



**HAL**  
open science

# Impact du méthylmercure sur le potentiel de migration, le statut énergétique et les mécanismes de détoxification chez la civelle d'anguille européenne (*Anguilla anguilla*): études in situ et expérimentales

Julie Claveau

► **To cite this version:**

Julie Claveau. Impact du méthylmercure sur le potentiel de migration, le statut énergétique et les mécanismes de détoxification chez la civelle d'anguille européenne (*Anguilla anguilla*): études in situ et expérimentales. Biodiversité et Ecologie. Université de Pau et des Pays de l'Adour, 2014. Français. NNT: . tel-02801378

**HAL Id: tel-02801378**

**<https://hal.inrae.fr/tel-02801378>**

Submitted on 5 Jun 2020

**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.

# THÈSE

UNIVERSITE DE PAU ET DES PAYS DE L'ADOUR

École doctorale des Sciences Exactes et leurs Applications

Présentée et soutenue le 4 décembre 2014

Par **Julie CLAVEAU**

pour obtenir le grade de docteur

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

**Spécialité : Biologie et Physiologie des Organismes**

IMPACT DU METHYLMERCURE SUR LE POTENTIEL DE MIGRATION, LE  
STATUT ENERGETIQUE ET LES MECANISMES DE DETOXICATION CHEZ  
LA CIVELLE D'ANGUILLE EUROPEENNE (*Anguilla anguilla*) :  
ETUDES *IN SITU* ET EXPERIMENTALES

## ENCADREMENT DE THESE

- Valérie BOLLIET
- Mathilde MONPERRUS
- Magalie BAUDRIMONT
- Patrice GONZALEZ
- Marc JARRY

Professeur  
Maître de conférence  
Professeur  
Chargé de recherche  
Professeur

UPPA, Pau, France  
UPPA, Pau, France  
CNRS, Bordeaux, France  
CNRS, Bordeaux, France  
UPPA, Pau, France

## MEMBRES DU JURY

### RAPPORTEURS

- Patrice COUTURE
- Olivier SIMON

Professeur  
Chargé de recherche

INRS, Québec, Canada  
IRSN, Cadarache, France

### EXAMINATRICE

- Agnès BARDONNET

Directeur de recherche

INRA, St Pée sur Nivelle, France

### DIRECTRICE

- Valérie BOLLIET

Professeur

UPPA, Pau, France





# THÈSE

UNIVERSITE DE PAU ET DES PAYS DE L'ADOUR  
École doctorale des Sciences Exactes et leurs Applications

Présentée et soutenue le 4 décembre 2014

Par **Julie CLAVEAU**

pour obtenir le grade de docteur  
de l'Université de Pau et des Pays de l'Adour  
**Spécialité : Biologie et Physiologie des Organismes**

IMPACT DU METHYLMERCURE SUR LE POTENTIEL DE MIGRATION, LE  
STATUT ENERGETIQUE ET LES MECANISMES DE DETOXICATION CHEZ  
LA CIVELLE D'ANGUILLE EUROPEENNE (*Anguilla anguilla*) :  
ETUDES *IN SITU* ET EXPERIMENTALES

## ENCADREMENT DE THESE

• Valérie BOLLIET	Professeur	UPPA, Pau, France
• Mathilde MONPERRUS	Maître de conférence	UPPA, Pau, France
• Magalie BAUDRIMONT	Professeur	CNRS, Bordeaux, France
• Patrice GONZALEZ	Chargé de recherche	CNRS, Bordeaux, France
• Marc JARRY	Professeur	UPPA, Pau, France

## MEMBRES DU JURY

### RAPPORTEURS

• Patrice COUTURE	Professeur	INRS, Québec, Canada
• Olivier SIMON	Chargé de recherche	IRSN, Cadarache, France

### EXAMINATRICE

• Agnès BARDONNET	Directeur de recherche	INRA, St Pée sur Nivelle, France
-------------------	------------------------	----------------------------------

### DIRECTRICE

• Valérie BOLLIET	Professeur	UPPA, Pau, France
-------------------	------------	-------------------





*A ma grand-mère*



## Remerciements

Je tiens ici en premier lieu à remercier toutes les personnes qui ont participé à la concrétisation de ce travail. Dans l'éventualité où ma mémoire me joue des tours lors de la restitution des noms de cette liste, ma gratitude et mes remerciements n'en sont pas moins réels, malgré mes possibles oublis.

Je tiens tout d'abord à remercier Patrice Couture, professeur à l'Institut National de la Recherche Scientifique (INRS) du Québec, et Olivier Simon, chargé de recherche à l'Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire (IRSN) à Cadarache d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse. Je remercie également Agnès Bardonnnet, directrice de recherche de l'Institut Nationale de la Recherche Agronomique (INRA) de St Pée sur Nivelles d'avoir bien voulu être l'examinatrice de ce travail.

Je tiens à remercier ma directrice de thèse : Valérie Bolliet ainsi que mes deux co-encadrantes : Mathilde Monperrus et Magalie Baudrimont (les non reconnues administrativement) pour leurs conseils, leurs disponibilités à toutes heures et pour leurs patientes durant ces trois années. Merci pour toutes ses connaissances que j'ai pu apprendre à vos côtés notamment dans des domaines qui ne m'étaient pas forcément familiers. Un grand merci pour m'avoir permis de faire du monitorat en Licence, ce fut une expérience très enrichissante !

Un merci à Jacques Rives et Emmanuel Huchet pour les 'coups de mains' lors des pêches et des manipulations. Un merci particulier à Jacques Rives pour ta bonne humeur permanente et pour m'avoir permis de découvrir la pêche à la civelle !!

Merci à Pascale Coste pour ton aide sur les manipulations et pendant ses longs moments de respiro à 11°C !! Merci d'avoir bien voulu contribuer aux broyages de civelles même si cela t'as valu quelques ampoules !!

Un grand merci à Marc Jarry pour l'aide en statistiques et pour ta contribution lors de la révision d'articles.

Merci à Patrice Gonzalez !! Je te suis extrêmement reconnaissante pour ton inconditionnel investissement durant mes cours et intensifs séjours à Arcachon. Merci pour ta bonne humeur, ton enthousiasme (même devant beaucoup d'échantillons !!) et tes conseils avisés en toutes circonstances durant toute ma thèse. Un grand merci également à Cerise Daffe pour son aide et son soutien lors de mes différentes visites. Et bien évidemment merci à Nathalie Mesmer-Dudons pour son aide sur la microscopie électronique.

Merci à David Amouroux et Emmanuel Tessier pour m'avoir accordé leur confiance et permis de travailler avec eux lors de mes passages à l'IPREM.

Je tiens une nouvelle fois à remercier Agnès Bardonnnet pour m'avoir accueilli pendant ses trois années au sein de l'UMR ECOBIOP INRA/UPPA de St Pée sur Nivelles. Je remercie également le directeur de l'équipe EA(EPOC), Jean-Charles Massabuau et celui du laboratoire LCABIE, Ryszard Lobinski, pour m'avoir accueilli de façon temporaire, permettant ainsi la réalisation de cette étude pluridisciplinaire.



Un grand merci aux membres de mes différents comités de thèse : Agnès Bardonnnet, Magalie Baudrimont, Valérie Bolliet, Jérôme Cachot, Patrice Gonzalez, Marc Jarry et Mathilde Monperrus pour toutes ses discussions enrichissantes qui ont permis de mener à bien ce projet

Merci à l'ensemble de l'ensemble de l'équipe EA lors de mes passages pour leur accueil et leur gentillesse.

Mes remerciements vont aussi à tous les membres de l'INRA de St Pée sur Nivelles pour leur bonne humeur et leur aide ponctuelle au détour d'un couloir. Un merci particulier à Pantxika Dufau-Iribarren, qui est toujours disponible pour répondre à une question administrative ou régler un problème d'ordre pratique, à Philippe Laborde, qui a su m'éviter bien des frayeurs avec mon PC et à Pascale Avril qui est la reine des publications introuvables !

Une pensée particulière pour tous mes compagnons de 'galère' et pour les agréables rencontres effectuées aux détours des laboratoires : Hugues, Lucie, Piwi, Sophie, Hélène, Zoé, Joana, Laure, Hervé, Laurent. Une attention particulière pour ma petite Zozo : la route fut longue et semée d'embûches mais tu en vois bientôt le bout donc c'est le moment de t'accrocher !! Et comme on dit le meilleur pour la fin, enfin la meilleure. Ce fût un véritable plaisir que de préparer des échantillons au laboratoire avec toi même tard le soir..., que de partager un bon moment autour de bières ou de mojitos suite à de nombreux paris perdus!! (il faut d'ailleurs qu'on règle la note !!).

Au début de ma thèse, j'entendais souvent 'trois ans, ça passe vite !' Avec le recul, c'est vrai, mais à vivre, cela a pu paraître différent... Une thèse est un investissement personnel conséquent, je tiens donc à remercier les personnes qui me sont chères et qui m'ont soutenue de prêt ou de loin. Merci à mes amis fidèles de toujours sans qui je ne serais sûrement pas là aujourd'hui : Luce, Caro, Noémie, ..., avec un remerciement particulier pour mon soutien officiel, ma petite Luce !! Même à l'autre bout de la planète, d'où tu me nargues depuis maintenant deux ans, tu es toujours une vraie bouffée d'oxygène !

Je veux également remercier mes parents sans qui je n'en serais pas là aujourd'hui ! Merci à tous les deux d'avoir toujours été là, notamment dans cette dernière ligne droite qui n'a pas toujours été facile. Un grand merci au reste de ma famille pour laquelle je n'ai malheureusement pas été aussi présente que je l'aurais voulu et qui malgré tous ces deniers moments a toujours su rebondir et me soutenir en toutes circonstances...

Une dédicace particulière pour mon soutien inconditionnel et sans faille à toutes heures : ma sœur sans qui je ne saurais toujours pas quelle couleur de fond mettre sur mon poster ! Un problème crucial ! Merci à toi d'être toujours là quand j'en ai besoin !!

Pour finir, merci à toi, Nico, pour m'avoir supportée durant tous ces moments d'anxiétés, merci pour ta patience et ton soutien en toutes circonstances.

*Ils ne savaient pas que c'était impossible, alors ils l'ont fait.*

*Mark Twain*



# Sommaire

<b><u>INTRODUCTION</u></b>	<b>1 à 76</b>
<b>Problématique générale</b>	<b>3 à 5</b>
<b>1. L'anguille européenne</b>	<b>6 à 13</b>
1.1. Cycle biologique de l'anguille européenne	6
1.2. Caractéristiques des différentes phases de vie chez l'anguille	8
1.3. Une espèce en déclin	10
1.3.1. Impact de la pollution	12
1.3.2. Impact de la surpêche	12
1.4. Gestion et restauration	13
<b>2. Concepts de la migration et lien avec l'énergie</b>	<b>14 à 24</b>
2.1. Concept de la migration	14
2.1.1. Qu'est-ce que la migration ?	14
2.1.2. Cadres théoriques de la migration	15
2.1.3. Quelques notions en lien avec la plasticité phénotypique	16
2.1.4. Stratégies conditionnelles évolutivement stables	18
2.2. Migration partielle et cas de l'anguille européenne	18
2.3. Le statut énergétique	23 à 24
2.3.1. Définition	23
2.3.2. Les réserves énergétiques	23
2.3.3. Le métabolisme	24
<b>3. Le mercure dans les environnements aquatiques</b>	<b>25 à 39</b>
3.1. Le mercure dans l'environnement	25
3.1.1. Spéciation du mercure	25
3.1.2. Sources du mercure dans l'environnement	26
3.2. Spéciation et transformation du mercure dans les environnements aquatiques	28
3.2.1. Méthylation dans les environnements aquatiques	29
3.2.2. Déméthylation dans les environnements aquatiques	31
3.2.3. Oxydation et réduction dans les environnements aquatiques	33
3.3. Bioaccumulation et bioamplification du mercure	33
3.4. Les systèmes estuariens	37
3.4.1. Cas particulier : L'estuaire de l'Adour	37
<b>4. Effets du mercure et processus de détoxification</b>	<b>40 à 50</b>
4.1. Effets du mercure sur les organismes aquatiques	40
4.1.1. Effets du mercure sur le comportement	41
4.1.2. Effets du mercure et métabolisme	42
4.2. Processus de détoxification du mercure	48
4.2.1. Les métallothionéines	48
4.2.2. Le glutathion	49
4.2.3. Déméthylation et interaction avec le sélénium	50
4.2.4. Systèmes de défenses antioxydantes	50
<b>5. Objectifs de la thèse</b>	<b>51</b>

<b><u>METHODOLOGIES</u></b>	<b>77 à 94</b>
<b>1. Dispositifs expérimentaux</b>	<b>79 à 85</b>
<b>1.1. Fluvarium et chronotron</b>	80
1.1.1. <i>Evaluation du potentiel de migration en réponse au signal crépusculaire : le fluvarium</i>	80
1.1.2. <i>Evaluation du potentiel de migration des civelles au signal de marée : le chronotron</i>	81
<b>1.2. La micro-respirométrie</b>	81
<b>1.3. Etude de la contamination en MeHg par utilisation de traceurs isotopiques</b>	85
<b>2. Techniques analytiques</b>	<b>85 à 93</b>
<b>2.1. Analyse de spéciation du mercure par GC-ICPMS</b>	85
<b>2.2. Approche génétique : PCR quantitative en temps réel</b>	89
<b>2.3. Dosage des métallothionéines</b>	91
<b><u>CHAPITRE 1 : Etat des lieux de la concentration en MeHg des civelles d'anguille européenne (<i>Anguilla anguilla</i>) dans l'estuaire de l'Adour</u></b>	<b>97 à 120</b>
<b><u>Article 1</u></b> : Spatial and seasonal variations of methylmercury in European glass eels ( <i>Anguilla Anguilla</i> ) in the Adour estuary (France) and relation with their migratory behavior.	99
<b><u>CHAPITRE 2 : Etude en milieu contrôlé de l'impact du MeHg sur les capacités migratoires des civelles, le statut énergétique et les capacités de détoxication</u></b>	<b>123 à 172</b>
<b><u>Partie 1</u></b> : Effet du MeHg sur comportement de migration des civelles ( <i>Anguilla anguilla</i> ) : une étude expérimentale	125
<b><u>Article 2</u></b> : MeHg effects on migratory behaviour in glass eels ( <i>Anguilla anguilla</i> ) : an experimental study	125
<b><u>Partie 2</u></b> : Effet du MeHg sur la synchronisation des civelles en réponse au signal de marée	159
<b><u>CHAPITRE 3 : Etude dans le milieu naturel du comportement de migration, du taux de contamination au mercure et des mécanismes de détoxication</u></b>	<b>175 à 202</b>
<b><u>DISCUSSION</u></b>	<b>203 à 212</b>
<b><u>ANNEXES</u></b>	<b>213 à 220</b>
<b><u>Abstract/résumé</u></b>	

# Liste des Figures

## INTRODUCTION

<b>Figure 1</b> : Aire de distribution et de répartition de l'anguille européenne <i>Anguilla Anguilla</i> (Feunteun 2002).	6
<b>Figure 2</b> : Cycle de vie de l'anguille européenne : <i>Anguilla anguilla</i> (adapté d'après Dekker 2002).	7
<b>Figure 3</b> : Estimation du recrutement des civelles d'anguille <i>Anguilla anguilla</i> en Europe (Suède, Finlande, Estonie, Lettonie, Lituanie, Pologne, Allemagne, Pays-Bas, Belgique, Irlande du Nord, France) depuis 1977 (adapté d'après CIEM 2013).	11
<b>Figure 4</b> : Modèle conceptuel holistique de la migration. Les cercles indiquent les quatre éléments principaux, les flèches grises, les principaux processus qui les relie, les flèches blanches, les principaux modes d'influence de l'environnement. La courte flèche grise symbolise l'impact de la population sur son habitat (épuiement des ressources, agents pathogènes). Adapté d'après Drake et al. 1995.	16
<b>Figure 5</b> : Exemple de résultats de norme de réaction pouvant être obtenus lors de l'étude d'un trait à travers une gamme environnementale (température) (Adapté d'après Huey et Kingsolver 1989). Tmin et Tmax sont les températures minimum et maximum pour laquelle la performance est supérieure à zéro. Topt correspond à la température optimale du trait étudié.	17
<b>Figure 6</b> : Variations du rapport Sr/Ca d'otolithes d' <i>Anguilla anguilla</i> représentant les types d'habitats d'utilisés. Adapté d'après Daverat et al. 2006.	20
<b>Figure 7</b> : Modèle de stratégie conditionnelle évolutivement stable basée sur les tactiques migratoires des civelles. Adapté d'après Edeline et al. 2007.	22
<b>Figure 8</b> : Cycle biogéochimique du mercure dans l'environnement (Adapté de Harris et al. 2007).	25
<b>Figure 9</b> : Principaux flux (tonnes/an) du cycle biogéochimique du mercure. Les flux naturels sont en noirs et les flux anthropiques en rouge. Les flux naturels augmentés par l'activité anthropique sont en pointillés noir et rouge. (Mason et al. 2012).	26
<b>Figure 10</b> : Distribution globale des émissions anthropiques de mercure en 2010 (UNEP 2013).	28
<b>Figure 11</b> : Cycle aquatique du mercure SBR : BSR Bactérie Sulfato-Réductrice (Adapté d'après Morel et al. 1998).	29
<b>Figure 12</b> : Gamme de concentration (ng L <sup>-1</sup> ou ng kg <sup>-1</sup> ) en mercure total (Hg) et proportion en MeHg (%) pour les divers compartiments aquatiques (d'après Tessier 2004).	34
<b>Figure 13</b> : Carte de l'estuaire de l'Adour et de ses principaux affluents.	38
<b>Figure 14</b> : Représentation schématique des modes d'activation de la synthèse de métallothionéines et de ses conséquences (adapté d'après Lichten et Schaffner 2001).	48

## METHODOLOGIES

<b>Figure 15</b> : Schéma d'un tri en fluvarium lors du signal crépusculaire (en haut) et le lendemain matin (en bas).	80
<b>Figure 16</b> : Schéma d'un chronotron.	81
<b>Figure 17</b> : Chambres de respirométrie.	82
<b>Figure 18</b> : Représentation schématique du fonctionnement d'une chambre de respirométrie. Pompe 1 : circuit ouvert-renouvellement de l'eau à partir du bac tampon (1) maintenue à saturation d'oxygène, pompe 2 : circuit fermé- circulation de l'eau dans la chambre (2).	83
<b>Figure 19</b> : Exemple d'enregistrement de la consommation d'oxygène pour une civelle. Les pentes représentées en rouge correspondent aux enregistrements réalisés en circuit fermé. La différence entre les pentes correspondant aux contrôles et aux tests permet de déterminer la consommation d'O <sup>2</sup> .	84
<b>Figure 20</b> : Installation expérimentale utilisée pour la contamination des civelles.	85
<b>Figure 21</b> : Détermination de la concentration c d'un échantillon naturel par dilution isotopique après ajout de standard enrichi, cas du Hg(II), enrichi en <sup>199</sup> (Hg(II)) (d'après Monperrus, 2004).	86
<b>Figure 22</b> : Protocole de préparation des échantillons pour l'analyse de spéciation du Hg par dilution isotopique (à partir de la méthode de Navarro et al. 2013).	87
<b>Figure 23</b> : Méthode de calculs permettant de déterminer les concentrations issues de la méthylation ou de la déméthylation par la technique de dilution isotopique inverse, d'après Monperrus, 2004.	88
<b>Figure 24</b> : Principe général de la PCR quantitative en temps réel (schéma modifié de la documentation de l'appareil LightCycler, Roche).	90
<b>Figure 25</b> : Principe de dosage des métallothionéines.	93

## CHAPITRE 1

- Figure 26 :** Map of the sampling sites. 103
- Figure 27 :** Relationship between dry weight (mg) and MeHg concentration (ng Hg g<sup>-1</sup>dw) in marine (a.) and estuarine (b.) glass eels. Data were combined from 2004 to 2012, n= 116 for marine glass eels and n=178 for estuarine glass eels (Table 10). Lines indicate regression slopes for log (MeHg) versus dry weight (dw). 107
- Figure 28 :** Relationship between dry weight (mg) and MeHg concentration (ng Hg g<sup>-1</sup>dw) in marine glass eels. Lines indicate regression slopes for log (MeHg) versus dry weight (dw) for each sampling date from 2004 to 2011 (see Table 10). 109
- Figure 29 :** Relationship between dry weight (mg) and MeHg concentration (ng Hg g<sup>-1</sup>dw) in estuarine glass eels. Lines indicate regression slopes for log (MeHg) versus dry weight (dw) for each sampling date from 2004 to 2011 (see Table 10). 110
- Figure 30 :** Relationship between dry weight (mg) and MeHg concentration (ng Hg g<sup>-1</sup>dw) in marine glass eels. Lines indicate regression slopes for log (MeHg) versus dry weight (dw) from November 2009 to April 2010 (Table 10). 111

## CHAPITRE 2

- Figure 31 :** Schematical representation of the experimental protocol. S1 to S3: sampling times for biometric and mercury speciation analysis. S1: first sampling, before exposure to <sup>201</sup>MeHg; S2: second sampling just after exposure; S3 third sampling, after the second sorting and oxygen consumption measurement. 129
- Figure 32 :** Schematic view of flume 130
- Figure 33 :** Experimental set up after the first sorting to investigate the effect of MeHg on glass eels' propensity to migrate, 72 migrant and 72 non-migrant glass eels were tagged and exposed to <sup>201</sup>MeHg (50 ng L<sup>-1</sup>) in 10L tanks for 11 days before a second sorting. To investigate the effect of MeHg exposure on gene expression and bioaccumulation, 24 migrant and 24 non-migrant glass eels were exposed to the same conditions but were untagged. 131
- Figure 34 :** Effect of MeHg on glass eel behaviour sorted in an experimental flume in response to dusk. Sorting 1: before exposure to MeHg, Sorting 2: after exposure to MeHg. The number of individuals for each behaviour is indicated in each section. 138
- Figure 35 :** Natural and spiked MeHg and Hg(II) concentrations (log transformed) in glass eels against dry weight. Migrant and non-migrant individuals have been pooled. S1: glass eels sampled just after the first sorting before <sup>201</sup>MeHg exposure , S2: glass eels sampled after the first sorting and just after the exposure to <sup>201</sup>MeHg, S3: glass eels sampled after the second sorting and oxygen consumption measurements. 139
- Figure 36 :** Gene expression in mitochondrial metabolism. *12s*: panel (a), *coxI*: panel (b) in log (as compared to *β-actin*) in contaminated (MeHg) or controls (C) migrant and non-migrant glass eels. Boxplots show the median, first and third quartiles as well as extreme values and outliers. Different letters on top of each box-plot indicate a significant difference between treatments or groups as determined by ANOVA followed Tukey's pairwise comparisons (P < 0,05). 140
- Figure 37 :** Gene expression in oxidative stress. *cat*: panel (a), *sod2*: panel (b) in log (as compared to *β-actin*) in contaminated (MeHg) or controls (C) migrant and non-migrant glass eels. Boxplots show the median, first and third quartiles as well as extreme values and outliers. Different letters on top of each boxplot indicate a significant difference between treatments or groups as determined by ANOVA followed Tukey's pairwise comparisons (P < 0,05). 141
- Figure 38 :** Gene expression in detoxification process. *gst*: panel (a), *mt1* : panel (b) in log (as compared to *β-actin*) in contaminated (MeHg) or controls (C) migrant and non-migrant glass eels. Boxplots show the median, first and third quartiles as well as extreme values and outliers. Different letters on top of each boxplot indicate a significant difference between treatments or groups as determined by ANOVA followed Tukey's pairwise comparisons (P < 0,05). 142
- Figure 39 :** Metallothionein concentrations (nmol Hg sites g<sup>-1</sup>ww) in contaminated (MeHg) or controls (C) migrant and non-migrant glass eels. Boxplots show the median, first and third quartiles as well as extreme values and outliers. Different letters on top of each boxplot indicate a significant difference between treatments or groups as determined by ANOVA followed Tukey's pairwise comparisons (P < 0,05). 142

- Figure 40** : Electron microscopic analysis of muscular fibres of migrant (a-d) and non-migrant (e-f) gill eels for control (a-c-e) and contaminated (b-d-f) conditions. is: interfiber space, m:mitochondria, mf: muscle fiber, sc:sarcomeres. 143
- Figure 41** : Protocole expérimental de contamination pour évaluer l'effet du MeHg sur la synchronisation de nage des civelles à l'inversion du courant. 48 civelles ont été marquées et exposées au  $^{201}\text{MeHg}$  ( $50 \text{ ng L}^{-1}$ ) dans des aquariums de 10L pour 11 jours et 36 civelles ont également été marquées pour suivre l'impact de la contamination dans les chronotrons. 72 civelles non marquées et non contaminées ont favorisé la synchronisation des civelles par effet de densité. 160
- Figure 42** : Perte de poids des civelles à la fin de la phase 3 en fonction du nombre total d'observations dans le sens ou à contre-courant pour les civelles contaminées ( $F=87.74$  ;  $p=1,17.10^{-7}$  ;  $R^2=0.84$ ) et contrôles ( $F=23.33$  ;  $2,21.10^{-4}$  ;  $R^2=0.58$ ). 163
- Figure 43** : Moyenne des déplacements des civelles contaminées (rouge) ou contrôles (blanc) observées lors des trois phases de suivis comportementaux : phase 1, 11 jours de synchronisation à l'inversion du courant; phase 2, étaie (arrêt du courant); phase 3, 4 jours de synchronisation à l'inversion du courant. Chaque valeur sous les histogrammes correspond au nombre de civelles observées plus de 15 fois en activité, synchronisées avec ou à contre-courant. Aucune différence significative n'a été observée entre les lots. 163
- Figure 44** : Concentrations naturelles et spikées en méthylmercure (MeHg) et mercure inorganique (Hg(II)) dans les civelles ( $\text{ng Hg}^{-1} \text{ ps}$ ) en fonction du poids sec (en mg). t2 : civelles analysées à la fin de la contamination, t3 : civelles analysées après l'étude comportementale, 15 jours après la fin de la contamination 165

### CHAPITRE 3

- Figure 45** : Sites choisis pour les prélèvements des civelles. 178
- Figure 46** : Protocole expérimental réalisé pour chaque pêche. Lg: longueur, PF : Poids Frais, PS : Poids Sec, n : nombre de civelles échantillonnées par comportement de migration. L'acronyme (§) fait référence au paragraphe de la partie Méthodologies (§ X), de ce manuscrit et à chaque sous-partie (§ X, X) expliquant les méthodes d'échantillonnages et d'analyses des échantillons. 180
- Figure 47** : Comportements observés lors des tris en fluvarium sur l'ensemble des campagnes d'échantillonnages de 2011 à 2013. a. Début de saison 2011-2012 / b. Fin de saison 2011-2012 / c. Fin de saison 2012-2013. 182
- Figure 48** : Analyse en Composante Principale (ACP) en fonction du Métabolisme Absolu (MA), du Métabolisme Relatif (MR), du Poids Sec (PS), de la concentration en Méthylmercure (MeHg) et en Mercure Inorganique (Hg(II)) pour des civelles Migrantes (M ; ●) et Non Migrantes (NM ; ●) du lot 2. Cercle des corrélations (a.), carte des individus avec ellipses de dispersion des individus (b.). 185
- Figure 49** : Carte et ellipses de dispersion des individus du lot 2 et issus de l'Analyse en Composante Principale (ACP) en fonction du Métabolisme Absolu (MA), du Métabolisme Relatif (MR), du Poids Sec (PS), de la concentration en Méthylmercure (MeHg) et en Mercure Inorganique (Hg(II)). M: civelles Migrantes ; NM: civelles Non Migrantes ; DS : Début de saison ; DS : Fin de Saison. En haut à droite le cercle de corrélation. 188
- Figure 50** : Carte et ellipses de dispersion des individus du lot 2 et issus de l'Analyse en Composante Principale (ACP) en fonction du Métabolisme Absolu (MA), du Métabolisme Relatif (MR), du Poids Sec (PS), de la concentration en Méthylmercure (MeHg) et en Mercure Inorganique (Hg(II)). M: civelles Migrantes ; NM: civelles Non Migrantes échantillonnées à Urt et à Moliets. En haut à droite le cercle de corrélation. 191
- Figure 51** : Analyse en Composante Principale (ACP) en fonction du Métabolisme Absolu (MA), du Métabolisme Relatif (MR), du Poids Sec (PS), de la concentration en Méthylmercure (MeHg) et en Mercure Inorganique (Hg(II)) pour des civelles Migrantes (M ; ●) et Non Migrantes (NM ; ●) du lot 2. Cercle des corrélations (a.), carte des individus avec ellipses de dispersion des individus (b.). 193





# Liste des Tables et Tableaux

## INTRODUCTION

<b>Tableau 1 :</b> Différents types de migration (Adapté d'après Dingle 1996).	18
<b>Tableau 2 :</b> Gamme (minimum –maximum) de concentrations de MeHg (mg kg <sup>-1</sup> poids frais) observées dans le muscle de différentes espèces de poissons adultes dans différents milieux. Mil : Milieux = Dulçaquicole (Dul), Marin (Mar), Lacustre (Lac), Estuarien (Est). * concentrations exprimées en poids sec.	35
<b>Tableau 3 :</b> Gamme (minimum-maximum) de concentration en méthylmercure (MeHg) et mercure total (Hg) dans différentes matrices de l'estuaire de l'Adour.	39
<b>Tableau 4 :</b> Effets du Hg (MeHg et Hg(II)) observés sur le comportement des poissons Types de comportements étudiés : en violet (activité de nage), en vert (capture de proies), en orange (apprentissage), en bleu (prédation) / Stade : stade de l'organisme durant l'exposition= adulte (A), juvénile (J), larvaire (L), embryonnaire (E), nd = non déterminé / Voie d'exposition (VE) de l'organisme au MeHg : par voie trophique (VT), par voie aqueuse (VA), par injection intra-péritonéale (II) / Durée d'exposition : période pendant laquelle l'organisme a été exposé au Hg / nb[Hg] <sub>testées</sub> : nombre de concentrations testées (MeHg ou Hg(II)) / [Hg] <sub>sans effet</sub> : concentration (MeHg ou Hg(II)) n'ayant pas d'effet sur l'organisme étudié / [Hg] <sub>avec effet</sub> : concentration (MeHg ou Hg(II)) minimale ayant un effet sur l'organisme étudié / Effets observés sur les organismes après exposition ; ↑ : augmentation, ↓ : diminution, <sup>a</sup> : pour la plus forte concentration testée ; <sup>b</sup> : proportionnelle aux concentrations.	43
<b>Tableau 5 :</b> Effets du MeHg sur le stress oxydant et le métabolisme. Stade : Stade de l'organisme durant la contamination= adulte (A), juvénile (J), nd = non déterminé / Organes (O) ou tissus (T) analysés durant les expériences : cerveau (C), foie (F), muscle (Mu), mitochondrie (Mi), reins (R) / Voie d'exposition (VE) de l'organisme au MeHg : par voie trophique (VT), par voie aqueuse (VA), par injection intra-péritonéale (II), nd = non déterminé / Durée d'exposition : période pendant laquelle l'organisme a été exposé au MeHg / nb [MeHg] <sub>testées</sub> : nombre de concentrations testées / [MeHg] <sub>min-max</sub> : plus faible et plus forte concentration au MeHg testée / [MeHg] <sub>observées</sub> : concentrations déterminées dans l'organe ou le tissu de l'organisme (cX : rappel de la concentration d'exposition). Les concentrations exprimées par unité de masse sont en poids frais. (*si poids sec) / Effets observés sur les organismes après exposition. ↑ : augmentation, ↓ : diminution.	44-45
<b>Tableau 6 :</b> Effets du Hg(II) sur le stress oxydant et le métabolisme Stade : Stade de l'organisme durant la contamination = adulte (A), juvénile (J), nd = non déterminé / Organes (O) ou tissus (T) analysés durant les expériences : branchie (B), cerveau (C), cœur (Co), foie (F), glande digestive (GD), muscle (Mu), reins (R), gonade (G) / Voie d'exposition (VE) de l'organisme au Hg(II): par voie trophique (VT) ou voie aqueuse (VA) / Durée d'exposition : période pendant laquelle l'organisme a été exposé au Hg(II) / nb [Hg(II)] <sub>testés</sub> : nombre de concentrations testé / [Hg(II)] <sub>min-max</sub> : plus faible et plus forte concentration au Hg(II) testée / [Hg(II)] <sub>observées</sub> : concentrations déterminées dans l'organe ou le tissu de l'organisme (cX : rappel de la concentration d'exposition/ou de la durée d'exposition). Les concentrations exprimées par unité de masse sont en poids frais (*si poids sec) / Effets observés sur les organismes après exposition. ↑ : augmentation, ↓ : diminution.	46-47

## METHODOLOGIES

<b>Tableau 7 :</b> Dispositifs expérimentaux et techniques analytiques utilisés lors de ce travail.	79
<b>Tableau 8 :</b> Paramètres d'utilisation du GC-ICPMS lors du dosage des espèces mercurielles.	89
<b>Tableau 9 :</b> Caractéristiques des gènes utilisés lors de la Q-PCR.	91

## CHAPITRE 1

<b>Table 10:</b> Overview of samples and measurements (mean ± standard deviation, nd=no determined).	104
--	-----

**Table 11:** Results of covariance analysis (Anova, type II) based on the linear model for explaining MeHg concentrations as a function of site (marine vs. estuarine) and dry weight %: percentage of 109variance explained by the factors. The direction of the effect is indicated only when the effect of the factor was significant. 108

## CHAPITRE 2

**Table 12 :** Overview of samples, biometric measurements and mercury species concentrations (mean  $\pm$  standard deviation). The behaviour was determine before exposure to MeHg (Sampling 1, S1), just after exposure (Sampling 2, S2) and after the second sorting that followed exposure (Sampling 3, S3). For this second sorting, we indicated first the behaviour observed during the first sorting and then during the second one. Natural concentrations correspond to mercury species bioaccumulated in the wild while spiked concentrations correspond to mercury species accumulated after experimental exposure to  $^{201}\text{MeHg}$ . 133

**Table 13 :** Function and specific primer pairs for the 7 genes from *A. anguilla* used in this study. (<sup>a</sup> : forward primer, <sup>b</sup> : reverse primer) 134

**Table 14 :** Mean length and weight of migrant, non-migrant and active glass eels before (sorting 1) and after (sorting 2) exposure to MeHg. (N) Number of glass eels, (%) proportions of glass eels. Results that differs significantly are represented in bold ( $p < 0.05$ ) 137

**Table 15 :** Oxygen consumption (mean  $\pm$  standard deviation,  $\text{mm}^3 \text{g}^{-1} \text{dw}$ ) in controls and contaminated glass eels related to migratory behaviour. N: number of glass eels sampled. 143

