manche en 1983. *ICES Shell Comm CM* 24:11 pp.

23. Bodin N, Abarnou A, Le Guellec A-M, Loizeau V, Philippon X. 2005. Submitted. Organochlorine contaminants in decapod crustaceans from the coasts of Brittany and Normandy (France). *Chemosphere*

24. Bodin N, Abarnou A, Fraisse D, Defour S, Loizeau V, Le Guellec A-M, Philippon X. Submitted. PCB, PCDD/F and PBDE levels and profiles in crustaceans from the coastal waters of Brittany and Normandy (France). *Environ Sci Technol*

25. Biger E. 1996. Mesure du bruit de fond géochimique naturel et mise en évidence de l'influence anthropique en zone rurale: application au bassin de la Seine. DEA Report DEA Hydrologie, Hydrogéologie, Géostatistique et Géochimie, Université Pierre et Marie Curie, Paris VI, France.

26. Tessier L. 2003. Transport et caractérisation des matières en suspension dans le bassin versant de la Seine: identification de signatures naturelles anthropiques. Thèse de doctorat, Ecole Nationale des Ponts et Chaussée, Paris, France.

27. Connell DW. 1987. Age to PCB concentration relationship with the striped bass (*Morone saxatilis*) in the Hudson River and Long Island Sound. *Chemosphere* 16:1469-1474.

28. Larsson P, Hamrin S, Okla L. 1991. Factors determining the uptake of persistent pollutants in an eel population (*Anguila anguilla* L.). *Environ Pollut* 69:39-50.

29. Loizeau V, Abarnou A. 1994. Distribution of polychlorinated biphenyls in dab (*Limanda limanda*) from the baie de Seine (Eastern Channel). *Mar Environ Res* 38:77-91.

30. Pastor D, Boix J, Fernandez V, Albaiges J. 1996. Bioaccumulation of organochlorinated contaminants in three estuarine fish species (*Mullus barbatus*, *Mugil cephalus* and *Dicentrarcus labrax*). *Mar Pollut Bull* 32:257-262.

31. Harding GC, LeBlanc RJ, Vass WP, Addison RF, Hargrave BT, Pearre JS, Dupuis A, Brodie PF. 1997. Bioaccumulation of polychlorinated biphenyls (PCBs) in the marine pelagic food web, based on a seasonal study in the southern Gulf of St. Lawrence, 1976-1977. *Mar Chem* 56:145-179.

32. Vives I, Grimalt JO, Ventura M, Catalan J, Rosseland BO. 2005. Age dependence of the accumulation of organochlorine pollutants in brown trout (*Salmo trutta*) from a remote high mountain lake (Redo, Pyrenees). *Environ Pollut* 133:343-350.

33. Muir DCG, Savinova T, Savinov V, Alexeeva L, Potelov V, Svetochev V. 2003. Bioaccumulation of PCBs and chlorinated pesticides in seals, fishes and invertebrates from the White Sea, Russia. *Sci Total Environ* 306:111-131.

34. Tanabe S, Madhusree B, Ozturk AA, Tatsukawa R, Miyazaki N, Ozdamar E, Aral O, Samsun O, Ozturk B. 1997. Persistent organochlorine residues in harbour porpoise (*Phocoena phocoena*) from the Black Sea. *Mar Pollut Bull* 34:338-347.

35. Addison RF, Ikonomou MG, Smith TG. 2005. PCDD/F and PCB in harbour seals (*Phoca vitulina*) from British Columbia: response to exposure to pulp mill effluents. *Mar Environ Res* 59:165-176.

36. Tuerk KJS, Kucklick JR, McFee WE, Pugh RS, Becker PR. 2005. Factors influencing persistent organic pollutant concentrations in the Atlantic white-sided dolphin (*Lagenorhynchus acutus*). *Environ Toxicol Chem* 24:1079-1087.

37. Bodin N, Le Loc'h F, Hily C, Caisey X, Latrouite D, Le Guellec A-M. Submitted. Variability of stable isotopes signatures ($\delta^{13}C$ and $\delta^{15}N$) in two spider crab populations (*Maja brachydactyla*) in Western Europe. *J Exp Mar Biol Ecol*

38. Lafite R, Romana L-A. 2001. A Man-altered microtidal estuary: the Seine Estuary (France). *Estuaries* 24:939.

39. Abarnou A, Loizeau V, Le Guellec A-M, Jaouen-Madoulet A. 2002. Contaminants in marine foodwebs. *Revue Méd Vét* 153:425-432.

40. Kannan K, Yasunaga Y, Iwata H, Ichihashi H, Tanabe S, Tatsukawa R. 1995. Concentrations of heavy metals, organochlorine, and organotins, in horseshoe crab, *Tachypleus tridentatus*, from Japanese coastal waters. *Arch Environ Contam Toxicol* 28:40-47.

41. Kannan N, Reusch TBH, Schulz-Bull DE, Petrick G, Duinker JC. 1995. Chlorobiphenyls: Model compounds for metabolism in food chain organisms and their potential use as ecotoxicological stress indicators by application of the metabolic slope concept. *Environ Sci Technol* 29:1851-1859.

42. Mothershead R, Hale RC, Greaves J. 1991. Xenobiotic compounds in blue crabs from a highly contaminated urban subestuary. *Environ Toxicol Chem* 10:1341-1349.

43. Menone ML, Bortolus A, Botto F, Aizpun de Moreno JE, Moreno VJ, Iribarne O, Metcalfe TL, Metcalfe CD. 2000. Organochlorine contaminants in a coastal lagoon in Argentine: Analysis of sediment, crabs, and cordgrass from two different habitats. *Estuaries* 23:583-592.

44. Brown J, John F. 1992. Metabolic alterations of PCB residues in aquatic fauna: distributions of cytochrome P4501A- and P4502B-like activities. *Mar Environ Res* 34:261-266.

45. James MO, Boyle SM. 1998. Cytochromes P450 in crustacea. *Comp Biochem Physiol* 121C:157-172.

46. Livingstone DR. 1998. The fate of organic xenobiotics in aquatic ecosystems: quantitative and qualitative differences in biotransformation by invertebrates and fish. *Comp Biochem Physiol* 120A:43-49.

47. Goerke H, Weber K. 2001. Species-specific elimination of polychlorinated biphenyls in estuarine animals and its impact on residue patterns. *Mar Environ Res* 51:131-149.

48. Bernárdez C, Freire J, González-Gurriarán E 2000. Feeding of the spider crab *Maja squinado* in rocky subtidal areas of the Ria de Arousa (north-west Spain). *J Mar Biol Ass UK* 80:95-102.

49. Andersson T, Förlin L. 1992. Regulation of the cytochrome P450 enzyme system in fish. *Aquatic Toxicol* 24:1-20.

50. Kennish JM, Bolinger RA, Chambers KA, Russell ML 1992. Xenobiotic

metabolizing enzyme activity in sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) during spawning migration. *Mar Environ Res* 34:293-298.

51. O'Hara SCM, Corner EDS, Forsberg TEV, Moore MN 1982. Studies on benzo[a]pyrene monooxygenase in the shore crab, *Carcinus maenus*. *J Mar Biol Ass UK* 65:113-131.

52. Kirchin MA, Wiseman A, Livingstone DR. 1992. Seasonal and sex variation in the mixed-function oxygenase system of digestive gland microsomes of the common mussel, *Mytilus edulis* L. *Comp Biochem Physiol* 101C:81-91.

53. Den Besten PJ. 1998. Cytochrome P450 monooxygenase system in echinoderms. *Comp Biochem Physiol* 121C:139-146.

54. Georgiades ET, Temara A, Holdway DA. *In Press, Corrected Proof.* Influence of the reproductive cycle on cytochrome P450 levels in the sea star *Coscinasterias muricata*. *Mar Pollut Bull*

55. Gentil F. 1976. Distribution des peuplements benthiques en baie de Seine. Thèse de Doctorat, Université Paris VI, France.

56. Raffin C. 2003. Bases biologiques et écologiques de la conservation du milieu marin en mer d'Iroise. Thèse de Doctorat, Université de Bretagne Occidentale, Brest, France.

57. Borrell A, Bloch D, Desportes G. 1995. Age trends and reproductive transfer of organochlorine compounds in long-finned pilot whales from Farse Islands. *Environ Pollut* 88:283-292.

58. Ross PS, Ellis GM, Ikonomou MG, Barrett-Lennard LG, Addison RF. 2000. High PCB Concentrations in Free-Ranging Pacific Killer Whales, *Orcinus orca*: Effects of Age, Sex and Dietary Preference. *Mar Pollut Bull* 40:504-515.

59. Swackhamer DL, Hites RA. 1988. Occurrence and bioaccumulation of organochlorine compounds in fishes from Siskiwit lake, Isle Royale, Lake Superior. *Environ Sci Technol* 22:543-548.

60. Nakata H, Tanabe S, Tatsukawa R, Amano M, Miyazaki N, Petrov EA. 1995. Persistent organochlorine residues and their accumulation kinetics in Baikal seal from Lake Baikal, Russia. *Environ Sci Technol* 29:2877-2885.

61. Guiney PD, Melancon MJ, Lech JJ, Peterson RE. 1979. Effects of egg and sperm maturation and spawning on the distribution and elimination of a polychlorinated biphenyl in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Toxicol Appl Pharmacol* 47:261-272.

62. Hummel H, UitOudeGroeneveld JP, Nieuwenhuise J, van Liere JM, Bogaards RH, de Wolf L. 1989. A relation between PCB concentrations and reproduction in mussels *Mytilus edulis*. *Mar Environ Res* 28:489-493.

63. McManus GB, Wyman KT, Peterson WT, Wurster CF. 1983. Factors affecting the elimination of PCBs in the marine copepod *Acartia tonsa*. *Estuar Coast Shelf Sci* 17:421-430.

64. Gilliers C, Le Pape O, Amara R, Morin J, Desaunay Y. 2004. Les estuaires fortement contaminés: des nourriceries de poissons aux performances écologiques médiocres. In Travail du Réseau National d'Observation de la qualité du milieu marin. Edition 2004. (France), pp. 19-30.

65. Payne JF, Fancey LS, Rahimtula AD, Porter EL. 1987. Review and perspective on the use of mixed-function oxygenase enzymes in biological monitoring. *Comp Biochem Physiol* 86C:233-245.

Table and figure list

Table 1. Morphometric data of spider crabs from the Iroise Sea and the Seine Bay. CL = carapace length.

Table 2. CB153 concentrations (ng.g-1d.w.) and lipid content (%, dry weight basis) in spider crab tissues from the Iroise Sea and the Seine Bay. NA = not analyzed.

Table 3. Contribution (%) of each PCB group to the $\sum_{16}$PCBs in hepatopancreas of adult male spider crabs (3-4 and 4+ years old) collected from the Iroise Sea and the Seine Bay. SW = Shallow waters (spring); DW = Deep waters (winter); group I = CB153, 180, 187, 194; group II+IV = CB52, 101, 110, 132, 149; group III = CB105, 118, 128, 138, 156, 170 (Kannan et al., 1995).

Table 4. PCB burdens in whole body and eggs of adult female spider crabs collected from the Iroise Sea and the Seine Bay.

Fig. 1. Map of the two sampling areas: the Iroise Sea and the Seine Bay

Fig. 2. Relationship between body size (carapace length, mm) and hepatopancreas CB153 concentrations ($ng.g^{-1}$d.w.) for spider crabs collected in spring in shallow waters, from the Iroise Sea (A) and the Seine Bay (B). Juveniles (0-1 and 1-2 years old) and adults (≥ 2-3 years old) are respectively represented by gray and black symbols. Significant linear relationships were obtained for juveniles both from the Iroise Sea ([CB153] = 1.71 × CL – 62.12; $p<0.001$) and the Seine Bay ([CB153] = 7.22 × CL – 183.97; $p<0.001$).

Fig. 3. Relationship between age and CB153 concentrations in hepatopancreas ($ng.g^{-1}$d.w.) for spider crabs collected in spring in shallow waters, from the Iroise Sea (A) and the Seine Bay (B). Females and males are respectively represented by gray and black symbols.

Fig. 4. PCB pattern in hepatopancreas of spider crabs of different age classes collected in spring in shallow waters, from the Iroise Sea (A: males; B: females) and the Seine Bay (C: males; D: females). Group I = CB153, 180, 187, 194; group II = CB52, 101, 149; group III = CB105, 118, 128, 138, 156, 170; group IV = CB110, 132 (Kannan et al., 1995).

Fig. 5. Coefficients of variation (CV, %) of CB153 concentrations based on $ng.g^{-1}$d.w. (A) and $ng.g^{-1}$lipid (B) measured in hepatopancreas of adult male spider crabs from the Iroise Sea (gray symbols) and the Seine Bay (black symbols).

Table 1. Morphometric data of spider crabs from the Iroise Sea and the Seine Bay. CL = carapace length.

Station	Age class	Sex	n	Weight (g)	CL (mm)
Iroise Sea	0-1	F	23	106 ± 7	69 ± 11
		M	25	110 ± 25	70 ± 6
	1-2	F	30	265 ± 75	98 ± 11
		M	24	307 ± 129	104 ± 12
	2-3	F	12	630 ± 158	126 ± 12
		M	6	583 ± 138	121 ± 16
	3-4	F	30	629 ± 176	126 ± 12
		M	22	1105 ± 417	146 ± 16
	4+	F	10	709 ± 188	129 ± 8
		M	12	1370 ± 497	157 ± 18
Seine Bay	0-1	F	8	85 ± 43	68 ± 15
		M	9	87 ± 64	63 ± 19
	1-2	F	13	337 ± 104	103 ± 14
		M	12	251 ± 106	99 ± 11
	2-3	F	6	530 ± 296	118 ± 15
		M	13	606 ± 321	116 ± 16
	3-4	F	24	499 ± 224	114 ± 11
		M	7	454 ± 217	114 ± 13
	4+	F	11	547 ± 139	116 ± 8
		M	9	504 ± 236	112 ± 15

Table 2. CB153 concentrations (ng.g-1d.w.) and lipid content (%, dry weight basis) in spider crab tissues from the Iroise Sea and the Seine Bay. NA = not analyzed.

	Iroise Sea			Seine Bay		
	n	Lipids (%)	CB153 ($ng.g^{-1}d.w.$)	n	Lipids (%)	CB153 ($ng.g^{-1}d.w.$)
Hepatopancreas	194	47 ± 22	122 ± 79	112	43 ± 15	739 ± 367
Female gonads	52	12 ± 2	42 ± 18	41	12 ± 3	221 ± 69
Muscle	122	3.4 ± 0.4	2.5 ± 1.4	83	2.8 ± 0.6	15 ± 10
Gills	10	<1	0.9 ± 0.4	10	<1	5.2 ± 3
Heart	6	NA	1 ± 0.5	6	NA	6 ± 4

Table 3. Contribution (%) of each PCB group to the $\sum_{16}$PCBs in hepatopancreas of adult male spider crabs (3-4 and 4+ years old) collected from the Iroise Sea and the Seine Bay. SW = Shallow waters (spring); DW = Deep waters (winter); group I = CB153, 180, 187, 194; group II+IV = CB52, 101, 110, 132, 149; group III = CB105, 118, 128, 138, 156, 170 (Kannan et al., 1995).

