Suivis télémétriques des phoques gris et veaux-marins avant, pendant la construction, pendant l'exploitation du parc éolien en mer de Dieppe – Le Tréport, et suivi des colonies de baie d'Authie et de baie de Somme.

Suivi du niveau de stress des phoques : Rapport final sur l'état de référence

Depuille, M., Parenteau, C., Angelier F., Planque, Y., Vincent, C., Spitz, J.

Mars 2023

Suivis télémétriques des phoques gris et veaux-marins avant, pendant la construction, pendant l'exploitation du parc éolien en mer de Dieppe – Le Tréport, et suivi des colonies de baie d'Authie et de baie de Somme.

Suivi du niveau de stress des phoques : Rapport final sur l'état de référence

Depuille[1], M., Parenteau[1], C., Angelier[1] F., Planque[1], Y., Vincent[1], C., Spitz[1,2], J.

[1] Centre d'Études Biologiques de Chizé (CEBC, UMR 7372), CNRS/La Rochelle Université

[2] Observatoire Pelagis (UAR 3462), CNRS/La Rochelle Université

Citation du document : Depuille, M., Parenteau, C., Angelier F., Planque, Y., Vincent, C., Spitz, J. 2023. Suivi du niveau de stress des phoques : Rapport final sur l'état de référence. Rapport CEBC pour EMDT. Mars 2023. 23 PP.

Table des matières

Table des matières 3
Résumé étendu 4
Contexte et objectifs 5
I. Introduction 7
II. Matériels et développements méthodologiques 8
2.1 Échantillonnage 8
2.2 Préparation des échantillons - phase de tests 9
2.2.1 Comportement de l'échantillon à la manipulation 9
2.2.2 Effet du sable sur la concentration en cortisol 9
2.2.3 Standardisation et pesée des échantillons 11
2.3 Extraction du Cortisol 12
2.3.1 Phase de tests 12
2.3.2 Protocole d'extraction final au méthanol 80% 15
2.4 Dosage du Cortisol en ELISA 15
2.4.1 Phase de tests 15
III. Résultats et discussion 17
VI. Conclusion et recommandations 20
VII. Références 21
VIII. ANNEXES : Fiches de résultat des dosages de cortisol 22

Résumé étendu

Les espèces sauvages peuvent être soumis à différentes pressions d'origine humaine dont l'intensité et la durée sont de nature à affecter la dynamique d'une population. Les pressions dites tertiaires comme les dérangements humains peuvent engendrer une augmentation du stress ou des déplacements d'individus vers d'autres habitats potentiellement moins favorables. Dans ce dernier cas, les conséquences aux échelles individuelle et populationnelle résultent d'un phénomène de cascade débutant par un stress physiologique. Dans ce contexte, le dosage dans différents tissus d'hormones de stress comme les glucocorticoïdes, ou de leurs métabolites, est devenu une approche classique pour évaluer l'état physiologique d'individus ou de populations soumis à des pressions anthropiques.

Dans le cas de l'évaluation de l'impact des travaux de construction du parc éolien en mer sur les phoques en baie de Somme, un suivi de la concentration des hormones de stress dans les fèces est donc apparu comme une approche pertinente pour évaluer et comparer les niveaux de stress avant, pendant et après travaux. Cette étude a permis pour la première fois en France métropolitaine de mesurer les niveaux d'hormones de stress chez deux espèces de phoques, le phoque gris et le phoque veau-marin. Des tests et développements méthodologiques ont été conduits et ont permis d'obtenir un protocole robuste et reproductible afin de produire des données de qualité. L'analyse de 55 échantillons collectés entre 2019 et 2022 ont permis d'établir un niveau basal des concentrations en cortisols dans les fèces de phoque (<40ng/g) au-dessus duquel une augmentation du niveau de stress peut être interprété. Nos résultats ont également confirmé l'importance du cycle reproducteur dans la variabilité des concentrations fécales de cortisol et mis en évidence des concentrations fortes pour quelques cas. L'objectif d'établir un état de référence pour être comparé aux dosages à réaliser lors des prochaines phases de travaux est atteint. Enfin, pour la suite de ce suivi du niveau de stress, des recommandations sont formulées afin de disposer d'un échantillonnage et d'analyses complémentaires de nature à identifier au mieux l'existence d'un impact des travaux sur la physiologie des phoques (saisonnalité des collecte, sexage et dosage des hormones de la reproduction, …).

Contexte et objectifs

Face aux défis du changement climatique et des enjeux d'indépendance énergétique, la France a mis en place une Programmation Pluriannuelle de l'Energie (PPE) permettant de détailler les orientations du gouvernement français en matière de politique énergétique. Cette programmation prévoit notamment de porter à 40% la part de production d'électricité issue des énergie renouvelables d'ici 2030[1]. Une partie de cette électricité d'origine renouvelable doit provenir de l'éolien en mer : à court terme, les objectifs sont d'atteindre une puissance installée de 2.4 GW en 2023 et 5.2 à 6.2 GW en 2028 (Décret n° 2020-456 du 21 avril 2020 relatif à la PPE). Ces projets de constructions sont accompagnés d'études environnementales sur l'état de référence et le suivi des impacts de ces travaux.

Le parc éolien en mer posé de Dieppe-Le Tréport est issu du deuxième appel d'offres lancé en 2013. Composé de 62 éoliennes installée dans un périmètre de 83 km², il aura une puissance installée totale de 496 MW. Les travaux de construction des éoliennes en mer sont actuellement prévus pour 2024. Le présent projet porte sur l'établissement d'une partie de l'état de référence, qui servira de base à l'évaluation et au suivi des effets et des impacts du projet de parc éolien en mer de Dieppe Le Tréport sur l'environnement. Il n'inclut pas les parties relatives au raccordement au réseau de transport électrique public (géré par RTE) ainsi que les bases d'exploitation et de maintenance.

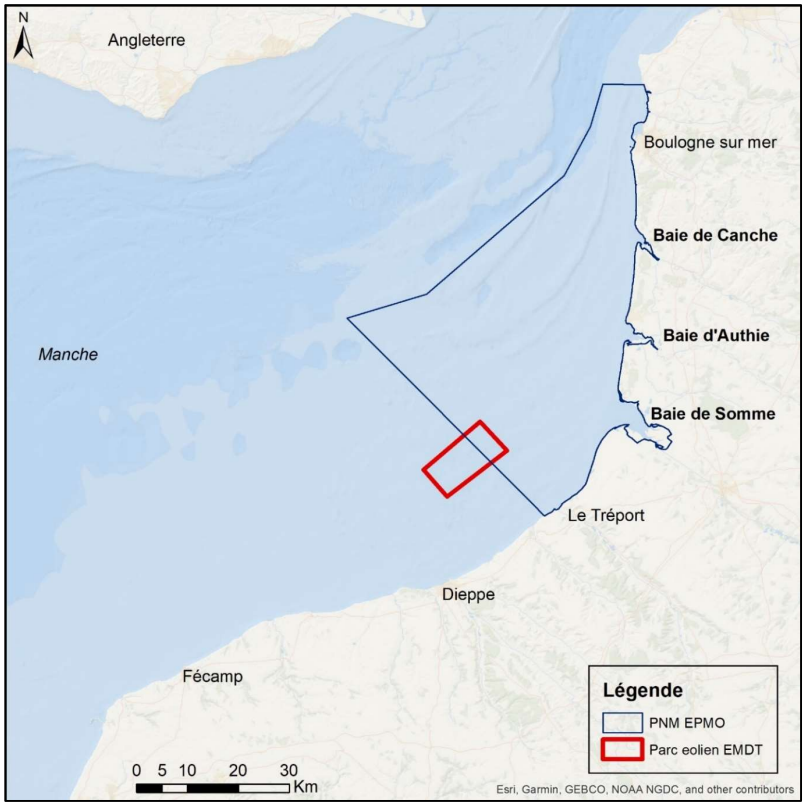

Figure i.1 : Localisation des trois baies (en gras) au sein desquelles les suivis des phoques ont été réalisés. PNM EPMO : Parc naturel marin des estuaires picards et de la mer d'Opale. EMDT : Eoliennes en Mer Dieppe – Le Tréport.