**Tableau 16 :** Nombre de civelles contaminées ou contrôles observées lors des phases 1 à 3 plus de 15 fois en activité et synchronisées avec une période de 12,4hrs $\pm$  0,3 avec le courant. SC : civelles nageant avec le courant une marée sur 2, CC : civelles nageant à contre-courant une marée sur 2 ; SC/CC : civelles alternant la nage avec et à contre-courant à chaque inversion de courant. 164

**Tableau 17 :** Concentration moyenne mesurée dans deux aquariums du traceur ( $^{201}\text{MeHg}$  spiké et  $^{201}\text{Hg(II)}$  spiké) à la fin de la contamination (t2) ( $\text{ng L}^{-1}$ ) et facteur de bioaccumulation correspondant. t2 ; civelles analysées à la fin de la contamination, t3 : civelles analysées après l'étude comportementale, 15 jours après la fin de la contamination 165

## CHAPITRE 3

**Tableau 18 :** Effectifs (Eff) obtenus après les tris en fluvarium puis pour l'échantillonnage du lot 3 et pour le regroupement des lots 1 et 3. Caractérisation du comportement des civelles après le tri en fluvarium : migrantes (Mig), actives (Act), non migrantes (NM), reliquats et perdus (Rel et Per) à partir des effectifs totaux (eff tot) obtenus lors des différents pêches effectuées entre 2011 et 2013 à Urt (U) et Moliets (M). Les civelles migrantes correspondent aux civelles ayant répondu au signal crépusculaire, les civelles actives correspondent à celles qui ne se sont pas synchronisées en réponse au signal crépusculaire et les civelles non migrantes sont celles qui sont restées dans les abris. 182

**Tableau 19 :** Effet du lieu (Urt/Moliets) et de la saison (début et fin de saison) sur le comportement (migrante/non migrante) des civelles triées en milieu expérimental en réponse au crépuscule. Résultats de l'analyse de déviance basée sur le modèle linéaire généralisé (GLM) (avec distribution binomiale). DS : début de saison, FS : fin de saison 183

**Tableau 20 :** Caractéristiques des civelles migrantes et non migrantes des lots 1 et 3 (poolés) et du lot 2, indépendamment de la saison et du lieu de pêche (cf Tableau 18). Les données sont exprimées en moyenne  $\pm$  écart-type). Lg : Longueur, PF : Poids frais. Les paramètres variant significativement sont en gras. 184

**Tableau 21 :** Caractéristiques des civelles des lots 1 et 3 (poolés) et du lot 2 en fonction la saison et indépendamment du comportement migratoire des individus et du lieu de pêche (cf Tableau 18). Les données sont exprimées en moyenne  $\pm$  écart-type). Lg : Longueur, PF : Poids frais. Les paramètres variant significativement sont en gras. 186

**Tableau 22 :** Caractéristiques des civelles migrantes et non migrantes des lots 1 et 3 (poolés) et du lot 2 en début de saison, indépendamment du lieu de pêche (cf Tableau 18). Les données sont exprimées en moyenne  $\pm$  écart-type). Lg : Longueur, PF : Poids frais. Les paramètres variant significativement sont en gras. 187

<b>Tableau 23</b> : Caractéristiques des civelles migrantes et non migrantes des lots 1 et 3 (poolés) et du lot 2 en fin de saison, indépendamment du lieu de pêche (cf Tableau 18). Les données sont exprimées en moyenne $\pm$ écart-type). Lg : Longueur, PF : Poids frais. Les paramètres variant significativement sont en gras.	187
<b>Tableau 24</b> : Caractéristiques des civelles des lots 1 et 3 (poolés) et du lot 2 échantillonnées à Urt et Moliets, indépendamment du comportement migratoire et de la saison de pêche (cf Tableau 18). Les données sont exprimées en moyenne $\pm$ écart-type). Lg : Longueur, PF : Poids frais. Les paramètres variant significativement sont en gras.	189
<b>Tableau 25</b> : Caractéristiques des civelles migrantes et non migrantes des lots 1 et 3 (poolés) et du lot 2 échantillonnées à Moliets, indépendamment de la saison de pêche (cf Tableau 18). Les données sont exprimées en moyenne $\pm$ écart-type). Lg : Longueur, PF : Poids frais. Les paramètres variant significativement sont en gras.	190
<b>Tableau 26</b> : Caractéristiques des civelles migrantes et non migrantes des lots 1 et 3 (poolés) et du lot 2 échantillonnées à Moliets, indépendamment de la saison de pêche (cf Tableau 18). Les données sont exprimées en moyenne $\pm$ écart-type). Lg : Longueur, PF : Poids frais. Les paramètres variant significativement sont en gras.	190
<b>Tableau 27</b> : Biométrie, expression de gènes impliqués dans le métabolisme mitochondrial ((12s, <i>cox</i> ), le métabolisme des lipides ( <i>tgf</i> ), le stress oxydant ( <i>cat</i> , <i>sod</i> ), les mécanismes de détoxification ( <i>gst</i> ) et la concentrations en métallothionéines (MT) chez les civelles migrantes et non migrantes échantillonnées à Moliets en fin de saison de pêche 2013. Les données sont exprimées en moyenne $\pm$ écart-type). Lg : Longueur, PF : Poids frais. Entre parenthèses, les valeurs, à titre de comparaison, obtenues sur un échantillonnage réalisé à Moliets en 2012. Les paramètres variant significativement sont en gras.	192
<b>Tableau 28</b> : Biométrie, expression de gènes impliqués dans le métabolisme mitochondrial ((12s, <i>cox</i> ), le métabolisme des lipides ( <i>tgf</i> ), le stress oxydant ( <i>cat</i> , <i>sod</i> ), les mécanismes de détoxification ( <i>gst</i> ) et concentrations en métallothionéines (MT) chez les civelles migrantes et non migrantes échantillonnées à Urt en fin de saison de pêche 2013. Les données sont exprimées en moyenne $\pm$ écart-type). Lg : Longueur, PF : Poids frais. Les paramètres variant significativement sont en gras.	193

## ANNEXES

<b>Tableau 1bis</b> : Résumé des paramètres biométriques obtenus pour chaque civelle pour les différentes périodes d'échantillonnage : t1 (après la pêche), t2 (après la contamination) et t3 (après le suivi comportemental dans les chronotrons).	215
<b>Tableau 2bis</b> : Caractéristiques des civelles migrantes des lots 1 et 3 (poolés) et du lot 2 en début et fin de saison, indépendamment du lieu de pêche (cf Tableau 17). Les données sont exprimées en moyenne $\pm$ écart-type). Lg : Longueur, PF : Poids frais. Les paramètres variant significativement sont en gras.	216
<b>Tableau 3bis</b> : Caractéristiques des civelles non migrantes des lots 1 et 3 (poolés) et du lot 2 en début et fin de saison, indépendamment du lieu de pêche (cf Tableau 17). Les données sont exprimées en moyenne $\pm$ écart-type). Lg : Longueur, PF : Poids frais. Les paramètres variant significativement sont en gras.	217
<b>Tableau 4bis</b> : Caractéristiques des civelles migrantes des lots 1 et 3 (poolés) et du lot 2 entre Moliets et Urt, indépendamment de la saison (cf Tableau 17). Les données sont exprimées en moyenne $\pm$ écart-type). Lg : Longueur, PF : Poids frais. Les paramètres variant significativement sont en gras.	218
<b>Tableau 5bis</b> : Caractéristiques des civelles non migrantes des lots 1 et 3 (poolés) et du lot 2 entre Moliets et Urt, indépendamment de la saison (cf Tableau 17). Les données sont exprimées en moyenne $\pm$ écart-type). Lg : Longueur, PF : Poids frais. Les paramètres variant significativement sont en gras.	219



## Abréviations

<b>12s</b>	petite sous unité de l'ARN ribosomique
<b>ACP</b>	Analyse en Composante Principale
<b>ADN</b>	Acide DésoxyriboNucléique (ADNc : complémentaire)
<b>Ag</b>	Argent
<b>ARN</b>	Acide RiboNucléique
<b>ATP</b>	Adénosine Tri Phospahte
<b>Bi</b>	Bismuth
<b>BSR</b>	Bactérie Sulfato-Réductrice
<b>Ca</b>	Calcium
<b>cat</b>	catalase
<b>CC</b>	Contre-Courant
<b>Cd</b>	Cadnium
<b>CH<sub>3</sub></b>	Méthyl
<b>CH<sub>4</sub></b>	Méthane
<b>((CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub></b>	Diméthyl
<b>(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Hg</b>	Diméthylmercure
<b>Co</b>	Cobalt
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dioxyde de carbone
<b>cox</b>	cytochrome – c – oxydase
<b>Cu</b>	Cuivre
<b>DS</b>	Début de Saison
<b>Dul</b>	Dulçaquicole
<b>ERO</b>	Espèce Réactive à l'Oxygène (ROS : Reactive Oxygen Species)
<b>Est</b>	Estuarien
<b>Fe</b>	Fer
<b>FS</b>	Fin de Saison
<b>GAG</b>	GlycoAminoGlycane
<b>GC-ICPMS</b>	Chromatographie en phase Gazeuse Couplée à un Spectromètre de Masse à Plasma Induit
<b>GLM</b>	General Linear Model ( modèle linéaire généralisé)
<b>GSH</b>	Glutahion
<b>gst</b>	Glutathion –s- transferase
<b>Hg<sup>0</sup></b>	Mercure élémentaire
<b>Hg(II), HgCl<sub>2</sub>, Hg<sup>2+</sup></b>	Mercure inorganique
<b>Hrs/hrs</b>	Heures
<b>Lac</b>	Lacustre
<b>Lg</b>	Longueur
<b>L</b>	Litre
<b>M</b>	Migrante
<b>MA</b>	Métabolisme Absolu
<b>Mar</b>	Marin
<b>Max</b>	Maximum
<b>MeHg</b>	Méthylmercure
<b>MR</b>	Métabolisme Relatif
<b>Min</b>	Minimum
<b>MT</b>	Métallothionéine
<b>N</b>	Nord

<b>N<sub>2</sub></b>	Azote
<b>NM</b>	Non Migrante
<b>O<sub>2</sub></b>	Oxygène
<b>OH</b>	Hydroxyde
<b>Pb</b>	Plomb
<b>PF, pf</b>	Poids Frais
<b>pH</b>	Potentiel Hydrogène
<b>PS, ps</b>	Poids sec
<b>QA/QC</b>	Quality Assurance/ Quality Control
<b>Q-PCR</b>	Réaction de Polymérisation en Chaîne Quantitative
<b>Radicaux OH</b>	Radicaux hydroxyles
<b>SC</b>	Sens du Courant
<b>Se</b>	Sélénium
<b>sod</b>	superoxyde dismutase
<b>Sr</b>	Strontium
<b>T</b>	Température
<b>t</b>	tonne
<b>TMAH</b>	TétrAMethylAmmoniumHydroxyde
<b>TTS</b>	Transport Tidal Sélectif (STST: selective tidal stream transport)
<b>UICN</b>	Union International pour la Conservation de la Nature
<b>UNEP</b>	United Nation Environment Programme
<b>UV</b>	Ultra-Violet
<b>W</b>	West
<b>Zn</b>	Zinc

# ***INTRODUCTION***

---





## **Problématique générale**

L'anguille, bien qu'ayant suscité une véritable fascination auprès des scientifiques depuis l'antiquité, a souvent été méprisée. Selon Aristote (*Historia Animalium*, -384 à -322 av JC), l'anguille proviendrait de ce qui est décrit comme les entrailles de la terre, d'endroits riches de matières en décomposition, là où la chaleur du soleil induirait la putréfaction (Van Ginneken et Maes 2005). Il y a encore quelques décennies, elle était considérée comme nuisible (Bruslé, 1990) mais aujourd'hui, la population d'anguille enregistre une baisse constante et importante des arrivées de civelles entraînant une diminution des densités d'anguille jaune dans les bassins versants (Stone 2003 ; Palstra et al. 2006). Même si les causes de ce déclin ne sont à l'heure actuelle pas clairement connues, plusieurs hypothèses ont été avancées telles que : la fragmentation des habitats, la surpêche, le braconnage, le parasitisme ou encore la pollution (Dekker 2004 ; Bonhommeau et al. 2009).

L'anguille européenne (*Anguilla anguilla*) se reproduit en mer des Sargasses. Les larves leptocéphales qui en résultent vont effectuer une migration transocéanique jusqu'aux côtes européennes puis effectuer leur première métamorphose **en stade civelle**. Ces dernières vont ensuite remonter l'estuaire sans s'alimenter et au stade anguille jaune, vont effectuer une phase de croissance somatique en eau douce. L'anguille jaune va ensuite se métamorphoser en stade anguille argentée et amorcer la seconde migration transocéanique vers son site de reproduction en mer des Sargasses (Dekker 2002).

Chez l'anguille, les travaux sur la microchimie des otolithes<sup>1</sup> ont permis de mettre en évidence l'existence de différents patrons de migration dans l'estuaire. Avec l'étude du rapport Strontium/Calcium (Sr/Ca), Daverat et al. (2006) a ainsi pu montrer **qu'une partie des civelles migre jusqu'à atteindre les rivières et que l'autre partie s'arrête et se sédentarise en zone côtière ou estuarienne** mettant en évidence des divergences de comportement migratoire. Généralement, les individus qui se sédentarisent en zone côtière ou estuarienne conduiront à des individus mâles, et à l'inverse, ceux migrant en rivière à des individus femelles. Il semble donc nécessaire afin de comprendre la migration de l'anguille d'en comprendre les déterminismes.

A l'heure actuelle, les facteurs influençant les différents comportements de migration ne sont pas clairement identifiés. Un lien a été établi entre le contenu énergétique des individus et leur capacité migratoire : **les civelles ayant des plus grandes réserves énergétiques auraient**

---

<sup>1</sup> Concrétion minérale apportant des informations sur l'histoire de vie des poissons, renseigne sur le milieu où il a vécu.

**une plus grande capacité de migration** (Bureau du Colombier et al. 2007, 2009 ; Edeline 2007). Cependant, ces différents travaux ont aussi mis en évidence que **ce seul facteur ne permettait pas d'expliquer en totalité le comportement de migration**. Lors de la migration estuarienne, la civelle ne s'alimente pas ou peu (Bardonnnet et Riera 2005) et elle doit donc utiliser les réserves énergétiques accumulées par la larve leptocéphale pour migrer. **Or, la vitesse d'utilisation des réserves énergétiques, soit le métabolisme, pourrait également être un facteur important pour le déterminisme de la migration**. Le métabolisme peut naturellement varier d'un individu à un autre mais dépend également des conditions rencontrées en mer et en estuaire telles que des variations de température, de débit ou la présence de contaminants, comme le mercure.

**Dans l'estuaire de l'Adour**, localisé au sud-ouest de la France, Point et al. (2004) a mis en évidence **des sources de mercure** à l'amont mais également à l'aval avec des apports urbains et industriels. De fortes concentrations de MeHg sont observées dans les sédiments (Stoichev et al. 2006) et sont notamment dues à la présence de bactéries sulfato-réductrices ayant un fort potentiel de méthylation (Dias 2008 ; Duran et al. 2008). Par ailleurs, de faibles concentrations de MeHg ont également pu être observées dans la colonne d'eau (Sharif et al. 2014). Ces deux **sources de MeHg peuvent ainsi directement être accumulées par les organismes et notamment par la civelle dans la colonne d'eau**. En effet, Le MeHg est un composé lipophile facilement bioaccumulable par les espèces aquatiques. A ce jour, **le MeHg est reconnu pour induire de nombreux effets** et ce, à différentes échelles : moléculaires, physiologiques et comportementales. Cependant, à l'heure actuelle, généralement, un ou deux variables d'exposition sont pris en compte et très souvent les doses d'exposition sont très éloignées du milieu. **Il est en effet rare que des études s'attachent à effectuer une mesure conjointe de variables biologiques afin d'apporter des informations complémentaires pour comprendre à différentes échelles (de la molécule à l'organisme) le processus de contamination et ses conséquences sur l'organisme étudié.**

Dans ce contexte, cette étude a consisté à analyser différents marqueurs biologiques, à différentes échelles, afin de mieux comprendre l'impact d'une contamination au MeHg sur le comportement de migration des civelles.

Ce manuscrit s'articule en différentes parties. Une **première partie** est consacrée à un état de l'art sur l'Anguille européenne (*Anguilla anguilla*) et les concepts de la migration en lien avec le statut énergétique. Le rôle du mercure dans les environnements aquatiques, les effets de celui-ci sur les organismes et les systèmes de détoxification possibles sont également abordés. La **deuxième partie** regroupe les différents outils et techniques mises en œuvre au cours de ce travail.

La suite du manuscrit est ensuite séparée en trois chapitres. Dans un **premier chapitre** intitulé : 'Etat des lieux de la concentration en MeHg des civelles d'anguille européenne (*Anguilla anguilla*) dans l'estuaire de l'Adour' sont présentés les résultats obtenus lors de campagnes *in situ* réalisées de 2004 à 2012. Cet article est accepté pour publication.

Le **deuxième chapitre** est consacré aux données récoltées en milieu expérimental et a consisté à étudier l'impact du Méthylmercure (MeHg) sur le comportement migratoire des civelles. Dans une première partie intitulé : 'Effet du MeHg sur le comportement de migration des civelles (*Anguilla anguilla*) : étude expérimentale' sont présentés les résultats concernant l'impact du méthylmercure sur le comportement de migration, le métabolisme, les réserves énergétiques et les processus de détoxification. Cet article est soumis pour publication. Une deuxième partie intitulée : 'Effet du MeHg sur la synchronisation des civelles en réponse au signal de marée' sont présentés les résultats sur les processus d'accumulation et de transformation du MeHg et son impact sur le rythme d'activité de nage des civelles.

Le **troisième chapitre** est consacré aux données récoltées *in situ* et confronte les résultats obtenues à ceux obtenus en milieu expérimental.

La **dernière partie** clôture ce manuscrit avec les conclusions de ces recherches et les perspectives.

# 1. L'anguille européenne

## 1.1. Cycle biologique de l'anguille européenne

L'anguille européenne (*Anguilla anguilla* Linnée 1758) est l'un des poissons osseux les plus primitifs appartenant à l'ordre des Anguilliformes et à la famille des Anguillidés. C'est un téléostéen thalassotoque<sup>2</sup> qui se répartit entre zones tempérées et tropicales sur l'ensemble du globe. A ce jour, la mer des Sargasses est le seul site de reproduction connu (Schmidt 1922 ; McCleave et al. 1998 ; Tesch 2003). Même si plusieurs travaux ont tenté de remettre en cause l'hypothèse de la panmixie<sup>3</sup> de l'anguille (Daemen et al. 2001 ; Wirth et Bernatchez 2001), les récents travaux de Als et al. (2011) et Côté et al. (2013) tendent à la supporter. Après la reproduction, les larves leptocéphales vont être transportées passivement, par vagues successives, vers les côtes européennes et nord africaines par le Gulf Stream et le courant Nord Atlantique (Feunteun 2002 ; Tesch 2003) (Figure 1).

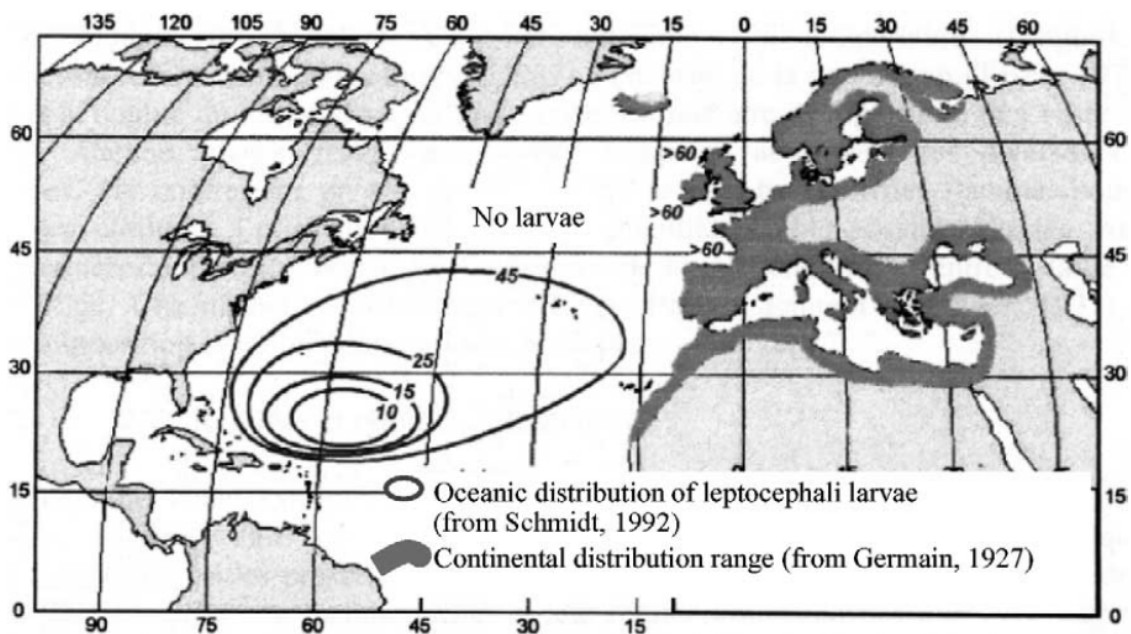


Figure 1 : Aire de distribution et de répartition de l'anguille européenne *Anguilla Anguilla* (Feunteun 2002).

<sup>2</sup> Désigne un organisme qui se reproduit en mer

<sup>3</sup> Caractérise des individus qui se reproduisent aléatoirement et qui se répartissent de façon homogène au sein de la population

L'utilisation d'un transport actif lors de la migration a également été suggérée (Lecomte-Finiger 1994 ; Arai et al. 2000) suite à la mise en évidence de mouvements migratoires verticaux de larves dans la colonne d'eau (Schoth et Tesch 1984 ; McCleave et al. 1998). La durée de la migration est sujet de débats, avec des estimations variant de 7 mois (Lecomte-Finiger 1992) à deux ans (Kettle et Haines 2006 ; Bonhommeau et al. 2009) mais les différentes études sur la microstructure de l'otolithe laisseraient penser que la migration s'effectuerait entre 5 et 8 mois (Lecomte-Finiger 1994; Arai et al. 2000). A l'approche du plateau continental, les larves vont effectuer leur première métamorphose en civelles et progressivement se pigmenter en remontant les estuaires. Par la suite, une phase de croissance somatique en rivière va avoir lieu sous le stade d'anguille jaune. Généralement, cette phase dure de 3 à 8 ans pour les mâles et de 8 à 15 ans pour les femelles (Feunteun 2002) avec une majorité de mâles recensés en aval et des femelles principalement en amont des bassins versants (Bruslé et Quignard 2001). L'anguille effectue ensuite une seconde métamorphose pour atteindre le stade d'anguille argentée et amorce sa seconde migration transocéanique pour se reproduire et mourir en mer des Sargasses (Figure 2).

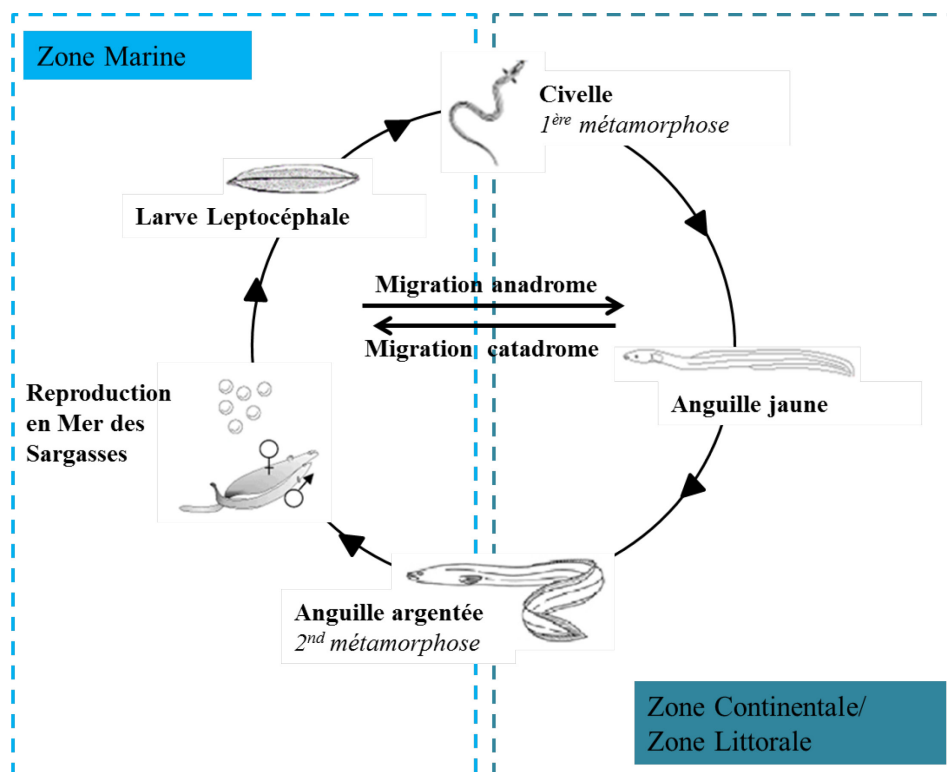


Figure 2 : Cycle de vie de l'anguille européenne : *Anguilla anguilla* (adapté d'après Dekker 2002).

## **1.2. Caractéristiques des différentes phases de vie chez l'anguille**

### Phase leptocéphale

Le stade leptocéphale correspond à l'étape de l'accumulation des réserves énergétiques pour la métamorphose et la migration estuarienne (Bertin 1951 ; Elie 1979 ; McCleave et Kleckner 1987). Contrairement à d'autres espèces de poissons, la larve leptocéphale consommerait moins d'énergie lors de la migration transocéanique, ce qui lui permettrait une meilleure survie (Lecomte-Finiger 1994 ; Bonhommeau et al. 2009). De récents travaux ont montré qu'elle s'alimente principalement d'organismes planctoniques (Riemann et al. 2010) ou encore de neige marine<sup>4</sup> (Miller et al. 2012 , 2013). Cependant, le régime alimentaire de la larve est dépendant des conditions environnementales qu'elle va rencontrer lors de la dérive océanique (Miller et al. 2012, 2013). La larve leptocéphale présente une matrice extracellulaire constituée de GlycoAminoGlycanes (GAG) ce qui lui permet d'atteindre une taille importante (entre 7 et 8 cm) alors qu'elle investit majoritairement l'énergie assimilée dans son métabolisme (Bishop et Torres 2001). En effet, l'accumulation de ces composés non métabolisables (GAG) permet une augmentation substantielle de la taille de la larve sans les coûts associés d'une prolifération cellulaire (Bishop et Torres 1999). Ces GAG ont un rôle de maintien de la structure et d'hydratation de la larve mais seront à l'origine des réserves énergétiques de la civelle qui ne s'alimentera quasiment pas durant sa migration estuarienne (Bertin 1951 ; Bardonnnet et Riera 2005).

### Phase civelle

La métamorphose en civelle, sous contrôle hormonal, notamment thyroïdien (Yamano et al. 2007) est une étape clé du développement de l'anguille puisqu'elle se traduit par de nombreux changements morphologiques, physiologiques et comportementaux coûteux en énergie (Elie et Rochard 1994). Elle est marquée par un processus de pigmentation (Vilter 1945 ; Elie et al. 1982) ainsi que par l'arrêt de la prise de nourriture et donc de la croissance. Un développement du système digestif, des dents (Elie 1979 ; Elie et al. 1982), de la musculature, de l'acuité visuelle et du cerveau ont lieu (Otake 2003). En parallèle, les branchies et les cellules à ions chlorures évoluent pour permettre la transition entre l'eau de mer et l'eau douce (Otake 2003). Après cette métamorphose, les civelles arrivent dans les estuaires des côtes européennes et nord-africaines entre le mois d'octobre et d'avril pour coloniser les milieux (Bertin 1951 ; Tesch 2003). Pour traverser l'estuaire, la majorité des civelles utilisent

---

<sup>4</sup> Détritus organiques aux propriétés colloïdales tombant des couches supérieures de l'océan

le Transport Tidal Sélectif (TTS, Jellyman 1979 ; Gascuel 1986 ; Forward et Tankersley 2001) avec une utilisation plus ou moins optimale des courants (Wippelhauser et McCleave 1987 ; Beaulaton et Castelnaud 2005). A marée montante, les civelles remontent dans la colonne d'eau et se laissent porter par le courant à un coût énergétique modéré (Weihs 1978 ; Hickman 1981). Au jusant, elles vont redescendre vers le substrat et éventuellement s'y enfouir. La migration de la civelle en estuaire est sous la dépendance de divers synchroniseurs environnementaux (McCleave et Wippelhauser 1987) tels que l'inversion des courants de marée (Wippelhauser et McCleave 1987 ; Jellyman et Lambert 2003), les odeurs (Creutzberg 1959) ou encore la photopériode (Creutzberg 1961 ; Jellyman 1977 ; Bardonnnet et al. 2003, 2005). Lors de la traversée de l'estuaire, la civelle s'alimente pas ou peu (Bardonnnet et Riera 2005) et doit donc utiliser les réserves accumulées par la larve leptocéphale pour faire face aux dépenses liées à l'adaptation à son environnement (variations de salinités, de températures, débits ou l'exposition à des polluants) et à ses déplacements. En fonction de leur stade de développement et de l'implantation d'une denture fonctionnelle, une fois arrivées en eau douce, les civelles recommencent à se nourrir (Charlon et Blanc 1983 ; Peterson et Martin-Robichaud 1994) et à nager activement à contre-courant (Elie 1979).

#### Phase anguille jaune

Le stade anguille jaune correspond à la phase de croissance pendant laquelle les individus vont devoir acquérir les réserves énergétiques nécessaires pour la migration de reproduction (Van Ginneken et Van Den Thillart 2000 ; Bruslé et Quignard 2001 ; Van Ginneken 2005). Cette période de croissance s'étend sur plusieurs années et permet le stockage de réserves énergétiques sous forme de triglycérides dans les muscles et le foie (Boëtius et Boëtius 1985 ; Bruslé et Quignard 2001). Les anguilles sont nocturnes et s'alimentent d'insectes, de crustacés et de poissons (Bergersen et Klemetsen 1988 ; Costa et al. 1992) en dehors de la période hivernale pendant laquelle elles restent enfouies dans le sédiment. A ce stade de vie, les individus sont territoriaux, solitaires et agressifs (Tesch 2003). Leurs dépenses énergétiques sont très variables d'un individu à l'autre, en fonction de l'environnement dans lequel ils évoluent et de leurs déplacements.

#### Phase anguille argentée

A la fin de la phase de croissance, la seconde métamorphose a lieu. Les anguilles deviennent argentées et de nombreux processus physiologiques, tels que le développement de la rétine, l'épaississement de la vessie natatoire et l'augmentation du nombre de cellules à chlorures se



mettent en place (Fontaine 1994 ; Van Ginneken et al. 2007). Ces changements permettent la migration de 6000 km qui séparent les anguilles argentées de leur zone de fraies en mer des Sargasses (Tucker 1959). En parallèle, les anguilles cessent de s'alimenter (Beaumont et al. 1994) et une partie des réserves énergétiques accumulées par l'anguille jaune dans les muscles et le foie (Boëtius et Boëtius 1985 ; Bruslé et Quignard 2001) sont mobilisées vers les gonades (Bruslé et Quignard 2001). Durant la migration transocéanique, ces réserves vont également être catabolisées pour couvrir les dépenses énergétiques nécessaires aux activités de nage et de changement de salinité (Beaumont et al. 1994). Il a été montré que les réserves énergétiques accumulées par l'anguille jaune couvraient pour 40% les dépenses énergétiques liées à la migration et pour 60% les dépenses énergétiques liées à la reproduction (Van Ginneken et Van den Thillart 2000 ; Van Ginneken 2005). Les dévalaisons<sup>5</sup> ont lieu toute l'année et les mécanismes déclenchant la migration seraient sous l'influence de facteurs de développement (taille, contenu énergétique, sexe, âge/croissance) et de facteurs environnementaux (température, photopériode, etc.) (Gosset et al. 2000). La migration à de grandes profondeurs déclencherait la maturation sexuelle (Fontaine 1994) et une fois en mer des Sargasses, les individus matures s'accoupleraient avant de mourir d'épuisement (Tesch 2003).

### **1.3. Une espèce en déclin**

Cette espèce, considérée autrefois comme nuisible, connaît depuis plus d'une trentaine d'années un déclin très important sur l'ensemble de son aire de répartition (Bruslé 1994 ; Stone 2003 ; CIEM<sup>6</sup> 2013) (Figure 3). Elle est aujourd'hui placée sur la liste rouge des espèces en danger critique d'extinction (UICN France) et considérée en dehors de ses limites biologiques de sécurité (CIEM 1996). Cette diminution des stocks se matérialise par une diminution des captures de civelles (Dekker et al. 2003) et d'anguilles jaunes dans certaines zones amont des cours d'eaux et donc potentiellement de dévalentes (Verbiest et al. 2012). Même si à l'heure actuelle, les raisons expliquant ce déclin demeurent peu connues, plusieurs hypothèses d'origines naturelles ou anthropiques ont été évoquées (Feunteun 2002 ; Palstra et al. 2006 ; Friedland et al. 2007). Le réchauffement climatique pourrait par exemple entraîner une déviation des courants océaniques et notamment du Gulf Stream avec, pour conséquence, une migration transocéanique plus longue, voire impossible entraînant la mort des larves avant d'atteindre leurs sites de colonisation (Castonguay et al. 1994 ; Moriarty et Dekker

---

<sup>5</sup> Correspond au moment où les individus descendent un cours d'eau

<sup>6</sup> Centre International pour l'Exploitation de la Mer

1997). Une diminution de la productivité océanique a également été suggérée, engendrant à long terme une réduction de la taille des civelles recrutées (Bonhommeau et al. 2008). Par ailleurs, la présence d'infrastructures infranchissables constitue un véritable frein à la migration des anguilles (Elie et Rigaud 1984 ; Moriarty et Dekker 1997) et est responsable d'importantes mortalités (Durif et al. 2003 ; Winter et al. 2006). A cela s'ajoute la perte d'habitats, avec notamment la disparition des marais et des zones humides suite aux pratiques intensives d'assèchements et de dragages pour les activités industrielles et agricoles (Moriarty et Dekker 1997). L'introduction du parasite *Anguillicola crassus* semble également une hypothèse pouvant contribuer à la diminution des stocks d'anguilles. En effet, ce dernier entraîne un épaissement de la vessie natatoire des anguilles, ce qui affecte leurs capacités de nage et de migration océanique vers les sites de reproduction (Würtz et Taraschewski 2000 ; Feunteun 2002). Enfin, l'anguille se révèle être très sensible aux polluants, notamment à cause de sa forte teneur en lipide (pour les polluants lipophiles) qui favorise la bioaccumulation<sup>7</sup> (Le et al. 2010 ; Navarro et al. 2013 ; Van Ael et al. 2014).