		Iroise Sea				Seine Bay			
		n	I	II + IV	III	n	I	II + IV	III
3-4 y.	SW	13	61	2.9	36	3	55	6.3	39
	DW	9	57	7.1	36	4	58	5.0	37
4+ y.	SW	5	60	2.7	37	4	56	6.0	38
	DW	7	56	6.9	37	5	58	5.0	38

Table 4. PCB burdens in whole body and eggs of adult female spider crabs collected from the Iroise Sea and the Seine Bay.

	Iroise Sea		Seine Bay	
Age classes	3-4 years	4+ years	3-4 years	4+ years
n	17	8	11	6
Whole body burdens (µg)	1.91 ± 0.86	6.08 ± 4.10	20.6 ± 10.8	31.8 ± 16.6
Egg burdens (µg)	0.21 ± 0.09	0.66 ± 0.21	0.85 ± 0.67	1.52 ± 1.24
Loss due to spawning (%)	11 ± 6	12 ± 6	4 ± 3	5 ± 4

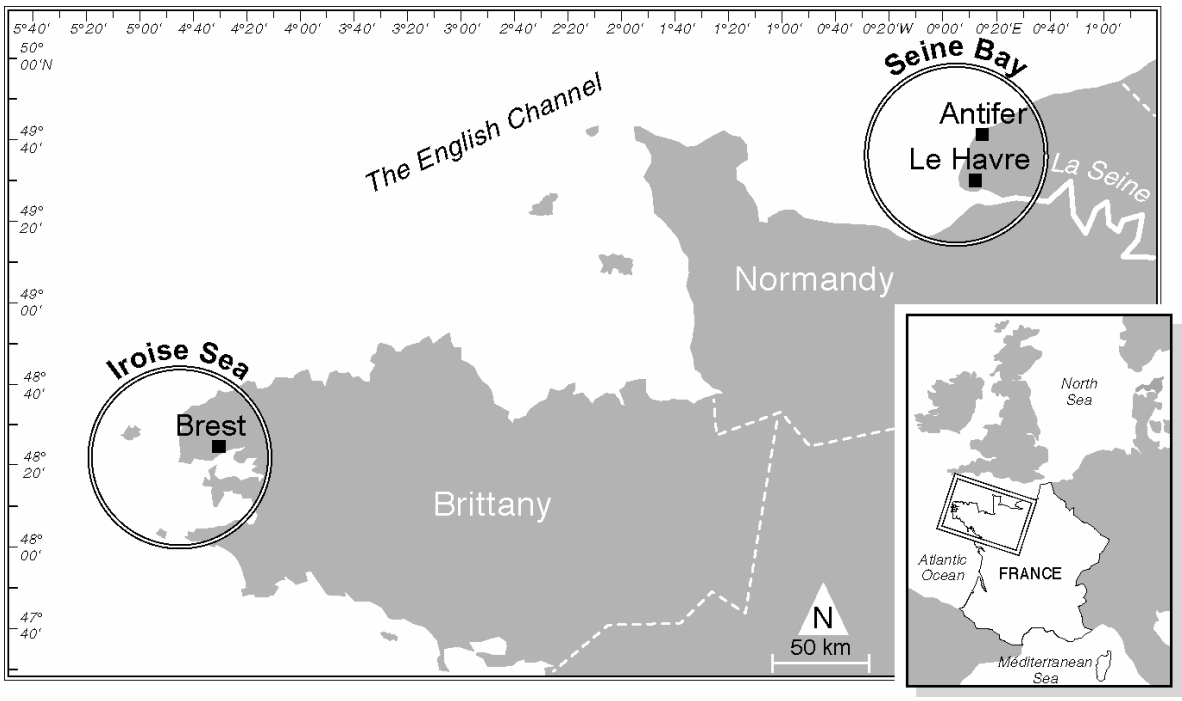

Fig. 1. Map of the two sampling areas: the Iroise Sea and the Seine Bay

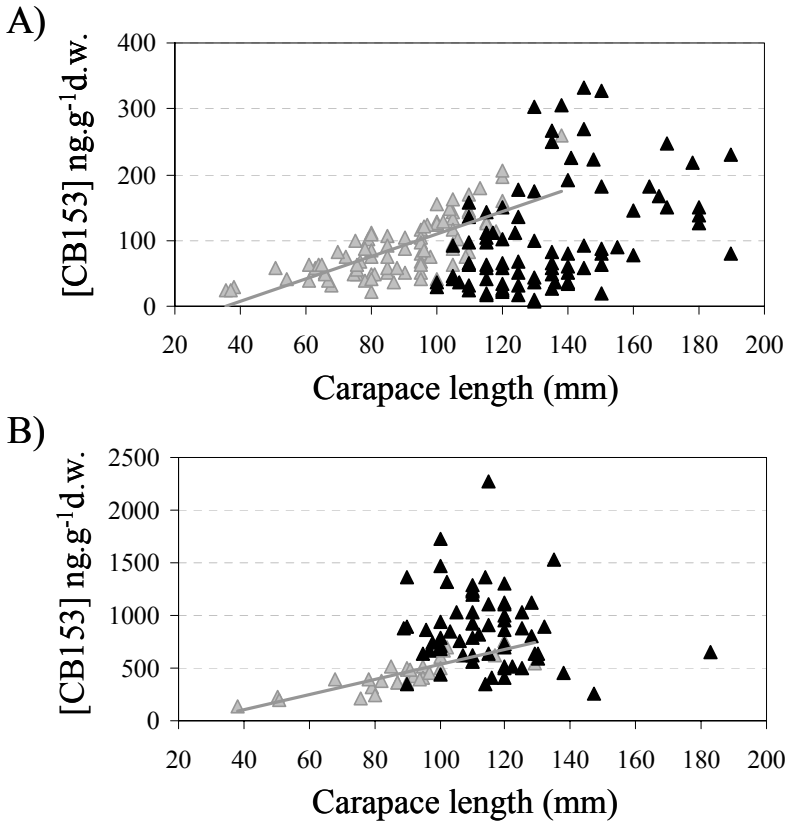

Fig. 2. Relationship between body size (carapace length, mm) and hepatopancreas CB153 concentrations (ng.g^{-1}d.w.) for spider crabs collected in spring in shallow waters, from the Iroise Sea (A) and the Seine Bay (B). Juveniles (0-1 and 1-2 years old) and adults (≥ 2-3 years old) are represented with gray and black symbols, respectively. Significant linear relationships were obtained for juveniles both from the Iroise Sea ([CB153] = 1.71 × CL – 62.12; $p<0.001$) and the Seine Bay ([CB153] = 7.22 × CL – 183.97; $p<0.001$).

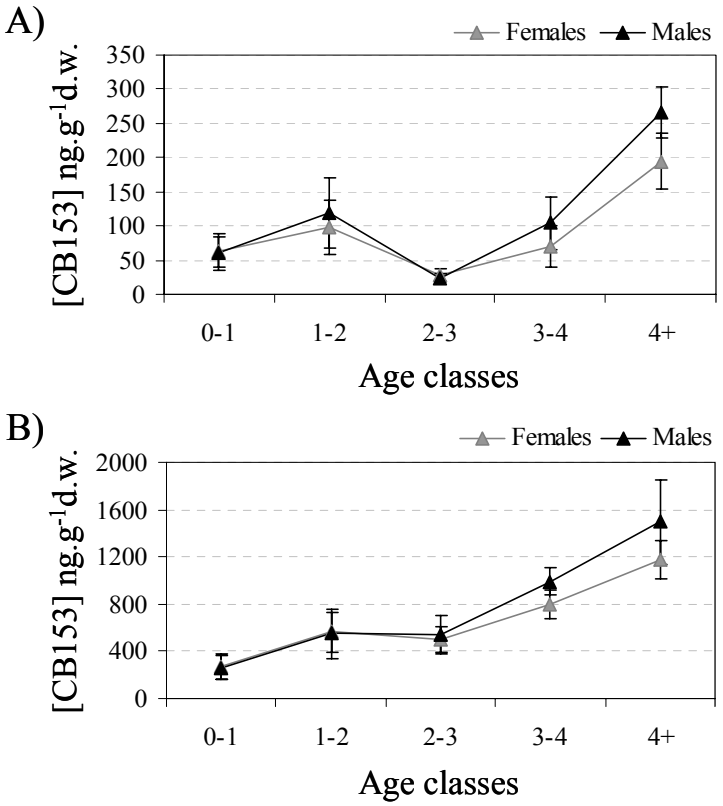

Fig. 3. Relationship between age and CB153 concentrations in hepatopancreas (ng.g^{-1}d.w.) for spider crabs collected in spring in shallow waters, from the Iroise Sea (A) and the Seine Bay (B). Females and males are represented with gray and black symbols, respectively.

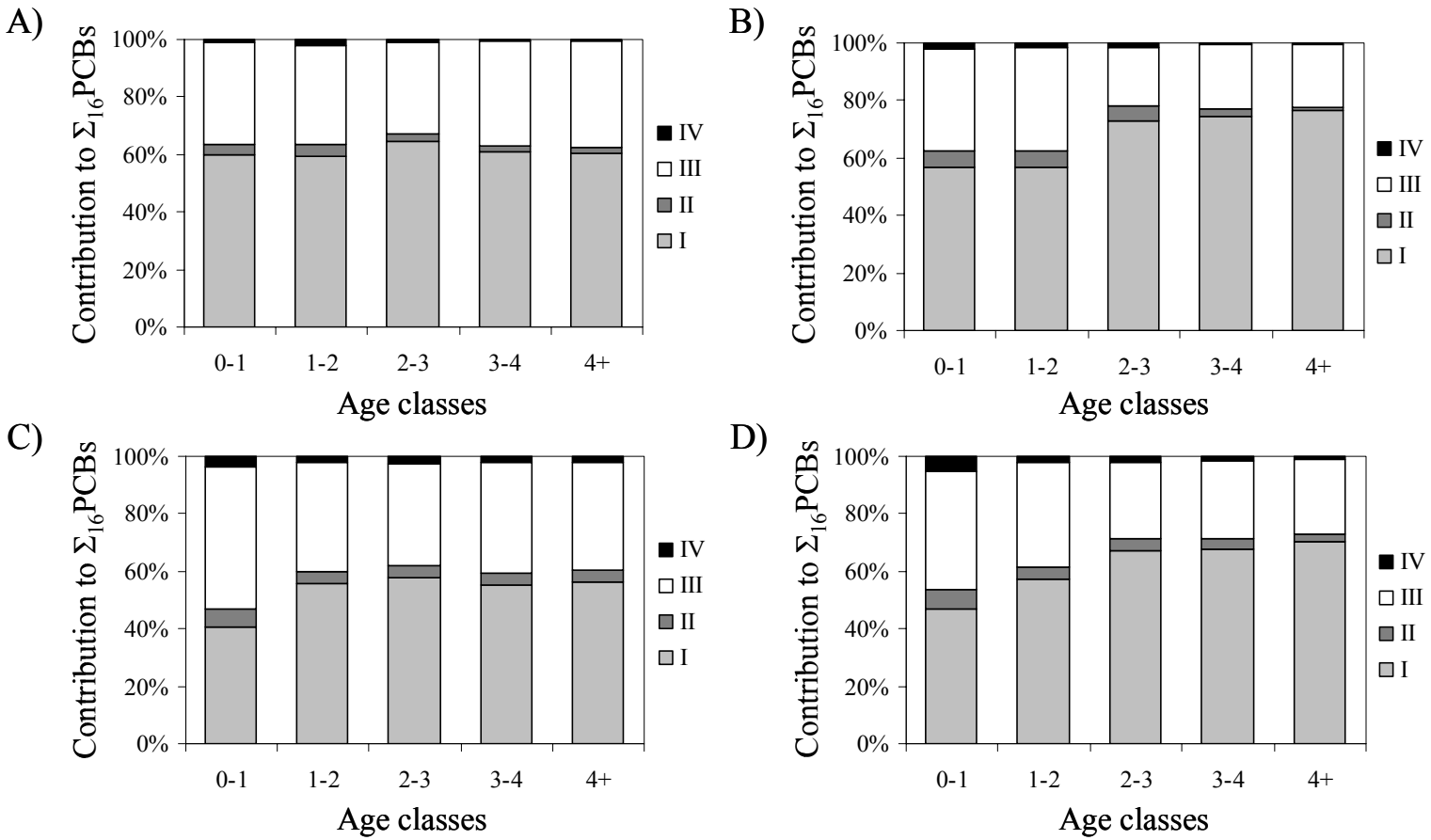

Fig. 4. PCB pattern in hepatopancreas of spider crabs of different age classes collected in spring in shallow waters, from the Iroise Sea (A: males; B: females) and the Seine Bay (C: males; D: females). Group I = CB153, 180, 187, 194; group II = CB52, 101, 149; group III = CB105, 118, 128, 138, 156, 170; group IV = CB110, 132 (Kannan et al., 1995).

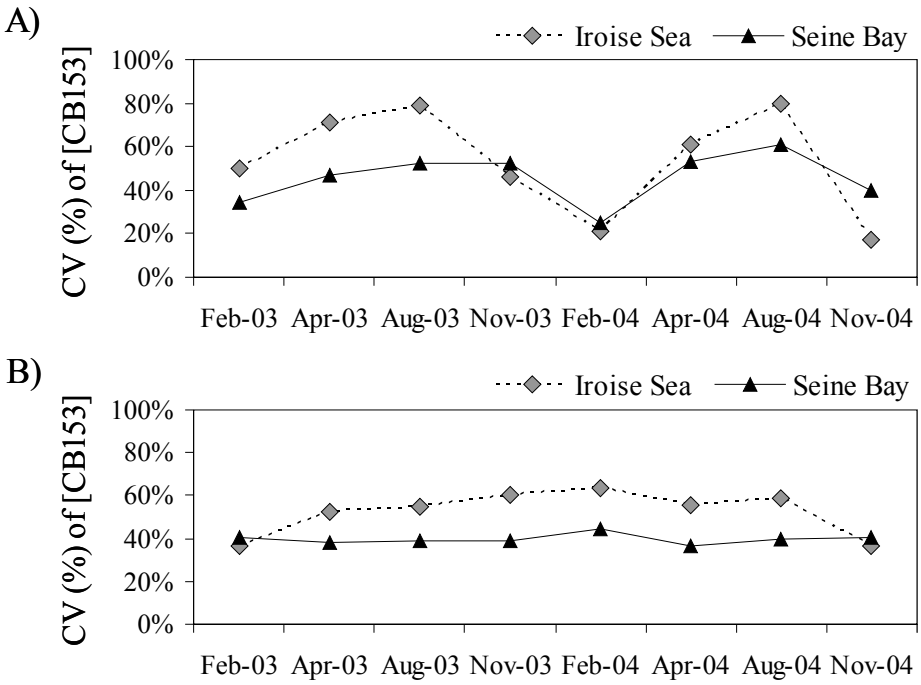

Fig. 5. Coefficients of variation (CV, %) of CB153 concentrations based on $ng.g^{-1}$d.w. (A) and $ng.g^{-1}$lipid (B) measured in hepatopancreas of adult male spider crabs from the Iroise Sea (gray symbols) and the Seine Bay (black symbols).