[1] https://www.ecologie.gouv.fr/energies-renouvelables

Ce rapport relate l'état d'avancement de la mesure de suivi « SE1bis » relative au suivi des colonies de phoques gris (*Halichoerus grypus*) et veaux-marins (*Phoca vitulina*) des baies de Somme, Authie et Canche (Figure i.1) dans le cadre de l'état de référence pour le projet éolien en mer de Dieppe-Le Tréport (EMDT). Les deux premières baies se trouvent dans l'Aire d'Etude Eloignée (AEE) tandis que la troisième se trouve dans l'Aire d'Etude Large (AEL). Ces suivis sont répartis en plusieurs actions, qui sont présentées ici en autant de rapports finaux : 1) les recensements (terrestres et aériens) et la photo-identification des phoques dans les trois baies, 2) le suivi télémétrique des phoques par balises GPS/GSM, 3) le suivi télémétrique des phoques par balises DTags, 4) le suivi du régime alimentaire et de l'écologie trophique des phoques, et 5) le suivi des niveaux de stress des phoques. La combinaison de ces différentes méthodes permet d'obtenir une vision aussi complète que possible de la dynamique des populations, de la mobilité des individus entre colonies (ou de leur fidélité aux sites), de leur écologie en mer (types de ressources exploitées, zones et comportements de chasse) et de leur niveau de stress. Cet état de référence permettra de suivre ultérieurement les potentielles évolutions de ces différents paramètres au cours du futur projet de construction des éoliennes en mer.

La présente étude porte spécifiquement sur le suivi des niveaux de stress des phoques. Après une introduction à la problématique et l'énoncé des objectifs de l'étude, le rapport présente dans un premier temps l'échantillonnage et les développements méthodologiques pour le dosage du cortisol dans les fèces des deux espèces de phoques, puis les résultats obtenus. Une conclusion associée à des recommandations pour la suite de la mise en œuvre du suivi du niveau de stress dans les fèces de phoques clos le présent rapport.

I. Introduction

Les espèces sauvages peuvent être soumises à différentes pressions d'origine humaine dont l'intensité et la durée sont de nature à affecter la dynamique d'une population (Authier et al., 2017). On distingue alors les pressions primaires qui causent une mortalité additionnelle (comme les captures accidentelles ou les collisions), les pressions secondaires qui vont affecter directement l'état de santé ou les capacités reproductrices des individus touchés (comme par exemple une exposition chronique à des polluants chimiques) et enfin des pressions tertiaires qui engendrent une augmentation du stress ou des déplacements d'individus vers d'autres habitats potentiellement moins favorables. Dans ce dernier cas, les conséquences aux échelles individuelle et populationnelle résultent d'un phénomène de cascade débutant par un stress physiologique (Figure 1.1). Les pressions tertiaires sont généralement associées à un dérangement humain (bruit, harcèlement, …) ou à une modification de la disponibilité ou de la qualité des ressources (alimentaire ou habitat).

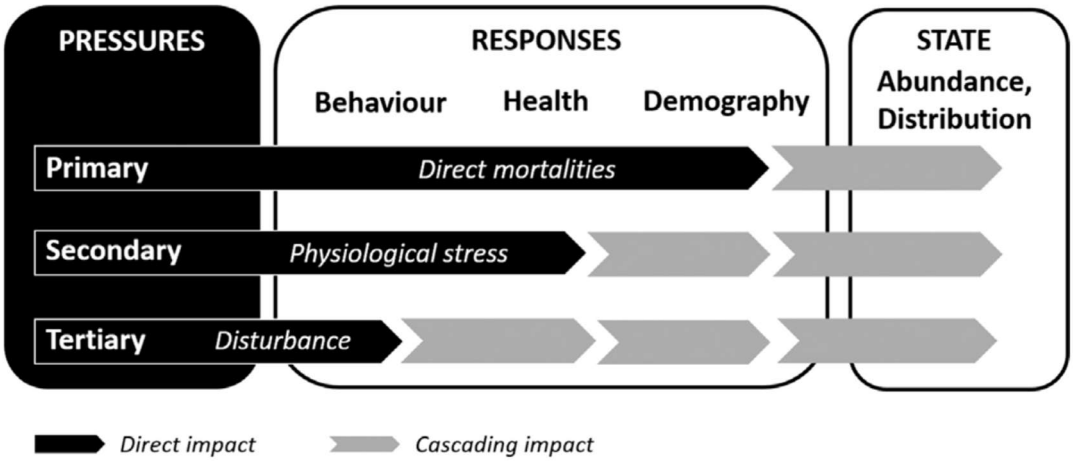

Figure 1.1 : Typologie des pressions affectant la mégafaune marine (Authier et al., 2017).

Les réactions physiologiques de stress vont impliquer la libération d'hormones de stress telles que le cortisol et l'adrénaline, qui peuvent augmenter notamment le rythme cardiaque, la pression artérielle et la respiration (Fair and Becker, 2000). Une exposition prolongée à ces facteurs de stress peut avoir ainsi des conséquences en cascade sur la santé et le bien-être de l'individu affecté, pouvant entraîner une diminution du succès de la reproduction, une altération des fonctions immunitaires, une réduction de la durée de vie, voire la mort de l'animal. Le suivi du stress physiologique chez les animaux sauvages est généralement un challenge et d'autant plus pour les espèces marines, notamment due aux difficultés de mesures (Romero and Gormally, 2019). Dans ce contexte, le dosage dans différents tissus d'hormones de stress comme les glucocorticoïdes, ou de leurs métabolites, est devenu une approche classique pour évaluer l'état physiologique d'individus ou de populations (Madliger et al., 2018). Chez les grands mammifères dont les espèces protégées comme les mammifères marins, les enjeux de capture ont amené à rechercher des méthodes non-invasives. Le dosage de glucocorticoïdes dans la matière fécale s'est révélé concluant pour mettre en évidence un stress physiologique consécutif à une pression d'origine anthropique ou non. Un lien a par exemple été mis en évidence chez les baleines franches (*Eubalena glacialis*) avec les niveaux de bruit ambiant (Rolland et al., 2012), ou encore une chute des concentrations en métabolites de glucocorticoïdes dans les fèces d'otarie à fourrure du Cap (*Arctocephalus pusillus pusillus*) à la suite du déclin et de la disparition de son principal prédateur, le grand requin blanc (*Carcharodon carcharias*) à False Bay, Afrique du Sud (Hammerschlag et al., 2022).

Cette approche ainsi été mise en œuvre chez différentes espèces de pinnipèdes dans différentes conditions telles que le phoque moine, le phoque de Weddell, le phoque veau-marin ou le lion de mer de Steller (Gobush et al., 2014; Hunt et al., 2004; Jeanniard du Dot et al., 2009; Mellish et al., 2010).

Dans le cas de l'évaluation de l'impact des travaux de construction du parc éolien en mer sur les phoques en baie de Somme, un suivi de la concentration des hormones de stress dans les fèces est apparu comme une approche pertinente pour évaluer et comparer les niveaux de stress avant, pendant et après travaux. Il n'existe de pas niveau de référence à ce jour pour les phoques gris et veau-marin en France. La présente étude a le double objectif de (1) développer et optimiser le dosage d'une hormone de stress, le cortisol, dans des fèces des deux espèces de phoques collectées en baie de Somme, et (2) d'établir des niveaux de référence pour ces deux espèces.

II. Matériels et développements méthodologiques

2.1 Échantillonnage

Les fèces ont été collectées en baie de Somme entre les années 2019 et 2022 sur les reposoirs lors de la collecte d'échantillons pour l'analyse du régime alimentaire. Au total 55 échantillons ont été retenus, 22 pour le phoque veau-marin et 33 pour le phoques gris (Tableau 2.1). Les fèces ont été conditionnées individuellement dans des sachets plastiques et conservés à -20°C. Au laboratoire, les échantillons ont ensuite été lyophilisés et stockés dans des pots en plastique dans le but de faciliter leur manipulation et leur conservation dans un endroit sec à température ambiante. Néanmoins, tous les échantillons ne sont pas similaires et l'étape de lyophilisation a permis de mettre en évidence une part plus ou moins importante de sable ainsi que d'autres éléments présents (restes alimentaires) dans l'échantillon.

Tableau 2.1. Répartition des échantillons collectés en baie de Somme pour le dosage des concentrations d'hormones de stress.

	Phoque gris		**Phoque veau-marin***
	2019	**2021**	**2022**
Février	10		
Avril		11	
Mai		2	8
Juin			9
Juillet			5
Octobre	9		
NA	1		
Total	**33**		**22**

2.2 Préparation des échantillons - phase de tests

2.2.1 Comportement de l'échantillon à la manipulation

La première étape a été de broyer et de tamiser quelques échantillons à l'aide d'un mortier, d'un pilon et d'une passoire. L'objectif de cette étape a été d'observer si un échantillon présentait des différences en concentration de cortisol du fait qu'il ait été broyé-tamisé ou non. L'échantillon utilisé pour ce test ne présentait visuellement pas ou très peu de sable, une fois broyé celui-ci semblait bien homogène (couleur et granulométrie homogène), le tamisage a permis d'isoler puis de supprimer des éléments comme des fragments de coquille ou encore des poils.