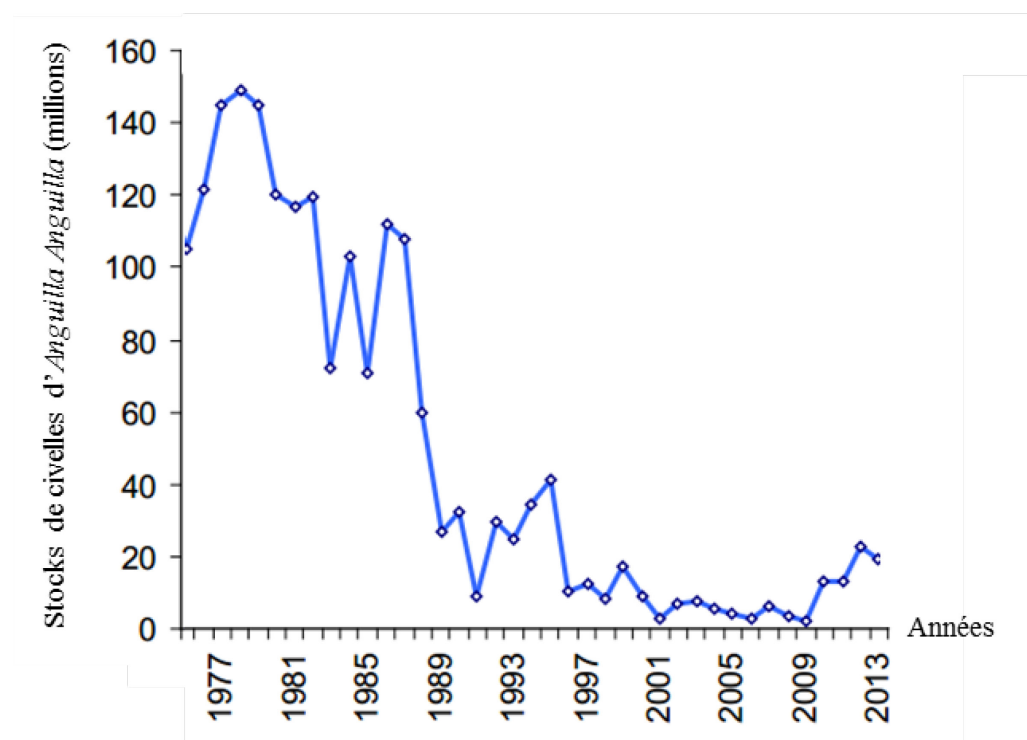


Figure 3 : Estimation du recrutement des civelles d'anguille *Anguilla anguilla* en Europe (Suède, Finlande, Estonie, Lettonie, Lituanie, Pologne, Allemagne, Pays-Bas, Belgique, Irlande du Nord, France) depuis 1977 (adapté d'après CIEM 2013).

<sup>7</sup> Caractérise l'absorption de substances chimiques présentes dans le milieu

### ***1.3.1. Impact de la pollution***

L'anguille, autrefois considérée comme résistante à la pollution, s'avère en réalité y être plus sensible que certaines autres espèces (Bruslé 1994). En novembre 1986, lors de l'incendie d'usines à Bâle, l'anguille est l'espèce qui a présenté la plus forte mortalité parmi toutes celles présentes dans le Rhin. Avec sa longue phase de croissance, son régime alimentaire carnivore et sa position au sommet de la chaîne alimentaire, l'anguille est particulièrement exposée aux polluants de par sa forte teneur lipidique et est propice à une importante bioaccumulation (COSEPAC 2012). De nombreuses études ont notamment mis en évidence que l'anguille accumule de grandes quantités de polluants tels que les HAPs (Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques, Oliveira Ribeiro et al. 2005 ; Nagel et al. 2012), les pesticides (Byer et al. 2013 ; Jürgens et al. 2015), les PCB (PolyChloroBiphényles, Tapie et al. 2011 ; Couderc et al. 2015) où les métaux lourds (Neto et al. 2011 ; Navarro et al. 2013). L'accumulation de ces composés tout au long de la phase de croissance de l'anguille pourrait engendrer des effets délétères, de façon synergique ou individuelle (Geeraerts et al. 2010) et ainsi contribuer au déclin de l'espèce (Hodson et al. 1994 ; Van Ginneken et al. 2005). Par ailleurs, le fait que les anguilles argentées jeûnent lors de leur migration transocéanique vers la mer des Sargasses entraîne une remobilisation des polluants accumulés et un relargage dans la circulation sanguine. Ces processus pourraient avoir des conséquences sur la qualité des géniteurs, leur succès reproducteur et la qualité des descendants (Castonguay et al. 1994 ; Palstra et al. 2006 ; Belpaire et al. 2009). A titre d'exemple, les travaux de Palstra et al. (2006) ont montré l'existence d'un transfert maternel de PCB (anguilles argentées artificiellement maturées) vers les gonades ainsi qu'une corrélation positive entre la teneur en PCB des gonades et la présence de malformations embryonnaires.

### ***1.3.2. Impact de la surpêche***

L'anguille européenne est pêchée et commercialisée à presque tous les stades de vie : de la civelle (principalement pêchée sur la côte Atlantique française) à l'anguille jaune (pêchée en Méditerranée) et l'anguille argentée (essentiellement pêchée dans le Nord de l'Europe). Les pêches d'anguilles représentaient 410,5 tonnes (t) au stade civelle et 310 t au stade anguille jaune-argentée en France en 1997 (Castelnaud 2000). L'exploitation de plus en plus intensive de la plupart des rivières fréquentées par l'anguille, de même qu'une forte proportion d'immatures dans les captures, ont pu conduire à réduire l'échappement des géniteurs et le recrutement. Après l'instauration de la législation française (en 2007), les pêches d'anguilles représentaient 35 t au stade civelle et 19 t au stade anguille jaune-argenté en 2011-2012 en

France. Par ailleurs, les civelles sont victimes de braconnage. Elles demeurent, en raison de leur prix élevé (pouvant varier de 150 à 1000 euros le kilo), la cible de pêcheries et de filières commerciales illicites qui participent à réduire les effectifs de l'espèce et à limiter l'échappement des géniteurs (Cicotti et al. 1997 ; Fontenelle et al. 1997). En France, en 2011, dans le cadre de la législation française contre le braconnage, sur les 621 contrôles effectués, 277 se sont avérés non conformes à la réglementation en vigueur (Plan de Gestion Anguille de La France -Juin 2012).

#### **1.4. Gestion et restauration**

L'anguille européenne est un élément majeur de nombreux écosystèmes estuariens. Sa présence renseigne de la qualité physico-chimique du milieu et de l'accessibilité de l'habitat (Feunteun 2002 ; Robinet et Feunteun 2002). Pour compenser le déclin des stocks observé depuis plusieurs années, des mesures de restauration ont été mises en place. Après la décision d'une gestion au niveau Européen (en 1983), le premier règlement concernant la sauvegarde de l'anguille a été publié dans le Journal Officiel de l'Union Européenne le 22 septembre 2007. Ce dernier avait pour objectif d'augmenter le nombre d'anguilles allant se reproduire en limitant leur pêche et les obstacles à la migration, en développant l'aquaculture, et en repeuplant les bassins versants avec des civelles. Un plan de gestion a donc été établi par la France et approuvé par l'Union Européenne le 16 février 2010. A l'heure du premier bilan établi par la France en juin 2012, l'effort de pêche a été réduit avec une diminution de moitié du nombre de pêcheurs professionnels autorisés à pêcher l'anguille. Les captures de civelles ont diminué de 56% entre 2011 et 2012 (mise en place de quotas, réduction des dates de pêches). En revanche, aucun chiffre n'a pu être estimé quant à la biomasse d'anguille quittant le territoire et la mortalité d'anguille induite par les activités anthropiques. La France compte donc faire des efforts pour 2015. Dans le cadre du repeuplement, 3,1 tonnes d'anguilles de moins de 12cm ont été utilisées sur la saison 2011-2012 et des mesures de suivis sont désormais mises en œuvre afin d'évaluer la qualité de ces repeuplements. Bien que la mortalité liée aux activités de pêche ait baissé de 22% sur l'année 2010-2011, il n'en reste pas moins que la reconstitution des stocks nécessite des actions et un suivi à long terme (Plan de Gestion Anguille de La France -Juin 2012).

## 2. Concepts de la migration et lien avec l'énergie

L'étude de la migration de l'anguille européenne nécessite de définir quelques concepts généraux afin d'appréhender les relations ayant conduit à ce travail de thèse. Dans un premier temps, le cadre général de la migration va être introduit et l'accent sera mis sur la migration partielle observée chez l'anguille. Par la suite, le rôle du statut énergétique sera abordé.

### 2.1. Concepts de la migration

#### 2.1.1. Qu'est-ce que la migration ?

##### Définition de la migration

Au sein du règne animal, la migration est l'un des phénomènes le plus visible et le plus largement répandu notamment chez les insectes, les poissons, les baleines et les oiseaux (Dingle 1996 ; Alerstam et al. 2003). La migration est un processus de déplacement complexe et c'est une composante essentielle de l'histoire de vie de certains organismes que ce soit, la sterne arctique (*Sterna paradisaea*), qui traverse plus de 16 000 km pour se rendre en antarctique, ou le saumon du pacifique (*Oncorhynchus spp.*), qui traverse les rapides d'une rivière de l'Alaska pour se reproduire. A partir d'une définition de Kennedy (1985), Dingle (1996) considère que la migration est un déplacement non distrait par la ressource, qui présente 5 caractéristiques :

1. la persistance du mouvement
2. la droiture du déplacement (aucun détour possible)
3. l'absence de distraction par la ressource
4. des conditions de départ et d'arrivée spécifiques
5. une énergie réallouée pour maintenir la migration

Cette définition présente l'avantage de poser de nombreux postulats qui peuvent s'appliquer à tous les organismes migrants.

La distinction entre migration et dispersion est souvent confuse mais contrairement à la migration, la dispersion est un processus de répartition d'individus observable d'un point de vue génétique à l'échelle de la population.

### Rôle de la migration

Selon certains auteurs, les animaux migrent dans l'optique de maximiser leur fitness<sup>8</sup> pour une seule ou plusieurs raisons :

- Trouver une aire d'alimentation plus riche. Les individus migrent ainsi vers une zone de croissance plus favorables où la ressource alimentaire n'est pas limitante (Southwood 1961 ; Northcote 1978 ; Aidley 1981).
- Rejoindre une aire de reproduction pour favoriser l'isolement reproducteur et le succès de reproduction (Northcote 1978 ; Sinclair 1988).
- Fuir les prédateurs. Les individus évitent ainsi les conditions défavorables du milieu précédent et maximisent leurs chances de survie (Northcote 1978 ; Werner et Gilliam 1984 ; Jonsson et Jonsson 1993).

### **2.1.2. Cadres théoriques de la migration**

La migration est la conséquence d'interactions complexes entre des facteurs intrinsèques (génétiques, physiologiques et comportementaux) et des facteurs extrinsèques (conditions climatiques, habitat, ressources) (ÅKesson et Hedenström 2007). Afin de bien comprendre la migration dans son ensemble, Drake et al. (1995) ont proposé un modèle conceptuel afin de mieux appréhender les relations agissant sur la migration (Figure 4). Ce modèle est basé sur 4 composantes essentielles :

- L'aire de migration qui comprend l'environnement et les éléments biotiques auxquels les migrants sont adaptés.
- Le syndrome de migration qui regroupe l'ensemble des traits permettant l'activité migratrice (processus de locomotion, signaux environnementaux etc.).
  - Le cadre génétique qui est à la base de la mise en place du syndrome.
  - La trajectoire de la population qui prend en compte de nombreux paramètres comme le temps de migration, la route empruntée etc.

Ce modèle permet ainsi de définir les bases à la compréhension de la migration puisqu'il incorpore les facteurs sélectifs et proximaux agissant sur la migration tout en prenant en compte la sélection naturelle.

---

<sup>8</sup> Capacité d'un individu d'un certain génotype à se reproduire (ou valeur sélective)

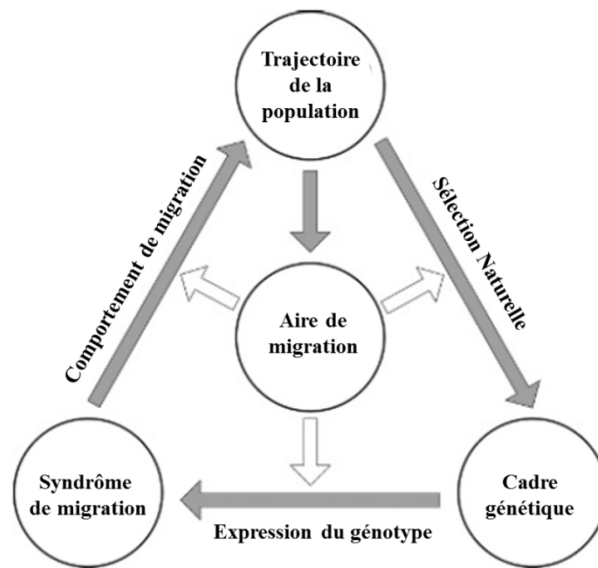


Figure 4 : Modèle conceptuel holistique de la migration. Les cercles indiquent les quatre éléments principaux, les flèches grises, les principaux processus qui les relient, les flèches blanches, les principaux modes d'influence de l'environnement. La courte flèche grise symbolise l'impact de la population sur son habitat (épuisement des ressources, agents pathogènes). Adapté d'après Drake et al. 1995.

### 2.1.3. Quelques notions en lien avec la plasticité phénotypique

La plasticité phénotypique est la capacité d'un génotype à produire des phénotypes alternatifs en fonction de l'environnement dans lequel il évolue (Schmalhausen 1949 ; Levins 1963, 1968 ; Bradshaw 1965). Autrement dit, cela représente une réponse adaptative de l'individu à la variabilité de l'environnement. Ces changements s'observent sur le développement, la physiologie, la morphologie ou la démographie des organismes (Sultan 2001), aussi bien à l'échelle de l'individu que de la population (Clausen et al. 1940 ; Winn 1996). Cependant, des coûts sont engendrés afin de garantir un tel niveau de flexibilité si bien que la plasticité reste limitée (DeWitt et al. 1998).

Pour mettre en évidence une plasticité, l'utilisation de norme de réaction est indispensable. Pour cela, concrètement, des organismes de génotypes similaires vont être exposés à des facteurs environnementaux (T, salinité, O<sub>2</sub> etc.) et l'effet de ces facteurs sur le trait étudié va être observé (Huey et Kingsolver 1989) (Figure 5). En d'autres termes, on appelle norme de réaction l'ensemble des différents phénotypes qui peuvent exister à partir d'un même génotype dans une gamme donnée de l'environnement (Schmalhausen 1949 ; Danchin et al. 2005). Les normes de réaction peuvent présenter différents types de réponses : linéaire (car une seule partie du facteur environnemental a été testé), curviligne (atteinte d'un seuil), ou fixe (réponse non plastique, pas de changement du trait lié au facteur environnemental). La

norme de réaction renseigne ainsi sur la valeur du trait à travers la gamme environnementale et également sur la valeur optimale du trait pour lequel le trait est maximisé.

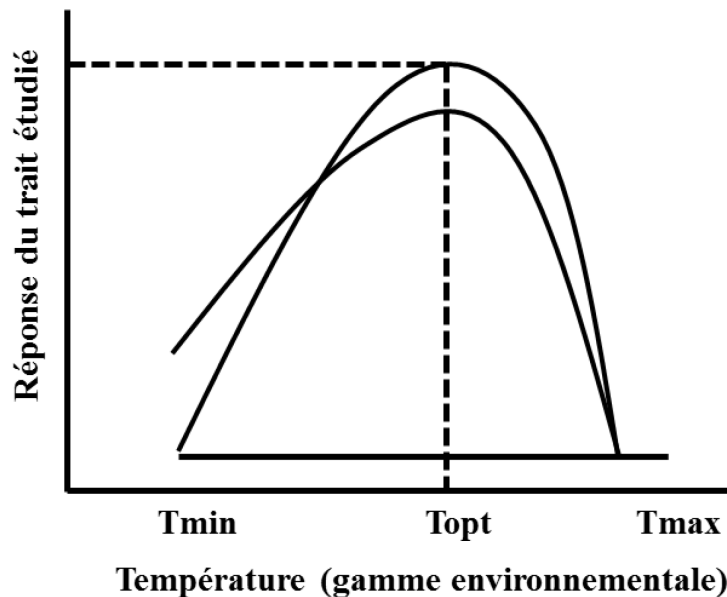


Figure 5 : Exemple de résultats de norme de réaction pouvant être obtenus lors de l'étude d'un trait à travers une gamme environnementale (température) (Adapté d'après Huey et Kingsolver 1989).  $T_{min}$  et  $T_{max}$  sont les températures minimum et maximum pour laquelle la performance est supérieure à zéro.  $T_{opt}$  correspond à la température optimale du trait étudié.

La norme de réaction des espèces diadromes, notamment chez les salmonidés, repose sur la teneur énergétique des individus (Metcalfé 1998 ; Thorpe 1999). Metcalfé (1998) a montré que la smoltification<sup>9</sup> n'a lieu que si l'individu a stocké une quantité d'énergie suffisante. Généralement, le fait de migrer est très souvent considéré comme dépendant d'un compromis entre les coûts et les bénéfices apportés, le but étant de maximiser la fitness (Jonsson et Jonsson 1993). Ces compromis peuvent être de trois ordres : des compromis d'allocation (en lien avec la ressource, dépendant de la teneur énergétique des individus), des compromis d'acquisition (réduit le risque de mortalité et maximise l'acquisition de la ressource) et des compromis spécialiste-généraliste (spécialisation dans un environnement particulier) (Angilletta et al. 2003). Par ailleurs, au sein d'une population, il existe des groupes de poissons qui une fois installés effectuent des migrations saisonnières non partagées par les autres, c'est ce qu'on appelle un contingent (Clark 1968). Jessop et al. (2002) ont montré que la décision de ces individus pouvait être en lien direct avec leur statut énergétique et ainsi refléter l'existence de norme de réaction.

<sup>9</sup> Ensemble des changements permettant à un individu vivant en eau douce de s'adapter en eau de mer



### 2.1.4. Stratégies conditionnelles évolutivement stables

En théorie des jeux, le terme de ‘stratégie évolutivement stable’ est utilisé lorsqu’une stratégie ne peut être remplacée ou envahie par une autre sous l’influence de la sélection naturelle et que presque tous les individus peuvent l’adopter (Taylor et Jonker 1978 ; Smith 1982). Cette dernière est dite ‘conditionnelle’ pour définir un type de plasticité phénotypique dans lequel un individu peut exprimer différents phénotypes ou tactiques en fonction de son environnement ou de son statut physiologique ou social (Gross 1996 ; Tomkins et Hazel 2007 ; Vélez-Espino et al. 2013). Chaque stratégie est une règle de décision déterminée génétiquement qui va s’exprimer par une contribution de l’effort reproductif et somatique pour différents phénotypes appelés des ‘tactiques’. Chacune de ces stratégies a lieu à l’échelle de la population de par un processus physiologique, biochimique etc. qui va être induit par des signaux environnementaux conduisant à des règles de décision de la stratégie dans le but de maximiser la fitness. Une tactique va quant à elle être le phénotype résultant de la stratégie. A titre d’exemple, la catadromie de l’anguille est une stratégie, alors que la décision de se mouvoir ou de rester immobile sont deux tactiques différentes au sein de cette stratégie (Gross 1996 ; Hendry et Stearns 2004).

## 2.2. Migration partielle et cas de l’anguille européenne

### Variétés de migrations

La migration peut prendre différentes formes et être décrite à différentes échelles. Dans le Tableau 1, sont répertoriés les différents types de migrations classés en fonction de l’individu, du temps, du lieu et du milieu.

Tableau 1 : Différents types de migration (Adapté d’après Dingle 1996).

<b>Catégories</b>	<b>Types de Migration</b>
Individu	Obligatoire, Facultative, Partielle, Différentielle
Temps	Saisonniers, Occasionnelle
Espace	Aller-Retour, A sens unique, Altitudinale, Nomade
Milieu	Diadrome, Dérive

### Définition de la migration partielle

La migration partielle survient chez de nombreuses espèces : *Salmo trutta* (Campbell 1977), *Salvelinus alpinus* (Nordeng 1983), *Osmerus eperlanus* (Nikolskii 1969), *Plecoglossus attivelis* (Tsukamoto et al. 1987) etc. Elle décrit le phénomène où, au sein même d'une population, deux types d'individus peuvent être différenciés : les individus migrants et les individus non migrants (Lundberg 1987 ; Jonsson et Jonsson 1993 ; Thériault et Dodson 2003). La 'décision' pour un organisme de migrer ou non est susceptible d'être dépendante d'un compromis entre les avantages et les coûts de la migration, ces derniers étant pondérés par leur effet sur la fitness (Jonsson et Jonsson 1993 ; Chapman et al. 2012). Dans tous les cas, en théorie, la sélection naturelle oriente les organismes à migrer dans l'optique de maximiser leur fitness (Barash 1982 ; Jonsson et Jonsson 1993).

### Mise en évidence chez la civelle

Tsukamoto et al. (1998) a été l'un des pionniers à remettre en cause la catadromie de l'anguille comme obligatoire. Ses travaux sur les rapports Sr/Ca des otolithes ont fourni des informations sur le temps passé par les anguilles européennes (*Anguilla anguilla*) et américaines (*Anguilla rostrata*) dans les différents habitats (marin, estuarien ou dulcaquicole) habituellement occupés par l'anguille. Il a ainsi pu démontrer que la phase de croissance en eau douce n'était pas obligatoire et pouvait se réaliser en milieu marin, définissant ainsi les anguilles comme catadromes facultatives. Par la suite, ce processus 'facultatif' a pu être étayé par de nombreux autres travaux utilisant la même approche aussi bien pour *Anguilla anguilla*, *Anguilla rostrata* que pour *Anguilla japonica* (Tzeng et al. 2000, 2002, 2003 ; Tsukamoto et Arai 2001 ; Jessop et al. 2002 ; Tsukamoto et al. 2002 ; Thibault et al. 2007 ; Arai et Chino 2012). Les travaux de Daverat et al. (2006) ont permis de mettre en évidence trois patrons de migrations dans l'estuaire avec (Figure 6) :

- Les individus qui vont se sédentariser et vont passer l'intégralité de leur phase de croissance en eau de mer (Figure 6a)
- Les individus qui vont migrer et passer l'intégralité de leur phase de croissance en eau douce (Figure 6b)
- Les individus qui sont nomades avec :
  - Les individus passant du temps en eau saumâtre puis en eau de mer (Figure 6c).

- Les individus passant du temps en eau douce puis en eau saumâtre (Figure 6d).
- Les individus passant du temps en eau douce puis en eau saumâtre et à nouveau en eau douce (Figure 6e).
- Les individus ayant tendance à passer du temps en eau saumâtre (Figure 6f).

Ces résultats suggèrent que des divergences migratoires existent dès le stade civelle avec une partie des individus qui migre jusqu'à atteindre les rivières et une autre qui se sédentarise en zone côtière ou estuarienne. Cependant, indépendamment du comportement migratoire de la civelle, ces dernières seront par la suite toute capable d'effectuer le reste de leur cycle de vie montrant une stratégie de migration de l'anguille souple avec un degré de plasticité comportementale élevé.

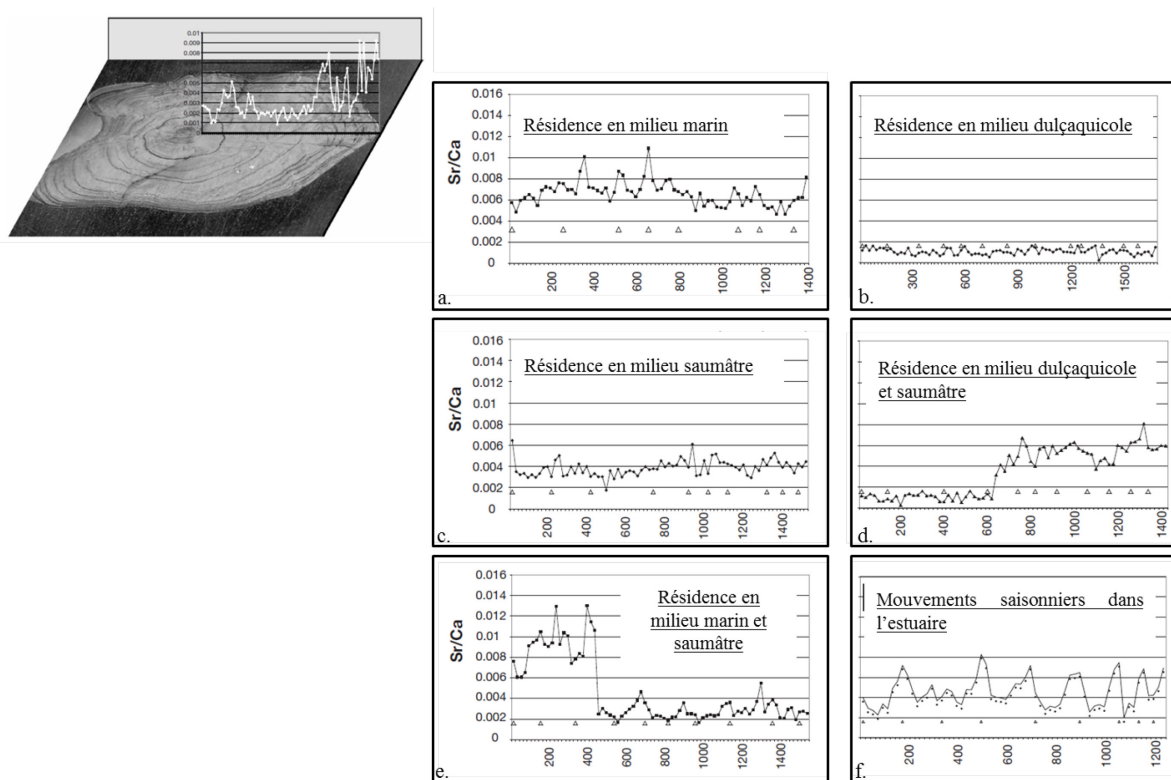


Figure 6 : Variations du rapport Sr/Ca d'otolithes d'*Anguilla anguilla* représentant les types d'habitats d'utilisés. Adapté d'après Daverat et al. 2006.

### Coûts de la migration partielle

La migration présente de nombreux inconvénients tels qu'une consommation d'énergie importante notamment liée aux déplacements des individus qui peut conduire à une mortalité accrue (Jonsson et Jonsson 2006). Par ailleurs, la migration induit un changement de milieu dont les coûts directs et indirects via le stress engendré peuvent être conséquents. C'est par

exemple le cas pour les oiseaux qui peuvent être soumis à d'importantes variations de pressions, de températures et de vents (Bernatchez et Dodson 1987 ; Richardson 1990 ; Dingle 1996). Les poissons sont, quant à eux, sous l'influence des courants et de la variation physico-chimique du milieu (T°, O<sub>2</sub>, salinité, polluants etc.) (Fontaine 1975 ; Mc Dowall 1988 ; Jonsson et Jonsson 1993 ; Varsamos et al. 2005). Par ailleurs, pour de nombreuses espèces, ces coûts vont être d'autant plus conséquents si, lors de la phase de migration, l'individu jeûne (Bernatchez et Dodson 1987 ; Dingle 1996). C'est notamment le cas de la civelle (migration estuarienne), de l'anguille argentée et du saumon atlantique (migration de reproduction) qui s'exposent ainsi davantage à la maladie et à la prédation (Jonsson et Jonsson 1993).

#### Déterminismes de la migration partielle

Les tenants et les aboutissants (maximiser la fitness) de la migration sont d'une façon générale assez simple à concevoir mais les facteurs expliquant le déclenchement de la migration sont beaucoup plus complexes à appréhender. Plusieurs études se sont intéressées à comprendre les mécanismes sous-jacents qui induisent la migration des espèces (Metcalfé et al. 1995 ; Thorpe et al. 1998 ; Forseth et al. 1999). Dans le cas où la période de migration est accompagnée d'un jeûne, la quantité de réserves énergétiques et la vitesse d'utilisation de ces dernières peuvent être des facteurs limitant le processus de migration. Différents travaux sur les espèces diadromes semblent appuyer cette hypothèse puisqu'ils ont permis d'établir différentes relations entre le déclenchement de la migration et :

- l'état physiologique de l'organisme (évalué par son contenu lipidique ou son poids) et la vitesse de changement de son état (Thorpe et al. 1998).

- le budget énergétique alloué aux processus métaboliques (Metcalfé et al. 1995 ; Forseth et al. 1999 ; Rosenfeld et al. 2014).

Par conséquent, il semble intéressant de considérer le statut énergétique, qui s'intéresse à la fois au contenu énergétique et aux besoins énergétiques individuels, afin d'étudier les déterminismes du comportement de migration.

Dans le cadre de la migration de l'anguille, des premiers travaux ont mis en évidence que les préférences de salinité chez la civelle étaient liées à leur facteur de condition et leur taux de croissance, suggérant que le statut énergétique des individus pourrait avoir un rôle sur leur comportement de migration (Edeline et al. 2004, 2006). Par ailleurs, en 2007, Bureau Du Colombier et al. ont montré qu'il existait des différences de contenu énergétique entre les

civelles migrantes et les civelles non migrantes, les civelles migrantes ayant un plus fort contenu énergétique. Par la suite, Edeline (2007) a suggéré que les civelles suivraient une stratégie conditionnelle évolutivement stable. Chaque individu choisirait donc une tactique migratoire, en fonction de son niveau énergétique (Edeline et al. 2006 ; Bureau Du Colombier et al. 2007) afin de maximiser sa fitness. La diadromie serait ainsi plus favorable chez les individus ayant un statut énergétique plus élevé jusqu'au moment où ce dernier diminue et où les coûts de la diadromie dépassent finalement les avantages : la tactique change et devient alors désavantageuse, c'est le 'switch-point' (sp). Dans la Figure 7 est illustrée comment les civelles maximiseraient leurs fitness en fonction de leur statut énergétique. La diadromie de l'anguille peut donc être appréhendée comme une norme de réaction induite par un statut énergétique élevé, favorisée par la sélection lorsque le rapport coût de la fitness par rapport au bénéfice de la diadromie est faible. Cependant, l'augmentation de ce rapport, notamment lié aux pressions humaines (barrages, destruction zones humides pollution, etc.) induit un changement évolutif de la norme de réaction et par conséquent réduit la proportion de tactique migrante dans la population.

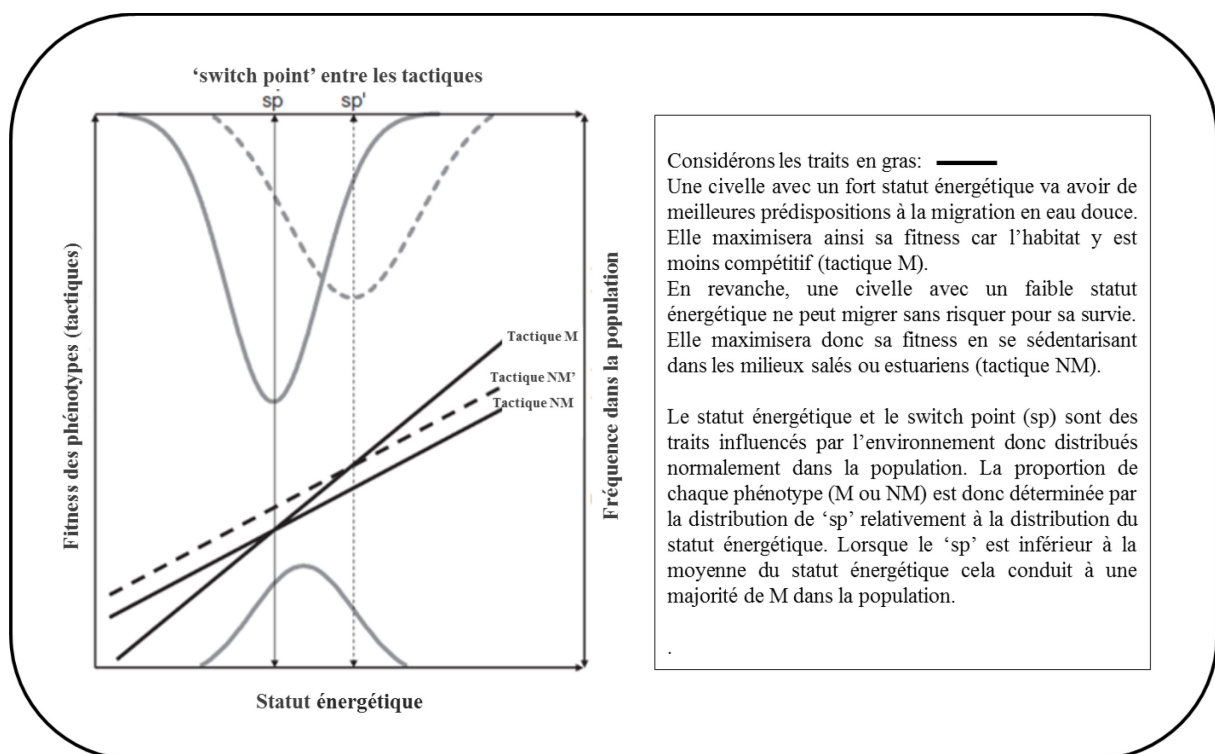


Figure 7 : Modèle de stratégie conditionnelle évolutivement stable basée sur les tactiques migratoires des civelles. Adapté d'après Edeline et al. 2007.

## 2.3. Le statut énergétique

### 2.3.1. Définition

En général, l'énergie consommée par un organisme peut être utilisée pour différentes finalités : des fins de croissance et/ou de reproduction, une dissipation sous forme de chaleur par le métabolisme de maintenance, l'activité et la digestion, ou l'excrétion par les fèces (Winberg 1987 ; Rombough 2011). Cette répartition de l'énergie est communément définie sous le terme de budget énergétique. Morinville et Ramussen (2003) ont par exemple mis en évidence que les ombles de fontaine (*Salvelinus fontinalis*) migrants avaient des taux de consommation 1,4 fois plus importante montrant ainsi que ces individus allouent une part plus conséquente de leurs budgets énergétiques aux processus métaboliques. Dans le cas des civelles, qui ne s'alimentent pas pour la plupart (Bardonnet et Riera 2005), la part de réserves qu'elles alloueront à leur métabolisme de maintenance aura donc des répercussions directes sur l'énergie nécessaire à leur migration. Le terme de statut énergétique<sup>10</sup> fait appel au concept de budget énergétique car il représente l'interaction entre l'énergie disponible et les besoins énergétiques d'un individu. L'énergie disponible est le reflet des réserves énergétiques de l'individu. Les besoins énergétiques vont quant à eux déterminer la vitesse à laquelle l'individu va utiliser ses réserves. Du fait de l'évolution des réserves énergétiques d'une part et des besoins énergétiques d'autre part, ces deux paramètres ne sont pas des variables statiques si bien que le statut énergétique évolue dans le temps et dans l'espace. Ainsi, l'expression de tout comportement coûteux en énergie (activité, décontamination, stress) aura pour effet de diminuer le statut énergétique.