ARTICLE 6

Assessment of PCB bioaccumulation in the spider crab food web using stable isotopes

N. Bodin [a,b,*], F. Le Loc'h [c], X. Caisey [a], A-M. Le Guellec [a], A. Abarnou [a], V. Loizeau [a], D. Latrouite [d]

[a] IFREMER, DCN-BE, Technopôle Brest-Iroise, Pointe du Diable, 29280 Plouzané, France

[b] LPTC, Université de Bordeaux 1, CNRS, 351 Cours de la Libération, 33400 Talence, France

[c] IRD, UR 070 RAP, Centre de Recherche Halieutique, Avenue Jean Monnet, B.P. 171, 34203 Sète Cedex, France

[d] IFREMER, DCB-STH, Technopôle Brest-Iroise, Pointe du Diable, 29280 Plouzané, France

[*] Corresponding author. Email: n.bodin@lptc.u-bordeaux1.fr; Tel: +33 (0) 5 40 00 22 55; Fax: +33 (0) 5 40 00 22 67.

Soumis à Environmental Pollution (Nov 2005)

Abstract

Carbon and nitrogen stable isotope compositions and polychlorobiphenyl (PCB) contamination were investigated in the spider crab (*Maja brachydactyla*) food web from the Iroise Sea (Western Brittany) and the Seine Bay (Eastern English Channel). The biota examined included sediment, macroalgae and phanerogames, as well as various benthic species of polychaetes, molluscs, echinoderms and crustaceans. From primary consumers to upper predators, the benthic food web of the spider crab from the two sampling areas covered almost three trophic levels. PCB concentrations were all significantly higher in organisms from the Seine Bay than those from the Iroise Sea, and at both sites, they were significantly related to the trophic position. The highest food web magnification factors (FWMFs) were calculated for the congeners with 2,4,5-substitution. Moreover, PCBs having only m,p vicinal H-atoms and those with both m,p and o,m vicinal H-atoms were not biomagnified until decapod crustaceans, suggesting these compounds are biotransformed by such species.

Keywords: *Maja brachydactyla*, Polychlorobiphenyls, $\delta^{15}N$ and $\delta^{13}C$, Trophic level, Food web biomagnification factor.

1. Introduction

Polychlorinated biphenyls (PCBs) have been largely used for industrial purposes due to their chemical inertness. However their lipophilicity and high environmental stability enable them to persist in the environment and to bioaccumulate through the food web (Thomann, 1989). The accumulation, biotransformation and excretion of PCBs in lower trophic level biota influence the concentration of contaminants in higher trophic level species (Fisk et al., 2001; Moisey et al., 2001). Therefore, determining the trophic transfer of PCBs is required in order to better address their exposure and risk to human and wildlife.

Nitrogen stable isotopes ($^{15}N/^{14}N$) have been used to assess the trophic level of aquatic biota (Minagawa and Wada, 1984; Michener and Schell, 1994) and provide a quantitative and continuous variable for studying the biomagnification of persistent contaminants within complex food webs (Kiriluk et al., 1995; Cabana and Rasmussen, 1996; Ruus et al., 2002). In contrast, the ratios of carbon stable isotopes ($^{13}C/^{12}C$) in biota can help to elucidate the trophic interactions by establishing the relative contribution of marine (or pelagic) versus coastal (or benthic) carbon sources (France and Peters, 1997, Hobson et al, 2002, Le Loc'h and Hily, 2005). The use of stable isotopes to assess the trophic position has numerous advantages over traditional methods, like the analysis of gut contents, as it averages dietary assimilation over a longer period of time (Hobson and Clark, 1992; Hesslein et al., 1993; Post, 2002). However, it does not allow determining the exact composition of the species diet. As a result, the quantification of both C and N stable isotope ratios can provide valuable information into the feeding ecology of biota and its potential influence on the trophic enrichment of organochlorinated contaminants, especially PCBs (Hoekstra et al., 2003b; Evenset et al., 2004).

The decapod crustacean *Maja brachydactyla* is a common species of the Northeast Atlantic coast, especially on the coasts of Brittany and Normandy (France). Several studies have been carried out on the growth, migration, reproduction and fishing of this species. With regards to its diet composition, direct field observations (Carlisle, 1957; De Kergariou, 1974), laboratory experiments (Stevcic, 1967), as well as studies of gut contents (Brosnan, 1981; De Kergariou, 1974; Stevcic, 1967; Bernárdez et al., 2000), and stable isotopes (Bodin et al., submitted d) have been carried out suggesting an omnivorous feeding behaviour of *Maja brachydactyla*. Its diet is based on the consumption of common preys in their habitat, and consists of algae, mollusc bivalves

and gastropods, echinoderms, crustaceans and also fish cadavers. Because of the economical importance of the spider crab fishery, and the necessity to certify their quality and safety for human consumption, a better knowledge of the interactions between this species and its environment is required, particularly to identify the possible pathways of pollutants in the food web. For that purpose, our study focused on two different spider crab populations: one from the Seine Bay (Eastern English Channel) and the other one from the Iroise Sea (Western Brittany). In coastal ecosystems, the bioaccumulation of contaminants is very intricate processes in which environmental and biological factors act more or less simultaneously. Indeed, juvenile spider crabs spend two years in coastal shallow waters and consequently are more exposed to chemicals from terrestrial sources. On the contrary, adults migrate towards offshore waters in winter, and come back to their coastal spawning habitat in spring. For that reason, in each sampling area, spider crab populations were followed only in spring in both nursery and coastal spawning habitat.

The aims of this study were first to identify trophic relationships in the coastal benthic communities of the Seine Bay and the Iroise Sea, and then to determine the PCB concentrations and their distribution in various organisms that potentially constitute the spider crab diet. Finally, the bioaccumulation processes of different PCB congeners along this food web were studied, using stable isotope analysis.

2. Material and methods

2.1. Sampling strategy

Three areas were sampled in April 2004: two from the Iroise Sea, and one from the Seine Bay (Fig 1). The Iroise Sea, in Western Brittany, is an important spider crab fishery. It is characterized by a very weak chemical contamination because of the oceanic influence (Bodin et al., accepted). However, the coastal waters may be exposed to water exchanges flowing out the Bay of Brest, an urban zone with about 250 000 inhabitants, and a large naval base also characterized by shipyard and various industrial activities. The juveniles and their potential preys were collected on sandy bottoms from the Bertheaume Bay nursery, with a 5-10 meter depth; the adult spider crabs were captured from the Corbin Rock in depth of 10-15 m, as well as algae and invertebrate species. The Seine Bay is located in the Eastern English Channel and is greatly exposed to large contaminant discharges from the Seine River (Abarnou et al., 2002). The Seine watershed is about 78 600 km^2, where approximately 30% of the French population

lives. Moreover, 40% of the French industrial activity is located in this catchment area, where agricultural activities are also important (Tessier, 2003). Juvenile and adult spider crabs were collected in the same site, near the Antifer oil terminal at about 5-10 m depth.

Juvenile and adult spider crabs as well as various benthic species which correspond to their potential preys were collected in these three areas (Table 1). Preliminary sample pre-treatment steps were performed as soon as possible after the sampling. For the spider crab (*Maja brachydactyla*), the green crab (*Carcinus maenas*) and the velvet swimming crab (*Necora puber*), a fraction of the muscle was carefully dissected from the inner body part for stable isotope analysis, whereas the whole body rest was analyzed for PCB contamination. The age class (juvenile or adult) of *Maja brachydactyla* was determined according to the method developed by (Le Foll, 1993). All the other species were kept in filtered aerated sea water during one night to allow gut content evacuation. Then the shells of molluscs were removed, as well as the abdomen of the hermit crab (*Pagurus bernhardus*). As regards for polychaetes, echinoderms and molluscs, the dissection not making it possible to have sufficient material, their whole body was analyzed. Each sample was divided into two parts: one for the stable isotope analysis, and the second for the PCB determination.

All samples were kept at –20°C until analysis. They were lyophilized and the water content was determined. For the stable isotope analysis, samples were ground to an ultra-fine powder using a ball mill. In order to eliminate any trace of inorganic carbon, an acidification treatment was performed with HCl (10%) on whole body species samples and sediment. For PCB analysis, samples were ground to obtain a fine homogeneous powder. Moreover, the contribution of organic and inorganic matters of each sample was determined with a chlorhydric acid treatment; measured PCB concentrations were then normalized by the organic matter content in order to homogenise PCB results between species.

2.2. Stable isotopic analysis

One milligram of each dried sample was weighted in tin capsules for stable isotope analysis. The stable isotope ratios of carbon and nitrogen were determined at the Scottish Crop Institute (Dundee, Scotland) by CF-IRMS analysis using a Europa Scientific ANCA-NT 20-20 Stable Isotope Analyzer together with an ANCA-NT Solid/Liquid Preparation Module. As the samples contained more than 10% nitrogen,

the CF-IRMS was operated in dual isotope mode, allowing $\delta^{15}N$ and $\delta^{13}C$ to be measured in the same sample. Stable isotope ratios were expressed in conventional δ notation as parts per mil (‰) according to the following equation:

$$\delta X_{sample} = [\ (R_{sample} / R_{reference}) - 1\ ] \times 1000$$

where X is ^{13}C or ^{15}N and R is the corresponding $^{13}C/^{12}C$ or $^{15}N/^{14}N$ ratio. Reference is VPDB (cretaceous PeeDee Belemnite) for $\delta^{13}C$ and atmospheric N_2 for $\delta^{15}N$. The analytical precisions were ± 0.2‰ for both nitrogen and carbon, as estimated from standards analyzed together with the samples.

Trophic levels were calculated assuming a constant per trophic level fractionation factor of 3.4‰ for $\delta^{15}N$ (Minagawa and Wada, 1984). As Post (2002) demonstrated that this fractionation pattern is consistent for many trophic groups, the following formula was used to estimate trophic levels:

$$TL_{Ni} = (\delta^{15}N_i - \delta^{15}N_{baseline}) / 3.4 + 2$$

where TL_{Ni} is the trophic level of the species i, $\delta^{15}N_i$ is the mean $\delta^{15}N$ of the species i and $\delta^{15}N_{baseline}$ is the mean $\delta^{15}N$ of *Mytilus edulis* from each sampling area. The suspension feeder bivalve *M. edulis* was chosen as "baseline" materials because it occupies a trophic level 2 (Riera et al., 1999; Post, 2002) and because it was present at each sampling station. Moreover, as suggested by Post (2002), bivalves have longer life histories and slower tissue turnover times than their food, so the isotopic compositions of their tissues integrate the isotopic variability of the food sources (Lorrain et al, 2002).

2.3. Chemical analysis

PCB analysis was carried out according to the procedure described by Bodin et al. (accepted). In order to isolate these contaminants form the bulk of the matrix, samples were extracted using a derived Soxhlet extraction method. A precisely weighed amount of the powdered materiel was extracted in a hot Soxtec 1043 Auto System HT6 (Tecator, Höganäs, Sweden) during three hours with a hexane:acetone mixture (80:20). The amount of extracted fat was determined gravimetrically. In the case of sediment, sea urchin (*Echinocardium cordatum*), and brittle star (*Ophiotrix sp.*), it was necessary to remove the elemental sulfur which was co-extracted with the organic compounds because it can significantly interfere with many compounds during gas chromatographic analysis with electron-capture detection (ECD) (Jaouen-Madoulet et al., 2000). The sulphur was removed using a tetrabutylammonium sulfite treatment. The reagent (1 ml)

and 2 ml of 2-propanol were added to a 2 ml sample extract in hexane, shaken for at least 1 min and then placed at 4°C until a solid residue appears. After this treatment, 5 ml of Milli-Q water were added and the mixture was shaken. Then, the overlaying organic phase was removed and concentrated to approximately 500 µl before the clean-up step.

In order to remove other unwanted co-extracted materials (biogenic macromolecules, lipids and pigments) which may interfere in the final determination and quantification of the compounds, two successive clean-up were performed. First, lipids and co-extractible material were destroyed by addition of one millilitre of concentrated sulphuric acid. Secondly, the cleaned extracts were purified by adsorption chromatography on a Florisil column (Florisil, 60-100 mesh size, activated during one night at 200°C, deactivated with 3% of demineralised water) and eluted with pentane (20 ml). After concentration, the final extract was taken up by iso-octane and transferred into a chromatographic vial with the addition of the internal standard (1,2,3,4-tetrachloronaphtalene). Finally, PCB congeners were analyzed by gas chromatography with electron capture detector, on a HP 5890 series II equipped with a CP-Sil19 column (60 m length, internal diameter 0.25 mm, and 0.15 µm phase film thickness).

Fourteen PCBs were quantified in all matrix, of which the six indicator PCB congeners (CB52, 101, 118, 138, 153, 180) and a few other to describe a larger range of chlorination from 4 to 7 chlorine molecules (CB105, 110, 128, 132, 149, 156, 170, 187). These last compounds were chosen because they can highlight underlying mechanisms acting on the distribution of organic contaminants in biota like bioaccumulation or biotransformation. All steps of the analytical protocol were validated in term of reproducibility and accuracy; procedural blanks were systematically checked each ten samples and a certified reference material (BCR CRM349 cod liver oil) was analyzed together with the real samples (see Bodin et al., accepted).

2.4. Statistical analysis

Both stable isotopic and contaminant data followed a non-normal distribution according to the Shapiro-Wilk test ($p>0.05$). A Mann Whitney U-test was used to compare the mean concentrations of PCBs between the sampling areas. Then data on trophic levels and PCB concentrations were subjected to correlation analysis using Spearman's correlation coefficient. All statistical tests were performed using Statistica Software 6.0.

3. Results

3.1. Stable isotope signatures

Trophic level calculated from $\delta^{15}N$ exhibited a continuum among benthic invertebrates ranging from TL 2 (suspension feeders) to TL 3.9 (carnivore crustaceans), macroalgae and *Zostera marina* having inferiors TL (Table 1). Among primary consumers, $\delta^{13}C$ values varied greatly (about 5‰): grazers were ^{13}C-enriched compared to suspension feeders, and deposit feeders exhibited an intermediate position (Table 1). Moreover, the grazer $\delta^{13}C$ values (around -16‰) were close to those of the macroalgae *Laminaria digitata* (-16.3‰ to -18.3‰), whereas those of the deposit feeders (-17.5‰ to -20.6‰) and of the suspension feeders (-17.6‰ to -21‰) had to be link to those of SOM (sediment organic matter; -20.2 ‰) and POM (particulate organic matter; -22 ‰ to -24 ‰), from Lorrain et al. (2002) for the Bay of Brest and Savoye et al. (2003) for the Bay of Seine respectively. This range of $\delta^{13}C$ variation was also found in the upper consumers, some carnivorous crustaceans (*Carcinus maenas*, *Necora puber*) or echinoderms (*Asterias rubens*, *Masthasterias glacialis*) being more ^{13}C-enriched than carnivorous polychaetes (*Glycera rouxii*, *Nephtys hombergii*).