Les résultats de ce premier test (Figure 2.2) montrent une faible différence entre un essai tamisé et un non tamisé. Néanmoins cette manipulation a permis de connaitre le comportement de l'échantillon lors de son traitement au laboratoire. En effet ce test a été réalisé directement sur une paillasse au laboratoire, la finesse de la fèces broyée a provoqué lors du tamisage une mise en suspension dans l'air d'une fraction fine de l'échantillon.

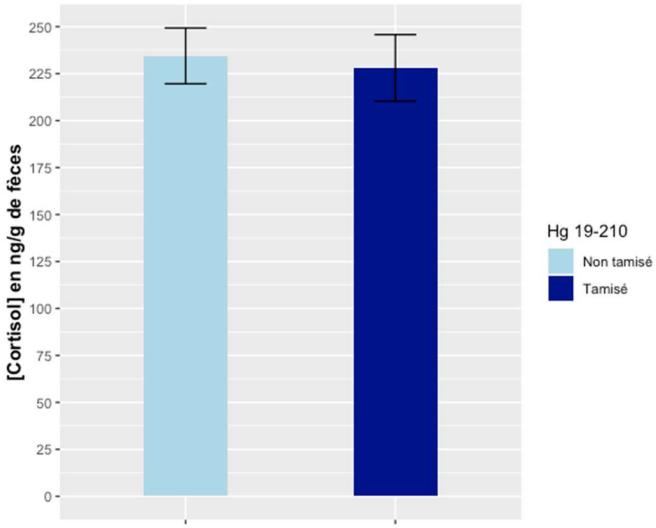

Figure 2.2 : Moyenne et écart type en ng/ml de la concentration en cortisol d'un échantillon broyé puis tamisé (Bleu foncé) et d'un échantillon non soumis à cette étape (Bleu clair).

Ce premier essai a également permis la mise en place dans le protocole final d'étapes permettant de répondre aux premières problématiques rencontrées. Les problématiques sont :

1- Réduction de la volatilité de l'échantillon broyé.
2- Réduction du temps de nettoyage du matériel de broyage et de tamisage entre chaque échantillon afin de ne pas risquer de contamination entre individus.
3- Répondre aux problématiques 1 et 2 tout en conservant l'étape de broyage-tamisage du fait des éléments présents dans la fèces qui diffèrent d'un individu à l'autre et qui pourraient impacter les résultats finaux (+/- sableux, présences de reste d'animaux ingérés, présence de poils, etc).

2.2.2 Effet du sable sur la concentration en cortisol

Certains échantillons présentent des taux de sable plus ou moins élevés, causés probablement par l'échantillonnage sur le terrain avec la prise accidentelle de sable lors du prélèvement, ou bien par ingestion directe lors de l'alimentation.

Le taux plus ou moins important de sable a été confirmé lors de la pesée des échantillons. Pour certains, nous avons pu constater une nette différence de volume dû à la densité des grains, plus lourds que la fèces broyée. Pour une série d'échantillons pesés à 200 mg par tube, on constate bien différents volumes d'échantillons (Figure 2.3). Visuellement ceux qui sont les plus bas représentent les échantillons ayant les plus forts taux de sable.

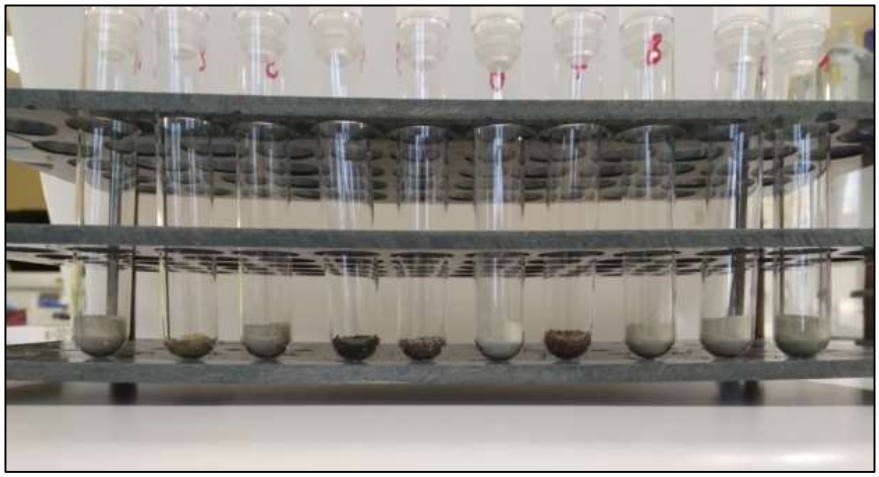

Figure 2.3 : Série d'échantillons de fèces de phoque à 200 mg par tube.

Dans ce test, nous avons donc dosé trois différentes prises d'essais sur un échantillon dont le pourcentage de sable était élevé (Figure 2.4) :

1 - Échantillon homogène
2 - Après « tapotage » du pot nous avons pris la partie supérieure de l'échantillon (fraction grossière) qui serait plus susceptible d'être de la fèces.
3 - Après « tapotage » du pot nous avons pris la partie inférieure de l'échantillon (fraction fine) qui serait plus susceptible d'être du sable

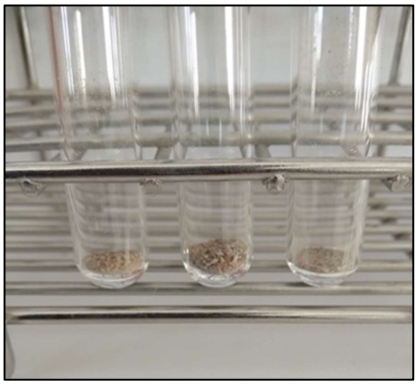

Figure 2.4 : A gauche, la fraction fine – Au centre, la fraction grossière – A droite, la prise d'essai homogène

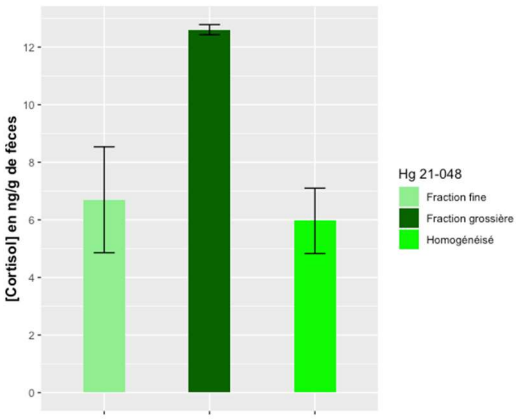

Figure 2.5 : Moyenne et écart-type en ng/ml de cortisol dans les trois prises d'essais différentes. En vert clair, la fraction fine – En vert foncé la fraction grossière – En vert fluo, la prise d'essai homogène

Les résultats ont montré une faible différence de concentration ainsi que des écart-types importants entre l'essai 1 homogénéisé et l'essai 3 la fraction fine (Figure 2.5). Cependant l'essai 2 représenté par la fraction grossière et plus susceptible d'être de la fèces, donne une concentration par rapport aux deux autres deux fois supérieure en cortisol, ainsi qu'une meilleure précision lors du dosage. Ce test semble confirmer l'effet du sable sur la concentration finale en cortisol.

2.2.3 Standardisation et pesée des échantillons

Dans un souci de standardisation et pour répondre aux problématiques rencontrées lors de tests précédents nous avons procédé à une étape de tamisage-broyage-tamisage sur chacun des échantillons. Pour cela nous avons mis au point un outil permettant de réaliser cette étape.
Pour réaliser cet ustensile nous nous sommes munis de deux couvercles (couvercles allant sur les pots de 90 ml dans lesquels sont stockés les échantillons lyophilisés) que nous avons percés. Nous avons ensuite placé entre ces deux couvercles une toile avec une maille d'environ 1mm^2 puis nous avons collé les deux couvercles ensemble. Ceci permet de visser de chaque côté un pot de façon hermétique, le premier avec l'échantillon initiale le deuxième pour récupérer le résultat du premier tamis (Voir figure 2.6).

Figure 2.4 : Outils utilisés pour l'étape de broyage-tamisage-broyage, étape permettant la standardisation de tous les échantillons de fèces avant l'extraction et le dosage du cortisol.