### 2.3.2. Les réserves énergétiques

Les réserves énergétiques constituent l'ensemble des substrats énergétiques que l'individu a accumulé pour faire face à ses besoins futurs. L'individu est donc capable de moduler ses apports énergétiques en fonction de ses besoins. Cependant, lorsque les réserves énergétiques ne sont plus suffisantes pour les besoins énergétiques, l'organisme va alors dégrader les protéines et les lipides de structures, conduisant inévitablement sur le long terme, à la mort de l'individu.

Les réserves énergétiques sont reconnues comme une composante clé nécessaire à la migration. Chez l'anguille, les caractéristiques de stockage d'énergie sont très variables selon

---

<sup>10</sup> Représente l'interaction entre la quantité d'énergie dont un organisme dispose à un instant t et ses besoins énergétiques de base à ce même instant, dans un environnement donné.

le stade du cycle de vie. La larve leptocéphale se nourrit principalement de neige marine (Miller et al. 2012, 2013) ou d'organismes planctoniques (Rieman et al. 2010) alors que la civelle ne s'alimente pas ou peu (Bardonnnet et Riera 2005) et est donc dépendante des réserves accumulées par la larve leptocéphale.

### **2.3.3. Le métabolisme**

Le métabolisme de maintenance ou métabolisme standard reflète l'énergie nécessaire pour maintenir les fonctions vitales d'un organisme au repos. Il se caractérise par l'ensemble des activités liées au catabolisme (dégradation de composés) et à l'anabolisme (synthèse de constituants) (Brett et Groves 1979 ; Lender et al. 1979). Le catabolisme est essentiel pour produire de l'énergie et assurer le fonctionnement cellulaire alors que l'anabolisme est consommateur d'énergie puisqu'il correspond à l'ensemble des réactions enzymatiques de synthèse de molécules organiques permettant le renouvellement cellulaire. Par ailleurs, le métabolisme est sous l'influence de multiples facteurs tels que la température, l'oxygène et le poids (Gillooly et al. 2006 ; Kim et al. 2006 ; Rosenfeld et al. 2014). Chez *Salmo salar*, il a été démontré par de nombreux auteurs que les individus qui ont un taux métabolique<sup>11</sup> plus élevé présentent une plus forte agressivité et migrent plus tôt en mer (Metcalfé et Thorpe 1992 ; Metcalfé et al. 1995, 1998 ; Cutts et al. 2002 ; Rosenfeld et al. 2014) suggérant ainsi que le métabolisme pourrait être lié aux stratégies d'histoire de vie des espèces diadromes.

---

<sup>11</sup> Correspond à l'énergie consommée par un individu par unité de temps

### 3. Le mercure dans les environnements aquatiques

#### 3.1. Le mercure dans l'environnement

##### 3.1.1. Spéciation du mercure

Le mercure (Hg) est un métal lourd non essentiel possédant 7 isotopes stables. Il est présent dans l'environnement sous différentes formes chimiques : liquide, gazeux, dissous, particulaire (Harris et al. 2007) (Figure 8) et se répartit à l'échelle planétaire (Morel et al. 1998 ; Lamborg et al. 2002). Le Hg se distribue dans tous les compartiments (atmosphère, lithosphère, hydrosphère) sous quatre espèces chimiques différentes : le mercure élémentaire ( $\text{Hg}^0$ ), le mercure inorganique ( $\text{Hg(II)}$ ), le diméthylmercure ( $(\text{CH}_3)_2\text{Hg}$ ) et le méthylmercure ( $\text{CH}_3\text{Hg}^+$ , noté MeHg). Tout comme les autres métaux, les transferts et les processus physico-chimiques entre ces quatre espèces sont responsables de la spéciation du Hg dans l'environnement. Les apports naturels et anthropiques, les paramètres environnementaux (pH, conductivité, potentiel redox, etc.), l'activité bactérienne, les matières en suspension etc. sont des facteurs qui influencent le devenir du Hg dans l'environnement. La sédimentation et le piégeage des espèces chimiques libres ou complexées ont également un rôle dans la biodisponibilité et donc dans la toxicité des composés.

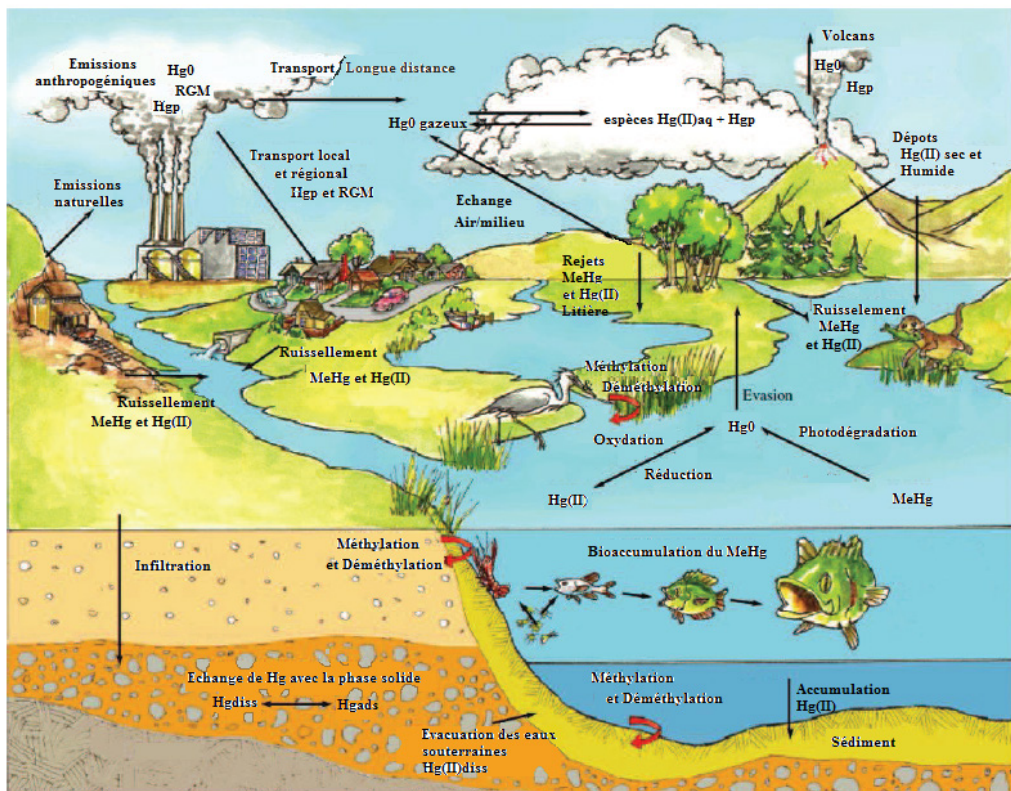


Figure 8 : Cycle biogéochimique du mercure dans l'environnement (Adapté de Harris et al. 2007).



**3.1.2. Sources de mercure dans l'environnement**

Le Hg est un composé ubiquiste présent dans tous les compartiments environnementaux : atmosphère, sols, sédiments, environnement aquatique. On estime que 2% du Hg est émis dans l'atmosphère par des sources naturelles, 16% par des sources anthropiques, et 82% par des sources naturelles anthropiquement déplacées (Mason et al. 2012, Figure 9). Depuis l'ère industrielle, les flux globaux de Hg ont fortement augmenté, jusqu'à être multipliés par trois (Lamborg et al. 2002 ; Gustin et al. 2008 ; Selin et al. 2008). Ce phénomène, principalement dû à des apports anthropiques conséquents, engendre une contamination accrue (Sunderland et Mason 2007) et conduit notamment à une bioaccumulation et à une bioconcentration<sup>12</sup> importante avec des concentrations de  $10^4$  à  $10^9$  fois supérieures dans les organismes que dans les systèmes aquatiques.

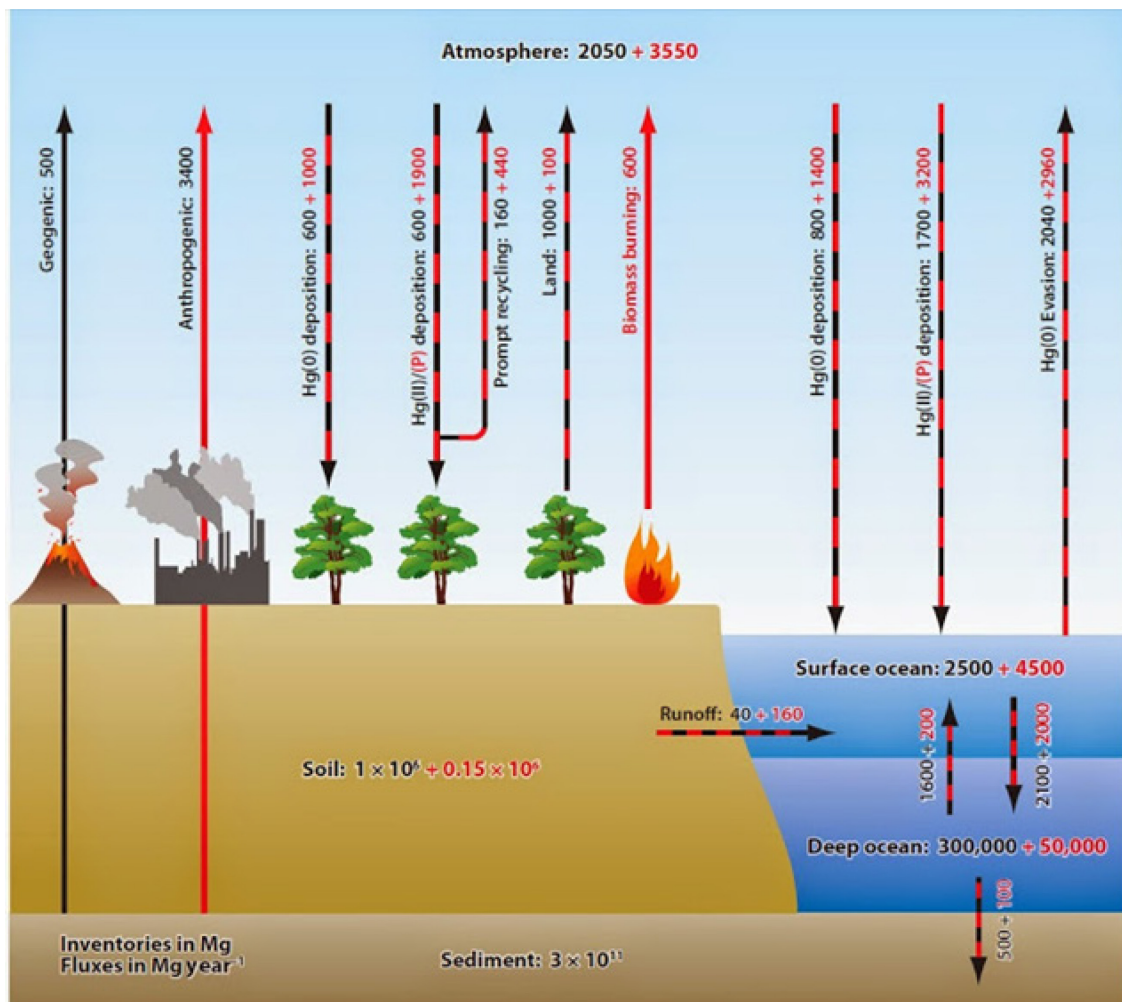


Figure 9 : Principaux flux (tonnes/an) du cycle biogéochimique du mercure. Les flux naturels sont en noirs et les flux anthropiques en rouge. Les flux naturels augmentés par l'activité anthropique sont en pointillés noir et rouge. (Mason et al. 2012).

<sup>12</sup> Désigne le phénomène pour une substance chimique donnée qui va engendrer des concentrations dans les organismes qui vont être supérieures aux concentrations présentes dans le milieu

### Sources naturelles

Le Hg est un élément naturellement présent dans l'écorce terrestre notamment sous forme de Hg<sup>0</sup> ou complexé au soufre. Il est principalement émis via l'atmosphère (Fitzgerald et Lamborg 2003 ; UNEP 2013) lors :

- d'activités géologiques
- de la volatilisation à partir des océans et des sols
- de la combustion de biomasse.

Les zones d'activités géologiques sont principalement situées au niveau des limites des plaques tectoniques communément appelées «ceintures mercurifères». Elles sont reconnues comme étant de grandes émettrices de Hg<sup>0</sup> dans l'atmosphère (Gustin et al. 2008). Les zones volcaniques ou géothermales constituent également des apports conséquents de Hg avec des émissions variant de 20 à 2000 t an<sup>-1</sup> pour les zones volcaniques (Gustin et al. 2008) et de 1 à 60 t an<sup>-1</sup> pour les zones géothermales (Nriagu et Becker 2003 ; Gustin et al. 2008). Par ailleurs, les océans jouent un rôle important dans le cycle du Hg et selon Strode et al. (2007), la volatilisation du Hg par les océans représente la principale source naturelle de Hg dans l'atmosphère avec un apport de 2800 t an<sup>-1</sup>. Les forêts et la combustion de biomasse ne sont également pas à négliger puisqu'elles représentent de grands réservoirs de Hg avec des flux estimés à 2000 t an<sup>-1</sup> (Selin et al. 2007).

Les émissions annuelles de Hg sont estimées entre 800 et 3000 t an<sup>-1</sup> (Gustin et al. 2008) et sont légèrement inférieures dans l'hémisphère nord (Pirrone et al. 2009). Cependant, ces émissions sont souvent difficiles à estimer de façon précise. En effet, il peut être problématique de différencier les émissions directes, des réémissions à partir de sources naturelles ou anthropiques (Fitzgerald et Lamborg 2003 ; Lindberg et al. 2007 ; Selin et al. 2007).

### Sources anthropiques

Le Hg émis dans l'atmosphère par des sources anthropiques se présente sous forme de calomel (HgCl<sub>2</sub>) ou de cinabre (HgS). La durée de vie de ces deux composés est généralement plus courte que le Hg<sup>0</sup> issu des sources naturelles (Gustin et Lindberg 2000). L'Asie contribue pour 50% des apports anthropiques mondiaux de Hg et se situe ainsi au premier rang des producteurs d'émission de Hg via l'atmosphère (Figure 10). Trois sources anthropiques (Barkay et al. 2003 ; Veiga et Baker 2004 ; Yudovich et Ketris 2005 ; Pacyna et al. 2006) sont majoritairement responsables de l'émission des 2000 t an<sup>-1</sup> estimées en 2010 (UNEP 2013).

La première source est la combustion de l'énergie fossile qui regroupe les centrales thermiques de charbon ainsi que les exploitations de gaz et de pétrole. La deuxième source constitue les exploitations minières notamment de plomb, de zinc et d'or (Guedron et al. 2006 ; Passos et Mergler 2008). La dernière source de Hg rassemble, quant à elle, les traitements de déchets urbains ou agricoles avec, entre autres, les industries de chlore, de soude et les lixiviats de sols. Depuis l'ère industrielle, malgré sa toxicité, le Hg est utilisé pour la fabrication de nombreux appareils tels que les piles, les batteries, la peinture, les appareils électriques, les lampes basses consommations, les pesticides, le papier, les cosmétiques etc. Il est estimé que sur ces apports anthropiques conséquents, 80% vont être envoyés dans l'atmosphère notamment sous forme de rejets de Hg après traitement, 15% vont être répandus dans les sols et 5% vont directement être rejetés dans les rivières (Stein et al. 1996).

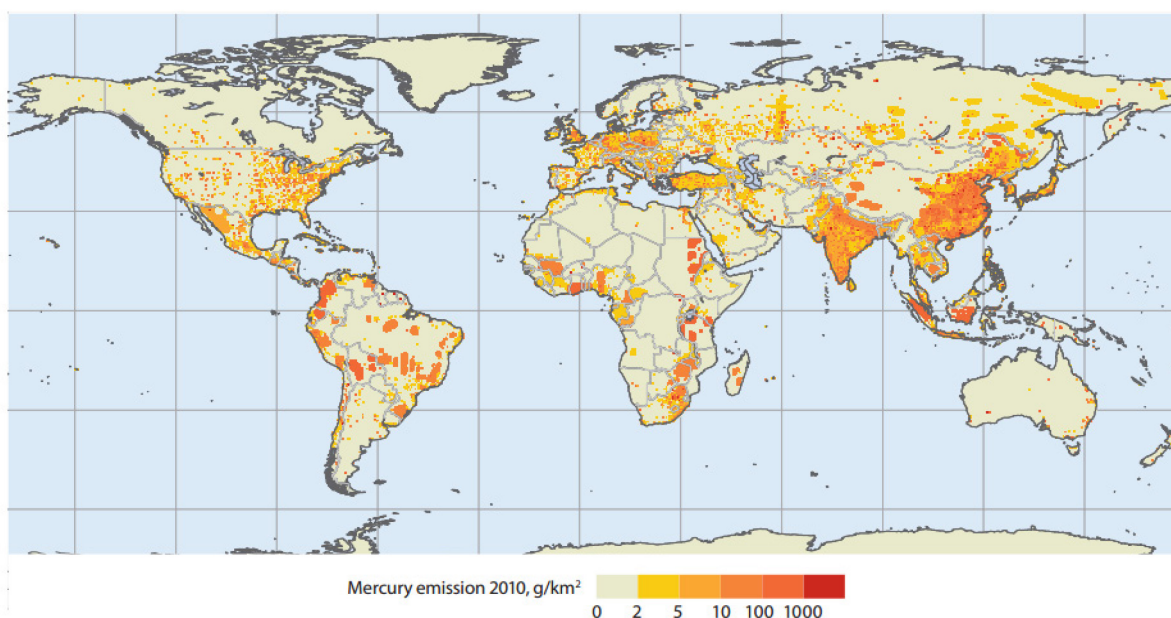


Figure 10 : Distribution globale des émissions anthropiques de mercure en 2010 (UNEP 2013).

### 3.2. Spéciation et transformation du mercure dans les environnements aquatiques

Les environnements aquatiques ont une importance particulière dans la biogéochimie du Hg. Ils sont le siège de nombreux processus de transformations (méthylation/déméthylation, oxydo-réduction, etc.) qui peuvent intervenir dans la colonne d'eau, le sédiment et le biote déterminant ainsi la biodisponibilité<sup>13</sup> et la toxicité du Hg dans le milieu. En plus du transport atmosphérique, le Hg issu de sources naturelles et anthropiques est transporté dans les milieux

<sup>13</sup> Capacité d'un composé à entrer en contact direct avec un organisme et à être absorbé au travers d'une membrane cellulaire



est le résultat de réactions biotiques et/ou abiotiques qui peuvent être affectées par de nombreux facteurs environnementaux (pH, T°, salinité, etc.) (Ullrich et al. 2001). A l'heure actuelle, ce sont les bactéries qui sont considérées comme principales responsables de la production du MeHg dans les environnements aquatiques (Compeau et Bartha 1984 ; Kerin et al. 2006).

#### Méthylation biotique

Considérée comme prépondérante (Macalady et al. 2000), la méthylation biotique est notamment le résultat de l'activité intense des Bactéries Sulfato-Réductrices (BSR) (Compeau et Bartha 1984 ; Gilmour et al. 1992 ; King et al. 2000 ; Ekstrom et al. 2003 ; Ekstrom et Morel 2008). Suite à l'absorption d'un complexe neutre mercure-sulfure, le MeHg va être formé (Jay et al. 2002). Cependant, l'excès de sulfure peut retarder la production de MeHg alors que l'excès de sulfate peut, quant à lui, stimuler la production de MeHg en augmentant l'activité des BSR (Gilmour et al. 1992). Certaines BSR sont également capables de méthyler en l'absence de sulfate, par exemple en conditions de fermentation (Bridou et al. 2011 ; Gilmour et al. 2011). Par ailleurs, d'autres souches que les BSR tels que les bactéries ferri-réductrices (Fleming et al. 2006 ; Kerin et al. 2006 ; Schaefer et al. 2011) et les méthanogènes (Hamelin et al. 2011) ont pu être identifiées comme présentant des aptitudes à méthyler et des capacités de synthèse du MeHg comparables aux BSR pour certaines d'entre elles (Fleming et al. 2006). Par ailleurs, en plus des algues (Pongratz et Heumann 1998 ; Mauro et al. 2002) et du phytoplancton (Mauro et al. 2002), des souches bactériennes colonisant des macrophytes ont également pu être récemment identifiées comme capables de méthyler le Hg (Achá et al. 2012). Même si ce processus est majeur, les mécanismes conduisant à l'ajout d'un groupement CH<sub>3</sub> sont encore sources de nombreuses interrogations. Cependant, de récents travaux ont pu mettre en évidence que l'absorption du Hg(II) pouvait notamment avoir lieu par transport actif via un transporteur du zinc (Schaefer et al. 2011, 2014) et deux gènes : *hgcA*, (codant pour une protéine) et *hgcB* (codant pour un potentiel transporteur de groupement CH<sub>3</sub>) ont été identifiés comme nécessaires à la méthylation (Parks et al. 2013).

#### Méthylation abiotique

La méthylation abiotique du Hg peut être induite par des réactions chimiques (transfert d'un groupement CH<sub>3</sub>) et photochimiques (réactions chimiques, radiations UV en présence d'acide

acétique) (Weber 1993 ; Gårdfeldt et al. 2003). L'agent principal capable de la méthylation abiotique du Hg dans les milieux aquatique est la méthylcobalamine (Craig 1978 ; Chen et al. 2007). Cette dernière peut en présence de Hg(II) produire aussi bien du MeHg que du (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Hg (Wood et al. 1968 ; Filippelli et Baldi 1993). D'autres agents donneurs de CH<sub>3</sub> existent tels que les dérivés de la vitamine B12, l'iodométhane, la méthionine S-adenosyle, l'acide acétique, les substances humiques et fulviques, les halogénures de CH<sub>3</sub>, les composés métalliques de CH<sub>3</sub> (Pb, As, Se) ou le diméthylsulfure (Craig 1978 ; Barkay et al. 2003 ; Celso et al. 2006).

### **3.2.2. Déméthylation dans les environnements aquatiques**

Dans les milieux aquatiques, le MeHg peut se dégrader et conduire à la formation de Hg(II) ou de Hg<sup>0</sup> volatil. De même que pour la méthylation, la déméthylation peut être d'origine biotique ou abiotique et la prépondérance de l'un ou l'autre de ces processus semble difficile à évaluer notamment au niveau des eaux côtières (Whalin et al. 2007). Il semblerait cependant que les processus de dégradation par voie abiotique soit dominants dans la couche euphotique de la colonne d'eau (Monperrus et al. 2007).

#### Déméthylation abiotique

La photodégradation du MeHg conduisant à la formation de Hg<sup>0</sup> volatil (par les UV) est le principal processus de déméthylation abiotique dans les environnements aquatiques (Marvin-DiPasquale et al. 2000 ; Barkay et al. 2003 ; Hammerschmidt et Fitzgerald 2006). Des radicaux hydroxyles (OH<sup>°</sup>) et de l'oxygène singulet ont pu être identifiés comme intermédiaires de réaction (Chen et al. 2003 ; Zhang et Hsu-Kim 2010). Majoritairement observée dans les eaux de surface (Tseng et al. 2001), la photo-déméthylation conduit notamment à l'apport de Hg<sup>0</sup> dans les écosystèmes (Mason et al. 1993). Etant favorisée en présence de ligands organiques contenant des sulfures (Zhang et Hsu-Kim 2010), la décomposition du MeHg semble dépendante de la nature de la matière organique dissoute, de l'intensité lumineuse et de la longueur d'onde (Hammerschmidt et Fitzgerald 2006). Des processus de photodégradation chimique, par oxydation ou hydrolyse, induisant la perte d'un groupement CH<sub>3</sub> peuvent également exister mais de façon moindre.

### Déméthylation biotique

Dominante dans les sédiments, deux types de déméthylation biotique existent selon le degré d'oxydation du groupement CH<sub>3</sub> : la déméthylation réductrice et la déméthylation oxydante (Oremland et al. 1991, 1995). Chacune de ces voies semblent dépendante du potentiel redox et de la concentration en Hg du milieu (Marvin-DiPasquale et al. 2000 ; Hines et al. 2006).

### Déméthylation réductrice

Ce processus a lieu dans les sédiments oxiques (présence d'oxygène) et fortement contaminés (Oremland et al. 1991 ; Hines et al. 2000 ; Gray et al. 2004 ; Schaefer et al. 2004). Il convertit le MeHg en Hg<sup>0</sup> et méthane (CH<sub>4</sub>, volatil) via un opéron *mer*. Cet opéron est constitué de 4 à 5 structures codant des gènes de régulation ainsi que le transport et la transformation du Hg. On distingue deux types d'opérons. Les opérons à spectre réduit, qui effectuent uniquement la réduction du Hg(II) en Hg<sup>0</sup> par l'intermédiaire d'une enzyme (*MerA*). Puis, les opérons à large spectre qui induisent une déméthylation dite 'réductrice' car le Hg(II) issu de la dégradation du MeHg par l'enzyme *MerB* est ensuite dégradé par *MerA* dans la cellule bactérienne avant d'être libéré sous forme de Hg<sup>0</sup> et CH<sub>4</sub> (Pitts et Summers 2002 ; Barkay et al. 2003 ; Schaefer et al. 2004 ; Kritee et al. 2009). La fréquence des gènes *mer* est d'autant plus importante que le milieu est contaminé, supposant que cette déméthylation est un processus de régulation de la contamination du MeHg. Ce système est largement distribué dans les compartiments marins, saumâtres et dulçaquicoles (Osborn et al. 1997 ; Barkay et Wagner-Döbler 2005) et a récemment été identifié en Arctique (Møller et al. 2011).

### Déméthylation oxydante

Ce processus dominant dans les environnements anoxiques (dépourvu d'oxygène) et faiblement contaminés (Marvin-DiPasquale et al. 2000) transforme le MeHg en Hg(II) et CO<sub>2</sub>. Cette transformation est possible par les BSR et les méthanogènes (Oremland et al. 1991, 1995 ; Pak et Bartha 1998) qui ont des processus de dégradation similaires. Une récente étude montrent que les BSR, capables de méthyler du Hg(II), sont aussi capables de déméthyliser du MeHg alors que l'inverse n'est pas toujours vrai (Bridou et al. 2011). Par ailleurs, ce travail met en évidence que la méthylation semble lente alors que la déméthylation est quant à elle plus rapide.

### **3.2.3. Oxydation et réduction dans les environnements aquatiques**

Dans les environnements aquatiques, le Hg(II) et le Hg<sup>0</sup> subissent de nombreuses transformations d'oxydo-réductions régularisées pas des facteurs météorologiques et hydrodynamiques (courants, vents, marées etc). En surface, des réactions de types photo-réduction ont lieu alors qu'en profondeur, ce sont essentiellement des réactions liées à l'activité biologiques (Monperrus et al. 2007 ; Whalin et al. 2007).

L'oxydation du Hg a été identifié en milieu marin (Amyot et al. 1997 ; Mason et al. 2001), estuarien (Lalonde et al. 2004) et lacustre (Lalonde et al. 2001 ; Hines et al. 2004). La photo-oxydation, est l'un des principaux processus d'oxydation du Hg<sup>0</sup> en Hg(II) avec notamment la production de radicaux OH comme intermédiaire chimique. (Lalonde et al. 2001 ; Gårdfeldt et al. 2003). L'oxydation par les microorganismes a également pu être observée par des bactéries hydro-péroxydes notamment dans des milieux dépourvus de lumière (Siciliano et al. 2002 ; Hines et al. 2004).

La réduction du Hg(II) en Hg<sup>0</sup>, à l'inverse de l'oxydation, induit la volatilisation du Hg<sup>0</sup> vers l'atmosphère. Elle est principalement d'origine photochimique (Amyot et al. 1997 ; Lanzillotta et al. 2002 ; O'Driscoll et al. 2006 ; Fantozzi et al. 2007) et, dans certains cas, constitue une réaction secondaire avec le carbone organique dissous ou le fer (Lanzillotta et al. 2004 ; Garcia et al. 2005). Les bactéries et le phytoplancton jouent également un rôle (Siciliano et al. 2002) mais de façon non prépondérante (Poulain et al. 2004). Cependant, les milieux fortement enrichis en Hg(II) induisent la réduction par les bactéries possédant des 'enzymes réductases' (Barkay et al. 2003).

### **3.3. Bioaccumulation et bioamplification du mercure**

Dans les systèmes aquatiques, les concentrations en Hg sont très variables selon les compartiments étudiés (océans, sédiments, organismes) (Figure 12). Les plus fortes concentrations en Hg total sont notamment observées dans les poissons (entre 10<sup>4</sup> à 10<sup>7</sup> ng Hg kg<sup>-1</sup> pf) et 60 à 99% du Hg se présentent sous une forme méthylée (Figure 12).



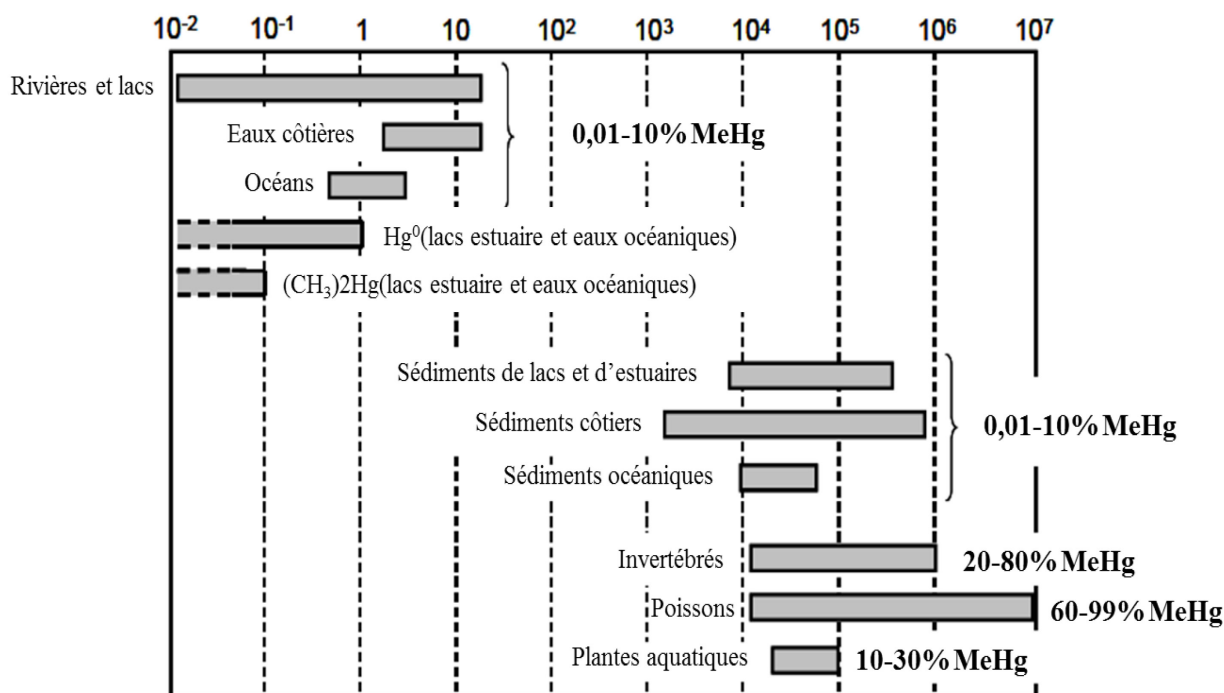


Figure 12 : Gamme de concentration (ng L<sup>-1</sup> ou ng kg<sup>-1</sup>) en mercure total (Hg) et proportion en MeHg (%) pour les divers compartiments aquatiques (d'après Tessier 2004).

Les concentrations en MeHg sont très variables selon le lieu d'étude, l'espèce choisie (Tableau 2) et l'écosystème étudié (marin, estuarien, dulçaquicole, lacustre) (Figure 12). Les milieux lacustres par exemple présentent des concentrations en MeHg très inférieures aux autres milieux et cela quel que soient les espèces considérées. Le congre (*Conger conger*) et le thon (*Thunnus thunnus* et *Thunnus obsesus*) sont les deux espèces qui concentrent le plus de MeHg alors que le poisson-chat (*Clarias gariepinus*) est celle qui en concentre le moins. Cela est certainement le résultat d'une bioamplification<sup>14</sup> différente due à leur position dans le réseau trophique.

Les formes chimiques du Hg qui peuvent être absorbées, accumulées et excrétées par les organismes aquatiques sont les Hg(II) et le MeHg (Morel et al. 1998 ; Kehrig et al. 2010 ; Bowling et al. 2011). Une fois la contamination des organismes par phénomène de diffusion ou par contact direct avec le Hg présent dans la colonne d'eau, ce dernier va être bioaccumulé et bioamplifié le long du réseau trophique (Mason et al. 1995 ; Watras et al. 1998 ; Hines et al. 2000 ; Dominique et al. 2007).

<sup>14</sup> Décrit le phénomène selon lequel les concentrations d'un composé augmentent à chaque maillon du réseau trophique

Tableau 2 : Gamme (minimum –maximum) de concentrations de MeHg (mg kg<sup>-1</sup> poids frais) observées dans le muscle de différentes espèces de poissons adultes dans différents milieux. Mil : Milieux = Dulçaquicole (Dul), Marin (Mar), Lacustre (Lac), Estuarien (Est). \* concentrations exprimées en poids sec.