The different species collected in the three sampling areas revealed different benthic communities. Despite these different communities and their geographical locations, species encountered in all sites showed very close isotopic signatures (*Hinia reticulata*, *Asterias rubens* and *Pagurus bernhardus*). Within the sampling areas, *Maja brachydactyla* followed the same isotopic pattern. Juvenile and adult spider crabs had very close trophic levels ranging from 3.3 to 3.6, and isotopic carbon ratio ^{13}C-enriched in comparison to the other benthic invertebrates, from -16.5‰ (Bertheaume's juveniles) to -15‰ (Antifer's adults).

3.2. PCB contamination

Among species, those which probably belong to the diet of *Maja brachydactyla* and for which there was enough biological material were also analyzed for PCB contamination. Table 2 shows CB153 (2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl) concentrations measured in each sample. This compound was chosen since it is one of the most recalcitrant chlorobiphenyl congeners with respect to biotransformation and it shows the highest concentrations in biota. Samples from Antifer were all significantly

more contaminated than those from the Iroise Sea (Mann Whitney test, $p<0.05$). For instance, CB153 levels measured in crustaceans from Antifer were approximately 3 to 12-fold higher than those observed in crustaceans from both the Corbin Rock and the Bertheaume Bay. As regards to algae, molluscs and echinoderms, species from Antifer were 5 to 60 times more contaminated than those from Western Brittany. At each sampling area, the lowest CB153 concentrations were measured in sediment and algae, followed by deposit feeders, scavengers, grazers and suspension feeders, and finally carnivore-omnivore species; *M. brachydactyla* showed the highest CB153 levels, especially in the adult specimens. Moreover, PCB concentrations were slightly higher in samples collected from the Bertheaume Bay than those from the Corbin Rock. In order to compare the mean concentrations of CB153 in both sites, a Mann Whitney U-test was applied to only species for which at least three samples or more were available. Among these species (*Mytilus edulis* and *Pagurus bernhardus*), the difference in concentrations between the Corbin Rock and the Bertheaume Bay was statistically significant (Mann Whitney test, $p<0.05$).

To visualize the PCB profiles in the different samples, congeners were separated into homologue groups depending on the number of chlorine atoms in the molecule (Figure 2). The contribution of each PCB group varied between species, but was almost the same for a given species whatever the sampling site. In macro-algae (*Corallina officinalis* and *Laminaria digitata*) and phanerogames (*Zostera marina*), the highest compounds were the penta- (= 45-48% of the $\sum_{14}$PCBs), followed by the hexa-chlorinated biphenyls (= 29-33% of the $\sum_{14}$PCBs). PCB patterns in sediment were dominated by the same groups but in different proportions (22-29% and 53-58% of the $\sum_{14}$PCBs for the penta- and hexa-chlorinated compounds, respectively). As regards to invertebrates, similar profiles were observed for the species having a same feeding mode. Grazer specimens (*Patella vulgata*, *Echinus esculentus*, *Gibbula umbilicalis*) presented PCB fingerprints close to those observed in algae and phanerogames, with a high proportion of penta-chlorinated compounds (= 38-40% of the $\sum_{14}$PCBs). Suspension feeders presented the highest proportion of tetra-chlorinated PCBs among the invertebrates (= 12-16% of the $\sum_{14}$PCBs). Oppositely, deposit feeders showed very similar PCB profiles than sediment with the predominance of the penta- and hexa-chlorinated compounds (25-28% and 59-63% of the $\sum_{14}$PCBs, respectively). Finally, scavenger (*Hinia reticulata*), carnivore and omnivore species were greatly dominated

by the hexa-(= 56-68% of the $\sum_{14}$PCBs), followed by the hepta-chlorinated biphenyls (= 12-27% of the $\sum_{14}$PCBs).

3.3. PCB bioaccumulation in the spider crab food web

In order to study PCB behaviour along the spider crab food web, concentrations measured in samples were lipid normalized and Ln-transformed, which allow to reduce on the one hand the inter-species lipid variations (Hebert and Keenleyside, 1995; Fisk et al., 2001; Gray, 2002), and on the other hand the skewness and kurtosis of the data prior to statistical comparisons (Fisk et al., 2003). At each sampling area, the PCB concentrations were significantly related to the trophic level of the species (Table 3 and figure 3). However, differences were highlighted between the PCB congeners depending on their structural characteristics. Those lacking *meta-para* (m,p) and *ortho-meta* (o,m) vicinal H-atoms (i.e. CB153 on figure 3), as well as those with only o,m vicinal H-atoms (i.e. CB118 on figure 3) were linearly correlated with the trophic level. Differently, polynomial relationships were observed when looking at compounds having only m,p vicinal H-atoms (i.e. CB149 on figure 3) and those with both m,p and o,m vicinal H-atoms (i.e. CB132 on figure 3). Moreover, significant linear relationships were then obtained for these compounds (Spearman coefficient, $p<0.01$; data not shown) after removing data of decapod crustacean species (spider crab, velvet swimming crab, common shore crab and hermit crab).

The biomagnification of PCBs through the spider crab food web was determined by calculating a food web magnification factor (FWMF) as defined by Fisk et al. (2001), and based on the relationship between δ^{15}N-determined trophic level and the Ln-transformed - lipid-normalized PCB concentrations. FWMF values for PCB congeners, which were linearly related to TL, varied from 2.1 to 9.0 at Antifer, from 2.5 to 17.3 at the Corbin Rock, and from 1.9 to 6.0 in the Bertheaume Bay (Table 3). For each congener, higher FWMFs were found in the food web from the Corbin Rock, followed by that from Antifer and, finally that from the Bertheaume Bay, except for the congener CB187. Considering CB105, CB118, CB153, CB170 and CB180, significant higher FWMFs were obtained at the Corbin Rock compared to the other sites. As regards for samples from the Seine Bay, the highest FWMFs were found for the congener CB153, followed by CB118, CB170 and CB180. At the Iroise Sea sampling areas (both Corbin Rock and Bertheaume Bay), CB170 presented the highest FWMF, followed by the

compounds CB180, CB153 and CB118.

4. Discussion

4.1. Stable isotope signatures – food web structure

Maja brachydactyla is an opportunistic species with an omnivorous diet based mainly on benthic organisms (De Kergariou, 1974; Stevcic, 1967; Bernárdez et al., 2000). In order to elucidate its food web, its potential preys, i.e. the most abundant benthic organisms presents in the studied area and those already referenced as belonging to its prey (Brosnan, 1981; De Kergariou, 1974; Stevcic, 1967; Bernárdez et al., 2000), were analyzed to determine their trophic positions.

As the suspension feeder *Mytilus edulis* was the most ^{15}N depleted within the benthic fauna with the exception of the urchin *Echinocardium cordatum*, the assumption that it could be used as a baseline to calculate the higher consumer TL is relevant as suggested by Post (2002). The ^{15}N depletion of the *E. cordatum* may be explained by the high lipid content of the tissue used for the isotopic analysis which could have an effect on the $\delta^{15}N$ towards lowest values (Bodin et al., submitted c). Even if the application of a unique trophic enrichment factor for $\delta^{15}N$ throughout an omnivorous species food web appears as a simplification of such a complex system (Oelbermann and Scheu, 2002; McCutchan et al. 2003), a mean trophic fractionation of 3.4‰ could be widely applicable in aquatic food webs (Post, 2002). From primary consumers to upper predators, the benthic food web of the spider crab covered almost 3 TL, which is lowest than in the maerl bed communities located close to the Iroise Sea, in the Bay of Brest (Grall et al., accepted). However, it is in the same range than other subtidal marine invertebrate communities (Hobson et al., 2002, Davenport and Bax, 2002, Le Loc'h and Hily, 2005). *M. brachydactyla* occupied TL slightly inferior to the upper consumers of the benthic communities, as the carnivorous crabs *Carcinus maenas* and *Necora puber,* and immediately superior to TL 3 occupied by the secondary consumers (*Asterias rubens* or *Nephtys hombergii)*. This intermediate trophic position is the consequence of its omnivorous diet based on several TL.

In marine benthic food webs, $\delta^{13}C$ signatures allow distinctions between "benthic-component" and "pelagic component" species (Le Loc'h and Hily, 2005). As regards for primary consumers from the Seine Bay and the Iroise Sea, $\delta^{13}C$ discriminated suspension feeders and grazers supplied by POM and macroalgae, respectively. Indeed,

primary consumers feeding on pelagic primary production are less ^{13}C enriched than those ingesting benthic primary production or detritic organic matter. In our study, most of the upper benthic consumers encountered (TL ≥ 3.4) as *M. brachydactyla* had an isotopic carbon ratio ^{13}C-enriched revealing a diet mainly based on "benthic-component" prey.

4.2. PCB contamination

All samples collected from Antifer were more contaminated by polychlorinated biphenyls than those from the Iroise Sea. Few data on the PCB contamination of benthic invertebrates from these two geographical zones have been published so far. The French monitoring program (R.N.O.) in 2002 recorded CB153 levels in the range of 200-250 $ng.g^{-1}$d.w. in mussels from sites close to the Seine Estuary, whereas they varied from 5 to 20 $ng.g^{-1}$d.w. in bivalves from the Brittany coasts (Abarnou et al., 2002). These results are in good agreement with to those measured in mussel tissues in this study. With regard to the sediment contamination, CB153 levels in samples collected at Antifer were in the same range than those reported by Loizeau (1993) and Jaouen-Madoulet (2000) from the Seine Bay. Moreover, relatively similar results were found in the sediment of coastal ecosystems from the North Vietnam (Nhan et al., 1999), the Dutch North Sea (Klamer et al., 2005) and the Gulf of Bothnia (Strandberg et al., 2000).

The organic chemical contamination of the Iroise Sea has been little investigated until now. Compared with literature data, it is assumed that the Iroise Sea and its whole ecosystem are very lowly contaminated by PCB (Bodin et al., accepted). However, samples from the Bertheaume Bay were more contaminated by a factor 1.5 to 2.5 than those from the Corbin Rock. The Bertheaume Bay is located very close to the coast and might be exposed to contaminant discharge inputs from the surrounding urban and industrial activities of the Bay of Brest (Marchand et al., 1983). The Corbin Rock is also situated at the mouth of Brest Channel, but the strong oceanic currents remove flush these contaminants. It could be concluded that PCB concentrations were clearly area dependent. Recently the same conclusions were drawn concerning levels of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and dioxins (PCDD/Fs) in decapod crustaceans from the Seine Bay and the Iroise Sea (Bodin et al., submitted a).

The PCB patterns showed increased influence of higher chlorinated congeners with trophic position of the organisms (Muir et al., 1988; Oliver and Niimi, 1988; Ruus et al, 2002), and similar fingerprints were observed for organisms having a same feeding

mode. On the contrary, no differences were noticed for a given species between the three sampling sites. These results agree with those of Bodin et al. (submitted a), suggesting that PCB fingerprints in biological tissues remain more or less unchanged whatever the geographical situation and the contamination levels, but is highly dependant to both properties of the organic compounds and the species (feeding mode, metabolisation capacities). Hexa- and hepta-chlorinated compounds dominated the PCB pattern in crustaceans. These congeners were industrially produced in higher proportions than other congeners, and have the highest bioaccumulation potentials (McFarland and Clarke, 1989). The prevalence of hexa- and heptachlorinated PCBs in crustaceans is similar to patterns found in various mammals (Muir et al., 1988; Norstrom et al., 1998; Gamberg and Braune, 1999; Hoekstra et al., 2003a). On the contrary, tetra- and pentaCBs comprised a much higher percentage of the PCBs in suspension feeder organisms, which coincides with phytoplankton PCB patterns observed in the Seine Estuary (Jaouen-Madoulet, 2000). The tetra- and pentaCBs studied have log Kow in the range of 5.86 to 6.46, while the hexa- and heptaCBs have log Kow from 6.63 to 7.01 (Hansen et al., 1999). This implies a larger bioavailable fraction of the lower chlorinated biphenyls for bioconcentration, especially for suspension feeders. Oppositely, with increasing trophic position (or size) of the organisms and lipophilicity (or chlorination) of the PCBs, the dietary route becomes more important for bioaccumulation, resulting in higher proportions of highly chlorinated congeners with higher trophic level. In addition, the different PCB fingerprints observed in the carnivorous-omnivorous organisms compared to benthic primary consumers are not likely to be solely dependent on the bioavailability, but probably also on metabolism and elimination processes (Boon et al., 1989; Ruus et al., 1999). Indeed, crustaceans have higher capacities than fish to metabolize some PCB congeners as suggested by several authors (Kannan et al., 1995; Goerke and Weber, 2001; Bodin et al., submitted a).

4.3. PCB bioaccumulation in the spider crab food web

Lipid weight concentrations of each PCB congener were significantly related to trophic position as defined by $\delta^{15}N$, in the spider crab food web from both the Seine Bay (Antifer) and the Iroise Sea (Corbin Rock and Bertheaume Bay). Statistic significant linear relationships were obtained for PCB congeners lacking m,p and o,m vicinal H-atoms, and those with only o,m vicinal H-atoms, indicating that these

compounds are subject to biomagnification through this food web. The highest FWMFs were found for penta- (CB118), hexa- (CB153), hepta- (CB170, CB180) with 2,4,5-substitution. These congeners are typically recalcitrant in most biota (Boon et al., 1994) due to their high log Kow and high persistence, and because they are non metabolizable, especially in invertebrates tissues (Kannan et al., 1995; Bodin et al., accepted). However, significant differences were observed between the sampling areas. As regards for the Iroise Sea, the lowest FWMFs for the Bertheaume Bay spider crab food web, compared to that of the Corbin Rock, reflect the relatively high PCB contamination levels in lower trophic level organisms which were included in the calculation (algae, deposit feeders, grazers and suspension feeders). Moreover, Bodin et al. (submitted b) reported an increase of PCB concentrations with the spider crab age, which can be considered as one of the most important factors influencing PCB bioaccumulation. Thus, lower FWMFs observed in the Bertheaume Bay food web reflect the lower concentrations of juvenile spider crabs compared to adult ones. The comparison of FWMFs from the Corbin Rock and Antifer revealed higher values for the Iroise Sea food web. This result reflects higher PCB levels of the species which composed the base of the Seine Bay trophic network, because these benthic organisms are particularly exposed to important contaminant discharges from the Seine River.

As far as we know, no similar approach has been conducted on food webs comprising only invertebrates. Several studies have dealt with the organochlorinated contaminant biomagnification in food webs including fishes, seabirds or mammals (Kidd et al., 1995; Evenset et al., 2004; Hoekstra et al., 2003b; Muir et al., 2003). Because the FWMFs depend on the species constituting the food web, comparison between studies should be done with caution. However, it can be noted that FWMFs calculated for the spider crab food web from the Seine Bay were close to those reported in the Barents Sea food web including poikilotherms (fish) (Hop et al., 2002), whereas values calculated for the spider crab food web from the Iroise Sea (Corbin Rock) were in the same range than those in the Baffin Bay food web including homeotherms (seabirds and mammals) (Fisk et al, 2001).