Ainsi la première étape de tamisage s'effectue par simple retournement des pots en appliquant quelques à-coups afin de faire passer les grains au travers la maille. Les éléments tamisés ne sont pas conservés car il s'agit le plus souvent du sable présent dans l'échantillon qui n'a pas formé de « conglomérat » pendant la lyophilisation. L'échantillon retenu est quant à lui conservé puis broyé en fine poudre à l'aide d'un pilon. Cette poudre est de nouveau tamisée en suivant le même processus que précédemment mais cette fois le produit du tamisage est conservé. Les éléments retenus lors du deuxième tamisage sont de nouveau broyés et tamisés. Ce qui ne passe pas la maille suivant le deuxième tamisage n'est pas conservé car il s'agit très souvent d'objets contenus dans la fèces tels que des morceaux de coquille, de restes alimentaires durs ou des minéraux grossiers.
L'intérêt de cette étape a été d'obtenir un échantillon bien homogène avec moins d'éléments extérieurs (sable, restes durs de proies,…) pouvant interférer lors de la pesée et du dosage, et ainsi limiter le risque de sous-évaluation des concentrations en hormones. De plus, pouvoir effectuer le tamisage par retournement dans des contenants hermétiques a permis à la fraction volatile de rester dans les pots et de ne pas se diffuser dans l'air.

Figure 2.7 : Résultats Avant/Après de l'échantillon standardisé via la technique du tamisage-broyage-tamisage à l'aide de l'ustensile conçu pour répondre aux problématiques liées à la physique de l'échantillon. Image de gauche : Échantillon avec peu de sable, à gauche échantillon après tamisage-broyage-tamisage. A droite échantillon initial. Image de droite : Échantillon très sableux, à gauche échantillon après tamisage-broyage-tamisage.

Une fois tous les échantillons standardisés, la pesée de la masse à extraire s'effectue à l'aide d'une balance de précision. La masse de 200 mg a été déterminée à la suite d'une série de test permettant d'obtenir des concentrations, notamment pour des échantillons faibles en cortisol, comprises dans la gamme étalon du kit ELISA utilisé pour le dosage. De plus la littérature scientifique dont notamment les études de Palme et al. (2013) ou de Hunt et al. (2004) utilisent des prises d'essais se situant dans le même ordre de grandeur.

L'utilisation pour la pesée d'une spatule en bois facilite grandement la manipulation. En effet le broyat de fèces est très sensible à l'électricité statique causée par des matières comme le plastique ou l'inox.

2.3 Extraction du Cortisol

Il existe plusieurs méthodes d'extractions des hormones stéroïdiennes pour ce type d'échantillon. Certaines méthodes utilisent de l'éthanol ou des mélanges méthanol/eau distillée comme solvant pour extraire les hormones de matrices solides comme les fèces (Palme, 2019; Palme et al., 2013).
D'après Palme et al. (2013) qui ont testé plusieurs pourcentages de méthanol sur plusieurs espèces et qui sont spécialistes du dosage des glucocorticoïdes dans cette matrice, le méthanol 80 % (80 % Méthanol 100 % et 20 % H_2O distillée) est le solvant le mieux adapté et le plus efficace. Cependant, dans une approche d'optimisation du protocole et pour le valider, plusieurs méthodes d'extraction ont été testées et comparées.
Dans un premier temps, en suivant la même méthode mais en faisant varier uniquement les solvants d'extraction nous avons pu comparer les résultats entre l'extraction à l'éthanol 96% et celle au méthanol 80%. Puis, dans un second temps, nous avons comparé deux méthodes d'extraction, celle au méthanol 80% et la méthode QUECHERS qui utilise de l'acétonitrile et des sels d'extraction.

Lors de ces tests, nous avons intégré des tests de linéarité, de précision et de rendement pour ainsi valider la méthode et le solvant d'extraction.

2.3.1 Phase de tests

Effet de l'évaporation pour la linéarité

Nos premiers résultats de dosage, en dosant directement le cortisol dans le solvant, n'étaient pas satisfaisants avec le kit EIA de chez DEMEDITEC. Pour que le dosage soit optimal, le pourcentage d'alcool dans l'échantillon à analyser ne doit pas être supérieur à 5 % (>10 % l'alcool influence la liaison stéroïde-anticorps / l'activité de l'enzyme (Möstl et al., 2005). Afin de respecter au mieux les indications du kit et les informations issues de la littérature scientifique, une étape d'évaporation a été testée dans le but d'éliminer l'alcool de l'échantillon tout en conservant les hormones. L'extrait sec a ensuite été repris dans un tampon, ici il s'agit du CAL 0 (tampon du kit ELISA utilisé pour le dosage).

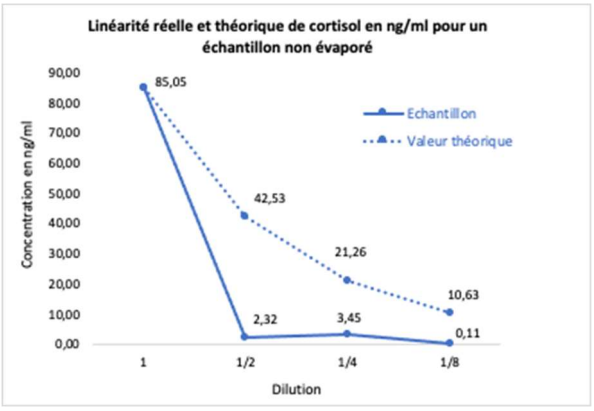

Figure 2.6 : Linéarité réelle et théorique de la concentration en ng/ml de cortisol en fonction des différentes dilutions (en cascade) d'un échantillon n'ayant pas subi d'étape d'évaporation.

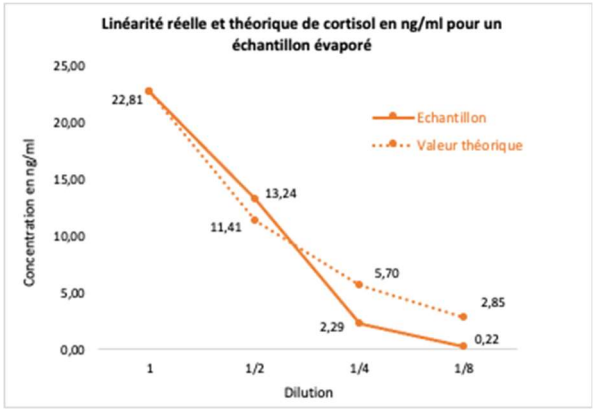

Figure 2.5 : Linéarité réelle et théorique de la concentration en ng/ml de cortisol en fonction des différentes dilutions (en cascade) d'un échantillon ayant subi d'étape d'évaporation.

On observe nettement que la linéarité sur l'essai évaporé et repris en tampon est plus proche des valeurs théoriques que pour l'essai non évaporé (Figure 2.8). Une étape d'évaporation a donc été ajoutée au protocole final.

Effet de la purification pour la précision

Cependant, à la suite de l'évaporation et de la reprise de l'extrait sec avec 150 µl de tampon, nous avons observé des particules en suspension dans l'échantillon (invisibles dans le solvant). Ces particules en suspension peuvent interférer sur le volume à prélever lors de la distribution de l'échantillon dans les puits du kit EIA et donc être source d'imprécision.
Afin de les éliminer, un essai avec une étape de purification sur colonne C18 a été réalisé.

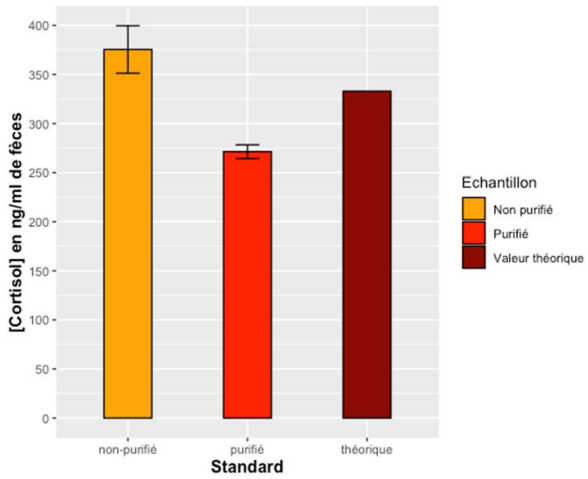

Figure 2.8 : Moyenne et écart-type du cortisol en ng/ml des blancs d'extractions « spikés » en fonction de la purification/non sur colonne C18. Le tout comparé à la valeur théorique de la concentration.