Espèces	[MeHg] (min-max)	Lieu	Mil	Référence
<i>Silurus glanis</i>	0,267-0,764	Ebro-Espagne	Dul	Carrasco et al. 2011
<i>Ameiurus melas</i>	0,110-0,590	Tagus-Espagne	Dul	Nevado et al. 2011
<i>Salmo trutta</i>	0,002-0,220	Arahura-Nouvelle Zélande	Dul	Kim et al. 2008
<i>Silurus asotus linnaeus</i>	0,109-0,261	Bayi-Tibet	Dul	Zhang et al. 2014
<i>Cichla sp.</i>	0,32-0,58	Rio Madeira-Brasil	Dul	Kehrig et al. 2008
<i>Black seabream</i>	0,12-0,17	Xinghua-Chine	Mar	Onsanit et al. 2012
<i>Conger conger</i>	0,38-4,56*	Açores-Portugal	Mar	Magalhães et al. 2007
<i>Cephalopholis argus</i>	0,073-0,273	Mer de Chine	Mar	Liu et al. 2014
<i>Thunnus obesus</i>	0,111-1,965*	Pacifique	Mar	Chen et al. 2014
<i>Thunnus thynnus</i>	0,5-2,61	Tapei-Japon	Mar	Seixas et al. 2014
<i>Cyprinus carpio</i>	0,005-0,126	Ya-er-Chine	Lac	Jin et al. 2006
<i>Clarias gariepinus</i>	0,017-0,095	Phewa-Nepal	Lac	Sharma et al. 2013
<i>Barbus grypus</i>	0,072-0,842*	Musa-Iran	Est	Sarasiab et al. 2014
<i>Platycephalus indicus</i>	0,016-0,145	Pearl-Chine	Est	Pan et al. 2014
<i>Anguilla anguilla</i>	0,12-0,45*	Adour-France	Est	Arleney et al. 2007

Pour 57% des espèces piscivores occupant l'ouest des Etats-Unis, les concentrations en MeHg dépassent le seuil de consommation humaine défini de 0,3 µg Hg g<sup>-1</sup> poids frais par filet (Peterson et al. 2007). Le MeHg est reconnu comme la forme mercurielle la plus toxique pour les organismes aquatiques (Fitzgerald et al. 2007). Concentré par le phytoplancton à de faibles concentrations, il est bioaccumulé et engendre de réels problèmes de contamination chez les organismes supérieurs (Mason et al. 1996 ; Hines et al. 2000). En effet, 64% du MeHg s'accumule dans le cytoplasme de la cellule phyto-planctonique alors que le Hg(II) (entre 84 à 91%) est séquestré dans la membrane par les groupements thiols. Ce dernier sera donc facilement éliminé après absorption par un organisme supérieur du réseau trophique (Mason et al. 1996 ; Pickhardt et al. 2006). Le MeHg sera quant à lui facilement assimilé car associé à la partie soluble de l'organisme phyto-planctonique (Watras et al. 1998 ; Baeyens et al. 2003).

La forme chimique du Hg va avoir une grande influence sur le type d'organe ciblé et la rapidité de bioaccumulation. La concentration en Hg va également dépendre de la quantité absorbée, de sa distribution dans les tissus ainsi que de son élimination. Les deux formes de

Hg (Hg(II) et MeHg) peuvent être bioaccumulés par voie directe ou par voie trophique et généralement le MeHg est plus rapidement absorbé que le Hg(II) (Boudou et al. 1991).

Chez les invertébrés, le MeHg représente généralement 1/3 du Hg absorbé et est majoritairement bioaccumulé dans les branchies et les glandes digestives. Chez les poissons, de nombreuses études en laboratoire ont montré que plus de 85% du Hg se présente sous forme de MeHg. Une importante bioaccumulation a pu être observée au niveau des branchies lors d'une exposition à de fortes concentrations en MeHg (Olson et al. 1975 ; McKim et al. 1976 ; Niimi et Kisson 1994) mais ces concentrations dépassent très souvent les doses observables en milieu naturel (Spry et Wiener 1991 ; Wiener et Spry 1996). Une fois absorbé, le MeHg traverse généralement le tube digestif des poissons, se lie aux cellules sanguines puis est transporté par le système sanguin vers les reins, le foie puis le muscle et le cerveau. Il va être en contact avec des molécules de propriétés et de tailles chimiques différentes. Il possède cependant une forte affinité pour les groupements thiols (-SH), ce qui engendre une fixation efficace à de nombreuses protéines et enzymes essentielles affectant ainsi leurs fonctions (Khan et Wang 2009). Une partie de ce MeHg peut cependant être déméthylée dans le foie en une forme généralement moins toxique, le Hg (II) (Burrows et Krenkel 1973 ; Gonzalez et al. 2005). En effet, le Hg(II) traverse moins facilement les barrières biologiques comme cela a été mis en évidence chez la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) qui présente un taux d'absorption intestinale de 10% en Hg(II) et de 80% en MeHg (Boudou et Ribeyre 1985). Une quantité importante de Hg(II) a cependant pu être observé au niveau des branchies après absorption passive ou complexation avec un groupement chlore (Klinck et al. 2005), surtout lorsque l'organisme était à jeun (Olson et Fromm 1973). Après absorption, le Hg(II) est bioaccumulé dans les reins et le foie, notamment en vue d'une rapide excrétion (Huckabee et al. 1979 ; Ribeyre et Boudou 1984 ; Oliveira Ribeiro et al. 1999). Ce dernier est également reconnu pour se complexer avec le sélénium, s'accumuler dans les lysosomes, et être éliminé par la bile (Loumbourdis et Danscher 2004).

Le Hg va être véhiculé dans différents organes et sa bioaccumulation va dépendre des propriétés fonctionnelles et structurales des barrières biologiques comme par exemple la surface d'échange, la disponibilité des sites de fixation, les mécanismes de transport, etc. La membrane plasmique, constituée d'une double couche de phospholipides est une étape de passage obligatoire pour le Hg. Plusieurs mécanismes ont pu être identifiés : Un processus de diffusion passif des espèces du Hg (Pickhardt et al. 2006) ainsi qu'un transport actif par complexation via des acides animés ou des protéines (Boudou et Ribeyre 1997 ; Morel et al.

1998) avec par exemple l'association du MeHg avec les groupements cystéines conduisant à la formation d'un complexe proche de celui de la méthionine.

La bioaccumulation du Hg est dépendante de nombreux paramètres environnementaux (pH, T°), physiologique (respiration, réserves énergétiques, métabolisme, absorption) ainsi que de la biodisponibilité du composé (Boudou et Ribeyre 1985 ; Watras et al. 1998 ; Baeyens et al. 2003 ; Burgess et Hobson 2006 ; Chasar et al. 2009). La bioaccumulation peut également être dépendante de l'âge de l'espèce (Szczebak et Taylor 2011). Dans les réseaux trophiques, la bioaccumulation du MeHg est liée à la spéciation du Hg dans les environnements aquatiques. La concentration du MeHg peut être jusqu'à 10<sup>6</sup> fois plus importante entre le microorganisme (base) et le top-prédateur (haut) du même réseau trophique (Kehrig et al. 2010). La concentration en MeHg dans les organismes est donc positivement corrélée au niveau trophique des organismes (Watras et al. 1998 ; Burgess et Hobson 2006). Au sein d'un écosystème aquatique, de nombreux paramètres influencent la bioaccumulation du MeHg si bien que des variations temporelles et spatiales peuvent être observées pour une même espèce (Arribère et al. 2010 ; Greenfield et al. 2013a, 2013b).

### **3.4. Les systèmes estuariens**

Les estuaires sont des habitats uniques pour un certain nombre d'espèces. Ils constituent un continuum entre le milieu marin et le milieu dulçaquicole et représentent une zone largement utilisée pour la pêche commerciale. Ce sont des zones de transition fragiles où toute modification en amont entraîne une perturbation en aval. A proximité de forte implantation humaine, ils sont fortement affectés par des apports anthropiques liés à l'activité humaine, auxquels s'ajoutent les apports des bassins versants et le lessivage des sols, ce qui peut favoriser le transfert de polluants dans les maillons du réseau trophique. Les estuaires sont caractérisés par une dynamique particulière où les processus biogéochimiques vont modifier la biodisponibilité des éléments en affectant la distribution des différentes formes chimiques.

#### **3.4.1. Cas particulier : L'estuaire de l'Adour**

##### Caractéristiques générales de l'hydrosystème

D'une superficie de 16 890 km<sup>2</sup>, l'Adour se situe au Sud-Ouest de la France (Figure 13). C'est un fleuve du bassin aquitain qui prend sa source dans le massif pyrénéen du Pic du Midi de Bigorre, au col du Tourmalet et se jette 308 km plus loin, dans l'océan Atlantique à Anglet.

L'Adour est alimenté par de nombreux affluents qui s'inscrivent dans une région agricole (maïs, vigne) et industrielle (papeterie, électronique, chimie, etc.). Le bassin versant de l'Adour est dominé à 42% par des forêts et 28% par l'agriculture. Le débit moyen de l'Adour est de  $300 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$  avec en été un débit moyen de  $160 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$  et lors de fortes crues un débit pouvant atteindre les  $2000 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$ . L'Adour est caractérisé par des milieux aquatiques variés et riches accueillant différentes espèces de vertébrés (oiseaux limicoles, anatidés cistude, vison d'Europe, saumon atlantique, anguille européenne).

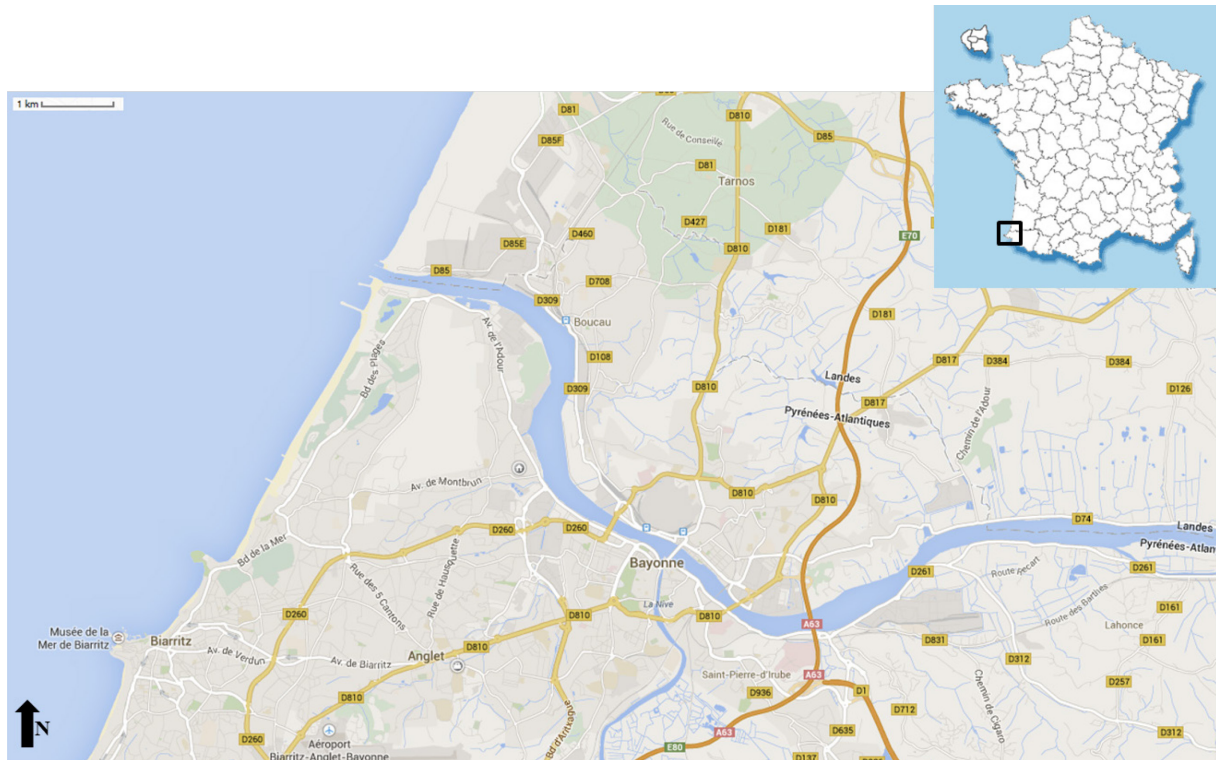


Figure 13 : Carte de l'estuaire de l'Adour et de ses principaux affluents.

### Le mercure dans l'estuaire de l'Adour

Stoichev et al. (2004) ont mis en évidence des variations saisonnières du MeHg dans les sédiments de surface de l'Adour, avec de plus fortes concentrations en MeHg en période estivale, associées à une diminution des concentrations en Hg(II). Ce résultat a été par la suite mis en relation avec la présence dans l'estuaire de nombreuses BSR ayant un fort potentiel de méthylation (Dias 2008 ; Duran et al. 2008), favorisant la remise en circulation du MeHg et son transport vers les zones côtières adjacentes (Stoichev et al. 2004 ; RNO 2005). Les niveaux de concentrations en Hg et MeHg dans les sédiments et le biote sont généralement plus importants que dans les eaux de l'estuaire (Tableau 3), bien que les sources ne soient à

l'heure actuelle pas clairement identifiées. Très peu d'études ont été réalisées afin d'évaluer la bioaccumulation du MeHg dans les différentes espèces de l'estuaire (Tableau 3).

**Tableau 3 : Gamme (minimum-maximum) de concentration en méthylmercure (MeHg) et mercure total (Hg) dans différentes matrices de l'estuaire de l'Adour.**

Type d'échantillons		MeHg (min-max)	Hg (min-max)	Références
eau de surface	diss (nmol L <sup>-1</sup> )	0,0001-0,0243	0,0025-0,1143	Stoichev et al. 2006
	part (nmol g <sup>-1</sup> )	0,02-3,01	0,1-69,4	
eau pluviales et usées	diss (nmol L <sup>-1</sup> )	0-0,008	0-0,131	Point 2004
	part (nmol g <sup>-1</sup> )	0-6,5	0-40,5	
	diss (nmol L <sup>-1</sup> )	0-0,007	0-0,103	Cavalheiro 2013
sédiment de surface	mg kg <sup>-1</sup>	0,01-1,7	0,020-1,466	Stoichev et al. 2004
macrofaune benthique	mg kg <sup>-1</sup>	0,01-0,120	0,200-1,200	Monperrus et al. 2005
huitre	mg kg <sup>-1</sup> poids sec		0-0,235	RNO 1999
	mg kg <sup>-1</sup> poids sec		0-0,16	Trut et al. 2013
muscle anguille jaune	mg kg <sup>-1</sup> poids frais	0,08-0,450	0,120-0,480	Arleny et al. 2007
civelle	mg kg <sup>-1</sup> poids frais	0,02-0,059	0,021-0,062	Navarro et al. 2013
muscle anguille jaune	mg kg <sup>-1</sup> poids frais	0,077-0,361	0,086-0,374	

## 4. Effets du mercure et processus de détoxification

L'exemple le plus connu d'intoxication au MeHg est l'accident de Minamata, au Japon. La contamination de la baie de Minamata par le MeHg a été le résultat de l'implantation d'une usine de fabrication d'acétaldéhyde dont l'une des étapes de synthèse a conduit à la génération de MeHg. Le MeHg fabriqué a été rejeté dans la baie entraînant une importante bioaccumulation dans les organismes aquatiques ce qui a mené à un véritable désastre suite à la consommation par les populations locales de poissons et de crustacés fortement contaminés (Irikayama et Kondo 1966 ; Harada 1995). Après cet empoisonnement, les habitants ont présenté différents symptômes tels qu'une perte de l'audition, une diminution de la sensibilité au toucher, une perte de la coordination des mouvements, etc. (Ekino et al. 2007). Par ailleurs, lors de cet épisode, le MeHg a été reconnu comme traversant aisément la barrière placentaire et s'accumulant ainsi plus facilement chez le fœtus que chez la mère (Sakamoto et al. 2002, 2004 ; Stern et Smith 2003). D'autres événements d'intoxication au MeHg ont par la suite eu lieu, notamment en Irak (hiver 1971-1972), suite à la consommation de farine fabriquée avec du blé traité avec des alkyls de Hg utilisés à l'époque comme fongicide (Bakir et al. 1973). Aux îles Féroé (1986-1987), l'épisode de contamination a principalement été liée à la consommation massive de poissons (cabillaud :  $0,07 \mu\text{g g}^{-1}$ ) ou de viande de baleine (Grandjean et al. 1997, 1998, 2003 ; Steuerwald et al. 2000).

A notre connaissance, peu ou pas d'accidents ont été recensés pour des intoxications au Hg(II), mais tous ces exemples apportent la preuve que la contamination des milieux aquatiques par le Hg est un vrai problème de santé publique à l'échelle planétaire. Depuis ces cinquante dernières années, les différentes études ont permis de faire progresser notre compréhension de l'effet toxique du MeHg, alors que l'impact du Hg(II) sur les organismes est beaucoup moins bien connu...

### 4.1. Effets du mercure sur les organismes aquatiques

Dans le milieu naturel, les concentrations de Hg (MeHg et Hg(II)) sont très variables d'une région à une autre, d'un écosystème à un autre, à l'intérieur d'un écosystème etc. Les quantités observées dépendent de nombreux paramètres tels que la biodisponibilité du composé, les paramètres physico-chimiques du milieu, la forme chimique du Hg etc. Généralement, on estime que dans l'eau, les concentrations mesurées sont de l'ordre du  $\mu\text{g L}^{-1}$  au  $\text{ng L}^{-1}$  de Hg (forme majoritaire Hg(II)) alors que dans le biote, notamment les poissons, les concentrations atteignent les  $\mu\text{g g}^{-1}$  de Hg (forme majoritaire MeHg). Après avoir traversé la membrane cellulaire, une variété de dysfonctionnements va être induite par le MeHg

engendrant de nombreux effets délétères (létaux et sublétaux) agissant de façon individuelle ou synergique. Suite à des injections intra-péritonéale de MeHg (0 à 2 mg kg<sup>-1</sup> MeHg) et une analyse protéomique du cerveau de *Gadus morhua*, il a été mis en évidence une dégénérescence de la structure cellulaire, un stress oxydatif et un dysfonctionnement de l'homéostasie du calcium dans cette région (Berg et al. 2010). Le MeHg est reconnu pour induire des dommages au niveau du système nerveux central et des organes sensoriels périphériques (Wolfe et Norman 1998 ; Aschner et al. 2007 ; Farina et al. 2011). La toxicité du MeHg peut également se manifester par des altérations hématologiques (Shah et Altindag 2004), immunitaires (Bols et al. 2001), histologiques (Alves Costa et al. 2007 ; Mela et al. 2007 ; Cambier et al. 2009) et du système reproducteur (Sandheinrich et Miller 2006 ; Klaper et al. 2008). Pour le Hg(II), les effets s'observent notamment par des atteintes sur la morphologie des branchies (Jakka et al. 2007) et sur l'histologie des organes (Oliveira Ribeiro et al. 2002 ; Vergilio et al. 2012). Une exposition à 30 µg L<sup>-1</sup> de Hg(II) (72hrs) a conduit à un gonflement cellulaire, une nécrose, une dégénérescence vacuolaire suivi de la congestion des vaisseaux sanguins dans le foie de *Scatophagus argus.L* par rapport aux individus contrôles (Morovvati et al. 2012).

#### **4.1.1. Effets du mercure sur le comportement**

Le comportement est une mesure particulièrement sensible de réponse d'un organisme à des contraintes environnementales telles que les contaminants. Les réponses observées vont être différentes en fonction de leur mode d'action, de la concentration testée et de la sensibilité de chaque espèce (MacLatchy et Robinson 2009). Les types de comportements qui ont été étudiés concernent essentiellement l'activité de nage, la capture de proies, l'apprentissage et l'évitement de prédateurs (Tableau 4). Certains travaux mettent en évidence que l'exposition de poissons au MeHg peut modifier l'activité de nage (Weber et al. 2006 ; Xiaojuan Xu et al. 2012) ou la réponse d'évitement à un stimulus (Weber et al. 2006) (Tableau 4). Zhou et al. (2001) ont examiné le comportement d'embryons et de larves de *Fundulus heteroclitus* exposés à 5 et 10 µg L<sup>-1</sup> de MeHg et ont pu observer une diminution de la capacité de capture des proies. Cependant, cet effet s'est avéré temporaire. L'apprentissage (Smith et al. 2010) et le comportement social peut également être affecté par le MeHg (Ososkov et Weis 1996). Des larves de *Fundulus heteroclitus*, dont le stade embryonnaire a été exposés à 5 µg L<sup>-1</sup> de MeHg, augmentent la fréquence des collisions avec leurs congénères, notamment si ces derniers sont proches (Ososkov et Weis 1996). Après une contamination à 0,05 mg kg<sup>-1</sup> de MeHg de géniteurs de *Micropogonias undulatus*, les larves ont présenté une baisse



d'efficacité de la prise de nourriture et de l'évitement des prédateurs, paramètres essentiels à leur survie (Alvarez et al. 2006).

Les récentes études sur les effets comportementaux du Hg(II) sont assez rares (Tableau 4). Une diminution de la vitesse de nage et de la distance parcourue a été relevée chez *Gambusia affinis* après 28 jours de contamination à 20 µg L<sup>-1</sup> de Hg(II) (Jakka et al. 2007). Chez *Danio rerio* contaminé par voie trophique avec 1 µg g<sup>-1</sup> de Hg(II), une augmentation de l'activité de nage a été observée, principalement sur le fond de la structure expérimentale (Maximino et al 2011).

#### **4.1.2. Effets du mercure et métabolisme**

Le stress oxydant est défini comme le résultat d'un déséquilibre entre la production d'Espèces Réactives à l'Oxygène (ERO) et les défenses antioxydantes (Edeas et al. 2010 ; Nishida 2011). La respiration mitochondriale est la principale source endogène d'ERO. En effet, la réduction de l'oxygène moléculaire par les cytochromes respiratoires peut être réalisée de façon incomplète et s'accompagner de 1 à 4 % d'oxygène (O<sub>2</sub>) incomplètement réduit. (Boveris et Cadenas 2000). Un électron est alors transféré à l'oxygène générant un radical hydroxyle selon l'équation suivante :  $O_2 + 1e^- \rightarrow O_2^-$

Cependant, ces dérivés de l'oxygène peuvent également être induits en présence de composés exogènes tels que les métaux lourds, les pesticides etc. (Monserrat et al. 2007 ; Slaninova et al. 2009 ; Lushchak 2011). C'est notamment le cas du Hg qui est reconnu pour être associé à une augmentation d'ERO chez de nombreux poissons conduisant à une rupture de l'équilibre oxydatif et générant un stress oxydant (Berntssen et al. 2003, Nøstbakken et al. 2012, Yadetie et al. 2013) (Tableau 5). Outre les dommages oxydatifs, plusieurs études mettent en évidence des effets moléculaires du MeHg sur les marqueurs métaboliques (Tableau 5). Citons à titre d'exemple, Cambier et al. (2009) qui ont montré que le MeHg inhibe uniquement le complexe 3 de la chaîne respiratoire mitochondriale chez *Danio rerio*. Une sous-régulation de l'ATP5B a également été observée chez *Salmo salar* exposé à 3,8 mg kg<sup>-1</sup> de MeHg suggérant que celui-ci peut inhiber les enzymes responsables de la phosphorylation de l'ATP dans les mitochondries (Nostbakken et al. 2012).

La toxicité du Hg(II) se manifeste quant à elle par une demande énergétique plus importante induisant un plus fort stress oxydant (Tableau 6). Chez *Ictalurus melas* exposé à 140 µg L<sup>-1</sup> de Hg(II), *Brycon amazonicus* exposé à 1,20 mg L<sup>-1</sup> de Hg(II) ou *Hoplias malabaricus* exposé à 8 mg kg<sup>-1</sup> de Hg(II), la contamination conduit à une augmentation de la production de ERO et donc à la mise en place de mécanismes de défenses antioxydantes (Elia et al. 2003 ; Monteiro et al. 2009, 2013).

**Tableau 4 : Effets du Hg (MeHg et Hg(II)) observés sur le comportement des poissons**

**Types de comportements étudiés** : en violet (activité de nage), en vert (capture de proies), en orange (apprentissage), en bleu (prédation) / **Stade** : stade de l'organisme durant l'exposition= adulte (A), juvénile (J), larvaire (L), embryonnaire (E), nd = non déterminé / **Voie d'exposition (VE)** de l'organisme au MeHg : par voie trophique (VT), par voie aqueuse (VA), par injection intra-péritonéale (II) / **Durée d'exposition** : période pendant laquelle l'organisme a été exposé au Hg / **nb[Hg]<sub>testées</sub>** : nombre de concentrations testées (MeHg ou Hg(II)) / **[Hg]<sub>sans effet</sub>** : concentration (MeHg ou Hg(II)) n'ayant pas d'effet sur l'organisme étudié / **[Hg]<sub>avec effet</sub>** : concentration (MeHg ou Hg(II)) minimale ayant un effet sur l'organisme étudié / **Effets observés** sur les organismes après exposition ; ↑ : augmentation, ↓ : diminution, <sup>a</sup> : pour la plus forte concentration testée ; <sup>b</sup> : proportionnelle aux concentrations.

Espèces	Stade	VE	Durée exposition	nb [Hg] <sub>testées</sub>	[Hg] <sub>sans effet</sub>	[Hg] <sub>avec effet</sub>	Effets observés	Références
<i>Fundulus heteroclitus</i>	E	VA	jusqu'à éclosion	3	0 µg L <sup>-1</sup>	5 µg L <sup>-1</sup>	↑ fréquence de collision en groupe	Ososkov et Weis 1996
<i>Pimephales promelas</i>	J	VT	jusqu'à la maturation sexuelle	4	0,06 µg g <sup>-1</sup>	0,87 µg g <sup>-1</sup>	↓ activité de nage	Sandheinrich et Miller 2006
<i>Danio rerio</i>	E	VA	0 à 24hrs après la fécondation	4	0 µg L <sup>-1</sup>	25 µg L <sup>-1</sup>	↓ temps de réponse au stimulus échec de réponses lors de stimuli répétés	Weber 2006
<i>Danio rerio</i>	E	VA	jusqu'à éclosion	5	0 µg L <sup>-1</sup>	2 µg L <sup>-1</sup>	↑ activité aucune capacité d'évitement	Xiaojuan Xu 2012
<i>Danio rerio</i>	E	VA	24h, 48 hrs, jusqu'à l'éclosion	4	5 µg L <sup>-1</sup>	10 µg L <sup>-1</sup>	↓ nage spontanée ↓ capture de proies mortalité (après 6jrs) <sup>a</sup>	Samson et al. 2001
<i>Micropogonias undulatus</i>	A/L	VT	tous les jours pendant 1 mois	3	0 mg kg <sup>-1</sup>	0,05 mg kg <sup>-1</sup>	↓ vitesse de réponse au stimulus ↓ capacité de recherche de nourriture ↓ de l'activité de nage	Alvarez et al. 2006
<i>Fundulus heteroclitus</i>	E	VA	jusqu'à l'éclosion	3	5 µg L <sup>-1</sup>	10 µg L <sup>-1</sup>	↓ capture de proies effet temporaire (1 semaine)	Weis et Weis 1995
<i>Fundulus heteroclitus</i>	E L	VA	jusqu'à l'éclosion 3/5/8/11/14 jours après l'éclosion	3	0 µg L <sup>-1</sup>	5 µg L <sup>-1</sup>	↓ capture des proies (embryons exposés) effet temporaire	Zhou et al. 2001
<i>Salmo salar</i>	J	VT	120 jours	3	0 mg kg <sup>-1</sup>	10 mg kg <sup>-1</sup>	↓ comportement alimentation	Berntssen et al. 2003
<i>Danio rerio</i>	E	VA	2 à 24 hrs après la fécondation	6	0 µg L <sup>-1</sup>	2 µg L <sup>-1</sup>	↓ capacité d'apprentissage (4 mois après fin exposition)	Smith et al. 2010
<i>Fundulus heteroclitus</i>	E	VA	jusqu'à l'éclosion	3	5 µg L <sup>-1</sup>	10 µg L <sup>-1</sup>	↑ activité de nage ↑ vulnérabilité à la prédation	Weis et Weis 1995
<i>Gambusia affinis</i>	nd	VA	28 jours	2	0 µg L <sup>-1</sup>	20 µg L <sup>-1</sup>	↑ thigmotaxis ↓ vitesse de nage ↓ distance parcourue	Jakka et al. 2007
<i>Danio rerio</i>	A	II	24 hrs	3	0 µg.g <sup>-1</sup>	1 µg g <sup>-1</sup>	↑ mouvement erratiques ↑ temps en mouvement ↑ thigmotaxis	Maximino et al. 2011

MeHg

Hg(II)

**Tableau 5 : Effets du MeHg sur le stress oxydant et le métabolisme.**

**Stade** : Stade de l'organisme durant la contamination= adulte (A), juvénile (J), nd = non déterminé / **Organes (O) ou tissus (T)** analysés durant les expériences : cerveau (C), foie (F), muscle (Mu), mitochondrie (Mi), reins (R) / **Voie d'exposition (VE)** de l'organisme au MeHg : par voie trophique (VT), par voie aqueuse (VA), par injection intra-péritonéale (II), nd = non déterminé / **Durée d'exposition** : période pendant laquelle l'organisme a été exposé au MeHg / **nb [MeHg]testés** : nombre de concentrations testées / **[MeHg]min-max** : plus faible et plus forte concentration au MeHg testée / **[MeHg]observées** : concentrations déterminées dans l'organe ou le tissu de l'organisme (cX : rappel de la concentration d'exposition). Les concentrations exprimées par unité de masse sont en poids frais. (\*si poids sec)

Espèces	Stade	O T	VE	Durée exposition	nb [MeHg] testés	[MeHg] min-max	[MeHg] observées
<i>Hoplias malabaricus</i>	A	F	VT	70 jours	2	1,05 µg g <sup>-1</sup> - 10,5 µg g <sup>-1</sup>	1,04 (c1,05) à 8,21 (c10,5) µg g <sup>-1</sup>
<i>Salmo salar</i>	A	C	VT	4 mois	3	0 - 10 mg kg <sup>-1</sup>	0,05 (c0) à 0,68 mg kg <sup>-1</sup> (c10)
<i>Salmo salar</i>	A	R	VT	8 semaines	2	0,07 - 3,8 mg kg <sup>-1</sup>	0,10 à 2,96 mg kg <sup>-1</sup>
<i>Danio rerio</i>	A	Mi	VT	49jours	2	0 - 13,5 µg g <sup>-1</sup>	nd
<i>Danio rerio</i>	A	Mu F	VT	7, 21 et 63 jours	3	0,08 - 13,5 µg g <sup>-1</sup>	0,08 à 33 µg g <sup>-1</sup> 0,08 à 40 µg g <sup>-1</sup>
<i>Danio rerio</i>	A	C	VT	25, 50 jours	2	0 - 13,5 µg g <sup>-1</sup>	30 (25jrs) à 46 (50jrs) µg g <sup>-1</sup>
<i>Danio rerio</i>	A	C	II	96hrs	2	0 à 0,5 µg g <sup>-1</sup>	nd
<i>Oryzias latipes</i>	A	C F	VA	8, 16 et 24 jours	6	0 - 40 ng mL <sup>-1</sup>	0,03 à 64,4 µg g <sup>-1</sup>
<i>Gadus morhua</i>	J	F	II	14 jours	2	0,5 - 2 mg kg <sup>-1</sup>	nd
<i>Liza aurata</i>	J	C	nd	nd	nd	nd	0,10 à 0,15 mg kg <sup>-1</sup> *
<i>Seter vitreus</i> <i>Perca flavescens</i>	A	F	nd	nd	nd	nd	0 à 300 mg kg <sup>-1</sup>
<i>Esox lucius</i>	A	F	nd	nd	nd	nd	0,069 à 0,622 µg g <sup>-1</sup>
<i>Hoplias malabaricus</i>	A	F	nd	nd	nd	nd	< 0,2 à > 0,2µg g <sup>-1</sup>
<i>Salvelinus alpinus</i>	A	F	VA	30 jours	2	0 - 0,26 µg g <sup>-1</sup>	nd
<i>Pimephales promelas</i>	A	F	II	96hrs	2	0 - 2 µg g <sup>-1</sup>	nd
<i>Pimephales promelas</i>	nd	F	VT	600 jours	3	0,058 - 3,93 µg g <sup>-1</sup>	nd
<i>Gadus morhua</i>	J	C	II	2 semaines	3	0 - 2 mg kg <sup>-1</sup>	nd

**Tableau 5 (cont.) : Effets du MeHg sur le stress oxydant et le métabolisme**  
**Effets observés** sur les organismes après exposition. ↑ : augmentation, ↓ : diminution

Espèces (cont.)	Effets observés	Références
<i>Hoplias malabaricus</i>	↓ stress oxydant/défenses antioxydantes ( <i>gst</i> et <i>cat</i> )	Mela et al. 2014
<i>Salmo salar</i>	↑ stress oxydant/défenses antioxydantes ( <i>sod</i> et <i>gsh</i> ) ↑ peroxydation lipides	Berntssen et al. 2003
<i>Salmo salar</i>	présence marqueurs protéomique du stress oxydant présence marqueurs protéomique du métabolisme ↑ métabolisme mitochondrial	Nøstbakken et al. 2012
<i>Danio rerio</i>	défaut synthèse ATP ↓ métabolisme mitochondrial ( <i>cox1</i> )	Cambier et al. 2009
<i>Danio rerio</i>	↑ métabolisme mitochondrial ( <i>cox1</i> ) ↑ stress oxydant/défenses antioxydantes ( <i>sod</i> )	Gonzalez et al. 2005
<i>Danio rerio</i>	pas de différence de respiration mitochondriale ↑ stress oxydant/défenses antioxydantes ( <i>gst</i> )	Cambier et al. 2012
<i>Danio rerio</i>	expressions altérées de la fonction mitochondriale, du stress oxydant, du métabolisme du glutathion et du métabolisme des lipides	Richter et al. 2011
<i>Oryzias latipes</i>	inhibition de l'acétylcholine estérase	Liao et al. 2006
<i>Gadus morhua</i>	expression altérée du métabolisme énergétique ( $\beta$ -oxydation acide gras) expression altérée du stress oxydant ( <i>gst</i> , <i>nrf2</i> )	Yadatie et al. 2013
<i>Liza aurata</i>	↑ stress oxydant/défenses antioxydantes pour la zone contaminée	Mieiro et al. 2010
<i>Seter vitreus</i>	↑ stress oxydant/défenses antioxydantes ( <i>gst</i> ) pour la zone contaminée	Larose et al. 2008
<i>Perca flavescens</i>	↓ stress oxydant/défenses antioxydantes ( <i>gst</i> , <i>gsh-px</i> <i>sod</i> )	
<i>Esox lucius</i>	↓ réserves lipidiques	Drevnick et al. 2008
<i>Hoplias malabaricus</i>	↑ défenses cellulaires ( <i>cat</i> , macrophages)	Da Silva et al. 2012
<i>Salvelinus alpinus</i>	↓ lipides de réserves	Oliveira Ribeiro et al. 2002
<i>Pimephales promelas</i>	↑ stress oxydant/défenses antioxydantes	Klaper et al. 2008
<i>Pimephales promelas</i>	stress oxydant/défenses antioxydantes ( <i>sod</i> , <i>gst</i> ) identiques	Klaper et al. 2006
<i>Gadus morhua</i>	expression altérée de la fonction mitochondriale, du stress oxydant et de l'homéostasie du calcium	Berg et al. 2010

## Introduction

**Tableau 6 : Effets du Hg(II) sur le stress oxydant et le métabolisme**

**Stade** : Stade de l'organisme durant la contamination = adulte (A), juvénile (J), nd = non déterminé / **Organes (O) ou tissus (T)** analysés durant les expériences : branchie (B), cerveau (C), cœur (Co), foie (F), glande digestive (GD), muscle (Mu), reins (R), gonade (G) / **Voie d'exposition (VE)** de l'organisme au Hg(II): par voie trophique (VT) ou voie aqueuse (VA) / **Durée d'exposition** : période pendant laquelle l'organisme a été exposé au Hg(II) / **nb [Hg(II)]<sub>testés</sub>** : nombre de concentrations testé / **[Hg(II)]<sub>min-max</sub>** : plus faible et plus forte concentration au Hg(II) testée / **[Hg(II)]<sub>observées</sub>** : concentrations déterminées dans l'organe ou le tissu de l'organisme (cX : rappel de la concentration d'exposition/ou de la durée d'exposition). Les concentrations exprimées par unité de masse sont en poids frais (\*si poids sec).