As regards for PCBs having only m,p vicinal H-atoms and those with both m,p and o,m vicinal H-atoms, significant polynomial relationships were obtained between TL and the lipid weight PCB concentrations in the case of the spider crab food web, for each sampling area. However, the significant linear relations observed when decapod crustacean data were removed suggested that these congeners were eliminated in the

tissues of crustaceans, compared to those of lower trophic level organisms. These results supported the assumption that crustaceans possess strong PCB metabolic capacities, especially for congeners having only m,p vicinal H-atoms and those with both m,p and o,m vicinal H-atoms, due to the presence of the enzymatic system CYP2B (Phenobarbital-type enzymes) (Kannan et al., 1995; Brown and John, 1992; Goerke and Weber, 2001; Livingstone, 1998; James and Boyle, 1998; Bodin et al., submitted a, submitted b). To conclude, the use of relationships between trophic level and PCB concentrations in food webs provide first information on the biomagnification of the contaminants but also on the metabolisation capacities of the predatory species.

Acknowledgments

This work was partially funded by the Regional Council of Brittany. Moreover, we would like to thank fishermen who very kindly offered their help when sampling the crustaceans. The authors are grateful to Claire Le Gall, Audrey Morel and Charlie Scrimgeour for their participation to the chemical analysis and Pierre Bodenes for drawing the map.

References

Abarnou, A., Loizeau, V., Le Guellec, A-M., Jaouen-Madoulet A., 2002. Contaminants in marine foodwebs. Revue Médecine Vétérinaire153, 425-432.

Bernárdez, C., Freire, J., González-Gurriarán, E., 2000. Feeding of the spider crab *Maja squinado* in rocky subtidal areas of the Ría de Arousa (north-west Spain). Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom 80, 95-102.

Bodin, N., Abarnou, A., Le Guellec, A-M., Loizeau, V., Philippon, X., accepted. PCBs in decapod crustaceans from the coasts of Brittany and Normandy (France). Accepted in Chemosphere.

Bodin, N, Abarnou, A, Fraisse, D, Defour, S, Loizeau, V, Le Guellec, A-M, Philippon, X. submitted a. PCB, PCDD/F and PBDE levels and profiles in crustaceans from the coastal waters of Brittany and Normandy (France). Submitted to Marine Pollution Bulletin.

Bodin, N., Caisey, X., Abarnou, A., Loizeau, V., Latrouite, D., Le Guellec, A-M., Guillou, M., submitted b. PCB contamination of the spider crab *Maja brachydactyla*: influence of physiological and ecological processes. Submitted to Environmental Toxicology and Chemistry

Bodin, N., Le Loc'h, F., Hily, C., submitted c. Variability of stable isotopes of carbon and nitrogen among decapod crustacean tissues in relation with lipid content. Submitted to Functional Ecology.

Bodin, N., Le Loc'h, F., Hily, C., Caisey, X., Latrouite, D., Le Guellec, A-M., submitted d. Variability of stable isotopes signatures ($\delta^{13}C$ and $\delta^{15}N$) in two spider crab populations (*Maja brachydactyla*) in Western Europe. Submitted to Journal of Experimental Marine Biology and Ecology.

Boon, J.P., Eijgenraam, F., Everaarts, J.M., Duinker, J.C., 1989. A structure-activity relationship (SAR) approach towards metabolism of PCBs in marine animals from different trophic levels. Marine Environmental Research 27, 159-176.

Boon, J.P., Oostingh, I., van der Meer, J., Hillebrand, M.T.J., 1994. A model for the bioaccumulation of chlorobiphenyl congeners in marine mammals. European Journal of Pharmacology: Environmental Toxicology and Pharmacology 270, 237-251.

Brosnan, D.M., 1981. Studies on the biology, ecology and fishery of the spider crab *Maia squinado* Herbst (1788) off the West Coast of Ireland. M. Sc. Thesis. University College, Galway.

Brown, J., John, F., 1992. Metabolic alterations of PCB residues in aquatic fauna: distributions of cytochrome P4501A- and P4502B-like activities. Marine Environmental Research 34, 261-266.

Cabana, G., Rasmussen, J.B., 1996. Comparison of aquatic food chains using nitrogen isotopes. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 93, 10844-10847.

Carlisle, D.B., 1957. On the hormonal inhibition of moulting in decapod Crustacea. II. The terminal anecdysis in crabs. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom 36, 291-307.

Davenport, S.R., Bax, N.J., 2002. A trophic study of a marine ecosystem off southeastern Australia using stable isotopes of carbon and nitrogen. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 59, 514-530.

De Kergariou, G., 1974. Régime alimentaire de *Maja squinado*. International Council for the Exploration of the Sea, Comité des crustacés, coquillages et benthos, 1974/K:36, 6 pp.

Evenset, A., Christensen, G.N., Skotvold, T., Fjeld, E., Schlabach, M., Wartena, E., Gregor, D., 2004. A comparison of organic contaminants in two high Arctic lake ecosystems, Bjornoya (Bear Island), Norway. Science of the Total Environment 318, 125-141.

Fisk, A.T., Hobson, K.A., Norstrom, R.J., 2001. Influence of chemical and biological factors on trophic transfer of persistent organic pollutants in the Northwater Polynya marine food web. Environmental Science and Technology 35, 732-738.

Fisk, A.T., Hoekstra, P.F., Gagnon, J-M., Duffe, J., Norstrom, R.J., Hobson, K.A., Kwan, M., Muir, D.C.G., 2003. Influence of habitat, trophic ecology and lipids on, and spatial trends of, organochlorine contaminants in Arctic marine invertebrates Marine Ecology Progress Series 262, 201-214.

France, R.L., Peters, R.H., 1997. Ecosystem differences in the trophic enrichment of ^{13}C in aquatic food webs. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 54, 1255-1258.

Gamberg, M., Braune, B.M., 1999. Contaminant residue levels in arctic wolves (*Canis lupus*) from the Yukon Territory, Canada. Science of the Total Environment 243/244, 329-338.

Goerke, H., Weber, K., 2001. Species-specific elimination of polychlorinated biphenyls in estuarine animals and its impact on residue patterns. Marine Environmental Research 51, 131-149.

Grall, J., Le Loc'h, F., Guyonnet, B., Riera, P., (*accepted*). Community structure and food web based on stable isotopes ($\delta^{15}N$ and $\delta^{13}C$) analysis of a North Eastern Atlantic maerl bed, Journal of Experimental Marine Biology and Ecology.

Gray, J.S., 2002. Biomagnification in marine systems: the perspective of an ecologist. Marine Pollution Bulletin 45, 46-52.

Hansen, B.G., Paya-Perez, A.B., Rahman, M., Larsen, B.R., 1999. QSARs for Kow

and Koc of PCB congeners: a critical examination of data, assumptions and statistical approaches. Chemosphere 39, 2209-2228.

Hebert, C.E., Keenleyside, K.A., 1995. To normalize or not to normalize? Fat is the question. Environmental Toxicology and Chemistry 14, 801-807.

Hesslein R. H., Hallard K. A. and Ramlal P., 1993. Replacement of Sulfur, Carbon, and Nitrogen in Tissue of Growing Broad Whitefish (*Coregonus nasus*) in Response to a Change in Diet Traced by □^{34}S, □^{13}C, and □^{15}N. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 50: 2071-2076.

Hobson, K.A., Clark, R.G., 1992. Assessing avian diets using stable isotopes. 1. Turnover of C-13 in tissues. Condor 94, 181-188.

Hobson, K.A., Fisk, A., Karnovsky, N., Hoist, M., Gagnon, J.M., Fortier, M., 2002. A stable isotope (δ^{13}C, δ^{15}N) model for the North Water food web: implications for evaluating trophodynamics and the flow of energy and contaminants. Deep Sea Research II 49, 5131-5150.

Hoekstra, P.F., Braune, B.M., Wong, C.S., Williamson, M., Elkin B., Muir, D.C.G., 2003a. Profile of persistent chlorinated contaminants, including selected chiral compounds, in wolverine (*Gulo gulo*) livers from the Canadian Arctic. Chemosphere 53, 551-560.

Hoekstra, P.F., O'Hara, T.M., Fisk, A.T., Borgå, K., Solomon, K.R., Muir, D.C.G., 2003b. Trophic transfer of persistent organochlorine contaminants (OCs) within an Arctic marine food web from the southern Beaufort-Chukchi Seas. Environmental Pollution 124, 509-522.

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

James, M.O., Boyle, S.M., 1998. Cytochromes P450 in crustacea. Comparative Biochemistry and Physiology 121C, 157-172.

Jaouen-Madoulet, A., 2000. Distribution et effets biologiques des PCB et des HAP dans les organismes de l'Estuaire de Seine. Thèse de Doctorat, Université du Havre, Le Havre, France, 244 pp.

Jaouen-Madoulet, A., Abarnou, A., Le Guellec, A-M., Loizeau, V., Leboulenger, F., 2000. Validation of an analytical procedure for polychlorinated biphenyls, coplanar polychlorinated biphenyls and polycyclic aromatic hydrocarbons in environmental samples. Journal of Chromatography 886A, 153-173.

Kannan, N., Reusch, T.B.H., Schulz-Bull, D.E., Petrick, G., Duinker, J.C., 1995. Chlorobiphenyls: Model compounds for metabolism in food chain organisms and their potential use as ecotoxicological stress indicators by application of the metabolic slope concept. Environmental Science and Technology 29, 1851-1859.

Kidd, K.A., Schindler, D.W., Muir, D.C.G., Lockhart, W.L., Hesslein, R.H., 1995. High concentrations of toxaphene in fishes from a subarctic lake. Science 269, 240-242.

Kiriluk, R., Servos, M., Whittle, D., 1995. Using ratios of stable nitrogen and carbon isotopes to characterize the biomagnification of DDE, Mirex, and PCB in a Lake Ontario pelagic food web. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 52, 2660-2674.

Klamer, H.J.C., Leonards, P.E.G., Lamoree, M.H., Villerius, L.A., Ågkerman, J.E. Bakker, J.F., 2005. A chemical and toxicological profile of Dutch North Sea surface sediments. Chemosphere 58, 1579-1587.

Le Foll, D., 1993. Biologie et exploitation de l'araignée de mer *Maja squinado* Herbst en Manche Ouest. Thèse de doctorat, Université de Bretagne Occidentale, Brest, France, 463 pp.

Le Loc'h, F., Hily, C., 2005. Stable carbon and nitrogen isotope analysis of *Nephrops norvegicus* / *Merluccius merluccius* fishing grounds in the Bay of Biscay (Northeast Atlantic). Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 62, 123-132.

Livingstone, D.R., 1998. The fate of organic xenobiotics in aquatic ecosystems: quantitative and qualitative differences in biotransformation by invertebrates and fish. Comparative Biochemistry and Physiology 120A, 43-49.

Loizeau, V., 1993. Modélisation de la bioaccumulation des PCB dans un réseau trophique simple en Baie de Seine. Thèse de doctorat, Université d'Aix-Marseille II, Marseille, France, 234 pp.

Lorrain, A., Paulet, Y-M., Chauvaud, L., Savoye, N., Donval, A., Saout, C., 2002. Differential $\delta^{13}C$ and $\delta^{15}N$ signatures among scallop tissues: implications for ecology and physiology. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 275, 47-61.

Marchand, M., Caprais, J.C., Cosson-Mannevy, M.A., Morinière, P., 1983. Apports et distribution des résidus organochlorés à haut poids moléculaire dans la rade de Brest (milieu marin semi-fermé). Oceanologica Acta 6, 269-282.

McCutchan, J.H. Jr, Lewis, W.M. Jr, Kendall, C., McGrath, C.C., 2003. Variation in trophic shift for stable isotope ratios of carbon, nitrogen, and sulfur. Oikos 102, 378-390.

McFarland, V.A., Clarke, J.U., 1989. Environmental occurrence, abundance and potential toxicity of polychlorinated biphenyl congeners: considerations for a congeners-specific analysis. Environmental Health and Perspectives 91, 225-231.

Michener, R.H., Schell, D.M., 1994. Stable isotope tracers in marine aquatic food webs. In: K. Lajtha, R.H. Michener (eds). Stable isotopes in ecology and environmental science. Blackwell Scientific, London, pp. 138-157.

Minagawa M. and Wada E., 1984. Stepwise enrichment of 15N along food chains: further evidence and the relation between 15N and animal age. Geochemical Cosmochimical Acta 48: 1135-1140.

Moisey, J., Fisk, A.T., Hobsen, K.A., Norstrom, R.J., 2001. Hexachlorocyclohexane (HCH) isomers and chiral signatures of α-HCH in the arctic marine food web of the Northwater Polynya. Environmental Science and Technology 35, 1920-1927.

Muir, D.C.G., Norstrom, R.J., Simon, M., 1988. Organochlorine Contaminants in Arctic Marine Food Chains: Accumulation of Specific Polychlorinated Biphenyls and Chlordane-Related Compounds. Environmental Science and Technology 22, 1071-1079.

Muir, D.C.G., Savinova, T., Savinov, V., Alexeeva, L., Potelov, V., Svetochev, V., 2003. Bioaccumulation of PCBs and chlorinated pesticides in seals, fishes and invertebrates from the White Sea, Russia. Science of the Total Environment 306, 111-131.

Nhan, D.D., Am, N.M., Carvalho, F. P., Villeneuve, J-P., Cattini, C., 1999. Organochlorine pesticides and PCBs along the coast of North Vietnam. Science of The Total Environment, 237/238, 363-371.

Norstrom, R.J., Belikov, S.E., Born, E.W., Garner, G.W., Malone, B., Olpinski, S., Ramsay, M.A., Schliebe, S., Stirling, I., Stishov, M.S., Taylor, M.K., Wiig, O., 1998. Chlorinated hydrocarbon contaminants in polar bears from Eastern Russia, North America, Greenland, and Svalbard: biomonitoring of Arctic pollution. Archives of Environmental Contamination and Toxicology 35, 354-367.

Oelbermann, K., Scheu, S., 2002. Stable isotope enrichment ($\delta^{15}N$ and $\delta^{13}C$) in a generalist predator (*Pardosa lugubris*, Araneae: Lycosidae): effects of prey quality. Oecologia 130, 337-344.

Oliver, B.G., Niimi, A.J., 1988. Trophodynamic analysis of polychlorinated biphenyl

congeners and other chlorinated hydrocarbons in the Lake Ontario ecosystem. Environmental Science and Technology 22, 388-397.

Post, D..M., 2002. Using stable isotopes to estimate trophic position: models, methods, and assumptions. Ecology 83, 703-718.

Riera, P., Stal, L.J., Nieuwenhuize, J., Richard, P., Blanchard, G., Gentil, F., 1999. Determination of food sources for benthic invertebrates in a salt marsh (Aiguillon Bay, France) by carbon and nitrogen stable isotopes: importance of locally produced sources. Marine Ecology Progress Series 187, 301-307.