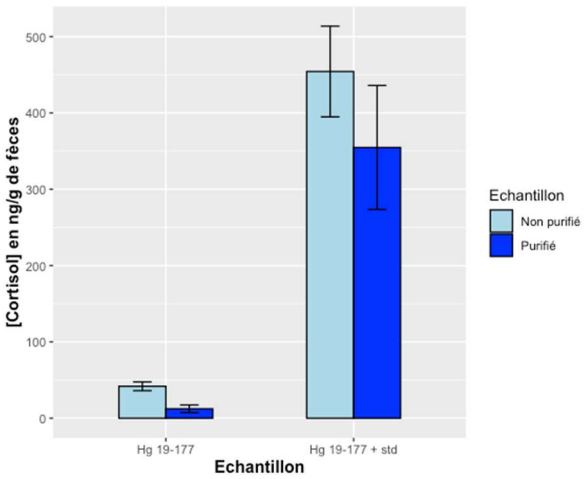

Figure 2.7 : Moyenne et écart-type du cortisol en ng/ml d'un échantillon pur (A gauche) et d'un échantillon « spiké » (A droite) en fonction de la purification/non sur colonne C18

On a observé peu de différence entre un échantillon purifié ou non purifié. On peut observer une concentration plus élevée pour les échantillons non purifiés très certainement liée à l'étape de lavage

lors de la purification qui peut être à l'origine d'une perte d'hormone. Étant donné que la purification n'améliore pas la précision et qu'elle entraîne même une perte de concentration, il a été décidé de ne pas conserver cette étape dans le protocole et de garder l'extrait avec les particules en suspension. Il suffit de faire attention à bien prélever le bon volume de prise d'essai indiqué par le kit lors du dosage.

Comparaison de trois méthodes d'extraction

L'objectif était de sélectionner la méthode la plus efficace et donc avec le rendement le plus élevé. Le test de « spiking » nous a permis de mesurer ce rendement, en ajoutant, en début d'extraction, du cortisol en concentration connue. Le cortisol est ajouté à l'échantillon ou à un blanc (pas d'échantillon mais protocole identique à celui des échantillons). Ainsi, on peut observer les éventuels effets matrices (linéarité) et mesurer le % de rendement. Une fois les échantillons extraits et dosés nous avons comparé les résultats de la linéarité et de rendement avec chacune des méthodes testées.

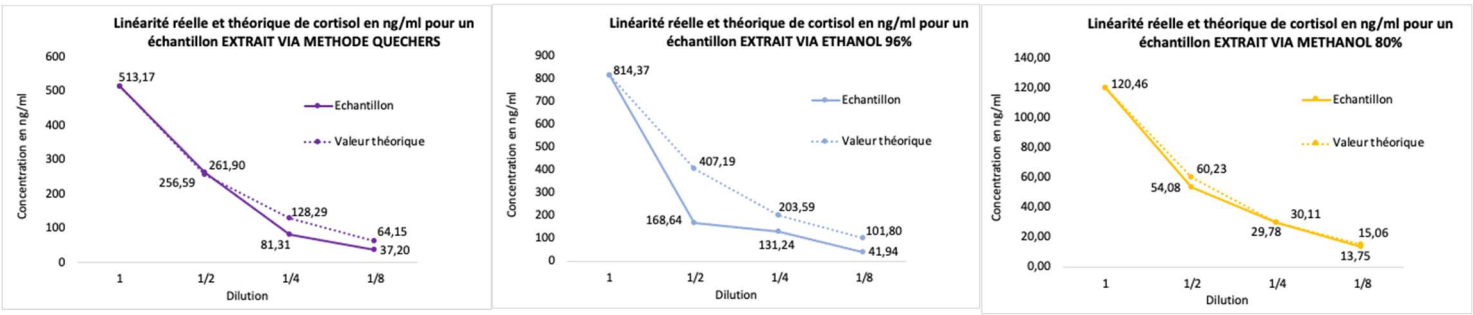

Figure 2.9 : Linéarité réelle et théorique de la concentration en ng/ml de cortisol en fonction des différentes dilutions (en cascade) d'un échantillon extrait, à gauche, via la méthode QUECHERS, au centre, avec de l'éthanol 96%, et à droite avec du méthanol 80% .

La méthode utilisant le méthanol 80% lors de l'extraction présente la meilleure linéarité (Figure 2.12). En effet comparé à l'éthanol 96%, les valeurs réelles des dilutions sont plus proches des valeurs théoriques ce qui donne des pourcentages de rendement pour chaque dilution qui tendent vers 100%. La méthode QUECHERS présente également une bonne linéarité.

Tableau 2.2 : Tableau pour chacune des méthodes d'extraction testée représentant les pourcentages de rendement respectifs en fonction des résultats issus de la concentration théorique attendue sur les concentrations obtenues

Extraction QUECHERS	[c] en ng/ml
Valeur Std obtenue	638,19
Valeur Std Théorique	1000,00
% Rendement	**43%**

Extraction éthanol	[c] en ng/ml
Valeur Std obtenue	498,11
Valeur Std Théorique	530,00
% Rendement	**94%**

Extraction méthanol 80%	[c] en ng/ml
Valeur Std obtenue	393,29
Valeur Std Théorique	333,00
% Rendement	**85%**

En dosant les blancs avec une concentration connue de cortisol nous avons pu calculer le rendement d'extraction pour chacune des trois méthodes (Tableau 2.2). L'extraction à l'éthanol possède le pourcentage le plus élevé (94%, Tableau 2), et le QUECHER le plus faible (43%). Le méthanol affiche un rendement à 85% ce qui est tout à fait acceptable. Les rendements d'extractions obtenus sont supérieurs à ceux de la littérature pour ce type de matrice qui sont de 64.4 ± 1.1% chez Hunt et al. (2004) et aux alentours de 70 – 80% chez Palme et al. (2013).

Cependant, malgré le plus fort pourcentage de rendement, l'extraction à l'éthanol 96% cause des interférences plus importantes que les deux autres méthodes lorsqu'il y a présence de matrice, ce qui n'est pas acceptable. La technique au méthanol 80% serait donc la plus optimale, sans effet matrice et avec un rendement relativement élevé. De plus, le spiking de cortisol n'est pas complètement représentatif des métabolites présents dans les fèces. D'après Palme et al. (2013), le méthanol 80%

aurait une polarité très proche des métabolites du cortisol et serait donc plus efficace que l'éthanol. Par ailleurs le protocole d'extraction au méthanol est plus simple à réaliser et plus rapide car il permet de passer une plus longue série d'échantillons en une seule fois.

2.3.2 Protocole d'extraction final au méthanol 80%

Le protocole consiste en les étapes suivantes :

- Tamisage/Broyage/tamisage des fèces lyophilisés puis pesée d'environ 200 mg dans des tubes en verre de 7,5 ml.
- Ajout de 2 ml de méthanol 80 %. Respecter le ratio 10:1 (100mg solide : 1ml métOH 80%) (Palme *et al*., 2013).
- Agitation au vortex automatique à 1800 rpm pendant 30 minutes.
- Puis, centrifugation pendant 15 min à 4000 rpm et 4°C pour récupérer les hormones présentes dans le surnageant et éliminer pour la suite, la matrice échantillon.
- Sur les 2 ml de solvant ajouté seulement 1 ml est prélevé et transféré dans un nouveau tube de 7,5 ml (lors de cette étape un facteur de 2 est appliqué à l'échantillon par rapport à sa masse initialement extraite.
- Le solvant est alors évaporé au bain Marie à 60°C sous flux d'azote.
- Une fois le méthanol évaporé l'extrait sec est repris avec 150 µl de solution tampon pour le dosage (ici il s'agit de cal 0 issu des kits EIA DEMEDITEC) et de nouveau homogénéisé à 2500 rpm pendant 1 min.

L'extrait est ensuite conservé à 8°C avant d'être dosé. Il peut aussi être congelé pour un stockage à plus long terme.

2.4 Dosage du Cortisol en ELISA

Pour ce projet, nous avons dosé le cortisol à l'aide de la technique ELISA directe par compétition. La RIA est également utilisée au CEBC, mais elle présente plus de risque (radioactivité), elle est plus longue et fastidieuse. C'est aussi dans un souci « d'innovation » que le choix s'est porté sur la méthode ELISA. Cette méthode présente les avantages d'être simple, rapide et de réduire les possibilités d'erreurs en limitant les étapes de pipetage. Néanmoins elle présente également des inconvénients tels que la sensibilité ou le risque de réactivité limité de l'anticorps. Le cortisol a été dosé avec le kit Cortisol ELISA Demeditec, ce kit étant déjà utilisé par le CEBC sur d'autres matrices.

2.4.1 Phase de tests

Dosage de l'échantillons en duplicat ou en triplicat ?

La précision intra-analyse des extraits de fèces n'est pas très satisfaisante avec ce kit Demeditec, notamment du fait de la faible concentration de cortisol dans les échantillons. Afin d'améliorer la précision et l'exactitude, nous avons dosé les fèces en triplicats, et ainsi réduire le %CV à moins de 10%. Les fèces de phoque une fois dosées en triplicats n'ont pas nécessité d'être repassés en tant que mauvais double, cela a permis un gain de temps non négligeable dans l'acquisition des concentrations finales.