Espèces	Stade	O	VE	Durée exposition	nb [Hg(II)] <sub>testés</sub>	[Hg(II)] <sub>min-max</sub>	[Hg(II)] <sub>observées</sub>
<i>Mytilus edulis</i>	nd	B	VA	14 jours – intermittent (I) 14 jours - continue (C)	2	0 ou 50 µg L <sup>-1</sup>	1351 (I) et 1732 (C) µg g <sup>-1</sup>
		GD					250 (I) et 900 (C) µg g <sup>-1</sup> dans GD
		G					175 (I) et 290 (C) µg g <sup>-1</sup> dans G
		Mu					100 (I) et 115 (C) µg g <sup>-1</sup> dans Mu
<i>Salmo salar</i>	A	C	VT	4 mois	3	0 à 100 mg kg <sup>-1</sup>	0,05 (c0) à 0,13 mg kg <sup>-1</sup> (c100)
<i>Brycon amazonicus</i>	J	F	VA	96hrs	2	0 à 0,15 mg L <sup>-1</sup>	10,46 mg kg <sup>-1</sup>
		B					17,80 mg kg <sup>-1</sup>
		Co					0,72 mg kg <sup>-1</sup>
		Mu					0,63 mg kg <sup>-1</sup>
<i>Hoplias malabaricus</i>	A	F	VT	30 jours	2	0 à 8,11 ± 0,96 mg kg <sup>-1</sup>	1,08 mg kg <sup>-1</sup>
		B					1,57 mg kg <sup>-1</sup>
		Co					0,12 mg kg <sup>-1</sup>
		Mu					0,16 mg kg <sup>-1</sup>
<i>Danio rerio</i>	nd	F	VA	96hrs	2	0 à 200 µg L <sup>-1</sup>	nd
<i>Ictalurus melas</i>	nd	B	VA	10 jours	4	0 à 140 µg L <sup>-1</sup>	15,28 mg g <sup>-1</sup> (c140)
		R					17,82 mg g <sup>-1</sup> (c140)

**Tableau 6 (cont.) : Effets du Hg(II) sur le stress oxydant et le métabolisme**  
**Effets observés** sur les organismes après exposition. ↑ : augmentation, ↓ : diminution

Espèces (cont.)	Effets observés	Références
<i>Mytilus edulis</i>	stress oxydant/défenses antioxydantes ( <i>sod, gst</i> ) identiques peroxydation des lipides identiques ↓ glutathion dommages histologiques	Amachree et al. 2014
<i>Salmo salar</i>	stress oxydant/défenses antioxydantes ( <i>sod neuronal et gsh</i> ) identiques peroxydation des lipides identiques ↓ activité neuronale	Berntssen et al. 2003
<i>Brycon amazonicus</i>	↑ stress oxydant/défenses antioxydantes ( <i>sod, cat</i> ) sauf dans Mu ↑ peroxydation lipides sauf Mu ↑ GSH dans F et B ↑ MT sauf dans Mu	Monteiro et al. 2009
<i>Hoplias malabaricus</i>	↑ stress oxydant/défenses antioxydantes ( <i>sod, cat</i> ) sauf dans B ↑ peroxydation lipides sauf B ↑ GSH (dans Co) ↑ MT (sauf Mu)	Monteiro et al. 2013
<i>Danio rerio</i>	perturbation chaine de transport des électrons perturbation métabolisme des B, oxydation des acides gras dommage à l'ADN hypoxie dysfonctionnement mitochondrial	Ung et al. 2010
<i>Ictalurus melas</i>	↑ stress oxydant/défenses antioxydantes	Elia et al. 2003

## 4.2. Processus de détoxication du mercure

Pour protéger les cellules du Hg et de ses effets, différents mécanismes sont mis en place. L'organisme va essayer de rendre le Hg moins biodisponible en le séquestrant par l'intermédiaire de nombreux composés cellulaires tels que : les métallothionéines (MT), le glutathion et les acides aminés. Une fois complexé, le Hg sera pris en charge afin d'être excrété. Des processus de transformation des espèces chimiques sont également observés afin de rendre le Hg sous une forme moins toxique. L'organisme va également se défendre contre la production de ERO suite à une exposition au Hg.

### 4.2.1. Les métallothionéines

Les MT constituent l'un des premiers systèmes de séquestrations des métaux. Les métaux non essentiels tels que le cadmium (Piscator 1964), essentiels comme le cuivre (Bremner 1979), et d'autres facteurs comme l'hypoxie ou le stress oxydant entraînent l'induction de ces protéines (Figure 14). Les MT ont été considérées, pendant longtemps, comme incapables de fixer le MeHg, de par l'encombrement stérique lié au groupement CH<sub>3</sub> (Chen et al. 1973). Mais, en 1974, Nordberg et al. ont mis en évidence l'induction de ces dernières suite à une contamination au MeHg. Il semblerait cependant selon Wiener et Spry (1996) que les MT aient une plus forte affinité pour les groupements Hg (II) .

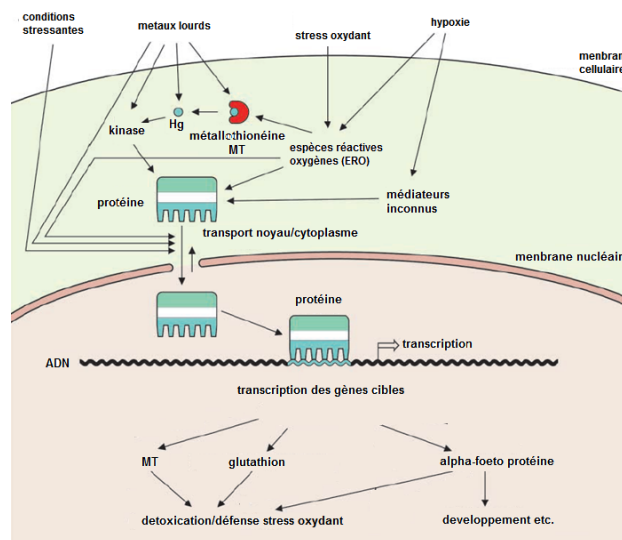


Figure 14 : Représentation schématique des modes d'activation de la synthèse de métallothionéines et de ses conséquences (adapté d'après Lichten et Schaffner 2001).

Bien que les fonctions de ces protéines ne soient à l'heure actuelle pas toutes connues, leur rôle majeur est d'assurer l'homéostasie des métaux essentiels (Brouwer et al. 2002 ; Wang et Rainbow 2010 ; Wood et al. 2012). Les MT comportant du Zinc (Zn) sont par exemple capable d'activer d'autres enzymes elles-mêmes dépendantes du Zn telles que la phosphatase alcaline, l'aldolase, l'anhydrase carbonique, etc. (Winge et Miklossy 1982). Une étude sur un crabe bleu (*Callinectes sapidus*) a par exemple démontré que les MT étaient impliquées dans les processus physiologiques et biochimiques contrôlant la croissance et la reproduction de ce dernier (Engel et Brouwer 1987).

Les MT peuvent également jouer un rôle protecteur contre des niveaux élevés de métaux essentiels et participer à la détoxification de métaux non essentiels tels que le Hg (Roesijadi et al. 1996 ; Monteiro et al. 2013). Les MT synthétisées suite à une exposition aux polluants vont immobiliser les ions libres et inhiber leur action, limitant ainsi leur toxicité. De nombreux travaux ont pu montrer une augmentation du gène codant pour les MT suite à l'exposition de métaux lourds pour de nombreux organismes (Marie et al. 2006 ; Faria et al. 2009 ; Ivanković et al. 2010).

#### **4.2.2. Le glutathion**

Les poissons possèdent plusieurs mécanismes de défense dont l'un des plus importants est le système du glutathion (GSH). Outre son rôle d'agent contre le stress oxydant, il est impliqué dans une variété de fonctions cellulaires telles que le transport d'acides aminés, des processus métaboliques et la défense cellulaire contre les xénobiotiques (Peña et al. 2000 ; Thom et al. 2001). Il intervient notamment dans les réactions de détoxification catalysées par la glutathion-S-transférase (*gst*), qui consistent en la conjugaison de composés électrophiles ou de métabolites avec la GSH (Edwards et al. 2000 ; Dickinson et Forman 2002). C'est une mesure de protection, qui facilite l'excrétion des xénobiotiques et protège d'autres cibles cellulaires (Hasspieler et al. 1994). Cependant, le MeHg peut interagir avec les groupements sulfhydryles des molécules antioxydantes tels que le glutathion (GSH), ce qui peut limiter son action. (Sanfeliu et al. 2003 ; Bridges et Zalups 2005).



#### **4.2.3. Déméthylation et interaction avec le sélénium**

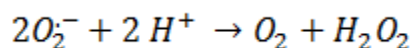
Le Hg(II) est généralement facilement éliminé dans l'organisme contrairement au MeHg. La déméthylation est la transformation du MeHg en Hg(II), moins toxique, et plus rapidement éliminé. Les capacités à métaboliser le MeHg en Hg(II) sont variables d'une espèce à l'autre. Ce processus a généralement lieu dans le foie (Yasutake et Hirayama 1990 ; Gonzalez et al. 2005) et une fois produit, le Hg(II) peut progressivement être séquestré et éliminé. La présence de certains inhibiteurs mitochondriaux peut cependant empêcher la formation de Hg(II) (Yasutake et Hirayama 2001). Scheuhammer et al. (1998) ont par exemple montré une importante déméthylation dans le foie et les reins de huard (*Gavia immer*) et de harles (*Mergus merganser*) avec notamment la formation de complexe stable de Hg(II) et sélénium sans toxicité apparente. Ces complexes séléno-mercuriels sont entourés de GSH et sont transportés dans la lumière du tube digestif via la bile (Loumbourdis et Danscher 2004) puis excrétés par les urines (Gailer 2007).

#### **4.2.4. Systèmes de défenses antioxydantes**

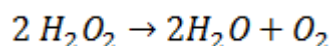
Lorsque l'organisme doit faire face à un stress oxydant, il peut choisir :

- (1) : de favoriser les catalyseurs de leurs formations et de leurs éliminations
- (2) : d'induire des systèmes de défenses antioxydantes
- (3) : d'augmenter les activités de réparations et d'élimination des cellules endommagées.

La superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT) et la glutathion (GSH) font partie des principales enzymes antioxydantes indicatrices d'un état de 'stress oxydant'. Deux types de SOD existent : une isoforme cytosolique avec un site catalytique contenant du Cuivre (Cu) et du Zn (*sod1*) et une isoforme mitochondriale (*sod2*) avec du manganèse dans son site catalytique. Les deux 'SOD' ont pour rôle de catalyser la dismutation de l'anion superoxyde en eau oxygénée selon l'équation suivante :



La CAT prend ensuite en charge l'eau oxygénée et la dismute en eau et en oxygène selon l'équation suivante :



Ce système de défense joue notamment un rôle dans le cas d'une contamination au mercure (Tableaux 5 et 6).

## 5. Objectifs de la thèse

Ces travaux de thèse ont pour objectif d'étudier l'impact du MeHg sur le comportement de migration des civelles, en lien avec le statut énergétique et les processus de détoxification. Dans une première partie, un état des lieux des concentrations en MeHg dans les civelles de l'estuaire de l'Adour a été réalisé en relation avec leur contenu énergétique. L'objectif de la seconde partie du manuscrit a été d'étudier l'impact de la contamination au MeHg sur le comportement de migration des civelles en milieu expérimental. L'utilisation de traceurs isotopiques a permis de travailler à des doses d'exposition représentatives de celles trouvées dans le milieu naturel. Les résultats obtenus ont été mis en relation avec le statut énergétique des individus, le stress oxydant et les mécanismes de détoxification. Le statut énergétique des civelles a été étudié en couplant l'analyse du métabolisme standard (micro-respirométrie), l'analyse de gènes du métabolisme énergétique (*12s* et *cox*) et le contenu énergétique. L'impact de la contamination sur le stress oxydant a été évalué par quantification en temps réel de l'expression de gènes antioxydants (*cat* et *sod2*). Pour répondre à la contamination, des mécanismes de défenses peuvent être induits. Pour cela, un gène de biotransformation (*gst*) et un gène de la métallothionéine (*mt1*) ont été suivis. La troisième partie a consisté à mettre en relation dans le milieu naturel le comportement migratoire, les taux de contamination en MeHg, le statut énergétique et les mécanismes de détoxification chez les civelles marines et estuariennes. Généralement, les travaux sur la contamination des organismes et la réponse biologique sont le plus souvent soit *in situ* soit expérimentaux. Associer les deux approches vise à une meilleure compréhension des mécanismes et des résultats obtenus en milieu naturel.

Avant d'aborder les 3 parties de ce manuscrit, les outils et méthodes analytiques employés vont être présentés. Pour finir, une dernière partie permettra de conclure sur ces travaux et de présenter quelques perspectives de recherche.

Références bibliographiques

- Achá D, Pabón CA, Hintelmann H. Mercury methylation and hydrogen sulfide production among unexpected strains isolated from periphyton of two macrophytes of the Amazon. *FEMS Microbiol Ecol.* 2012. 80(3):637–45.
- Aidley D. Animal migration. Cambridge University Press. 1981.
- Åkesson S, Hedenström A. How Migrants Get There: Migratory Performance and Orientation. *BioScience.* 2007. 57(2):123.
- Alerstam T, Hedenström A, Åkesson S. Long-distance migration: evolution and determinants. *Oikos.* 2003. 103(2):247–60.
- Als TD, Hansen MM, Maes GE, Castonguay M, Riemann L, Aarestrup K, Munk P, Sparholt H, Hanel R, Bernatchez L. All roads lead to home: panmixia of European eel in the Sargasso Sea: Panmixia of European eel in the Sargasso Sea. *Mol Ecol.* 2011. 20(7):1333–46.
- Alvarez M del C, Murphy CA, Rose KA, McCarthy ID, Fuiman LA. Maternal body burdens of methylmercury impair survival skills of offspring in Atlantic croaker (*Micropogonias undulatus*). *Aquat Toxicol.* 2006. 80(4):329–37.
- Alves Costa JRM, Mela M, Silva de Assis HC da, Pelletier É, Randi MAF, Oliveira Ribeiro CA de. Enzymatic inhibition and morphological changes in *Hoplias malabaricus* from dietary exposure to lead(II) or methylmercury. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2007. 67(1):82–8.
- Amachree D, Moody AJ, Handy RD. Comparison of intermittent and continuous exposures to inorganic mercury in the mussel, *Mytilus edulis*: Accumulation and sub-lethal physiological effects. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2014. 109:133–42.
- Amyot M, Mierle G, Lean D, Mc Queen DJ. Effect of solar radiation on the formation of dissolved gaseous mercury in temperate lakes. *Geochim Cosmochim Acta.* 1997. 61(5):975–87.
- Angilletta M, Wilson R, Navas C, James R. Tradeoffs and the evolution of thermal reaction norms. *Trends Ecol Evol.* 2003. 18:234–40.
- Arai T, Chino N. Diverse migration strategy between freshwater and seawater habitats in the freshwater eel genus *Anguilla*. *J Fish Biol.* 2012. 81(2):442–55.
- Arai T, Otake T, Tsukamoto K. Timing of metamorphosis and larval segregation of the Atlantic eels *Anguilla rostrata* and *A. anguilla*, as revealed by otolith microstructure and microchemistry. *Mar Biol.* 2000. 137(1):39–45.
- Arleny I, Tabouret H, Rodriguez-Gonzalez P, Bareille G, Donard OFX, Amouroux D. Methylmercury bioconcentration in muscle tissue of the European eel (*Anguilla anguilla*) from the Adour estuary (Bay of Biscay, France). *Mar Pollut Bull.* 2007. 54(7):1031–6.
- Arribére M, Diéguez MC, Guevara SR, Queimaliños CP, Fajon V, Reissig M, Horvat M. Mercury in an ultraoligotrophic North Patagonian Andean lake (Argentina): concentration patterns in different components of the water column. *J Environ Sci China.* 2010. 22(8):1171–8.
- Aschner M, Syversen T, Souza DO, Rocha JBT, Farina M. Involvement of glutamate and reactive oxygen species in methylmercury neurotoxicity. *Braz J Med Biol Res Rev Bras Pesqui Médicas E Biológicas Soc Bras Biofísica Al.* 2007. 40(3):285–91.

Baeyens W, Leermakers M, Papina T, Saprykin A, Brion N, Noyen J, De Gieter M, Elskens M, Goeyens L. Bioconcentration and biomagnification of mercury and methylmercury in North Sea and Scheldt estuary fish. *Arch Environ Contam Toxicol*. 2003. 45(4):498–508.

Bakir F, Damluji SF, Amin-Zaki L, Murtadha M, Khalidi A, al-Rawi NY, Tikriti S, Dahahir H.I, Clarkson TW, Smith JC, Doherty RA. Methylmercury poisoning in Iraq. *Science*. 1973. 181(4096):230–41.

Barash D. *Sociobiology and behaviour*. Elsevier North Holland. New-York. 1982.

Bardonnet A, Bolliet V, Belon V. Recruitment abundance estimation: Role of glass eel (*Anguilla anguilla* L.) response to light. *J Exp Mar Biol Ecol*. 2005. 321(2):181–90.

Bardonnet A, Dasse S, Parade M, Heland M. Study of glass-eels movements in a flume in relation to nycthemeral changes. *Bull Fr Pêche Piscic Fr*. 2003. 76:9-20

Bardonnet A, Riera P. Feeding of glass eels (*Anguilla anguilla*) in the course of their estuarine migration: new insights from stable isotope analysis. *Estuar Coast Shelf Sci*. 2005. 63(1-2):201–9.

Barkay T, Miller SM, Summers AO. Bacterial mercury resistance from atoms to ecosystems. *FEMS Microbiol Rev*. 2003. 27(2-3):355–84.

Barkay T, Wagner-Döbler I. Microbial transformations of mercury: potentials, challenges, and achievements in controlling mercury toxicity in the environment. *Adv Appl Microbiol*. 2005. 57:1–52.

Beaulaton L, Castelnaud G. The efficiency of selective tidal stream transport in glass eel entering the Gironde (France). *Bull Francais Pêche Piscic*. 2005. 379:5–21.

Beaumont A, Hourdry J, Vernier J-M, Wegnez M. *Développement*. Paris: Dunod. 1994.

Belpaire CGJ, Goemans G, Geeraerts C, Quataert P, Parmentier K, Hagel P, De Boer J. Decreasing el stocks : survival of the fattest? *Ecol of Fresh Fish*. 2009. 18(2):197-214

Bergersen R, Klemetsen A. Freshwater eel *Anguilla anguilla* (L.) from the North Norway with emphasis on occurrence, age and downstream migration. *Nord Journ Fresh Resear*. 1988. 54–66.

Berg K, Puntervoll P, Valdernes S, Goksøyr A. Responses in the brain proteome of Atlantic cod (*Gadus morhua*) exposed to methylmercury. *Aquat Toxicol Amst Neth*. 2010. 100(1):51–65.

Bernatchez L, Dodson JJ. Relationship between Bioenergetics and Behavior in Anadromous Fish Migrations. *Can J Fish Aquat Sci*. 1987. 44(2):399–407.

Berntssen MHG, Aatland A, Handy RD. Chronic dietary mercury exposure causes oxidative stress, brain lesions, and altered behaviour in Atlantic salmon (*Salmo salar*) parr. *Aquat Toxicol*. 2003. 65(1):55–72.

Bertin L. *Les anguilles. Variations, croissance, euryhalinité, toxicité, hermaphrodisme juvénile et sexualité, migrations, métamorphoses*. Payot. Paris; 1951. 188p.

Bishop RE, Torres JJ. Leptocephalus energetics: metabolism and excretion. *J Exp Biol*. 1999. 202(18):2485–93.

Bishop R.E, Torres J. Leptocephalus energetics: assembly of the energetics equation. *Mar Biol*. 2001. 138(6):1093–8.

- Boëtius I, Boétius J. Lipid and protein content in *Anguilla anguilla* during growth and starvation. Dana. 1985. 4(1):17.
- Bols NC, Brubacher JL, Ganassin RC, Lee LEJ. Ecotoxicology and innate immunity in fish. Dev Comp Immunol. 2001. 25(8–9):853–73.
- Bonhommeau S, Chassot E, Planque B, Rivot E, Knap A, Le Pape O. Impact of climate on eel populations of the Northern Hemisphere. Mar Ecol Prog Ser. 2008. 373:71–80.
- Bonhommeau S, Le Pape O, Gascuel D, Blanke B, Tréguier A-M, Grima N, Vermard Y, Castonguay M Rivot E. Estimates of the mortality and the duration of the trans-Atlantic migration of European eel *Anguilla anguilla* leptocephali using a particle tracking model. J Fish Biol. 2009. 74(9):1891–914.
- Boudou A, Ribeyre F. Experimental study of trophic contamination of *salmo gairdneri* by 2 mercury compounds - hgcl<sub>2</sub> and ch<sub>3</sub>hgcl - analysis at the organism and organ levels. Water Air Soil Pollut. 1985. (26):137–48.
- Boudou A, Ribeyre F. Mercury in the food web: accumulation and transfer mechanisms. MetIons Biol Syst. 1997. 34:289-319.
- Boudou A, Delnomdedieu M, Georgescauld D, Ribeyre F, Saouter E. Fundamental roles of biological barriers in mercury accumulation and transfer in freshwater ecosystems (analysis at organism, organ, cell and molecular levels). Water Air Soil Pollut. 1991. 56(1):807–21.
- Boveris A, Cadenas E. Mitochondrial production of hydrogen peroxide regulation by nitric oxide and the role of ubisemiquinone. IUBMB Life. 2000. 50(4-5):245–50.
- Bowling AM, Hammerschmidt CR, Oris JT. Necrophagy by a benthic omnivore influences biomagnification of methylmercury in fish. Aquat Toxicol. 2011. 102(3–4):134–41.
- Bradshaw AD. The evolutionary significance of phenotypic plasticity in plants. Adv Genet. 1965. 13:115–55.
- Brett J, Groves T. Physiological energetics. Fish Physiol WS Hoar DJ Randall JR Brett Eds Plenum Press N Y. 1979. VIII. 279–352p
- Bremner I. Factors influencing the occurrence of copper-thioneins in tissues. In Kägi JHR, Nordberg M, editors. Metallothionein. Birkhäuser Basel. 1979. 273-280p
- Bridges CC, Zalups RK. Molecular and ionic mimicry and the transport of toxic metals. Toxicol Appl Pharmacol. 2005. 204(3):274–308.
- Bridou R, Monperrus M, Gonzalez PR, Guyoneaud R, Amouroux D. Simultaneous determination of mercury methylation and demethylation capacities of various sulfate-reducing bacteria using species-specific isotopic tracers. Environ Toxicol Chem SETAC. 2011. 30(2):337–44.
- Brouwer M, Syring R, Hoexum Brouwer T. Role of a copper-specific metallothionein of the blue crab, *Callinectes sapidus*, in copper metabolism associated with degradation and synthesis of hemocyanin. J Inorg Biochem. 2002. 88(2):228–39.
- Bruslé, J. L'anguille Européenne (*Anguilla anguilla*), une espèce jugée commune jusqu'à la dernière décennie, mérite-t-elle d'acquérir aujourd'hui le statut d'espèce menacée ? Bulletin de la société zoologique de France. 1990. 114(3).

Bruslé J. L'anguille européenne *Anguilla anguilla*, un poisson sensible aux stress environnementaux et vulnérable à diverses atteintes pathogènes. Bull Fr Pêche Piscic. 1994. (335):237–60.

Bruslé J, Quignard, J.P. Biologie des poissons d'eau douce européens. Technique et Documentation Lavoisier. 2001. 625p

Bureau Du Colombier S, Bolliet V, Lambert P, Bardonnnet A. Energy and migratory behavior in glass eels (*Anguilla anguilla*). Physiol Behav. 2007. 92(4):684–90.

Bureau du Colombier S, Bolliet V, Bardonnnet A. Swimming activity and behaviour of European *Anguilla anguilla* glass eels in response to photoperiod and flow reversal and the role of energy status. Jour of Fish Biol 2009. 74:2002-2013.

Burgess NM, Hobson KA. Bioaccumulation of mercury in yellow perch (*Perca flavescens*) and common loons (*Gavia immer*) in relation to lake chemistry in Atlantic Canada. In: Hanson AR, Kerekes JJ, editors. Limnol Aquat Birds . Springer Netherlands; 2006. 275–82p

Burrows W, Krenkel P. Studies on uptake and loss of methylmercury-203 by bluegills (*Lepomis-macrochirus raf*). Env Sci Technol. 1973. (7):1127–30.

Byer JD, Lebeuf M, Alae M.R, Stephen B, Trottier S, Backus S, Keir M, Couillard CM, Casselman J, Hodson PV. Spatial trends of organochlorinated pesticides, polychlorinated biphenyls, and polybrominated dephenyl ethers in Atlantic Anguillid eels. Chemosphere. 2013. 50:1719-1728

Cambier S, Bénard G, Mesmer-Dudons N, Gonzalez P, Rossignol R, Brèthes D, Bourdineaud JP. At environmental doses, dietary methylmercury inhibits mitochondrial energy metabolism in skeletal muscles of the zebra fish (*Danio rerio*). Int J Biochem Cell Biol. 2009. 41(4):791–9.

Cambier S, Gonzalez P, Mesmer-Dudons N, Brèthes D, Fujimura M, Bourdineaud JP. Effects of dietary methylmercury on the zebrafish brain : histological, mitochondrial, and gene transcription analyses. BioMetals. 2012. 25(1):165-80.

Campbell J. Spawning characteristics of brown trout and sea trout *Salmo trutta* L. in Kirk Burn, River Tweed, Scotland. Journal Fish Biol. 1977. 11:217–29.

Carrasco L, Benejam L, Benito J, Bayona JM, Díez S. Methylmercury levels and bioaccumulation in the aquatic food web of a highly mercury-contaminated reservoir. Environ Int. 2011. 37(7):1213–8.

Castelnaud, G. Fishing location, fishermen and production of migratory species fisheries in the French rivers. Bull. Fr. Pêche Piscic. 2000. 358: 439-460.

Castonguay M, Hodson PV, Moriarty C, Drinkwater KF, Jessop BM. Is there a role of ocean environment in American and European eel decline? Fish Oceanogr. 1994. 3(3):197–203.

Cavalheiro J. Développement de techniques de séparation et détection pour l'analyse des polluants organiques et organométalliques dans les échantillons environnementaux. Université de Pau et des Pays de l'Adour. 2014.

Celo V, Lean DRS, Scott SL. Abiotic methylation of mercury in the aquatic environment. Sci Total Environ. 2006. 368(1):126–37.

Chapman BB, Hulthén K, Brodersen J, Nilsson PA, Skov C, Hansson L-A, Brönmark C. Partial migration in fishes: causes and consequences. J Fish Biol. 2012. 81(2):456–78.

Charlon N, Blanc JM. Etude des civelles d'*Anguilla anguilla* L. dans la région du bassin de l'Adour. 2. Régime alimentaire et variations de quelques caractéristiques biochimiques en cours de migration. Arch Hydrobiol. 1983

Chasar LC, Scudder BC, Stewart AR, Bell AH, Aiken GR. Mercury Cycling in Stream Ecosystems. 3. Trophic Dynamics and Methylmercury Bioaccumulation. Environ Sci Technol. 2009. 43(8):2733–9.

Chen B, Wang T, Yin Y, He B, Jiang G. Methylation of inorganic mercury by methylcobalamin in aquatic systems. Appl Organomet Chem. 2007. 21(6):462–7.

Chen C-Y, Lai C-C, Chen K-S, Hsu C-C, Hung C-C, Chen M-H. Total and organic mercury concentrations in the muscles of Pacific albacore (*Thunnus alalunga*) and bigeye tuna (*Thunnus obesus*). Mar Pollut Bull. 2014. 85:606-612

Chen J, Pehkonen SO, Lin C-J. Degradation of monomethylmercury chloride by hydroxyl radicals in simulated natural waters. Water Res. 2003. 37(10):2496–504.

Chen RW, Ganther HE, Hoekstra KG. Studies on the binding of methylmercury by thionein. Biochem Biophys Res Commun. 1973. 51(2):383–90.

Chen Y-W, Belzile N, Gunn JM. Antagonistic effect of selenium on mercury assimilation by fish populations near Sudbury metal smelters? Limnol Oceanogr. 2001. 46(7):1814–8.

Chételat J, Amyot M. Elevated methylmercury in High Arctic Daphnia and the role of productivity in controlling their distribution. Glob Change Biol. 2009. 15(3):706–18.

Chételat J, Amyot M, Cloutier L, Poulain A. Metamorphosis in chironomids, more than mercury supply, controls methylmercury transfer to fish in High Arctic lakes. Environ Sci Technol. 2008. 42(24):9110–5.

Cicotti, E. Italy. Management of European eel fisheries . In Moriarty C, Dekker W, editors. Irish Fish. Bull. 1997. 15, 91–100.

CIEM. Report of the 2013 session of the Joint EIFAC/CIEM Working Group on Eels. 2013.

CIEM. Report of the 1996 session of the Joint EIFAC/CIEM Working Group on Eels. 1996.

Clark J. Seasonal movements of striped bass contingents of Long Island Sound and the New York Bight. Trans Am Fish Soc 97. 1968. 320–43.

Clausen J, Keck D., Hiesey W. Experimental studies on the nature of species. I. Effects of varied environments on western North American plants. Carnegie Inst Wash Publ. 1940. 520:1–452.

Compeau G, Bartha R. Methylation and demethylation of mercury under controlled redox, pH and salinity conditions. Appl Environ Microbiol. 1984. 48(6):1203–7.

Costa JL, Assis CA, Almeida PR, Moreira FM, Costa MJ. On the food of the European eel, *Anguilla anguilla* (L.), in the upper zone of the Tagus estuary, Portugal. J Fish Biol. 1992. 41(5):841–50.

COSEPAC. Évaluation et rapport de situation du COSEPAC sur l'Anguille d'Amérique (*Anguilla rostrata*) au Canada. Comité sur la situation des espèces en péril au Canada. 2012. Ottawa, Canada. 127p

Côté CL, Gagnaire P-A, Bourret V, Verreault G, Castonguay M, Bernatchez L. Population genetics of the American eel (*Anguilla rostrata*): FST = 0 and North Atlantic Oscillation effects on demographic fluctuations of a panmictic species. *Mol Ecol*. 2013. 22(7):1763–76.

Craig R. *Soils mechanics*. New York: Van Nostrand Reinhold; 1978.

Creutzberg F. Discrimination Between Ebb and Flood Tide in Migrating Elvers (*Anguilla vulgaris* Turt.) by Means of Olfactory Perception. *Nature*. 1959. 184(4703):1961–2.

Creutzberg F. On the orientation of migrating elvers (*Anguilla vulgaris turt.*) in a tidal area. *Neth J Sea Res*. 1961. (3):257–338.

Cutts CJ, Metcalfe NB, Taylor AC. Fish may fight rather than feed in a novel environment: metabolic rate and feeding motivation in juvenile Atlantic salmon. *J Fish Biol*. 2002. 61(6):1540–8.

Daemen E, Cross T, Ollevier F, Volckaert F. Analysis of the genetic structure of European eel (*Anguilla anguilla*) using microsatellite DNA and mtDNA markers. *Mar Biol*. 2001. 139(4):755–64.

Danchin E, Giraldeau L., Cézilly F. *Ecologie comportementale*. Dunod. 2005.

Daverat F, Limburg KE, Thibault I, Shiao J-C, Dodson JJ, Caron F, Tzeng WN, Iizuka Y, Wickstrom H.. Phenotypic plasticity of habitat use by three temperate eel species, *Anguilla anguilla*, *A. japonica* and *A. rostrata*. *Mar Ecol Prog Ser*. 2006. 308:231–41.

Da Silva GS, Filipak Neto F, Silva de Assis HC, Bastos WR, de Oliveira Ribeiro CA. Potential risks of natural mercury levels to wild predator fish in an Amazon reservoir. *Environ Monit Assess*. 2012. 184(8):4815–27.

Dekker W. What caused the decline of the Lake IJsselmeer eel stock after 1960? *Ices Journal of Marine Science*. 2004. 61, 394-404.

Dekker W. Monitoring of glass eel recruitment. volume 1: thematic overview. IJmuiden, the Netherlands: RIVO - Netherlands institute for fisheries research; 2002.

Dekker W, Casselman J., Cairns D., Tsukamoto K, Jellyman D., Lickers H. Worldwide decline of eel resources necessitates immediate action. *Fisheries*. 2003. 28–30.

DeWitt TJ, Sih A, Wilson DS. Costs and limits of phenotypic plasticity. *Trends Ecol Evol*. 1998. 13(2):77–81.

Dias JCS. Characterization of *Desulfomicrobium salsuginis* sp. nov. and *Desulfomicrobium aestuarii* sp. nov., two new sulfate-reducing bacteria isolated from the Adour estuary (French Atlantic coast) with specific mercury methylation potentials. *Syst Appl Microbiol*. 2008. 31(1):30–7.

Dickinson DA, Forman HJ. Glutathione in defense and signaling: lessons from a small thiol. *Ann N Y Acad Sci*. 2002. 973:488–504.

Dietz R, Nielsen CO, Hansen MM, Hansen CT. Organic mercury in Greenland birds and mammals. *Sci Total Environ*. 1990. 95:41–51.

Dingle H. *Migration : the biology of life on the move*. Oxford university Press. 1996.

Dominique Y, Maury-Brachet R, Muresan B, Vigouroux R, Richard S, Cossa D, Mariotti A, Boudou A. Biofilm and mercury availability as key factors for mercury accumulation in fish (*Curimata cyprinoides*) from a disturbed Amazonian freshwater system. *Environ Toxicol Chem SETAC*. 2007. 26(1):45–52.



Drake VA, Gatehouse AG, Farrow RA. Insect migration. A holistic conceptual model. Insect Migr Track Resour Space Time. Cambridge University Press. Cambridge (united Kingdom): Drake V A, Gatehouse A G, eds.; 1995. 427–57p.

Drevnick PE, Roberts AP, Otter RR, Hammerschmidt CR, Klaper R, Oris JT. Mercury toxicity in livers of northern pike (*Esox lucius*) from Isle Royale, USA. Comp Biochem Physiol Toxicol Pharmacol CBP. 2008. 147(3):331–8.