Ruus, A., Ugland, K.I., Espeland, O., Skaare, J.U., 1999. Organochlorine contaminants in a local marine food chain from Jarfjord, Northern Norway. Marine Environmental Research 48, 131-146.

Ruus, A., Ugland, K.I., Skaare, J.U., 2002. Influence of trophic position on organochlorine concentrations and composition patterns in a marine food web. Environmental Toxicology and Chemistry 21, 2356-2364.

Savoye, N., Aminot, A., Tréguer, P., Fontugne, M., Naulet, N. Kérouel, R., 2003. Dynamics of particulate organic matter $\delta^{15}N$ and $\delta^{13}C$ during spring phytoplankton bloom in a macrotidal ecosystem (Bay of Seine, France). Marine Ecology Progress Series 255, 27-41.

Stevcic, Z., 1967. Le complexe de la nourriture de l'araignée de mer *Maja squinado*. Helgoländer Wiss Meeresuntersuchungen 15, 630-636.

Strandberg, B., Bandh, C., Van Bavel, B., Bergqvist, P-A., Broman, D., Ishaq, R., Näf, C., Rappe, C., 2000. Organochlorine compounds in the Gulf of Bothnia: sediment and benthic species. Chemosphere 40, 1205-1211.

Tessier, L., 2003. Transport et caractérisation des matières en suspension dans le bassin versant de la Seine: identification de signatures naturelles anthropiques. Thèse de doctorat, Ecole Nationale des Ponts et Chaussée, Paris, France.

Thomann, R.V., 1989. Bioaccumulation model of organic chemical distribution in aquatic food chains. Environmental Science and Technology 23, 699-707.

Table and figure list

Table 1. Nitrogen and carbon stable isotopic values (mean ‰ ± SD) of spider crab food web components from the Seine Bay (Antifer) and the Iroise Sea (Corbin Rock and Bertheaume Bay), and corresponding derived trophic level (TL). Feeding mode is listed for invertebrates.

Table 2. Mean ± SE of lipid content (% d.w.) and CB153 concentrations ($ng.g^{-1}$d.w.) of spider crab food web components from the Seine Bay (Antifer) and the Iroise Sea (Corbin Rock and Bertheaume Bay). SOM = Sedimented Organic Matter; Juv = Juveniles; Ad = Adults

Table 3. Food web magnification factors (FWMF) for PCB congeners linearly related to TL in the spider crab food web from the Seine Bay (Antifer) and the Iroise Sea (Corbin Rock and Bertheaume Bay).

Fig. 1. Map of the studied geographical zones: the Iroise Sea and the Seine Bay.

Fig. 2. Proportions of polychlorinated biphenyl (PCB) congeners with different chlorination degrees as percentage of Σ_{14}PCBs in the spider crab food web components from the Seine Bay (Antifer) and the Iroise Sea (Corbin Rock and Bertheaume Bay). Error bars indicate standard deviation. Sed = sediment; Dep = Deposit feeders; Alg-Pha = Algae and phanerogame; Graz = Grazers; Susp = Suspension feeders; Scav = Scavangers; Carn = Carnivores.

Fig. 3. Relationships between mean trophic level (TL) and mean PCB concentrations (Ln[CBx]-lipid normalized) in the spider crab food web components from the Seine Bay (Antifer) and the Iroise Sea (Corbin Rock and Bertheaume Bay). Error bars indicate standard deviation. A = *Asterias rubens*; B = *Balanus* sp.; Cm = *Carcinus maenas*; Co = *Corallina officinalis*; Cs = *Chamelea striatula*; D = *Dosinia exoleta*; E = *Echinus esculentus*; Ec = *Echinocardium cordatum*; G = *Gibbula umbilicalis*; H = *Hinia reticulata*; L = *Laminaria digitata*; Ma = *Maja brachydactyla* (Adults); Mj = *Maja brachydactyla* (Juveniles); Me = *Mytilus edulis*; Nh = *Nephtys hombergii*; Np = *Necora puber*; O = *Ophiura texturata*; Pb = *Pagurus bernhardus*; Pv = *Patella vulgata*; S = *Spisula solida*; Sd = sediment; T = *Tellina tenuis*; Z = *Zostera marina.*

Table 1. Nitrogen and carbon stable isotopic values (mean ‰ ± SD) of spider crab food web components from the Seine Bay (Antifer) and the Iroise Sea (Corbin Rock and Bertheaume Bay), and corresponding derived trophic level (TL). Feeding mode is listed for invertebrates.

Species	Feeding mode	Antifer				Corbin				Bertheaume			
		N	$\delta^{13}C$	$\delta^{15}N$	TL	N	$\delta^{13}C$	$\delta^{15}N$	TL	N	$\delta^{13}C$	$\delta^{15}N$	TL
Particulate Organic Matter (POM)													
Sedimented Organic Matter (SOM)		2	-20.2 ± 1.0	4.8 ± 0.2	1.1 ± 0.1					4	-20.2 ± 1.3	3.6 ± 1.1	1.0 ± 0.3
Algae-Phanerogame													
Laminaria digitata		4	-16.3 ± 0.9	6.2 ± 0.4	1.5 ± 0.1	5	-18.3 ± 1.1	5.3 ± 0.6	1.4 ± 0.2				
Corallina officinalis		3	ND	5.5 ± 0.5	1.3 ± 0.1	4	ND	5.9 ± 0.3	1.6 ± 0.1				
Zostera marina										4	-17.4 ± 1.2	6.2 ± 0.5	1.7 ± 0.1
Polychaete													
Glycera rouxii	carnivore									4	-20.5 ± 0.2	12.4 ± 0.5	3.5 ± 0.1
Nephtys hombergii	carnivore	5	-18.1 ± 0.9	11.5 ± 0.6	3.1 ± 0.2					3	-19.8 ± 0.1	10.8 ± 0.1	3.1 ± 0.02
Notomastus latericeus	deposit feeder					2	-17.4	11	3.1	4	-20.6 ± 1.3	8.6 ± 0.4	2.4 ± 0.1
Owenia fusiformis	deposit feeder	3	-18.6 ± 0.3	12.2 ± 0.3	3.3 ± 0.1								
Bivalve													
Chamelea striatula	suspension feeder									5	-19.8 ± 0.3	8.9 ± 0.4	2.5 ± 0.1
Clausinella fasciata	suspension feeder					2	-20.2 ± 0.7	8.3 ± 0.4	2.3 ± 0.1				
Dosinia exoleta	suspension feeder	1	-19.8	8.5	2.2	5	-19.1 ± 0.9	8.4 ± 0.5	2.3 ± 0.2				
Glycymeris glycymeris	suspension feeder					4	-19.6 ± 0.4	8.3 ± 0.3	2.3 ± 0.1				
Mytilus edulis	suspension feeder	8	-21.0 ± 0.3	7.9 ± 0.2	2.0 ± 0.1	10	-19.0 ± 0.4	7.3 ± 0.3	2.0 ± 0.1	3	-21.0 ± 0.7	7.2 ± 0.4	2.0 ± 0.1
Spisula solida	suspension feeder	2	-19.1 ± 0.1	9.5 ± 0.1	2.5 ± 0.04								
Tellina tenuis	deposit feeder					1	-18.7	8.8	2.5	5	-18.7 ± 0.3	7.1 ± 0.3	2.0 ± 0.1
Gastropod													
Gibbula umbilicalis	grazer	10	-17.0 ± 0.8	8.9 ± 0.3	2.3 ± 0.1					6	-17.0 ± 0.8	9.4 ± 0.3	2.7 ± 0.1
Hinia reticulata	scavanger	9	-17.3 ± 0.4	13.2 ± 0.6	3.6 ± 0.2	3	-18.5 ± 0.3	11.6 ± 0.8	3.3 ± 0.2	10	-17.7 ± 0.6	13.0 ± 0.4	3.7 ± 0.1
Patella vulgata	grazer	9	-16.5 ± 0.3	10.1 ± 0.4	2.7 ± 0.1	6	-16.4 ± 1.1	8.8 ± 0.8	2.5 ± 0.2				

Table 1. (*Continued*)

Species	Feeding mode	Antifer				Corbin				Bertheaume			
		N	$\delta^{13}C$	$\delta^{15}N$	TL	N	$\delta^{13}C$	$\delta^{15}N$	TL	N	$\delta^{13}C$	$\delta^{15}N$	TL
Echinoderm													
Asterias rubens	carnivore	4	-15.7 ± 1.2	11.4 ± 1.1	3.1 ± 0.3	5	-16.8 ± 1.4	10.2 ± 0.6	2.9 ± 0.2	4	-16.5 ± 0.9	11.8 ± 0.8	3.4 ± 0.2
Echinocardium cordatum	deposit feeder	5	-18.9 ± 0.6	6.5 ± 0.8	1.6 ± 0.2					5	-18.4 ± 1.1	7.4 ± 1.0	2.1 ± 0.3
Echinus esculentus	grazer					2	-19.2 ± 0.6	8.6 ± 0.1	2.4 ± 0.04				
Marthasterias glacialis	carnivore					5	-15.5 ± 0.8	9.8 ± 0.9	2.8 ± 0.3				
Ophiotrix fragilis	suspension feeder					4	-20.4 ± 1.3	10.2 ± 0.6	2.9 ± 0.2				
Ophiura texturata	carnivore					8	-18.5 ± 1.1	11.5 ± 0.8	3.2 ± 0.2				
Crustacean													
Balanus sp.	suspension feeder	8	-18.8 ± 0.4	8.4 ± 0.3	2.2 ± 0.1	4	-17.6 ± 0.9	9.4 ± 0.6	2.6 ± 0.2				
Carcinus maenas	carnivore	2	-15.1 ± 1.0	14.2 ± 0.6	3.9 ± 0.2								
Corystes cassivelaunus	carnivore	3	-17.3 ± 0.5	13.6 ± 0.1	3.7 ± 0.04								
Liocarcinus holsatus	carnivore									1	-17.9	12.4	3.6
Macropodia deflexa	carnivore									5	-19.3 ± 1.1	9.2 ± 0.6	2.6 ± 0.2
Maja brachydactyla (Juv)	omnivore	24	-15.2 ± 0.9	12.9 ± 0.5	3.5 ± 0.2					30	-16.5 ± 0.8	12.5 ± 0.4	3.6 ± 0.1
Maja brachydactyla (Ad)	omnivore	6	-15.0 ± 0.9	13.0 ± 0.7	3.5 ± 0.2	11	-15.9 ± 0.6	13.1 ± 0.4	3.7 ± 0.1				
Necora puber	carnivore	1	-16.3	14	3.8					1	-17.7	13.1	3.7
Pagurus bernhardus	carnivore	5	-17.2 ± 0.8	10.7 ± 0.3	2.8 ± 0.1	6	-17.0 ± 0.7	9.7 ± 0.5	2.7 ± 0.1	5	-17.5 ± 1.0	9.2 ± 0.6	2.6 ± 0.2
Pisidia longicornis	suspension feeder					5	-19.4 ± 0.7	7.3 ± 0.5	2.0 ± 0.1				

Table 2. Mean ± SE of lipid content (% d.w.) and CB153 concentrations (ng.g^{-1}d.w.) of spider crab food web components from the Seine Bay (Antifer) and the Iroise Sea (Corbin Rock and Bertheaume Bay). SOM = Sedimented Organic Matter; Juv = Juveniles; Ad = Adults

Species	**Antifer**		**Corbin**		**Bertheaume**	
	Lipid (%)	CB153	Lipid (%)	CB153	Lipid (%)	CB153
SOM		3.08				1.65
Algae-Phanerogame						
Laminaria digitata	3.12	6.4 ± 1.4	1.9	0.1 ± 0.07		
Corallina officinalis	2.28	3.5 ± 1.4	2.1	0.09 ± 0.05		
Zostera marina					1.0	0.26 ± 0.08
Polychaete						
Nephtys hombergii	9.72	40.7				
Bivalve						
Chamelea striatula					6.4	3.2
Dosinia exoleta			9.0	1.7		
Mytilus edulis	13.3	134.2 ± 12.7	7.7	2.6 ± 0.4	8.9	6.7 ± 1.7
Spisula solida	5.9	55.9				
Tellina tenuis					8.1	5.6
Gibbula umbilicalis	5.4	89.9 ± 3.5			8.5	5.0 ± 0.9
Gastropod						
Hinia reticulata	4.2	48.8			3.8	12.2
Patella vulgata	10.2	84.8 ± 5.2	7.0	1.3 ± 0.7		
Echinoderm						
Asterias rubens	6.69	196.8 ± 14	8.0	4.2 ± 0.8	5.2	10.6 ± 2.8
Echinocardium cordatum	0.84	5.5			0.7	1.2
Echinus esculentus			17.3	2.0 ± 0.2		
Ophiura texturata			3.3	16.3		
Crustacean						
Balanus sp.	5.1	82.9 ± 6.2	6.0	8.0 ± 1.1		
Carcinus maenas	4.4	90.6				
Maja brachydactyla (Juv)	6.9	238.2 ± 81.0			9.1	47.2 ± 19.2
Maja brachydactyla (Ad)	7.6	655.5 ± 342.4	10.3	127.8 ± 49.6		
Necora puber	5.7	98.5			2.9	7.9
Pagurus bernhardus	6.3	102 ± 11.5	5.0	11.3	6.9	18.8 ± 1.6

Table 3. Food web magnification factors (FWMF) for PCB congeners linearly related to trophic level in the spider crab food web from the Seine Bay (Antifer) and the Iroise Sea (Corbin Rock and Bertheaume Bay).