Comparaison des kits ELISA Demeditec et ArborAssay

Il existe sur le marché plusieurs fournisseurs fabricant ces kits et notre choix s'est porté sur deux d'entre eux. Le kit de chez ArborAssays et celui de chez Demeditec.
Le kit ArborAssays est souvent utilisé dans les publications traitant du cortisol dans les fèces. Contrairement au kit de chez Demeditec celui-ci est dit spécifique à ce type de matrice. Son principal avantage est aussi sa limite de détection de 0,0454 ng/ml contre 0,38 ng/ml pour Demeditec. Son point de gamme maximum s'élève à 3,2 ng/ml contre 800 ng/ml pour Demeditec.
Les points négatifs du kit ArborAssays sont : un protocole plus complexe à mettre en œuvre notamment avec la préparation des divers réactifs et solutions étalons qui sont déjà prêt à l'emploi dans le kit Demeditec et un prix à l'achat, le triple de Demediec.

Tableau2. 3. Comparaison sur des échantillons de fèces faiblement et fortement concentrés en cortisol entre le kit ArborAssays et le kit DEMEDITEC

	Résultats issus du kit ArborAssay			Résultats issus du kit DEMEDITEC		
Echantillon	Moyenne en pg/mg	Ecart type en pg/mg	CV% en fonction concentration	Moyenne en pg/mg	Ecart type en pg/mg	CV% en fonction concentration
Pv 22-059	0,91	0,05	5,84%	3,2	0,56	17,55%
Pv 22-072	under			0,62	0,32	52%
Hg 19-210	75,47 over			164,06	9,07	5,53%
Hg 19-043	540,77	*294,98*	54,55%	211,64	4,87	2,30%
LDL fèces pg/mg	0,68					

Les résultats obtenus à la suite de ce test, qui avait pour objectif de comparer deux échantillons faiblement concentrés (Pv 22-059 et Pv 22-072) et deux échantillons plus fortement concentrés (Hg 19-210 et Hg 19-043), ont montré des différences visibles entre les concentrations (Tableau 2.3). Les %CV mesurés sur les replicats des individus montrent que le kit ArborAssays est plus précis sur les faibles concentrations et inversement moins précis sur les fortes concentrations. Cela montre que les deux kits pourraient être utilisés en complément l'un de l'autre en fonction des taux de cortisol des échantillons. ArborAssays pourrait également permettre de travailler sur des échantillons beaucoup plus petits en ne prélevant pas la totalité de la fèces sur le terrain mais seulement une fraction ce qui permettrait de limiter la quantité de sable dans l'échantillon.

Kit et protocole utilisé pour le dosage

Suite aux différents tests, le kit Cortisol ELISA de chez Demeditec, de référence DEH3388, a été sélectionné pour doser les échantillons de fèces de phoque. Le protocole qui suit est fourni par le fournisseur directement dans le kit.

Dans un premier temps il est nécessaire de réaliser le plan de plaque. Celle-ci comprendra systématiquement 8 puits pour la gamme étalon, 2 puits pour les contrôles du kit (1 et 2) et 6 puits pour les référents L1, L2 et L3 (contrôles commerciaux prêts à l'emploi) qui eux sont dosés en duplicat. Les contrôles sont dosés en plusieurs réplicats à chaque nouvelle plaque afin de pouvoir ensuite calculer les précisions intra et inter plaques. Les kits ayant une capacité de 96 puits et en dosant les échantillons en triplicat, cela laisse, une fois la gamme et les référents ajoutés, la possibilité de doser

22 individus par plaque. Avec 55 individus au total (espèces confondues), il nous a fallu utiliser 3 kits pour doser la totalité des échantillons. Les trois kits étant issus du même lot (plaque et réactifs compris) et le tout dosé le même jour, nous pouvons considérer que tous les échantillons ont été dosés dans des conditions similaires.

La prise d'essai pour les échantillons (gamme, contrôles, référents, extraits de fèces) est de 10 µl. Une fois tous les échantillons pipetés, le conjugué enzymatique est ajouté à hauteur de 300 µl par puits à l'aide d'une pipette multicanaux. Ensuite la plaque est recouverte pour éviter d'éventuelles éclaboussures et mise sous agitation pendant 1 heures à 800 rpm à température ambiante. La plaque est coatée avec un anticorps anti-cortisol, le conjugué est constitué de cortisol conjugué à une enzyme. Le conjugué et le cortisol des échantillons vont alors se retrouver en compétition pour se fixer sur l'anticorps. L'anticorps étant polyclonal, il reconnait aussi en partie les métabolites du cortisol présents dans les fèces.

L'agitation terminée, l'étape de lavage se fait à l'aide d'un laveur de plaque procédant ainsi au rinçage des puits au travers 4 séries de 300µl de solution de lavage. L'utilisation d'un automate facilite la manipulation en standardisant les 4 cycles de lavage afin de minimiser les risques d'interférer avec la sensibilité et la précision du dosage.

Une fois le lavage terminé, nous ajoutons 200 µl par puits de « substrat solution » avant d'incuber la plaque à l'abri de la lumière et sans agitation pendant 30 min. L'enzyme du conjugué va dégrader le substrat et engendrer une réaction colorée dont l'intensité sera inversement proportionnelle à la quantité de cortisol échantillon fixée sur l'anticorps.

Suivant la seconde incubation, 50 µl de « stop solution » est ajouté au puits afin de stopper la réaction. La lecture s'effectue dans les 15 min suivant l'ajout de ce dernier réactif à l'aide d'un spectrophotomètre (Marque Berthold) à une longueur d'onde de 450 nm.

Les paramètres du lecteur sont réglés avec le logiciel MikroWin©. Les résultats sont calculés directement avec le logiciel, ceci permettant d'analyser les résultats immédiatement suivant la fin de la lecture.

III. Résultats et discussion

Pour le phoque gris, les échantillons présentent des valeurs comprises entre 3,35 et 136,48 ng/g de cortisol (Figure 3.1). La moyenne des échantillons est de 39,55 (σ= 42,35) ng/g de cortisol mais on observe une valeur médiane de 26,18 ng/g de cortisol. En effet, près de 80% des valeurs sont inférieures à 40 ng/g, quatre échantillons présentent des valeurs supérieures comprises entre 50 et 80 ng/g et trois échantillons présentant des valeurs plus extrêmes (>130 ng/g de cortisol).

Pour le phoque veau-marins, les échantillons présentent des valeurs comprises entre 0,62 et 179,89 ng/g de cortisol (Figure 3.1). La moyenne des échantillons est de 46,54 (σ= 36,90) ng/g de cortisol pour une valeur médiane de 30,67 ng/g de cortisol. Mais on observe une distribution bimodale des concentrations. En effet, la moitié des valeurs sont inférieures à 40 ng/g et l'autre moitié des valeurs sont supérieures à 60 ng/g dont un échantillon présente une valeur plus extrême (>130 ng/g de cortisol).

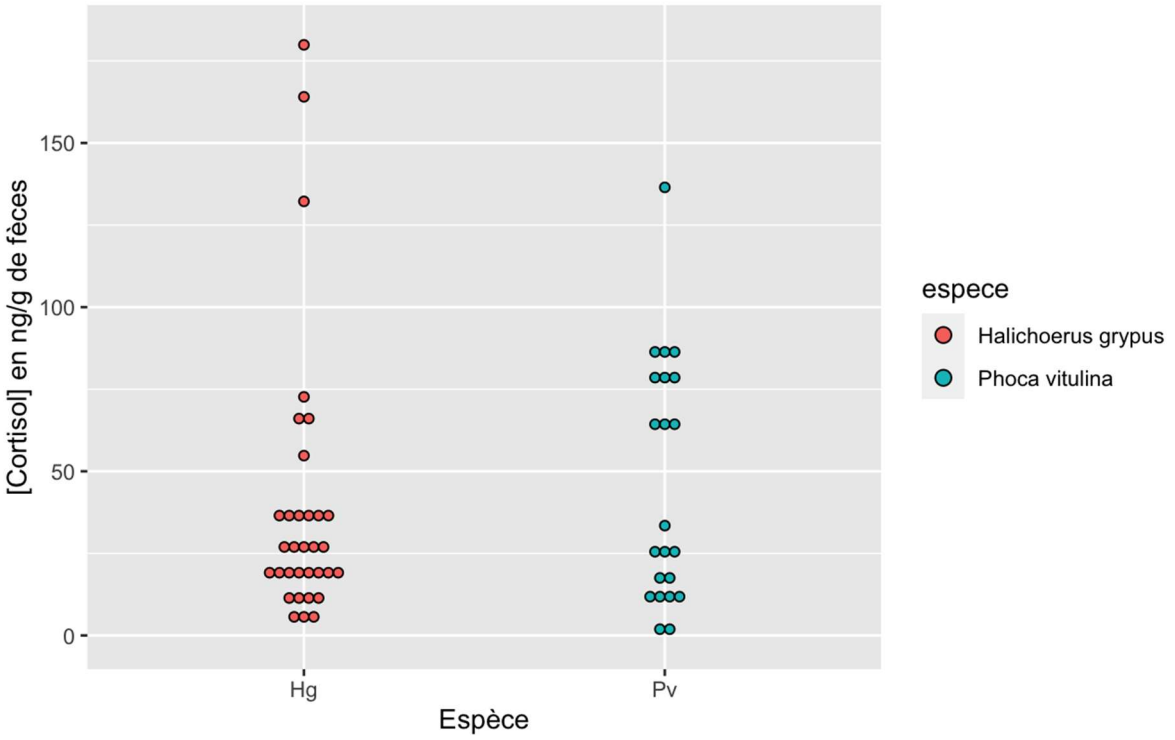

Figure 10.1 : Distribution des concentrations en ng/g de cortisol des différents échantillons pour le phoque gris et le phoque veau-marin.