Duran R, Ranchou-Peyruse M, Menuet V, Monperrus M, Bareille G, Goñi MS, Salvado JC, Amouroux D, Guyoneaud R, Donard OFX, Caumette P. Mercury methylation by a microbial community from sediments of the Adour Estuary (Bay of Biscay, France). Environ Pollut. 2008.156(3):951–8.

Durif C, Elie P, Gosset C, Rives J, Travade F. Behavioural study of downstream migrating eels by radiotelemetry at a small hydroelectric power plant. P Biology Manag Prot Catadromous Eelsp. 2003. 1;343–56.

Edeas M, Attaf D, Mailfert A-S, Nasu M, Joubet R. Maillard Reaction, mitochondria and oxidative stress : Potential role of antioxidants. Pathol Biol. 2010. (58):220–5.

Edeline E. Adaptive phenotypic plasticity of eel diadromy. Mar Ecol Prog Ser. 2007. 341:229–32.

Edeline E, Dufour S, Briand C, Fatin D, Elie P. Thyroid status is related to migratory behavior in *Anguilla anguilla* glass eels. Mar Ecol Prog Ser. 2004. 16;282:261–70.

Edeline E, Lambert P, Rigaud C, Elie P. Effects of body condition and water temperature on *Anguilla anguilla* glass eel migratory behavior. J Exp Mar Biol Ecol. 2006. 331(2):217–25.

Edwards R, Dixon DP, Walbot V. Plant glutathione S-transferases: enzymes with multiple functions in sickness and in health. Trends Plant Sci. 2000. 5(5):193–8.

Ekino S, Susa M, Ninomiya T, Imamura K, Kitamura T. Minamata disease revisited: an update on the acute and chronic manifestations of methyl mercury poisoning. J Neurol Sci. 2007. 15;262(1-2):131–44.

Ekstrom EB, Morel FMM, Benoit JM. Mercury Methylation Independent of the Acetyl-Coenzyme A Pathway in Sulfate-Reducing Bacteria. Appl Environ Microbiol. 2003. 69(9):5414–22.

Ekstrom EB, Morel FMM. Cobalt limitation of growth and mercury methylation in sulfate-reducing bacteria. Environ Sci Technol. 2008. 1;42(1):93–9.

Elia AC, Galarini R, Taticchi MI, Dörr AJM, Mantilacci L. Antioxidant responses and bioaccumulation in *Ictalurus melas* under mercury exposure. Ecotoxicol Environ Saf. 2003. 55(2):162–7.

Elie P. Contribution à l'étude des montées de civelles d'*Anguilla anguilla* Linné (Poisson, téléostéen, anguilliforme), dans l'estuaire de la Loire : pêche, écologie, écophysiologie et l'élevage. Thèse de doctorat biologie animale, Université Rennes I; 1979.

Elie P, Lecomte-Finiger R, Cantrelle I, Charlon N. Définition des limites des différents stades pigmentaires durant la phase civelle d'*Anguilla anguilla* L. (poisson téléostéen anguilliforme). Vie Milieu. 1982. 32(3):149–57.

Elie P, Rigaud C. Etude de la population d'anguille (*A. anguilla*) de l'estuaire et du bassin versant de la Vilaine : pêche, biologie, écologie. Examens particulier de l'impact du

barrage d'Arzal sur la migration anadrome. Université de Rennes, Cemagref. Bordeaux; 1984;175p.

Elie P, Rochard E. Migration des civelles d'anguilles (*Anguilla anguilla* L.) dans les estuaires, modalités du phénomène et caractéristiques des individus. Bull Fr Pêche Piscic. 1994. (335):81–98.

Engel DW, Brouwer M. Metal Regulation and Molting in the Blue Crab, *Callinectes sapidus*: Metallothionein Function in Metal Metabolism. Biol Bull. 1987. 173(1):239.

Fantozzi L, Ferrara R, Frontini FP, Dini F. Factors influencing the daily behaviour of dissolved gaseous mercury concentration in the Mediterranean Sea. Mar Chem. 2007. 107(1):4–12.

Faria M, Carrasco L, Diez S, Riva MC, Bayona JM, Barata C. Multi-biomarker responses in the freshwater mussel *Dreissena polymorpha* exposed to polychlorobiphenyls and metals. Comp Biochem Physiol Part C Toxicol Pharmacol. 2009. 149(3):281–8.

Farina M, Rocha JBT, Aschner M. Oxidative Stress and Methylmercury-Induced Neurotoxicity. In: Wang C, Jr WS, editors. Dev Neurotoxicology Res. John Wiley et Sons, Inc.; 2011. 357–85p

Feunteun E. Management and restoration of European eel population (*Anguilla anguilla*): An impossible bargain. Ecol Eng. 2002. 18(5):575–91.

Filippelli M, Baldi F. Alkylation of ionic mercury to methylmercury and dimethylmercury by methylcobalamin: Simultaneous determination by purge-and-trap GC in line with FTIR. Appl Organomet Chem. 1993. 1;7(7):487–93.

Fitzgerald WF, Lamborg CH. Geochemistry of mercury in the environment. Environ Geochem. 2003. (9):107–48.

Fitzgerald WF, Lamborg CH, Hammerschmidt CR. Marine Biogeochemical Cycling of Mercury. Chem Rev. 2007. 107(2):641–62.

Fleming EJ, Mack EE, Green PG, Nelson DC. Mercury methylation from unexpected sources: molybdate-inhibited freshwater sediments and an iron-reducing bacterium. Appl Environ Microbiol. 2006. 72(1):457–64.

Fontaine M. L'argenteure de l'Anguille : métamorphose, anticipation, adaptation. Knowl Manag Aquat Ecosyst. 1994. (335):15.

Fontaine M. Physiological mechanisms in the migration of marine and amphihaline fish. In "Advance in marine biology". FS Russel MYonge Eds. 1975. 13:241–355.

Fontenelle, G. Observations on the glass eel fishery in 1997. In : Moriarty,C., Dekker,W. (Eds.), Management of European eel fisheries. Irish Fish. Bull. 1997. 15:108–109.

Forseth T, Nesje TF, Jonsson B, Hårsaker K. Juvenile migration in brown trout: a consequence of energetic state. J Anim Ecol. 1999. 1;68(4):783–93.

Forward Jr RB, Tankersley RA. Selective tidal-stream transport of marine animals. Oceanogr Mar Biol Annu Rev. 2001. 39:305–53.

Friedland KD, Miller MJ, Knights B. Oceanic changes in the Sargasso Sea and declines in recruitment of the European eel. ICES J Mar Sci J Cons. 2007. 1;64(3):519–30.

Gailer J. Arsenic–selenium and mercury–selenium bonds in biology. Coord Chem Rev. 2007. 251(1–2):234–54.

Garcia E, Amyot M, Ariya PA. Relationship between DOC photochemistry and mercury redox transformations in temperate lakes and wetlands. *Geochim Cosmochim Acta*. 2005. 15;69(8):1917–24.

Gårdfeldt K, Munthe J, Strömberg D, Lindqvist O. A kinetic study on the abiotic methylation of divalent mercury in the aqueous phase. *Sci Total Environ*. 2003. 20;304(1-3):127–36.

Gascuel D. Flow-carried and active swimming migration of the glass eel (*Anguilla anguilla*) in the tidal area of a small estuary on the French Atlantic coast. *Helgoländer Meeresunters*. 1986. 1;40(3):321–6.

Geeraerts C, Belpaire C. The effects of contaminants in European eel: a review. *Ecotoxicology*. 2010. 9 (2) :239–266.

Geoffroy B, Bardonnnet A. Differential effects of behaviour, propensity to migrate and recruitment season on glass eels and elvers' growing performance: Young eel behaviour and growth pattern. *Ecol Freshw Fish*. 2012. 21(3):469–82.

Gillooly J, Allen A, Savage V, Charnov E, West G, Brown J. Response to Clarke and Fraser: effects of temperature on metabolic rate. *Funct Ecol*. 2006. 20:400–404

Gilmour CC, Elias DA, Kucken AM, Brown SD, Palumbo AV, Schadt CW, Wall JD. Sulfate-Reducing Bacterium *Desulfovibrio desulfuricans* ND132 as a Model for Understanding Bacterial Mercury Methylation. *Appl Environ Microbiol*. 2011. 77(12):3938–51.

Gilmour CC, Henry E., Mitchell R. Sulfate stimulation of mercury methylation in fresh water sediment. *Environ Sci Technol*. 1992. (26):2281–7.

Gonzalez P, Dominique Y, Massabuau JC, Boudou A, Bourdineaud JP. Comparative Effects of Dietary Methylmercury on Gene Expression in Liver, Skeletal Muscle, and Brain of the Zebrafish (*Danio rerio*). *Environ Sci Technol*. 2005. 39(11):3972–80.

Gosset C, Travade F, Durif C, Rives J, Garaicoechea C. Etude des dispositifs de dévalaison pour l'anguille argentée. Tests de deux exutoires de dévalaison à la centrale hydroélectrique de Halsou (Nive-64). Rapport de contrat INRA/EDF. 2000 35p

Grandjean P, Weihe P, White RF, Debes F. Cognitive performance of children prenatally exposed to “safe” levels of methylmercury. *Environ Res*. 1998. 77(2):165–72.

Grandjean P, Weihe P, White RF, Debes F, Araki S, Yokoyama K, et al. Cognitive deficit in 7-year-old children with prenatal exposure to methylmercury. *Neurotoxicol Teratol*. 1997. 19(6):417–28.

Grandjean P, White RF, Weihe P, Jørgensen PJ. Neurotoxic risk caused by stable and variable exposure to methylmercury from seafood. *Ambul Pediatr Off J Ambul Pediatr Assoc*. 2003. 3(1):18–23.

Gray JE, Hines ME, Higuera PL, Adatto I, Lasorsa BK. Mercury speciation and microbial transformations in mine wastes, stream sediments, and surface waters at the Almadén Mining District, Spain. *Environ Sci Technol*. 2004. 15;38(16):4285–92.

Greenfield BK, Melwani AR, Allen RM, Slotton DG, Ayers SM, Harrold KH, Ridolfi K, Jahn A, Grenier JL, Sandheinrich MB. Seasonal and annual trends in forage fish mercury concentrations, San Francisco Bay. *Sci Total Environ*. 2013a. 444:591–601.

Greenfield BK, Slotton DG, Harrold KH. Predictors of mercury spatial patterns in San Francisco Bay forage fish. *Environ Toxicol Chem*. 2013b. 1;32(12):2728–37.

Gross MR. Alternative reproductive strategies and tactics: diversity within sexes. *Trends Ecol Evol.* 1996. 11(2):92–8.

Guedron S, Grimaldi C, Chauvel C, Spadini L, Grimaldi M. Weathering versus atmospheric contributions to mercury concentrations in French Guiana soils. *Appl Geochem.* 2006. 21(11):2010–22.

Gustin MS, Lindberg SE. Assessing the contribution of natural sources to the global mercury cycle: the importance of intercomparing dynamic flux measurements. *Fresenius J Anal Chem.* 2000. 366(5):417–22.

Gustin MS, Lindberg SE, Weisberg PJ. An update on the natural sources and sinks of atmospheric mercury. *Appl Geochem.* 2008.23(3):482–93.

Hamelin S, Amyot M, Barkay T, Wang Y, Planas D. Methanogens: Principal Methylators of Mercury in Lake Periphyton. *Environ Sci Technol.* 2011. 45(18):7693–700.

Hammerschmidt CR, Fitzgerald WF. Photodecomposition of Methylmercury in an Arctic Alaskan Lake. *Environ Sci Technol.* 2006. 1;40(4):1212–6.

Harada M. Minamata disease: methylmercury poisoning in Japan caused by environmental pollution. *Crit Rev Toxicol.* 1995. 25(1):1–24.

Harris R, Krabbenhoft D., Mason R, Murray MW, Reash R, Saltman T. Ecosystems Responses to Mercury Contamination; Indicators of Change. SETAC North American Workshop on Mercury Monitoring and assessment. Pensacola, Florida: Taylor & Francis Group; 2007.

Hasspieler BM, Behar JV, Digiulio RT. Glutathione-Dependent Defense in Channel Catfish (*Ictalurus punctatus*) and Brown Bullhead (*Ameriurus nebulosus*). *Ecotoxicol Environ Saf.* 1994. 28(1):82–90.

Hendry AP, Stearns S. *Evolution Illuminated. Salmon and their relatives.* Oxford University Press. Oxford, UK; 2004.

Hickman RA. Densities and swimbladder development of juvenile American eels, *Anguilla rostrata* (Lesueur) as related to energetics of migration. *J Fish Biol.* 1981. 1;18(5):507–17.

Hines ME, Faganeli J, Adatto I, Horvat M. Microbial mercury transformations in marine, estuarine and freshwater sediment downstream of the Idrija Mercury Mine, Slovenia. *Appl Geochem.* 2006. 21(11):1924–39.

Hines ME, Horvat M, Faganeli J, Bonzongo JC, Barkay T, Major EB, Scott KJ, Bailey EA, Warwick JJ, Lyons WB. Mercury biogeochemistry in the Idrija river, Slovenia, from above the mine into the Gulf of Trieste. *Environ Res.* 2000. 83(2):129–39.

Hines NA, Brezonik PL, Engstrom DR. Sediment and Porewater Profiles and Fluxes of Mercury and Methylmercury in a Small Seepage Lake in Northern Minnesota. *Environ Sci Technol.* 2004. 1;38(24):6610–7.

Hodson P V, Castonguay M , Couillard CM, Desjardins C , Pelletier E, McLeod R. Spatial and temporal variations in chemical contamination of American eels, *Anguilla rostrata*, captured in the Estuary of the St. Lawrence River. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences.* 1944. 51(2):464-478

Huckabee J, Elwood J, Hildebrand S. Accumulation of mercury in freshwater biota, in biogeochemistry of mercury in the environment. Nriagu JU Ed ElsevierNorth-Holl Biomed Press New-York. 1979. 277–302.

Huey R, Kingsolver J. Evolution of thermal sensitivity of ectotherms performance. *Trends Ecol Evol.* 1989. 4:131–5.

Irikayama K, Kondo T. Studies on the organomercury compound in the fish and shellfish from Minamata Bay and its origin. In VII. Synthesis of methylmercury sulfate and its chemical properties. *Nihon Eiseigaku Zasshi Jpn J Hyg.* 1966. 21(5):342–3.

Ivanković D, Pavčić J, Beatović V, Klobucar RS, Klobucar GIV. Inducibility of metallothionein biosynthesis in the whole soft tissue of zebra mussels *Dreissena polymorpha* exposed to cadmium, copper, and pentachlorophenol. *Environ Toxicol.* 2010. 25(2):198–211.

Jakka NM, Rao TG, Rao JV. Locomotor behavioral response of mosquitofish (*Gambusia affinis*) to subacute mercury stress monitored by video tracking system. *Drug Chem Toxicol.* 2007. 30(4):383–97.

Jay JA, Murray KJ, Gilmour CC, Mason RP, Morel FMM, Roberts AL, Hemond HF.. Mercury methylation by *Desulfovibrio desulfuricans* ND132 in the presence of polysulfides. *Appl Environ Microbiol.* 2002. 68(11):5741–5.

Jellyman DJ. Invasion of a New Zealand freshwater stream by glass-eels of two *Anguilla* spp. *N Z J Mar Freshw Res.* 1977. 11(2):193–209.

Jellyman DJ. Upstream migration of glass-eels (*Anguilla* spp.) in the Waikato River. *N Z J Mar Freshw Res.* 1979. 13(1):13–22.

Jellyman DJ, Lambert PW. Factors affecting recruitment of glass eels into the Grey River, New Zealand. *J Fish Biol.* 2003. 63(5):1067–79.

Jessop BM, Shiao J-C, Iizuka Y, Tzeng W-N. Migratory behaviour and habitat use by American eels *Anguilla rostrata* as revealed by otolith microchemistry. *Mar Ecol Prog Ser.* 2002. (233):217, 217–29 – 229.

Jin L, Liang L, Jiang G, Xu Y. Methylmercury, total mercury and total selenium in four common freshwater fish species from Ya-Er Lake, China. *Environ Geochem Health.* 2006. 1;28(5):401–7.

Jonsson B, Jonsson N. Partial migration: niche shift versus sexual maturation in fishes. *Rev Fish Biol Fish.* 1993. 3(4):348–65.

Jonsson B, Jonsson N. Life-history effects of migratory costs in anadromous brown trout. *J Fish Biol.* 2006; 1;69(3):860–9.

Jürgens M.D, Chaemfa C, Hughes D, Johnson AC, Jones KC. PCB and organochlorine pesticide burden in eels in the lower Thames River (UK). 2015. *Chemosphere.* 118:103-111

Kehrig HA, Seixas TG, Baêta AP, Malm O, Moreira I. Inorganic and methylmercury: Do they transfer along a tropical coastal food web? *Mar Pollut Bull.* 2010. 60(12):2350–6.

Kennedy J. Migration, behavioral and ecological. In “Migration: mechanisms and adaptative significance.” *Contrib Mar Sci.* M.A Rankin, Eds. 1985. 27, 5–26.

Kerin EJ, Gilmour CC, Roden E, Suzuki MT, Coates JD, Mason RP. Mercury Methylation by Dissimilatory Iron-Reducing Bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 2006. 72(12):7919–21.

Kettle AJ, Haines K. How does the European eel (*Anguilla anguilla*) retain its population structure during its larval migration across the North Atlantic Ocean? *Can J Fish Aquat Sci.* 2006. 1;63(1):90–106.

Khan MAK, Wang F. Mercury-selenium compounds and their toxicological significance: Toward a molecular understanding of the mercury-selenium antagonism. *Environ Toxicol Chem.* 2009. 1;28(8):1567–77.

Kim J, Rochford T. Methyl mercury in brown trout (*Salmo trutta*) in Arahura River, New Zealand, *New Zealand Journal of Marine and Freshwater.* 2008. 42(3):271-276

King JK, Kostka JE, Frischer ME, Saunders FM. Sulfate-Reducing Bacteria Methylate Mercury at Variable Rates in Pure Culture and in Marine Sediments. *Appl Environ Microbiol.* 2000. 66(6):2430–7.

Kim WS, Yoon SJ, Kim JW, Lee JA, Lee TW. Metabolic response under different salinity and temperature conditions for glass eel *Anguilla japonica*. *Mar Biol.* 2006. 1;149(5):1209–15.

Klaper R, Carter B., Richter C. Use of a 15k gene microarray to determine gene expression changes in response to acute and chronic methylmercury exposure in the fathead minnow *Pimephales promelas* Rafinesque. *J Fish Biol.* 2008. 72:2207–80.

Klaper R, Rees CB, Drevnick P, Weber D, Sandheinrich M, Carvan MJ. Gene Expression Changes Related to Endocrine Function and Decline in Reproduction in Fathead Minnow (*Pimephales promelas*) after Dietary Methylmercury Exposure. *Environ Health Perspect.* 2006.114(9):1337–43.

Klinck J, Dunbar M, Brown S, Nichols J, Winter A, Hughes C, Playe R. Influence of water chemistry and natural organic matter on active and passive uptake of inorganic mercury by gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat Toxicol Amst Neth.* 2005. 25;72(1-2):161–75.

Kritee K, Barkay T, Blum JD. Mass dependent stable isotope fractionation of mercury during mer mediated microbial degradation of monomethylmercury. *Geochim Cosmochim Acta.* 2009. 1;73(5):1285–96.

Lalonde JD, Amyot M, Kraepiel AM, Morel FM. Photooxidation of Hg(0) in artificial and natural waters. *Environ Sci Technol.* 2001. 1;35(7):1367–72.

Lalonde JD, Amyot M, Orvoine J, Morel FMM, Auclair J-C, Ariya PA. Photoinduced oxidation of Hg<sub>0</sub>(aq) in the waters from the St. Lawrence estuary. *Environ Sci Technol.* 2004. 15;38(2):508–14.

Lamborg CH, Fitzgerald WF, O'Donnell J, Torgersen T. A non-steady-state compartmental model of global-scale mercury biogeochemistry with interhemispheric atmospheric gradients. *Geochim Cosmochim Acta.* 2002. 1;66(7):1105–18.

Lanzillotta E, Ceccarini C, Ferrara R. Photo-induced formation of dissolved gaseous mercury in coastal and offshore seawater of the Mediterranean basin. *Sci Total Environ.* 2002. 2;300(1-3):179–87.

Lanzillotta E, Ceccarini C, Ferrara R, Dini F, Frontini FP, Banchetti R. Importance of the biogenic organic matter in photo-formation of dissolved gaseous mercury in a culture of the marine diatom *Chaetoceros sp.* *Sci Total Environ.* 2004. 5;318(1–3):211–21.

Larose C, Canuel R, Lucotte M, Di Giulio RT. Toxicological effects of methylmercury on walleye (*Sander vitreus*) and perch (*Perca flavescens*) from lakes of the boreal forest. *Comp Biochem Physiol Part C Toxicol Pharmacol.* 2008. 147(2):139–49.

Lecomte-Finiger R. Growth history and age at recruitment of European glass eels (*Anguilla anguilla*) as revealed by otolith microstructure. *Mar Biol.* 1992. 1;114(2):205–10.

- Lecomte-Finiger R. The early life of the European eel. *Nature*. 1994. 11;370(6489):424–424.
- Le DQ, Chino N, Shirai K, Arai T. Trace metals in Japanese eel *Anguilla japonica* in relation to ecological migratory types and growth stages. *Estuar Coast Shelf Sci*. 2010.87(3):405–10.
- Lender T, Delavault R, Le Moigne A. Presse Universitaires de France. Paris; 1979.
- Levins R. Theory of fitness in a heterogeneous environment. II. Developmental flexibility and niche selection. *Am Nat*. 1963. 47:75–90.
- Levins R. Evolution in changing environments. Princeton University Press. Princeton; 1968.
- Liao C-Y, Fu J-J, Shi J-B, Zhou Q-F, Yuan C-G, Jiang G-B. Methylmercury accumulation, histopathology effects, and cholinesterase activity alterations in medaka (*Oryzias latipes*) following sublethal exposure to methylmercury chloride. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2006. 22(2):225–33.
- Lichtlen P, Schaffner W. The “metal transcription factor” MTF-1: biological facts and medical implications. *Swiss Med Wkly*. 2001. 1;131(45-46):647–52.
- Lindberg S, Bullock R, Ebinghaus R, Engstrom D, Feng X, Fitzgerald W, Pirrone N, Prestbo E, Seigneur C. A synthesis of progress and uncertainties in attributing the sources of mercury in deposition. *Ambio*. 2007. 36(1):19–32.
- Liu J, Xu X, Yu S, Cheng H, Hong Y, Feng X. Mercury pollution in fish from South China Sea : Levels, species-specific accumulation, and possible sources. *Environ Res*. 2014. 131:160-4
- Loumbourdis NS, Danscher G. Autometallographic tracing of mercury in frog liver. *Environ Pollut Barking Essex* 1987. 2004. 129(2):299–304.
- Lundberg P. Partial bird migration and evolutionarily stable strategies. *J Theor Biol*. 1987. 125, 351–340.
- Lushchak VI. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquat Toxicol Amst Neth*. 2011. 17;101(1):13–30.
- Macalady JL, Mack EE, Nelson DC, Scow KM. Sediment microbial community structure and mercury methylation in mercury-polluted Clear Lake, California. *Appl Environ Microbiol*. 2000. 66(4):1479–88.
- MacLachy D, Robinson PD. Behavioural toxicity of organic chemical contaminants in fish: application to ecological risk assessments (ERAs). *Can J Fish Aquat Sci*. 2009. 66(7):1179–88.
- Magalhães MC, Costa V, Menezes GM, Pinho MR, Santos RS, Monteiro LR. Intra- and inter-specific variability in total and methylmercury bioaccumulation by eight marine fish species from the Azores. *Mar Pollut Bull*. 2007.54(10):1654–62.
- Marie V, Baudrimont M, Boudou A. Cadmium and zinc bioaccumulation and metallothionein response in two freshwater bivalves (*Corbicula fluminea* and *Dreissena polymorpha*) transplanted along a polymetallic gradient. *Chemosphere*. 2006. 65(4):609–17.
- Marvin-DiPasquale M, Agee J, McGowan C, Oremland RS, Thomas M, Krabbenhoft D, Gilmour CC. Methyl-Mercury Degradation Pathways: A Comparison among Three Mercury-Impacted Ecosystems. *Environ Sci Technol*. 2000. 1;34(23):4908–16.

Mason RP, Choi AL, Fitzgerald WF, Hammerschmidt CR, Lamborg CH, Soerensen AL, Sunderland EM. Mercury Biogeochemical Cycling in the Ocean and Policy Implications. *Environ Res.* 2012.119:101–17.

Mason RP, Fitzgerald WF, Hurley J, Hanson AK, Donaghay PL, Sieburth JM. Mercury biogeochemical cycling in a stratified estuary. *Limnol Oceanogr.* 1993. 38(6):1227–41.

Mason RP, Laporte J-M, Andres S. Factors Controlling the Bioaccumulation of Mercury, Methylmercury, Arsenic, Selenium, and Cadmium by Freshwater Invertebrates and Fish. *Arch Environ Contam Toxicol.* 2000. 1;38(3):283–97.

Mason RP, Lawson NM, Sheu G-R. Mercury in the Atlantic Ocean: factors controlling air–sea exchange of mercury and its distribution in the upper waters. *Deep Sea Res Part II Top Stud Oceanogr.* 2001. 48(13):2829–53.

Mason RP, Reinfelder JR, Morel FMM. Bioaccumulation of mercury and methylmercury. *Water Air Soil Pollut.* 1995. 1;80(1-4):915–21.

Mason RP, Reinfelder JR, Morel FMM. Uptake, Toxicity, and Trophic Transfer of Mercury in a Coastal Diatom. *Environ Sci Technol.* 1996 May 1;30(6):1835–45.

Mauro JBN, Guimarães JRD, Hintelmann H, Watras CJ, Haack EA, Coelho-Souza SA. Mercury methylation in macrophytes, periphyton, and water -- comparative studies with stable and radio-mercury additions. *Anal Bioanal Chem.* 2002. 374(6):983–9.

Maximino C, Araujo J, Leão LKR, Grisolia ABA, Oliveira KRM, Lima MG, Batista EJ, Crespo-Lopez M, Gouveia A, Herculano A. Possible role of serotonergic system in the neurobehavioral impairment induced by acute methylmercury exposure in zebrafish (*Danio rerio*). *Neurotoxicol Teratol.* 2011. 33(6):727–34.

McCleave JD, Kleckner RC. Distribution of Leptocephali of the Catadromous *Anguilla* Species in the Western Sargasso Sea in Relation to Water Circulation and Migration. *Bull Mar Sci.* 1987. 1;41(3):789–806.

McCleave JD, Wipfelhauser GS. Behavioral aspects of selective tidal stream transport in juvenile American eels. *American Fisheries Society Symposium.* 1987.138–50.

McCleave JD., Brickley PJ, O'Brien KM, Kistner DA, Wong MW, Gallagher M, Watson SM. Do Leptocephali of the European Eel Swim to Reach Continental Waters? Status of the Question. *J Mar Biol Assoc U K.* 1998. 78(01):285–306.

Mc Dowall RM. Diadromy in fishes. *Croom Helm Lond.* 1988.

McKim JM, Olson GF, Holcombe GW, Hunt EP. Long-Term Effects of Methylmercuric Chloride on Three Generations of Brook Trout (*Salvelinus fontinalis*): Toxicity, Accumulation, Distribution, and Elimination. *J Fish Res Board Can.* 1976. 1;33(12):2726–39.

Mela M, Neto FF, Yamamoto FY, Almeida R, Grötzner SR, Ventura DF, Oliveira Ribeiro C. Mercury distribution in target organs and biochemical responses after subchronic and trophic exposure to Neotropical fish *Hoplias malabaricus*. *Fish Physiol Biochem.* 2014. 40(1):245–56.

Mela M, Randi MAF, Ventura DF, Carvalho CEV, Pelletier E, Oliveira Ribeiro CA. Effects of dietary methylmercury on liver and kidney histology in the neotropical fish *Hoplias malabaricus*. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2007.68(3):426–35.



Metcalf NB. The interaction between behavior and physiology in determining life history patterns in Atlantic salmon (*Salmo salar*). Can J Fish Aquat Sci. 1998. 1;55(S1):93–103.

Metcalf NB, Taylor AC, Thorpe JE. Metabolic rate, social status and life-history strategies in Atlantic salmon. Anim Behav. 1995. 49(2):431–6.

Metcalf NB, Thorpe JE. Early predictors of life-history events: the link between first feeding date, dominance and seaward migration in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. J Fish Biol. 1992. 1;41:93–9.

Mieiro CL, Ahmad I, Pereira ME, Duarte AC, Pacheco M. Antioxidant system breakdown in brain of feral golden grey mullet (*Liza aurata*) as an effect of mercury exposure. Ecotoxicol Lond Engl. 2010.19(6):1034–45.

Miller MJ, Chikaraishi Y, Ogawa NO, Yamada Y, Tsukamoto K, Ohkouchi N. A low trophic position of Japanese eel larvae indicates feeding on marine snow. Biol Lett. 2013. 9:826

Miller MJ, Otake T, Aoyama J, Wouthuyzen S, Suharti S, Sugeha HY, Tsukamoto K. Observations of gut contents of leptocephali in the North Equatorial Current and Tomini Bay, Indonesia. 2012. 20

Møller AK, Barkay T, Abu Al-Soud W, Sørensen SJ, Skov H, Kroer N. Diversity and characterization of mercury-resistant bacteria in snow, freshwater and sea-ice brine from the High Arctic. FEMS Microbiol Ecol. 2011. 75(3):390–401.

Monperrus M, Point D, Grall J, Chauvaud L, Amouroux D, Bareille G, Donard OFX. Determination of metal and organometal trophic bioaccumulation in the benthic macrofauna of the Adour estuary coastal zone (SW France, Bay of Biscay). J Environ Monit. 2005. 7(7):693.

Monperrus M, Tessier E, Amouroux D, Leynaert A, Huonnic P, Donard OFX. Mercury methylation, demethylation and reduction rates in coastal and marine surface waters of the Mediterranean Sea. Mar Chem. 2007. 1;107(1):49–63.

Monserrat JM, Martínez PE, Geracitano LA, Amado LL, Martins CMG, Pinho GLL, Chaves IS, Ferreira-Cravo M, Ventura-Lima J, Bianchini A. Pollution biomarkers in estuarine animals: critical review and new perspectives. Comp Biochem Physiol Toxicol Pharmacol CBP. 2007. 146(1-2):221–34.

Monteiro DA, Rantin FT, Kalinin AL. Inorganic mercury exposure: toxicological effects, oxidative stress biomarkers and bioaccumulation in the tropical freshwater fish matrinxã, *Brycon amazonicus*. Ecotoxicology. 2009. 28;19(1):105–23.

Monteiro DA, Rantin FT, Kalinin AL. Dietary intake of inorganic mercury: bioaccumulation and oxidative stress parameters in the neotropical fish *Hoplias malabaricus*. Ecotoxicology. 2013. 1;22(3):446–56.

Morel FM, Kraepiel AM, Amyot M. The chemical cycle and bioaccumulation of mercury. Annu Rev Ecol Syst. 1998. 543–66.

Moriarty C, Dekker W. Management of the European Eel. Marine Institute; 1997.

Morinville G., Ramussen J. Early juvenile bioenergetic differences between anadromous and resident brook trout (*Salvelinus fontinalis*). Can J Fish Aquat Sci. 2003. 60:60:401–10.

Morovvati H, Nikpour Y, Zolgharneine H, Ronagh M, Abdi R, Roshan A. Histological changes in the liver of reared spotted scat (*Scatophagus argus L.*) after exposure to mercury. *Comp Clin Pathol.* 2012. 1;21(5):745–53.

Nagel F, Kammann U, Wagner C, Hanel R. Metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons(PAHs)in bile as biomarkers of pollution in European eel (*anguilla anguilla*) from German rivers. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology.* 2012.62 : 254-263

Navarro P, Clemens S, Perrot V, Bolliet V, Tabouret H, Guérin T, Monperrus M, Amouroux D. Simultaneous determination of mercury and butyltin species using a multiple species-specific isotope dilution methodology on the European, *Anguilla anguilla* glass eel and yellow eel. *Int J Environ Anal Chem.* 2013. 93(2):166–82.

Neto AF, Costa JL, Costa MJ, Pereira ME, Duarte A, Caçador I, Domingos I. Accumulation of metals in *Anguilla anguilla* from the Tagus estuary and relationship to environmental contamination : metals in anguilla anguilla from Tagus estuary. *Journal of applied ichthyology.* 2012. 27(5):1265-1271.

Nevado JJB, Martín-Doimeadios RCR, Bernardo FJG, Moreno MJ, Ropero MJP, Serrano A de M. Mercury Speciation in Fish Tissues from a Mediterranean River Basin: The Tagus River (Central Spain) as a Case Study. *Arch Environ Contam Toxicol.* 2011. 1;61(4):642–52.

Niimi AJ, Kisson GP. Evaluation of the critical body burden concept based on inorganic and organic mercury toxicity to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Arch Environ Contam Toxicol.* 1994. 26(2):169–78.

Nikolskii G. Parallel intraspecific variation in fishes. *ProblIchtyol.* 1969. 9:4–8.

Nishida Y. The chemical process of oxidative stress by copper(II) and iron(III) ions in several neurodegenerative disorders. *Monatshefte Für Chem - Chem Mon.* 2011. 1;142(4):375–84.

Nordberg M, Trojanowska B, Nordberg GF. Studies on metal-binding proteins of low molecular weight from renal tissue of rabbits exposed to cadmium or mercury. *Environ Physiol Biochem.* 1974.4(4):149–58.

Nordeng H. Solution to the “Char Problem” based on Arctic Char (*Salvelinus alpinus*) in Norway. *Can J Fish Aquat Sci.* 1983. 40:1372–87.

Northcote T. Migratory strategies and production in freshwater fishes. In: “Ecology of freshwater fish production” . In S.D. Gerking, Eds. Blackwell Sci Publ Oxf. 1978. 327–59p.

Nøstbakken OJ, Bredal IL, Olsvik PA, Huang TS, Torstensen BE. Effect of Marine Omega 3 Fatty Acids on Methylmercury-Induced Toxicity in Fish and Mammalian Cells In Vitro. *J Biomed Biotechnol.* 2012. 1–13.

Nriagu J, Becker C. Volcanic emissions of mercury to the atmosphere: global and regional inventories. *Sci Total Environ.* 2003. 20;304(1–3):3–12.

O’Driscoll NJ, Siciliano SD, Lean DRS, Amyot M. Gross photoreduction kinetics of mercury in temperate freshwater lakes and rivers: application to a general model of DGM dynamics. *Environ Sci Technol.* 2006. 1;40(3):837–43.