	Antifer			**Corbin**			**Bertheaume**		
	r^2	*p*	FWMF	r^2	*p*	FWMF	r^2	*p*	FWMF
CB105	0.49	<0.01	3.4	0.56	<0.01	8.1	0.66	<0.01	3.9
CB118	0.79	<0.01	6.6	0.86	<0.01	10.8	0.86	<0.01	5.2
CB128	0.54	<0.01	4.5	0.62	<0.01	6.4	0.51	<0.01	3.4
CB138	0.49	<0.01	3.7	0.53	<0.01	4.4	0.42	<0.05	2.9
CB153	0.81	<0.01	9.0	0.86	<0.01	15.3	0.76	<0.01	4.1
CB156	0.51	<0.01	2.1	0.44	<0.01	2.5	0.32	<0.05	1.9
CB170	0.73	<0.01	6.4	0.90	<0.01	17.3	0.81	<0.01	6.0
CB180	0.75	<0.01	4.5	0.67	<0.01	16.8	0.63	<0.01	4.4
CB187	0.58	<0.01	5.2	0.65	<0.01	5.0	0.48	<0.01	3.0

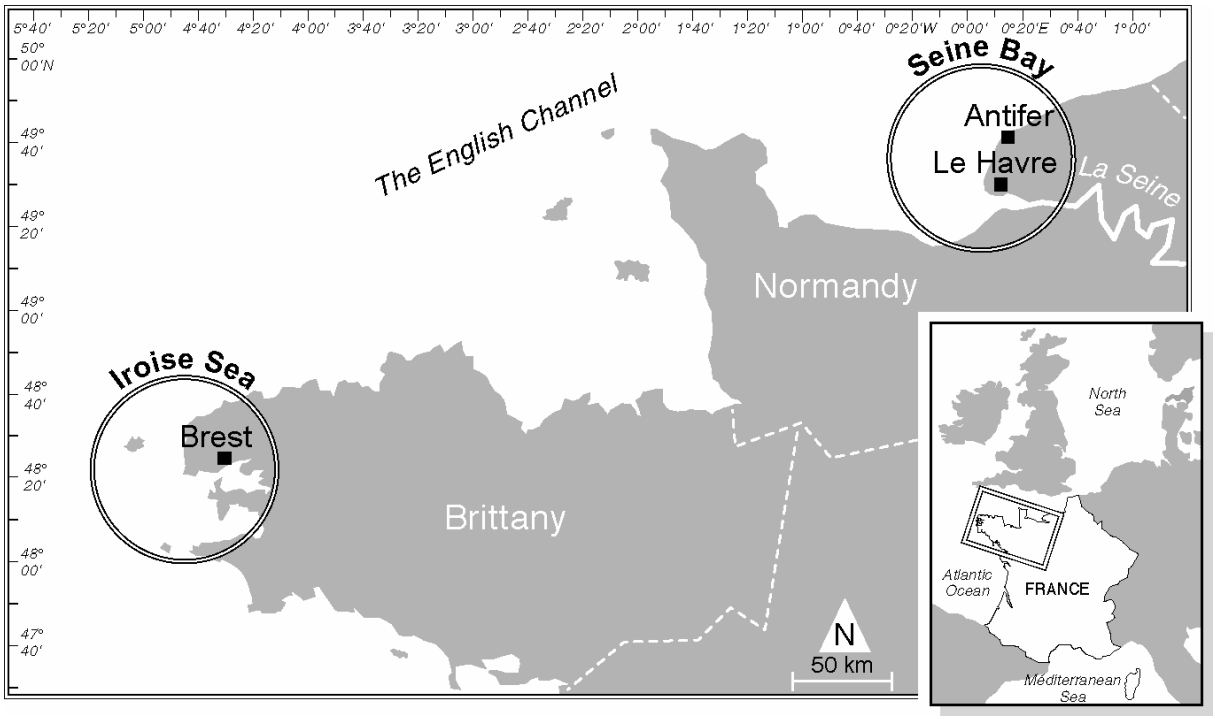

Fig. 1. Map of the studied geographical zones: the Iroise Sea and the Seine Bay.

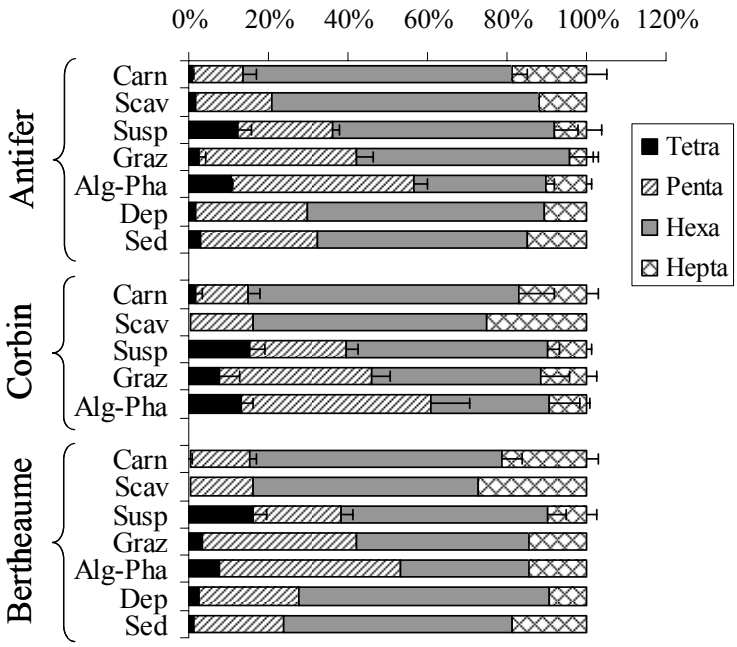

Fig. 2. Proportions of polychlorinated biphenyl (PCB) congeners with different chlorination degrees as percentage of Σ_{14}PCBs in the spider crab food web components from the Seine Bay (Antifer) and the Iroise Sea (Corbin Rock and Bertheaume Bay). Error bars indicate standard deviation. Sed = Sedimented Organic Matter; Dep = Deposit feeders; Alg-Pha = Algae and phanerogame; Graz = Grazers; Susp = Suspension feeders; Scav = Scavanger; Carn = Omnivores-carnivores.

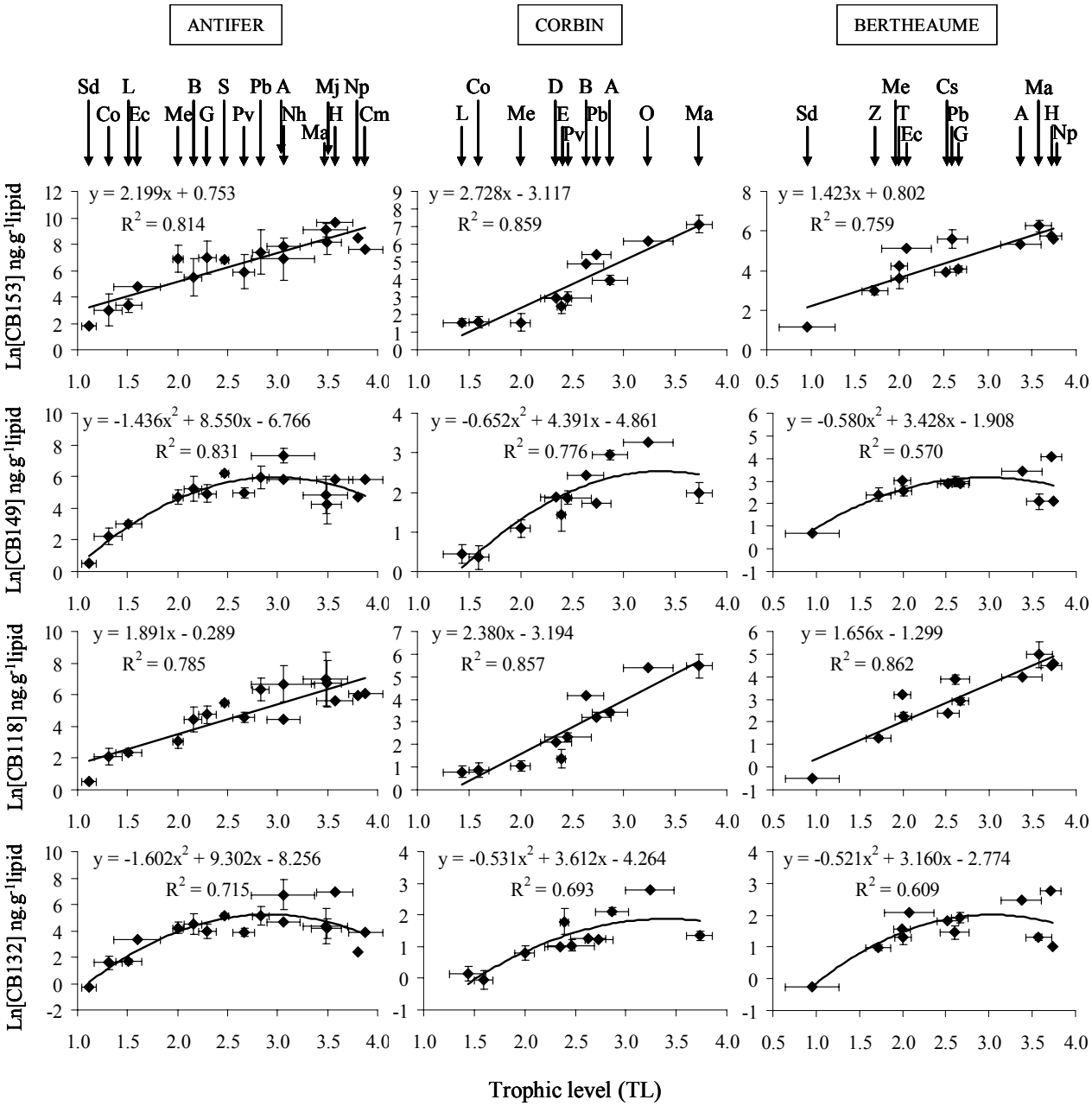

Fig. 3. Relationships between mean trophic level (TL) and mean PCB concentrations (ln[CBx]-lipid normalized) in the spider crab food web components from the Seine Bay (Antifer) and the Iroise Sea (Corbin Rock and Bertheaume Bay). Error bars indicate standard deviation. A = *Asterias rubens*; B = *Balanus* sp.; Cm = *Carcinus maenas*; Co = *Corallina officinalis*; Cs = *Chamelea striatula*; D = *Dosinia exoleta*; E = *Echinus esculentus*; Ec = *Echinocardium cordatum*; G = *Gibbula umbilicalis*; H = *Hinia reticulata*; L = *Laminaria digitata*; Ma = *Maja brachydactyla* (Adults); Mj = *Maja brachydactyla* (Juveniles); Me = *Mytilus edulis*; Nh = *Nephtys hombergii*; Np = *Necora puber*; O = *Ophiura texturata*; Pb = *Pagurus bernhardus*; Pv = *Patella vulgata*; S = *Spisula solida*; Sd = Sedimented Organic Matter; T = *Tellina tenuis*; Z = *Zostera marina.*

Nouveau Chapitre de Thèse : Valorisation des compétences

Sujet de thèse :

Contamination des crustacés décapodes exploités par les composés organohalogénés.

Cas particulier de la bioaccumulation des PCB chez l'araignée de mer *Maja brachydactyla*

Doctorante : Nathalie Bodin

École Doctorale des Sciences de la Mer

Université de Bretagne Occidentale

Directeur de thèse : Dr. M. Guillou

Mentor : Ph. Bertheuil

1. CADRE GENERAL ET ENJEUX DE LA THESE

Sujet : Les contaminants organiques lipophiles tels que les polychlorobiphényles, les dioxines et les polybromodiphényles éthers sont des composés très persistants et ubiquistes dans l'environnement ; le milieu littoral, en particulier, constitue un récepteur important de telles substances. Par leurs caractéristiques physico-chimiques, ces composés ont la particularité de s'accumuler dans les tissus riches en lipides, entraînant ainsi des teneurs de plus en plus élevées au fur et à mesure que l'on monte dans la chaîne trophique, jusqu'au prédateur final, l'homme. Les crustacés décapodes tels que l'araignée de mer, le tourteau, l'étrille et la langoustine sont des espèces de niveau trophique élevé du fait de leur régime alimentaire qualifié d'opportuniste, et sont très exploitées et consommées par la population française. Pour ces diverses raisons, le premier objectif de mon travail de thèse était de mesurer les niveaux de contamination de trois classes de contaminants dans les différents tissus des crustacés, ainsi que d'évaluer les risques sanitaires pour l'homme suite à la consommation de telles espèces. Dans un second temps, il s'agissait d'évaluer les variations des concentrations en polychlorobiphényles, composés marqueurs, en fonction du cycle de vie des crustacés, en utilisant l'araignée de mer comme organisme modèle.

Equipes : Mon sujet de recherche doctorale a été présenté conjointement par les départements Biogéochimie et Ecotoxicologie (BE) et Sciences et Technologies Halieutiques (STH) de l'Ifremer. Mes trois années de thèse se sont déroulées au sein du département BE du centre Ifremer de Brest.

Encadrants	**Laboratoires**	**Discipline**
A. Abarnou : responsable scientifique	DCN-BE-ARC, Ifremer	Chimie organique
D. Latrouite : responsable scientifique	DCB-STH-UDPP, Ifremer	Biologie des crustacés
M. Guillou : directeur de thèse	LEMAR, UMR 6539 CNRS, IUEM, Université de Bretagne Occidentale	biologie, écophysiologie des invertébrés

DCN-BE-ARC : Direction du Centre de Nantes, Département Biogéochimie et Ecotoxicologie, Laboratoire Analyse des Risques Chimiques

DCB-STH-UDPP : Direction du Centre de Brest, Département Sciences et Technologies Halieutiques, Unité Dynamique des Populations et des Peuplements

LEMAR-UMR 6539 CNRS, IUEM, UBO : Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin, Unité mixte de Recherche CNRS / Université de Bretagne Occidentale. Ce laboratoire fait partie de l'Institut Universitaire Européen de la Mer (IUEM) de l'Université de Bretagne Occidentale (UBO).

Place de la thèse dans les activités des départements BE et STH

• Le Département Biogéochimie et Ecotoxicologie mène des recherches sur la biogéochimie des contaminants organiques et inorganiques et leur toxicité sur les organismes et les populations des écosystèmes côtiers. La finalité de ces activités est de fournir aux "décideurs" les bases scientifiques et les outils nécessaires aux évaluations d'impact et de risques écologiques liés à la contamination chimique, afin de promouvoir la gestion durable et intégrée des ressources marines.

• Le Département Sciences et Technologies Halieutiques est chargé d'établir des diagnostics et avis, et proposer des solutions d'aménagements des pêcheries, en réponse à la demande sociétale émanant des Institutions, de la profession et du public, pour une exploitation durable des ressources halieutiques.

Appartenance de la thèse à des réseaux scientifiques et/ou industriels

• *Programme scientifique Seine-Aval :* Ce programme, multidisciplinaire et favorisant la recherche appliquée, a été initié pour faciliter la compréhension d'un estuaire fortement anthropisé et aider à la prise de décisions publiques.

• *Projet « Contamination Chimique et Santé » :* L'objectif est d'évaluer la «contribution marine» à l'exposition de l'homme aux contaminants chimiques par la consommation de produits de la mer.

2. FINANCEMENTS, GESTION ET COUT DU PROJET

Une bourse doctorale cofinancée région Bretagne/Ifremer a été obtenue pour ce projet, la région finançant à 50 % le salaire du doctorant.

Ressources humaines	Type travail	Temps (mois)	Salaire mensuel brut (€)	Coût (€)	Financement
• Doctorant		3*12 mois	1 280	46 080	Ifremer / Région
• Cadres	Encadrement	3*3*2 mois	8 320	149 760	Ifremer / CNRS
• Techniciens	Prélèvements, Analyses	4 mois	5 860	23 440	Ifremer
Coût total				**219 280**	

Dépenses	Nombre	Coût unitaire (€)	Coût (€)	Financement
Missions				
• Prélèvements				
- Plongeurs	32 plongées	40	1 280	
- Embarcation	14 sorties	500	7 000	Ifremer
- Pêcheurs professionnels	Achats crustacés + bars		443	
- Hébergement, transport, restauration	18 missions		2 097	
• Réunions, colloques, séminaires				
- RITMER, Brest			0	
- Seine-Aval, Rouen			189	
- ECSA, Rouen			329	Ifremer
- FECS, Bordeaux			521	
- CARSO, Lyon			255	
- SETAC, Lille			554	
Analyses				
• PCB (Brest)	819 analyses	162	132 678	Ifremer
• Isotopes Stables				
- Analyses (Ecosse)	542 analyses	5.8	3 144	Ifremer
- Matériel	542 capsules étain	0.55	299	
• PCB, PCDD/F et PBDE (Lyon)	14 analyses	1 000	14 000	Ifremer / Seine-Aval
Investissement				
• Ordinateur		1 504	1 504	Ifremer
Coût total			**164 293**	

3. PREPARATION ET CADRAGE DU PROJET

Etapes clés

Les principales étapes du projet ont été établies en équipe au début du contrat de travail. Une fois les principaux objectifs de ma thèse précisés (choix des contaminants, choix des espèces cibles) et le protocole analytique maîtrisé et validé, j'ai élaboré la stratégie d'échantillonnage adaptée (moyens techniques et humains, dates de prélèvement, coûts), et réalisé l'ensemble des mesures de façon totalement autonome durant 18 mois.