La gamme de valeurs observées est cohérente avec les études antérieures sur les mammifères marins ou terrestres comme le phoque moine d'Hawaï (Gobush et al., 2014), l'ours polaire, *Ursus maritimus* (Hein et al., 2020) ou même le loup d'Éthiopie, *Canis simensis* (van Kesteren et al., 2012). Les valeurs les plus fortes observées (>130 ng/g de cortisol) peuvent être dues à différents états individuels relatifs à des phénomènes naturels ou d'origine anthropique (gestation, état nutritionnel, maladie,…). Sans éléments contextuels, ces valeurs ne peuvent être associés ici à un processus en particulier mais concernant qu'une faible proportion des données (environ 7% des échantillons), il est fort probable qu'elles reflètent plus des cas particuliers qu'un stress chronique à l'échelle de la colonie. Par contre, la bimodalité observé chez le phoque veau-marin, pourrait s'expliquer avec un changement dans le cycle biologique. Les valeurs sont plus hautes sont observés en juin et juillet comparativement aux échantillons récoltés en mai (Figure 3.3), ce changement pourrait être associé au cycle reproducteur et au début de la saison de reproduction à partir du mois de Juin. Durant le cycle biologique des pinnipèdes, des valeurs de cortisol plus élevées sont mesurées lors des périodes de mue et de reproduction (Gobush et al., 2014).

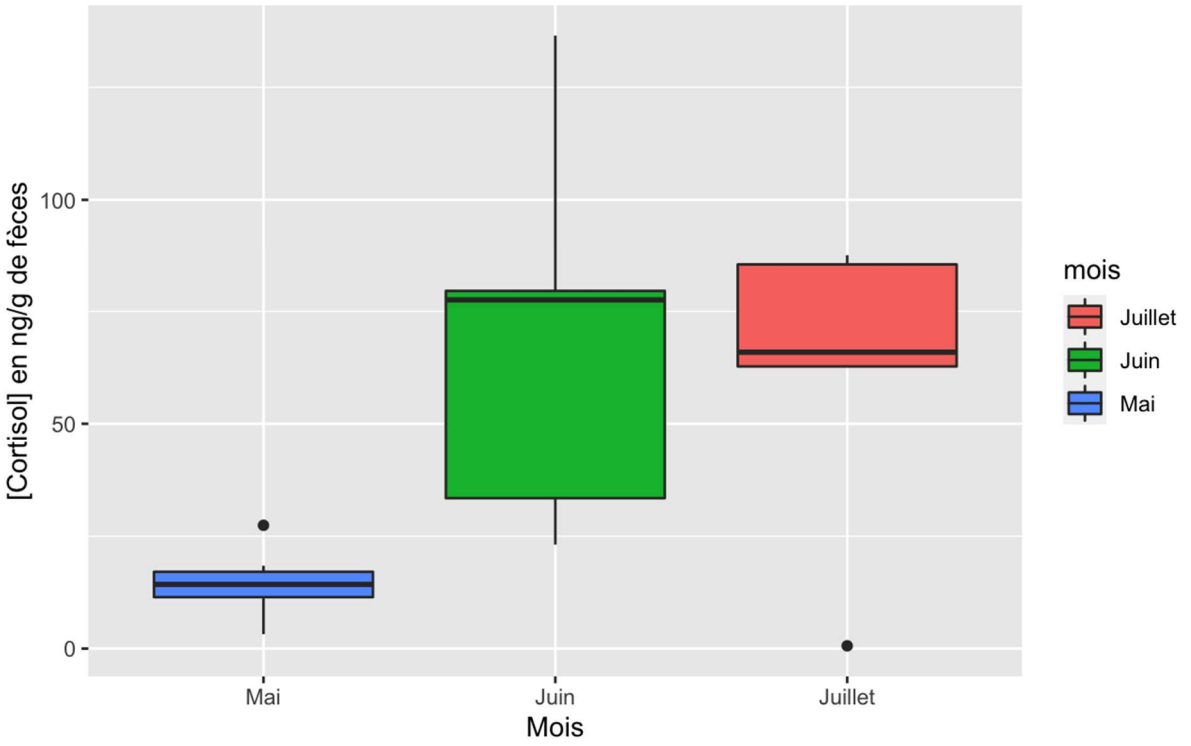

Figure 3.2 : Variations mensuelles des concentrations en ng/g de cortisol des différents échantillons pour le phoque veau-marin.

Pour le phoque gris les valeurs comprises entre 50 et 80 ng/g de cortisol correspondent à des échantillons collectés sur différentes années à différentes saisons (Figure 3.3). Aucune différence saisonnière n'a été mise en en évidence et aucune hypothèse ne peut être à ce stade favorisée pour expliquer ces valeurs plus élevées à partir des données disponibles. Cependant, l'absence de différence entre années suggère une certaine stabilité des concentrations malgré plusieurs années de congélations avant dosage des hormones.

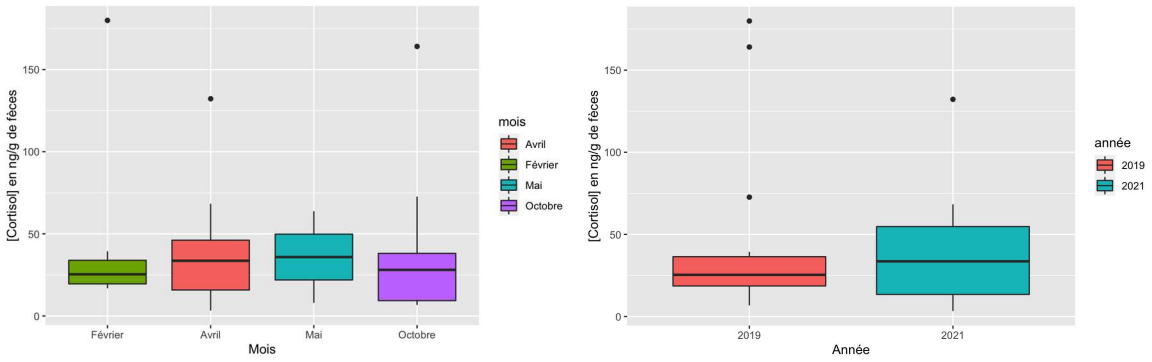

Figure 3.3 : Variations temporelles des concentrations en ng/g de cortisol des différents échantillons pour le phoque gris (mensuelles à gauche, annuelles à droite).

VI. Conclusion et recommandations

Le suivi des niveaux de stress exprimés par les concentrations en cortisol dans les fèces est de nature à renseigner des changements de pressions affectant les animaux sauvages. Cette approche a de ce fait été retenue pour évaluer l'existence d'un impact sur les colonies de phoques des travaux liés à l'implantation des éoliennes en mer. La présente étude a permis de mettre au point le protocole expérimental le plus robuste et reproductible pour la conduite d'un tel suivi. Les résultats obtenus permettent de dresser un état de référence pour les concentrations de cortisol dans les fèces pour la baie de Somme. Tout d'abord les gammes de valeurs sont similaires entre les deux espèces suggérant qu'une catégorisation des niveaux de stress peut s'appliquer sur les deux espèces à partir des mêmes valeurs seuils. La distribution des valeurs observées, nous conduit à proposer trois catégories de stress (Tableau 4.1) avec un niveau de base (concentration en cortisol inférieure à 40 ng/g), un niveau élevé (concentration en cortisol entre à 50 et 100 ng/g) et un niveau fort (concentration en cortisol supérieure à 130 ng/g). Pour la suite de ce suivi, une évolution des concentrations du niveau de bases ou un changement dans la distribution des valeurs observées (e.g. augmentation de la part des valeurs fortes dans l'échantillonnage) pendant la phase de travaux traduiraient un changement des niveaux de stress chez les colonies suivies.