Les différentes étapes ont été les suivantes :

- Novembre 2002 à décembre 2002 : étude bibliographique sur la biologie des crustacés et sur la bioaccumulation des contaminants organiques chez ces espèces, ainsi que mise en place de la stratégie d'échantillonnage.
- Janvier 2003 à février 2003 : apprentissage, amélioration et validation du protocole d'analyses chimiques.
- Mars 2003 à avril 2005 : échantillonnage, analyses chimiques en laboratoire, traitement des données, valorisation dans des colloques scientifiques.
- Mai 2005 à octobre 2005 : bibliographie sur la modélisation de la bioaccumulation des contaminants organiques dans les organismes vivants, essais de modélisation de la bioaccumulation des polychlorobiphényles chez l'araignée de mer grâce aux données obtenues, valorisation des résultats sous forme de publications scientifiques, rédaction du manuscrit de thèse.

Modalités de travail

Deux fois par an, j'étais tenue de rendre un rapport d'avancement destiné aux deux organismes financeurs, l'Ifremer et la Région Bretagne. Tout au long de la thèse, j'ai établi de nombreux contacts avec des scientifiques d'origines variées (Ifremer, CNRS, IRD, Muséum d'Histoire Naturelle, Université de Bretagne Occidentale, Université du Havre, Université de Bordeaux 1, Université de Paris VI) et de compétences diverses (chimistes, biologistes, écophysiologistes, écotoxicologistes, écologistes, systématiciens, modélisateurs...). De plus, j'organisais des réunions de travail (équivalent à des comités de thèse) deux fois par an, regroupant mes trois encadrants mais également des personnes extérieures (Ifremer, Universités, IRD, Muséum d'Histoire Naturelle, CNRS) proches de mon sujet de travail. Enfin, j'ai participé à de nombreux séminaires et colloques scientifiques au cours desquels j'ai

présenté mes résultats, permettant ainsi des échanges fructueux et des avis extérieurs indispensables pour le bon déroulement d'une thèse.

Problèmes rencontrés et solutions apportées

Lors de la phase d'échantillonnage, plusieurs étapes se sont succédées. Tout d'abord il s'est agi de prendre contact avec des pêcheurs professionnels dans cinq zones de prélèvement différentes, dans l'objectif d'acheter des crustacés. En plus d'obtenir des individus de sexe et taille spécifiques, je devais également connaître les coordonnées exactes des points de prélèvement. Il a fallu leur exposer clairement le projet de l'étude tout en restant bien entendu très diplomate, et en particulier leur expliquer que mon travail n'était pas destiné à empêcher le leur.

Ensuite, concernant les prélèvements en zone côtière lors des périodes printanières et estivales, j'ai dû gérer des équipes de plongeurs professionnels (2 à 5 personnes), ainsi que la disponibilité des embarcations. Pour plus de facilité et de liberté, j'ai passé mon permis côtier afin d'être présente à chaque sortie en mer, de gérer les prélèvements (en quantité et qualité), et ainsi m'affranchir de la gestion de l'emploi du temps d'une énième personne. Malgré les conditions climatiques difficiles rencontrées à Brest (houle, vent, manque de visibilité), les prélèvements se sont très bien déroulés puisque les moyens humains et techniques étaient sur place. Par contre, ma seconde zone d'étude se situait en Baie de Seine. En raison du coût très élevé des déplacements humain et matériel sur zone, ainsi que du risque des mauvaises conditions météorologiques, j'ai dû contacter différents clubs de plongée-loisir pour leur demander de l'aide. J'ai finalement eu de très bons contacts avec des plongeurs « apnéistes » qui ont réalisé 80% des prélèvements en Baie de Seine. Enfin, pour réduire les frais et les temps de déplacement, j'ai négocié avec le Professeur F. Leboulenger, responsable du LEMA (Laboratoire d'Ecotoxicolooge et des Milieux Aqautiques) de l'Université des Sciences du Havre, la possibilité de stocker les nombreux prélèvements des plongeurs, me permettant de faire un seul voyage au Havre tous les trois mois.

4. COMPETENCES ACQUISES ET DEVELOPPEES, QUALITES PROFESSIONNELLES ET PERSONNELLES

Domaines d'expertise scientifiques et techniques

Par sa pluridisciplinarité, cette thèse m'a permis d'acquérir de nombreuses connaissances. Tout d'abord, en termes de travail de terrain, je suis apte à établir un protocole

d'échantillonnage en fonction d'un sujet d'étude. J'ai appris à utiliser différentes techniques de prélèvement (échantillonnage d'espèces planctoniques ou benthiques, ou de sédiment). De même, la connaissance et la maîtrise des différentes procédures de prélèvements sont indispensables lorsque ceux-ci sont destinés à l'analyse de traces (évitement des risques de contamination entre le prélèvement en mer et l'analyse au laboratoire).

De formation initiale en biologie, j'ai dû m'initier à l'analyse chimique. Je suis désormais en mesure de suivre, améliorer et valider un protocole analytique tout en suivant une démarche d'« assurance qualité ».

Mon sujet de thèse se situe à la frontière entre la biologie et la chimie. Une étude bibliographique détaillée à la fois sur la biologie (cycle biologique, physiologie de l'organisme), la pêche et la consommation des crustacés, ainsi que sur la chimie des contaminants organiques (origines, caractéristiques physico-chimiques, comportement dans l'environnement, écotoxicologie et toxicologie) a d'abord été indispensable. J'ai également approfondi mes connaissances concernant les processus de bioaccumulation des contaminants dans les organismes, d'organotropisme et de bioamplification le long des chaînes trophiques. A cela s'ajoutent les réglementations environnementales et sanitaires avec lesquelles j'ai dû me familiariser. Enfin, j'ai acquis la maîtrise de logiciels de statistiques, comme Statistica ou S Plus, nécessaires pour le traitement des bases de données biologiques et chimiques. Je me suis également initiée au logiciel de modélisation Stella, ainsi qu'au concept du modèle DEB (Dynamic Energy Budget).

Compétences méthodologiques

• *Gestion du temps et du projet*

Trois ans pour s'approprier un sujet de thèse et le mener à bien est un temps très court. Il est tout d'abord très important de réaliser une bonne synthèse bibliographique afin de savoir ce qui a déjà été réalisé. Ensuite, malgré les intempéries et les problèmes techniques ou humains, j'ai dû respecter le temps imparti à mon échantillonnage. En effet, travaillant sur des organismes vivants, mes dates de prélèvements dépendaient du cycle biologique de l'espèce ; un retard trop considérable aurait pu m'empêcher de réaliser mes prélèvements au cours des deux premières années de ma thèse, et donc aurait rallongé celle-ci d'au moins un an. De plus, j'ai réalisé plus de 800 analyses chimiques lors de ces 2 premières années. Ce travail de laboratoire m'a demandé un important effort d'organisation en terme de temps et de matériel (gestion des échantillons, de la verrerie, des appareils instrumentaux). Enfin, parallèlement à

ces activités, différentes étapes de valorisation de mon travail m'ont également appris à gérer mon temps et à respecter les délais :

- la recherche sur Internet des différents colloques scientifiques dans lesquels mon sujet de thèse s'insérait,
- la rédaction des résumés scientifiques en un temps imparti pour que mes communications soient acceptées lors de ces congrès,
- le rendu des rapports d'avancement et du manuscrit de thèse à des dates fixes.

Ainsi, ma thèse s'est déroulée en 3 ans exactement.

• *Savoir-faire organisationnel et administratif*

Au cours de ma thèse, mes déplacements ont été très nombreux concernant aussi bien la partie échantillonnage que celle de valorisation lors de colloques. Ces missions, comprenant les réservations de véhicules de service, des embarcations, de l'hôtel), ainsi que l'inscription aux colloques, nécessitaient une organisation rigoureuse. L'ensemble de ces tâches m'a appris à gérer un budget ainsi que les procédures administratives.

• *Méthodologie de synthèse et de communication*

La communication est essentielle dans la recherche. Un simple exemple est celui de la publication d'un article. L'auteur doit souvent répondre aux critiques et observations des personnes avisées et re-travailler sa version. Ce processus répété plusieurs fois m'a apporté une rigueur certaine concernant la clarté et la formulation précise des informations, afin que le contenu soit facilement compréhensible.

Ma participation active à de nombreux colloques scientifiques (RITMER à Brest, ECSA à Rouen, FECS à Bordeaux et SETAC à Lille), séminaires (Seine-Aval à Rouen), formations et réunions de département m'a également appris à synthétiser et présenter des résultats. Ces communications tant écrites qu'orales étaient présentées en français ou en anglais.

Enfin, mes contacts avec les professionnels de la mer m'ont permis et appris à discuter de manière non scientifique autour de mon sujet, et ainsi d'évaluer l'impact et l'importance d'une telle étude pour ces personnes.

• *Travail en équipe, encadrement et enseignement*

Lors des campagnes de prélèvement, j'ai été amenée à manager une équipe de plongeurs professionnels. Afin que la sortie en mer soit efficace, je devais planifier :

- la zone et la date de prélèvement en fonction des conditions météorologiques (houle, vent, heures des marées)
- les quantités et qualités des espèces à prélever

Pendant ces trois années, j'ai également eu l'occasion d'encadrer plusieurs stagiaires (IUT de Chimie ; Licence et Maîtrise de Biologie des Populations et des Ecosystèmes), ainsi que d'enseigner à des élèves en Master Professionnel, sur le thème de la contamination chimique du milieu marin.

Qualités personnelles

Cette thèse a été aussi l'occasion pour moi de m'affirmer. Les diverses compétences que j'ai acquises ou consolidées lors de ce projet de 3 ans sont la capacité d'adaptation, la persévérance, la rigueur, la communication, le travail en équipe, la curiosité, et enfin la créativité.

5. RESULTATS, IMPACTS

Impacts pour l'équipe et les organismes financeurs

En plus de mon manuscrit de thèse, ce travail a donné lieu à la rédaction de nombreux articles scientifiques édités dans différents journaux internationaux. Ces articles ne peuvent que contribuer à la notoriété du laboratoire et renforcer sa position. J'ai également présenté mon travail lors de nombreux colloques nationaux et internationaux. Ces interventions m'ont permis de prendre contact avec des personnalités extérieures, chercheurs ou professionnels de différents secteurs économiques, en France ou à l'étranger. Ces contacts seront suivis par mon responsable scientifique afin établir des collaborations futures.

Mes pistes professionnelles

Ces trois années d'expérience dans un laboratoire de recherche n'ont fait que renforcer mon souhait de poursuivre dans ce domaine. Ainsi, suite aux interventions que j'ai effectuées dans différents colloques scientifiques, j'ai pris contact avec des chercheurs travaillant dans des laboratoires mixtes Université-CNRS. J'ai ainsi obtenu la possibilité d'effectuer un contrat à durée déterminée en tant qu'Attaché Temporaire à l'Enseignement et à la Recherche. Ce poste me permettra d'appliquer les compétences acquises à d'autres thématiques de recherche, mais également de découvrir un autre domaine, l'enseignement, que, jusqu'ici, je n'ai fait que survoler.

Résumé

Les crustacés décapodes marins sont des organismes macrobenthiques opportunistes, d'intérêt commercial, et susceptibles d'accumuler les contaminants. Dans un souci de sécurité du consommateur, une évaluation de la contamination de quatre espèces principales par les polychlorobiphényles (PCB), les polybromodiphényles éthers (PBDE) et les dioxines (PCDD/F) a été réalisée dans les eaux côtières de Bretagne et Normandie. Au regard des normes sanitaires actuelles, la consommation de chair de crustacés ne pose aucun problème de santé publique. Dans une seconde partie, les processus biologiques influant sur la bioaccumulation des polychlorobiphényles chez l'araignée de mer *Maja brachydactyla* ont été appréhendés. D'un point de vue quantitatif, l'organotropisme, le régime alimentaire et l'âge apparaissent comme les principaux facteurs d'influence. D'un point de vue qualitatif, les empreintes de contamination en PCB sont dépendantes du sexe, et dans une moindre mesure du comportement migratoire de l'espèce. L'analyse des isotopes stables du carbone ($\delta^{13}C$) et de l'azote ($\delta^{15}N$) dans la chaîne trophique de l'araignée de mer a confirmé le haut niveau de complexité des relations alimentaires dans le cas de prédateurs supérieurs omnivores. L'utilisation de la méthode isotopique stable en parallèle à l'analyse des contaminants a mis en évidence la bioamplification des congénères de PCB les plus persistants le long de la chaîne trophique de l'araignée de mer. A l'inverse, certains composés de structure chimique particulière sont métabolisés par les crustacés décapodes.

Mots-Clés : Contaminants organiques, polychlorobiphényles, bioaccumulation, crustacés décapodes, isotopes stables, réseaux trophiques, bioamplification, biotransformation, sécurité sanitaire.

Abstract

Marine decapod crustaceans are macrobenthic opportunist species, of great commercial interest, and can accumulate pollutants. Worrying about consumers' safety, polychlorobiphenyls (PCBs), polybromodiphenyl Ethers (PBDEs) and dioxins (PCDD/Fs) were analyzed in four crustacean species from the coastal waters of Brittany and Normandy. As regards to regulations, the consumption of crustacean muscle doesn't raise any health problems. The second objective of this study was to evaluate the biological processes influencing PCB bioaccumulation in the spider crab *Maja brachydactyla*. From a quantitative point of view, organotropism, diet and age were the major factors acting on contamination. From a qualitative point of view, PCB fingerprints depended on sex, and to a lesser extent, on the species migratory behaviour. The stable isotopic analysis of carbon ($\delta^{13}C$) and nitrogen ($\delta^{15}N$) in spider crab food web confirmed the high level of complexity of food relations in the case of omnivorous top predators. The use of both stable isotopic method and contaminant analysis highlighted the bioamplification of the most persistent PCB congeners along the spider crab food web. Conversely, some compounds with particular chemical structure are metabolized by decapod crustaceans.

Keywords: Organic contaminants, polychlorinated biphenyls, bioaccumulation, decapod crustaceans, stable isotopes, food webs, biomagnification, biotransformation, food safety.