Tableau 4.1. Proposition des niveaux de stress en fonction de la distribution des valeurs de concentrations de cortisol dans les fèces de phoques gris et phoque veau-marins. *les échantillons collectés pendant la période de reproduction ont été retirée pour comparer la distribution des niveaux à des périodes similaires du cycle biologique des deux espèces.

Niveau de stress	Concentration en cortisol	Phoque gris	Phoque veau-marin*
Base	0-40 ng/g	79%	92%
Elevé	50-100 ng/g	12%	0%
Fort	>130 ng/g	12%	8%

Pour assurer, la robustesse du suivi, cette étude permet d'établir des recommandations pour les prochaines phases d'échantillonnage :

- Éviter au maximum de collecter du sable avec l'échantillon pour diminuer le risque de sous-estimation des concentrations de cortisol ;
- Privilégier la collecte d'échantillons hors des périodes de reproduction et de mue pour éviter une surestimation du niveau de stress due à une augmentation naturelle lié au cycle biologique ;
- Réaliser le sexage des échantillons, car des différences peuvent être attendues entre mâles et femelles ; il est possible de déterminer le sexe de l'animal à l'origine de l'échantillons. Ces analyses seront faites ultérieurement sur les échantillons de cette étude en vue de compléter les sources de variations des concentrations observées ;
- Explorer le couplage d'un dosage commun des hormones de stress et des hormones de la reproduction afin de distinguer les valeurs élevées de cortisol associées au statut reproducteur de celles associées à un autre stress physiologique ;
- Augmenter l'échantillonnage pour mieux couvrir la variabilité intra-annuelle (e.g. 30 échantillons par trimestre).

VII. Références

Authier, M., Spitz, J., Blanck, A., Ridoux, V., 2017. Conservation science for marine megafauna in Europe: Historical perspectives and future directions. Deep-Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography 141, 1–7.

Fair, P.A., Becker, P.R., 2000. Review of stress in marine mammals. Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery 7, 335–354.

Gobush, K.S., Booth, R.K., Wasser, S.K., 2014. Validation and application of noninvasive glucocorticoid and thyroid hormone measures in free-ranging Hawaiian monk seals. General and comparative endocrinology 195, 174–182.

Hammerschlag, N., Fallows, C., Meÿer, M., Seakamela, S.M., Orndorff, S., Kirkman, S., Kotze, D., Creel, S., 2022. Loss of an apex predator in the wild induces physiological and behavioural changes in prey. Biology Letters 18, 20210476. https://doi.org/10.1098/rsbl.2021.0476

Hein, A., Palme, R., Baumgartner, K., von Fersen, L., Woelfing, B., Greenwood, A.D., Bechshoft, T., Siebert, U., 2020. Faecal glucocorticoid metabolites as a measure of adrenocortical activity in polar bears (Ursus maritimus). Conservation Physiology 8, coaa012. https://doi.org/10.1093/conphys/coaa012

Hunt, K.E., Trites, A.W., Wasser, S.K., 2004. Validation of a fecal glucocorticoid assay for Steller sea lions (Eumetopias jubatus). Physiology & Behavior 80, 595–601.

Jeanniard du Dot, T., Rosen, D.A.S., Richmond, J.P., Kitaysky, A.S., Zinn, S.A., Trites, A.W., 2009. Changes in glucocorticoids, IGF-I and thyroid hormones as indicators of nutritional stress and subsequent refeeding in Steller sea lions (*Eumetopias jubatus*). Comp. Bioch. Phys. A 152, 524–534.

Madliger, C.L., Love, O.P., Hultine, K.R., Cooke, S.J., 2018. The conservation physiology toolbox: status and opportunities. Conservation Physiology 6, coy029. https://doi.org/10.1093/conphys/coy029

Mellish, J.E., Hindle, A.G., Horning, M., 2010. A preliminary assessment of the impact of disturbance and handling on Weddell seals of McMurdo Sound, Antarctica. Antarctic Science 22, 25–29.

Möstl, E., Rettenbacher, S., Palme, R., 2005. Measurement of corticosterone metabolites in birds' droppings: an analytical approach. Annals of the New York Academy of Sciences 1046, 17–34.

Palme, R., 2019. Non-invasive measurement of glucocorticoids: Advances and problems. Physiology & behavior 199, 229–243.

Palme, R., Touma, C., Arias, N., Dominchin, M.F., Lepschy, M., 2013. Steroid extraction: get the best out of faecal samples.

Rolland, R.M., Parks, S.E., Hunt, K.E., Castellote, M., Corkeron, P.J., Nowacek, D.P., Wasser, S.K., Kraus, S.D., 2012. Evidence that ship noise increases stress in right whales. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences 279, 2363–2368. https://doi.org/10.1098/rspb.2011.2429

Romero, L.M., Gormally, B.M., 2019. How truly conserved is the "well-conserved" vertebrate stress response? Integrative and comparative biology 59, 273–281.

van Kesteren, F., Sillero-Zubiri, C., Millar, R., Argaw, K., Macdonald, D.W., Paris, M., 2012. Sex, stress and social status: Patterns in fecal testosterone and glucocorticoid metabolites in male Ethiopian wolves. General and Comparative Endocrinology 179, 30–37. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2012.07.016

VIII. ANNEXES : Fiches de résultat des dosages de cortisol

Centre d'Etudes Biologiques de Chizé - UMR7372
- Analyses Biologiques -

Cortisol Level
Espèce: *Halichoerus grypus*

cortisol Assay performances :
Samples (200mg) asseyed in 2 plates, in triplicate
Intra-assay precision : 8,73%
Inter-assay precision : 5,38%
LDL : 0,57 ng/g

Year : 2023 **Name : Matthieu**

Individus	Date	Concentration en ng/g
Hg 19-204	27/02/2019	16,87
Hg 19-203	27/02/2019	18,94
Hg 19-212	27/02/2019	21,36
Hg 19-176	27/02/2019	24,62
Hg 19-023	27/02/2019	26,18
Hg 19-205	27/02/2019	35,88
Hg 19-036	27/02/2019	39,41
Hg 19-043	27/02/2019	179,89
Hg 19-071	28/02/2019	18,13
Hg 19-087	28/02/2019	27,98
Hg 19-171	07/10/2019	6,78
Hg 19-202	07/10/2019	9,35
Hg 19-213	07/10/2019	9,38
Hg 19-206	07/10/2019	19,97
Hg 19-208	07/10/2019	28,09
Hg 19-177	07/10/2019	29,29
Hg 19-207	07/10/2019	38,13
Hg 19-214	07/10/2019	72,68
Hg 19-210	07/10/2019	164,06
Hg 19-211	2019	18,77
Hg 21-048	22/04/2021	3,35
Hg 21-045	22/04/2021	12,95
Hg 21-046	22/04/2021	13,47
Hg 21-047	22/04/2021	18,23
Hg 21-049	22/04/2021	19,51
Hg 21-053	22/04/2021	33,62
Hg 21-054	22/04/2021	33,77
Hg 21-056	22/04/2021	37,48
Hg 21-048	22/04/2021	54,77
Hg 21-055	22/04/2021	68,32
Hg 21-050	22/04/2021	132,22
Hg 21-051	20/05/2021	8,00
Hg 21-052	20/05/2021	63,80

Centre d'Etudes Biologiques de Chizé - UMR7372
- Analyses Biologiques -

Cortisol Level

Espèce: *Phoca vitulina*

cortisol Assay performances :

Samples (200mg) asseyed in 2 plates, in triplicate
Intra-assay precision : ε 7,60%
Inter-assay precision : ε 5,01%
LDL : 0,57 ng/g

Year : 2023 **Name : Matthieu Depuille**

Individus	Date	Concentration en ng/g
Pv 22-055	21/05/2022	14,68
Pv 22-054	21/05/2022	16,63
Pv 22-059	22/05/2022	3,20
Pv 22-057	22/05/2022	8,96
Pv 22-056	22/05/2022	12,27
Pv 22-060	22/05/2022	13,88
Pv 22-061	22/05/2022	18,42
Pv 22-058	22/05/2022	27,42
Pv 22-062	20/06/2022	27,89
Pv 22-073	22/06/2022	64,35
Pv 22-075	22/06/2022	77,55
Pv 22-064	22/06/2022	78,66
Pv 22-074	22/06/2022	79,55
Pv 22-063	22/06/2022	136,48
Pv 22-067	23/06/2022	23,13
Pv 22-066	23/06/2022	85,24
Pv 22-065	27/06/2022	33,46
Pv 22-068	15/07/2022	62,75
Pv 22-069	15/07/2022	87,49
Pv 22-071	17/07/2022	65,92
Pv 22-070	17/07/2022	85,44
Pv 22-072	23/07/2022	0,62