Ohi G, Nishigaki S, Seki H, Tamura Y, Maki T. Efficacy of selenium in tuna and selenite in modifying methylmercury intoxication. *Environ Res.* 1976 . 12(1):49–58.

Oliveira Ribeiro CA, Belger L, Pelletier É, Rouleau C. Histopathological evidence of inorganic mercury and methyl mercury toxicity in the arctic charr (*Salvelinus alpinus*). Environ Res. 2002. 90(3):217–25.

Oliveira Ribeiro CA, Rouleau C, Pelletier E, Audet C, Tjälve H. Distribution kinetics of dietary methylmercury in the Arctic Charr (*Salvelinus alpinus*). Environ Sci Technol. 1999. 33(6):902–7.

Oliveira Ribeiro CA, Vollaire T, Sanchez-Chardi A, Roche H. Bioaccumulation and the effects of organochlorine pesticides, PAH and heavy metals in the Eel (*anguilla anguilla*) at the Camargue Nature Reserve, France. Aquatic Toxicology. 2005. 74(74):53-69

Olson GF, Mount DI, Snarski VM, Thorslund TW. Mercury residues in fathead minnows, *Pimephales promelas* Rafinesque, chronically exposed to methylmercury in water. Bull Environ Contam Toxicol. 1975. 14(2):129–34.

Olson K, Fromm P. Mercury uptake and ion distribution in gills of rainbow-trout (*Salmo gairdneri*)-tissue scans with an electron-microprobe. J Fish Res Board Can. 1973. 30(10):1575–6.

Onsanit S, Chen M, Ke C, Wang W-X. Mercury and stable isotope signatures in caged marine fish and fish feeds. J Hazard Mater. 2012. 203-204:13–21.

Oremland RS, Culbertson CW, Winfrey MR. Methylmercury Decomposition in Sediments and Bacterial Cultures: Involvement of Methanogens and Sulfate Reducers in Oxidative Demethylation. Appl Environ Microbiol. 1991. 57(1):130–7.

Oremland RS, Miller LG, Dowdle P, Connell T, Barkay T. Methylmercury oxidative degradation potentials in contaminated and pristine sediments of the carson river, nevada. Appl Environ Microbiol. 1995. 61(7):2745–53.

Osborn AM, Bruce KD, Strike P, Ritchie DA. Distribution, diversity and evolution of the bacterial mercury resistance (*mer*) operon. FEMS Microbiol Rev. 1997. 19(4):239–62.

Ososkov I, Weis JS. Development of Social Behavior in Larval Mummichogs after Embryonic Exposure to Methylmercury. Trans Am Fish Soc. 1996. 125(6):983–7.

Otake T. Metamorphosis. Eel Biol. Hong kong: K.Aida, K.Tsukamoto, K.Yamauchi; 2003. 61–74p

Pacyna EG, Pacyna JM, Steenhuisen F, Wilson S. Global anthropogenic mercury emission inventory for 2000. Atmos Environ. 2006. 40(22):4048–63.

Pak K, Bartha R. Mercury methylation by interspecies hydrogen and acetate transfer between sulfidogens and methanogens. Appl Environ Microbiol. 1998. 64(6):1987–90.

Palstra AP, Ginneken VJT, Murk AJ, Thillart GEEJM. Are dioxin-like contaminants responsible for the eel (*Anguilla anguilla*) drama? Naturwissenschaften. 2006. 1;93(3):145–8.

Pan K, Chan H, Tam YK, Wang W-X. Low mercury levels in marine fish from estuarine and coastal environments in southern China. Environ Pollut. 2014. 185:250–7.

Parks JM, Johs A, Podar M, Bridou R, Hurt RA, Smith SD, Tomanicek SJ, Qian Y, Brown SD, Brandt CG, Palumbo AV, Smith JC, Wall JD, Elias DA, Liang L. The Genetic Basis for Bacterial Mercury Methylation. Science. 2013. 15;339(6125):1332–5.

Passos CJS, Mergler D. Human mercury exposure and adverse health effects in the Amazon: a review. Cad Saúde Pública. 2008. 4:503–20.

Peña S, Peña JB, Rios C, Sancho E, Fernández C, Ferrando MD. Role of Glutathione in Thiobencarb Resistance in the European Eel *Anguilla anguilla*. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2000. 46(1):51–6.

Peterson RH, Martin-Robichaud DJ. First feeding and growth of elvers of the American eel (*Anguilla rostrata* (Lesueur)) at several temperature regimes. Canada: 1994. 15p

Peterson SA, Van Sickle J, Herlihy AT, Hughes RM. Mercury concentration in fish from streams and rivers throughout the western United States. *Environ Sci Technol*. 2007. 41(1):58–65.

Pickhardt PC, Stepanova M, Fisher NS. Contrasting uptake routes and tissue distributions of inorganic and methylmercury in mosquitofish (*Gambusia affinis*) and redear sunfish (*Lepomis microlophus*). *Environ Toxicol Chem SETAC*. 2006. 25(8):2132–42.

Pirrone N, Cinnirella S, Feng X, Finkelman RB, Friedli HR, Leaner J, Mason R, Mukherjee AB, Stracher G, Streets DG, Telmer K, Mason R, Pirrone N. Global Mercury Emissions to the Atmosphere from Natural and Anthropogenic Sources. In: Mason R, Pirrone N, editors. *Mercury Fate Transp Glob Atmosphere*. Springer US; 2009. 1–47p.

Piscator M. On cadmium in normal human kidneys with a report on the isolation of metallothionein from cadmium exposed rabbit livers. *Nord Hyg Tidskr*. 1964. (45):76–82.

Pitts KE, Summers AO. The roles of thiols in the bacterial organomercurial lyase (MerB). *Biochemistry (Mosc)*. 2002. 13;41(32):10287–96.

Plan de gestion anguille de la France -Rapport de mise en oeuvre -juin 2012- article 9 du R(CE) n°1100/2007. 2012.

Point D. Spéciation et biochimie des éléments traces métalliques dans l'estuaire de l'Adour, Université de Pau et des Pays de l'Adour. 2004.

Pongratz R, Heumann KG. Production of methylated mercury and lead by polar macroalgae — A significant natural source for atmospheric heavy metals in clean room compartments. *Chemosphere*. 1998. 36(9):1935–46.

Poulain AJ, Amyot M, Findlay D, Hintelmann H. Biological and photochemical production of dissolved gaseous mercury in a boreal lake. *Limnol Oceanogr*. 2004. 49(6):2265–75.

Ribeyre F, Boudou A. Bioaccumulation et répartition tissulaire du mercure—HgCl<sub>2</sub> et CH<sub>3</sub>HgCl—chez *Salmo gairdneri* après contamination par voie directe. *Water Air Soil Pollut*. 1984. 23(2):169–86.

Richardson WJ. Timing of Bird Migration in Relation to Weather: Updated Review. In: Gwinner PDE, editor. *Bird Migr*. Springer Berlin Heidelberg; 1990. 78–101p.

Richter CA, Garcia-Reyero N, Martyniuk C, Knoebel I, Pope M, Wright-Osment MK, Denslow ND, Tillitt DE. Gene expression changes in female zebrafish (*Danio rerio*) brain in response to acute exposure to methylmercury. *Environ Toxicol Chem*. 2011. 30(2):301–8.

Riemann L, Alfredsson H, Hansen MM, Als TD, Nielsen TG, Munk P, Aarestrup K, Maes GE, Sparholt H, Petersen MI, Bachler M, Castonguay M. Qualitative assessment of the diet of European eel larvae in the Sargasso Sea resolved by DNA barcoding. *Biol Lett*. 2010. 23;6(6):819–22.

RNO. Surveillance du Milieu Marin. Travaux du RNO. Ifremer et Ministère de l'Ecologie et du Développement Durable. 1999.

RNO. Surveillance du milieu marin. Travaux du RNO. Ifremer et Ministère de l'Écologie et du Développement Durable. ISSN 1620-1124; 2005.

Robinet TT, Feunteun EE. Sublethal Effects of Exposure to Chemical Compounds: A Cause for the Decline in Atlantic Eels? *Ecotoxicology*. 2002. 1;11(4):265–77.

Roesijadi G, Hansen KM, Unger ME. Cadmium-induced metallothionein expression during embryonic and early larval development of the mollusc *Crassostrea virginica*. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1996. 140(2):356–63.

Rombough P. The energetics of embryonic growth. *Respir Physiol Neurobiol*. 2011. 31;178(1):22–9.

Rosenfeld J, Van Leeuwen T, Richards J, Allen D. Relationship between growth and standard metabolic rate: measurement artefacts and implications for habitat use and life-history adaptation in salmonids. *J Anim Ecol*. 2014. 84:4-20

Rosenkranz B, Bettmer J, Buscher W, Breer C, Cammann K. The behaviour of different organometallic compounds in the presence of inorganic mercury(II): transalkylation of mercury species and their analysis by the GC–MIP–PED system. *Appl Organomet Chem*. 1997. 1;11(9):721–5.

Sakamoto M, Kubota M, Liu XJ, Murata K, Nakai K, Satoh H. Maternal and fetal mercury and n-3 polyunsaturated fatty acids as a risk and benefit of fish consumption to fetus. *Environ Sci Technol*. 2004. 15;38(14):3860–3.

Sakamoto M, Kubota M, Matsumoto S, Nakano A, Akagi H. Declining risk of methylmercury exposure to infants during lactation. *Environ Res*. 2002. 90(3):185–9.

Samson JC, Goodridge R, Olobatuyi F, Weis JS. Delayed effects of embryonic exposure of zebrafish (*Danio rerio*) to methylmercury (MeHg). *Aquat Toxicol*. 2001. 51(4):369–76.

Sandheinrich MB, Miller KM. Effects of dietary methylmercury on reproductive behavior of fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Environ Toxicol Chem SETAC*. 2006. 25(11):3053–7.

Sanfeliu C, Sebastià J, Cristòfol R, Rodríguez-Farré E. Neurotoxicity of organomercurial compounds. *Neurotox Res*. 2003. 5(4):283–305.

Sarasiab AR, Hosseini M, Beni FT. Mercury and methyl mercury concentration in sediment, benthic, *Barbus Grypus* and pelagic, *Barbus esocinus* fish species, from Musa estuary, Iran. *Int Aquat Res*. 2014. 6(3):147–53.

Schaefer JK, Rocks SS, Zheng W, Liang L, Gu B, Morel FMM. Active transport, substrate specificity, and methylation of Hg(II) in anaerobic bacteria. *Proc Natl Acad Sci*. 2011. 24;108(21):8714–9.

Schaefer JK, Szczuka A, Morel FMM. Effect of Divalent Metals on Hg(II) Uptake and Methylation by Bacteria. *Environ Sci Technol*. 2014. 4;48(5):3007–13.

Schaefer JK, Yagi J, Reinfelder JR, Cardona T, Ellickson KM, Tel-Or S, Barkay T. Role of the bacterial organomercury lyase (MerB) in controlling methylmercury accumulation in mercury-contaminated natural waters. *Environ Sci Technol*. 2004. 15;38(16):4304–11.

Scheuhammer AM, Wong AHK, Bond D. Mercury and selenium accumulation in common loons (*Gavia immer*) and common mergansers (*Mergus merganser*) from Eastern Canada. *Environ Toxicol Chem*. 1998. 1;17(2):197–201.

Schmalhausen II. Factors of Evolution: The Theory of Stabilizing Selection. Blakiston. Philadelphia; 1949.

Schmidt J. The breeding places of the eel. Philos Trans R Soc. 1922. 179–208.

Schoth M, Tesch F-W. The vertical distribution of small O-group *Anguilla* larvae in the Sargasso Sea with reference to other anguilliform leptocephali. Meeresforschung. 1984. 30(3):188–95.

Seixas TG, Moreira I, Siciliano S, Malm O, Kehrig HA. Differences in Methylmercury and Inorganic Mercury Biomagnification in a Tropical Marine Food Web. Bull Environ Contam Toxicol. 2014. 1;92(3):274–8.

Selin NE, Jacob DJ, Park RJ, Yantosca RM, Strode S, Jaeglé L, Jaffe D. Chemical cycling and deposition of atmospheric mercury: Global constraints from observations. J Geophys Res Atmospheres. 2007. 112: D2-27.

Selin NE, Jacob DJ, Yantosca RM, Strode S, Jaeglé L, Sunderland EM. Global 3-D land-ocean-atmosphere model for mercury: Present-day versus preindustrial cycles and anthropogenic enrichment factors for deposition: Global 3-D Land-ocean-atmosphere model for mercury. Glob Biogeochem Cycles. 2008. 2(22):1-13

Shah S, Altindag A. Behavioural abnormalities of tench (*Tinca tinca* L. 1578) on exposure to mercury, cadmium and lead. Fresenius Environ Bull. 2004. 13(12):1482–5.

Sharif A, Monperrus M, Tessier E, Bouchet S, Pinaly H, Rodriguez-Gonzalez P, Maron P, Amouroux D. Fate of mercury species in the coastal plume of the Adour River estuary (Bay of Biscay, SW France) Sci Tot Environ. 2014. 496: 701-713.

Sharma CM, Basnet S, Kang S, Rosseland BO, Zhang Q, Pan K, et al. Mercury Concentrations in Commercial Fish Species of Lake Phewa, Nepal. Bull Environ Contam Toxicol. 2013. 1;91(3):272–7.

Siciliano S, O'Driscoll N, Lean D. Microbial reduction and oxidation of mercury in freshwater lakes. Environ Sci Technol. 2002. 36(14):3064–8.

Sinclair M. Marine populations: an essay on population regulation and speciation. Washington Sea Grant Program, Seattle, WA. 1988. 252 p.

Slaninova A, Smutna M, Modra H, Svobodova Z. A review: oxidative stress in fish induced by pesticides. Neuro Endocrinol Lett. 2009. 30 Suppl 1:2–12.

Smith J. Evolution and the theory of games. Cambridge University Press. 1982.

Smith LE, Carvan MJ, Dellinger JA, Ghorai JK, White DB, Williams FE, Weber DN. Developmental selenomethionine and methylmercury exposures affect zebrafish learning. Neurotoxicol Teratol. 2010. 32(2):246–55.

Southwood TR. A hormonal theory of the mechanism of wing polymorphism in Heteroptera. Proc Roy Entomol Soc. 1961. 36:63–6.

Spry DJ, Wiener JG. Metal bioavailability and toxicity to fish in low-alkalinity lakes: A critical review. Environ Pollut Barking Essex 1987. 1991. 71(2-4):243–304.

Stein ED, Cohen Y, Winer AM. Environmental distribution and transformation of mercury compounds. Crit Rev Environ Sci Technol. 1996. 1;26(1):1–43.

Stern AH, Smith AE. An assessment of the cord blood:maternal blood methylmercury ratio: implications for risk assessment. Environ Health Perspect. 2003. 111(12):1465–70.

Steuerwald U, Weihe P, Jørgensen PJ, Bjerve K, Brock J, Heinzow B, et al. Maternal seafood diet, methylmercury exposure, and neonatal neurologic function. *J Pediatr*. 2000. 136(5):599–605.

Stoichev T, Amouroux D, Monperrus M, Point D, Tessier E, Bareille G, Donard OFX. Mercury in surface waters of a macrotidal urban estuary (River Adour, south-west France). *Chem Ecol*. 2006. 22(2):137–48.

Stoichev T, Amouroux D, Wasserman J., Point D, De Diego A, Bareille G, Donard OFX. Dynamics of mercury species in surface sediments of a macrotidal estuarine–coastal system (Adour River, Bay of Biscay). *Estuar Coast Shelf Sci*. 2004. 59(3):511–21.

Stone R. Freshwater Eels Are Slip-Sliding Away. *Science*. 2003. 10;302(5643):221–2.

Strode SA, Jaeglé L, Selin NE, Jacob DJ, Park RJ, Yantosca RM, Mason RP, Slemr F. Air-sea exchange in the global mercury cycle. *Glob Biogeochem Cycles*. 2007. 1;21(1):GB1017.

Sultan SE. Phenotypic Plasticity for Fitness Components in Polygonum Species of Contrasting Ecological Breadth. *Ecology*. 2001. 82(2):328.

Sunderland EM, Mason RP. Human impacts on open ocean mercury concentrations. *Glob Biogeochem Cycles*. 2007. 1;21(4):GB4022.

Szczebak JT, Taylor DL. Ontogenetic patterns in bluefish (*Pomatomus saltatrix*) feeding ecology and the effect on mercury biomagnification. *Environ Toxicol Chem SETAC*. 2011. 30(6):1447–58.

Tapie N, Menach KL, Pasquaud S, Elie P, Devier MH, Budzinski H. PBDE and PCB contamination of eels from the Gironde estuary : from glass eels to silver eels. 2011. *Chemosphere*. 83:175-185

Taylor PD, Jonker LB. Evolutionary stable strategies and game dynamics. *Math Biosci*. 1978. 40(1–2):145–56.

Tesch F-W. The eel. Oxford, UK: Blackwell Science; 2003.

Tessier E. Etude de la réactivité et du transfert du tributylétain et du mercure dans les environnements aquatiques. Université de Pau et des Pays de l'Adour; 2004.

Thériault V, Dodson J. Body size and the adoption of a migratory tactic in brook charr. *Jounal Fish Biol*. 2003. 63, 1144–59.

Thibault I, Dodson J, Caron F, Tzeng W, Iizuka Y, Shiao J. Facultative catadromy in American eels: testing the conditional strategy hypothesis. *Mar Ecol Prog Ser*. 2007. 23;344:219–29.

Thom R, Dixon DP, Edwards R, Cole DJ, Laphorn AJ. The structure of a zeta class glutathione S-transferase from *Arabidopsis thaliana*: characterisation of a GST with novel active-site architecture and a putative role in tyrosine catabolism. *J Mol Biol*. 2001. 18;308(5):949–62.

Thorpe JE, Mangel M, Metcalfe NB, Huntingford FA. Modelling the proximate basis of salmonid life-history variation, with application to Atlantic salmon, *Salmo salar L*. *Evol Ecol*. 1998. 1;12(5):581–99.

Thorpe J. Flexible life-history strategies a context for understanding migration in salmonids. *Bull Tohoku Natl Fish Res Inst*. 1999. 62:151–64.

- Tomkins JL, Hazel W. The status of the conditional evolutionarily stable strategy. *Trends Ecol Evol.* 2007. 22(10):522–8.
- Trut G, Gouriou L, Auby I, Rigouin L, Barbier C, Oger-Jeanneret H. Valorisation des données de la surveillance DCE. Synthèse des données du suivi chimique «Biote» (2008-2011). Masses d'eau côtières et de transition du bassin Adour-Garonne. 2013
- Tseng CM, Amouroux D, Abril G, Tessier E, Etcheber H, Donard OF. Speciation of mercury in a fluid mud profile of a highly turbid macrotidal estuary (Gironde, France). *Environ Sci Technol.* 2001. 1;35(13):2627–33.
- Tsukamoto K, Aoyama J, Miller MJ. Migration, speciation, and the evolution of diadromy in anguillid eels. *Can J Fish Aquat Sci.* 2002. 1;59(12):1989–98.
- Tsukamoto K, Arai T. Facultative catadromy of the eel *Anguilla japonica* between freshwater and seawater habitats. *Mar Ecol Prog Ser.* 2001. 27;220:265–76.
- Tsukamoto K, Ishida R, Naka K, Kajihara T. Switching of size and migratory pattern in successive generations of landlocked ayu. *Am Fish Soc Symp.* 1987;1, 492–506.
- Tsukamoto K, Nakai I, Tesch W-V. Do all freshwater eels migrate? *Nature.* 1998. 396(6712):635–6.
- Tucker DW. A New Solution to the Atlantic Eel Problem. *Nature.* 1959. 21;183(4660):495–501.
- Tzeng W-N, Iizuka Y, Shiao J-C, Yamada Y, Oka HP. Identification and growth rates comparison of divergent migratory contingents of Japanese eel (*Anguilla japonica*). *Aquaculture.* 2003. 216(1):77–86.
- Tzeng WN, Lin HR, Wang CH, Xu SN. Differences in size and growth rates of male and female migrating Japanese eels in Pearl River, China. *J Fish Biol.* 2000. 1;57(5):1245–53.
- Tzeng WN, Shiao JC, Iizuka Y. Use of otolith Sr:Ca ratios to study the riverine migratory behaviors of Japanese eel *Anguilla japonica*. *Mar Ecol Prog Ser.* 2002. 245:213–21.
- Ullrich S, Tanton T, Abdrashitova S. Mercury in the aquatic environment : a review of factors affecting methylation. *Crit Rev Environ Sci Technol.* 2001. 31(3):241–93.
- UNEP. Global Mercury Assessment. United Nations Environment Programme. date accessed : 02.06.2013; 2013.
- Ung CY, Lam SH, Hlaing MM, Winata CL, Korzh S, Mathavan S, et al. Mercury-induced hepatotoxicity in zebrafish: in vivo mechanistic insights from transcriptome analysis, phenotype anchoring and targeted gene expression validation. *BMC Genomics.* 2010. 30;11(1):212.
- Van Ael E, Belpaire C, Breine J, Geeraerts C, Van Thuyne G, Eulaers I, et al. Are persistent organic pollutants and metals in eel muscle predictive for the ecological water quality? *Environ Pollut.* 2014. 186:165–71.
- Van Ginneken VJ, van den Thillart GE. Eel fat stores are enough to reach the Sargasso. *Nature.* 2000. 13;403(6766):156–7.
- Van Ginneken V. Eel migration to the Sargasso: remarkably high swimming efficiency and low energy costs. *J Exp Biol.* 2005. 1;208(7):1329–35.



Van Ginneken V, Durif C, Balm SP, Boot R, Verstegen MWA, Antonissen E, et al. Silvering of European eel (*Anguilla anguilla* L.): seasonal changes of morphological and metabolic parameters. *Anim Biol.* 2007. 1;57(1):63–77.

Van Ginneken VJT., Maes GE. The European eel (*Anguilla anguilla*, Linnaeus), its lifecycle, evolution and reproduction: a literature review. *Rev. Fish Biol. Fisheries.* 2005. 15, 367-398.

Varsamos S, Nebel C, Charmantier G. Ontogeny of osmoregulation in postembryonic fish: A review. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 2005. 141(4):401–29.

Veiga M, Baker R. Protocols for environmental and health assesment of mercury released by artisanal ans small-scale gold miners. *Glob Mercury Proj.* 2004.

Vélez-Espino LA, McLaughlin RL, Robillard M. Ecological advantages of partial migration as a conditional strategy. *Theor Popul Biol.* 2013. 85:1–11.

Verbiest H, Breukelaar A, Ovidio M, Philippart J-C, Belpaire C. Escapement success and patterns of downstream migration of female silver eel *Anguilla anguilla* in the River Meuse. *Ecol Freshw Fish.* 2012. 1;21(3):395–403.

Vergilio CS, Carvalho CEV, Melo EJT. Accumulation and Histopathological Effects of Mercury Chloride after Acute Exposure in Tropical Fish *Gymnotus carapo*. *J Chem Health Risks* 2012. 2(4)

Vilter V. Métamorphose myo-somatique de larves d’anguille et relations avec la croissance stomacale. *Compte rendu des séances de la Société Biologique de Marseille.* 1945. 808–10.

Wang W-X, Rainbow PS. Significance of metallothioneins in metal accumulation kinetics in marine animals. *Comp Biochem Physiol Part C Toxicol Pharmacol.* 2010. 152(1):1–8.

Watras CJ, Back RC, Halvorsen S, Hudson RJM, Morrison KA, Wentz SP. Bioaccumulation of mercury in pelagic freshwater food webs. *Sci Total Environ.* 1998. 28;219(2–3):183–208.

Weber DN. Dose-dependent effects of developmental mercury exposure on C-start escape responses of larval zebrafish *Danio rerio*. *J Fish Biol.* 2006. 1;69(1):75–94.

Weber JH. Review of possible paths for abiotic methylation of mercury(II) in the aquatic environment. *Chemosphere.* 1993. 26(11):2063–77.

Weihls D. Tidal stream transport as an efficient method for migration. *J Cons.* 1978. 1;38(1):92–9.

Weis JS, Weis P. Effects of embryonic exposure to methylmercury on larval prey-capture ability in the mummichog, *fundulus heteroclitus*. *Environ Toxicol Chem.* 1995. 1;14(1):153–6.

Werner E, Gilliam J. The ontogenic niche and species interactions in size structured populations. *Annu Rev Ecol Syst.* 1984. 15:393–425.

Whalin L, Kim E-H, Mason R. Factors influencing the oxidation, reduction, methylation and demethylation of mercury species in coastal waters. *Mar Chem.* 2007. 1;107(3):278–94.

Wiener JG, Spry DJ. Toxicological significance of mercury in freshwater fish. 1996. 297-339p.

Winberg G. The dependence of ontogenetic development from temperature. *Prod - Biol Investig Aquat Ecosyst. Nauka, Leningrad: A.F Alimov (Editors); 1987. 5–34p.*

Winge DR, Miklossy K-A. Differences in the polymorphic forms of metallothionein. *Arch Biochem Biophys.* 1982. 214(1):80–8.

Winn AA. The contributions of programmed developmental change and phenotypic plasticity to within-individual variation in leaf in *Dicerandra linearifolia*. *J Evol Biol.* 1996. 9:737–52.

Winter HV, Jansen HM, Bruijs MCM. Assessing the impact of hydropower and fisheries on downstream migrating silver eel, *Anguilla anguilla*, by telemetry in the River Meuse. *Ecol Freshw Fish.* 2006. 1;15(2):221–8.

Wippelhauser GS, McCleave JD. Precision of behavior of migrating juvenile American eels (*Anguilla rostrata*) utilizing selective tidal stream transport. *J Cons ICES J Mar Sci.* 1987. 1;44(1):80–9.

Wirth T, Bernatchez L. Genetic evidence against panmixia in the European eel. *Nature.* 2001. 22;409(6823):1037–40.

Wolfe M, Norman D. Effects of waterborne mercury on terrestrial wildlife at clear lake: Evaluation and testing of a predictive model. *Environ Toxicol Chem.* 1998. 1;17(2):214–27.

Wood CM, Farrell A., Brauner C. Homeostasis and toxicology of essential metals. Academic Press. 2012.

Wood JM, Kennedy FS, Rosen CG. Synthesis of methyl-mercury compounds by extracts of a methanogenic bacterium. *Nature.* 1968. 12;220(5163):173–4.

Wren CD, Stokes PM. Depressed mercury levels in biota from acid and metal stressed lakes near Sudbury, Ontario. Amsterdam-Pergamon Press; 1988.

Würtz J, Taraschewski H. Histopathological changes in the swimbladder wall of the European eel *Anguilla anguilla* due to infections with *Anguillicola crassus*. *Dis Aquat Organ.* 2000. 14;39(2):121–34.

Xiaojuan Xu. Developmental methylmercury exposure affects avoidance learning outcomes in adult zebrafish. *J Toxicol Environ Health Sci.* 2012. 4(5).

Yadete F, Karlsen OA, Lanzén A, Berg K, Olsvik P, Hogstrand C, Goksoyr A. Global transcriptome analysis of Atlantic cod (*Gadus morhua*) liver after in vivo methylmercury exposure suggests effects on energy metabolism pathways. *Aquat Toxicol.* 2013. 126:314–25.

Yamano K, Nomura K, Tanaka H. Development of thyroid gland and changes in thyroid hormone levels in Leptocephali of Japanese Eel (*Anguilla japonica*). *Aquaculture.* 2007. 28;270(1–4):499–504.

Yasutake A, Hirayama K. Selective quantification of inorganic mercury in tissues of methylmercury-treated rats. *Bull Environ Contam Toxicol.* 1990. 45(5):662–6.

Yasutake A, Hirayama K. Evaluation of methylmercury biotransformation using rat liver slices. *Arch Toxicol.* 2001. 75(7):400–6.

Yudovich YE, Ketris MP. Mercury in coal: a review Part 2. Coal use and environmental problems. *Int J Coal Geol.* 2005. 11;62(3):135–65.

Zhang Q, Pan K, Kang S, Zhu A, Wang W-X. Mercury in wild fish from high-altitude aquatic ecosystems in the Tibetan Plateau. *Environ Sci Technol.* 2014. 6;48(9):5220–8.

Zhang T, Hsu-Kim H. Photolytic degradation of methylmercury enhanced by binding to natural organic ligands. *Nat Geosci.* 2010. 3(7):473–6.

Zhou T, Scali R, Weis JS. Effects of methylmercury on ontogeny of prey capture ability and growth in three populations of larval *Fundulus heteroclitus*. *Arch Environ Contam Toxicol.* 2001. 41(1):47–54.

Žižek S, Horvat M, Gibičar D, Fajon V, Toman MJ. Bioaccumulation of mercury in benthic communities of a river ecosystem affected by mercury mining. *Sci Total Environ.* 2007. 15;377(2–3):407–15.

# ***METHODOLOGIES***

---



## Préambule

L'approche pluridisciplinaire développée pendant ce travail de thèse a nécessité l'utilisation de nombreux dispositifs expérimentaux et de techniques analytiques qui sont présentés dans le Tableau 7. Cette partie se propose dans un premier temps de présenter le principe et le fonctionnement des différents outils expérimentaux utilisés au cours de ce travail. Puis la seconde partie est dédiée à une description des différentes techniques analytiques utilisées.

**Tableau 7 : Dispositifs expérimentaux et techniques analytiques utilisés lors de ce travail.**

<b>Dispositifs expérimentaux</b>	<b>Informations recueillies</b>
	Evaluation du potentiel de migration
Fluvarium	en réponse au signal crépusculaire
Chronotron	en réponse au signal de marée
Chambres de micro-respirométrie	Mesure du métabolisme standard
Aquariums	Contamination par traceur isotopique du MeHg
<b>Techniques analytiques</b>	<b>Informations recueillies</b>
Couplage GC-ICPMS	Dosage des espèces du Hg 'spikées' <sup>1</sup> et 'naturelles' <sup>2</sup> Détermination de la bioaccumulation et métabolisation
Analyse génétique (Q-PCR)	Expression des gènes du métabolisme mitochondrial, du stress oxydant, de la détoxification et de la mobilisation des réserves lipidiques
Analyse MT (AMA)	Quantification des métallothionéines

## 1. Dispositifs expérimentaux

### 1.1. Fluvarium et chronotron

Lors de leur remontée en estuaire (utilisation du transport tidal sélectif, voir Introduction, paragraphe 1.1.2.), les civelles sont sous la dépendance, entre autre, de deux synchroniseurs : le signal crépusculaire et le signal de marée. L'UMR ECOBIOP dispose de deux dispositifs expérimentaux permettant de reproduire ces deux synchroniseurs (Bardonnnet et al. 2003 ; Bolliet et al. 2007 ; Bureau Du Colombier et al. 2007 ; Geffroy et Bardonnnet 2012). Le fluvarium a été utilisé pour étudier le comportement des civelles en réponse au signal

<sup>1</sup> Correspond uniquement au Hg (MeHg et Hg(II)) marqué avec un traceur isotopique et bioaccumulé par la civelle après les expériences de contamination

<sup>2</sup> Correspond au Hg naturellement présent dans la civelle

crépusculaire et le chronotron pour observer la synchronisation des civelles à l'inversion du courant.

**1.1.1. Evaluation du potentiel de migration en réponse au signal crépusculaire : le fluvarium**

Dans le cadre d'une expérience de contamination en laboratoire (chapitre 2) et de l'ensemble des expériences en milieu naturel (chapitre 3), les civelles récoltées ont été comptées puis réparties en une ou deux sections (selon le nombre d'individus) d'un grand appareil annulaire appelé 'fluvarium' (Figure 15). C'est une structure expérimentale de 10 m de long, 0,8 m de haut et 1 m de large qui dispose de pièges situés en amont et en aval de chaque section. Des abris artificiels de 1m<sup>2</sup> sont également présents au centre de chaque section. Le fluvarium a été rempli avec de l'eau douce à partir de la rivière Nivelle pour une vitesse moyenne de courant de  $10 \pm 1 \text{ cm s}^{-1}$  et une température de l'eau de  $11,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$ . La photopériode (cycle jour/nuit) a été réglée sur le cycle réel de chacune des dates d'échantillonnage pour ne pas perturber le cycle biologique des individus. Ce tri est basé sur la réponse comportementale des individus lors d'une simulation de crépuscule. Pour cela, les civelles répondant à la diminution de l'intensité lumineuse en remontant et en se déplaçant dans la colonne d'eau ont été récupérées dans les pièges aval et amont. Ces individus ont été qualifiés de migrants. Au contraire, les individus restant dans les abris jusqu'au lendemain ont quant à eux été qualifiés comme non migrants et ayant un faible potentiel de migration. Par ailleurs, les civelles qui ont été récupérées dans les pièges en dehors de la période crépusculaire de jour ou de nuit ont été considérées comme 'actives non synchronisées'.

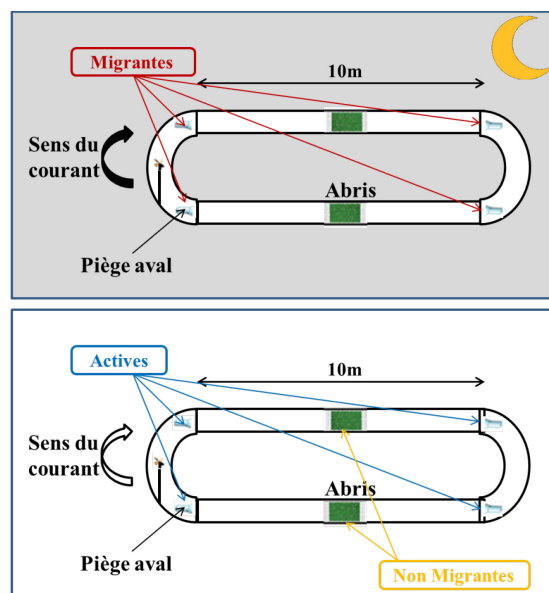


Figure 15 : Schéma d'un tri en fluvarium lors du signal crépusculaire (en haut) et le lendemain matin (en bas).

**1.1.2. Evaluation du potentiel de migration des civelles au signal de marée :**

**le chronotron**

Dans le cadre d'une expérience de contamination en laboratoire, le chronotron a été utilisé pour suivre la synchronisation des civelles sur les rythmes de marées dans la colonne d'eau (plus de détails sur le protocole suivi dans le chapitre 2). Le chronotron est une structure expérimentale ovale de 1,5 m de long, séparé par une paroi rigide au centre dans lequel il est possible de choisir le sens du courant grâce à des pompes qui peuvent être programmées sur des rythmes de marées de 6,2h (Figure 16). Le chronotron a été alimenté avec de l'eau douce à partir de la rivière Nivelle pour une température de l'eau de  $11,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$ . Lors de l'expérience, la vitesse des civelles était en moyenne de  $9 \pm 0,1 \text{ cm s}^{-1}$ . Le fond de la structure a été recouvert d'une couche de gravier afin de permettre aux civelles de se cacher dans le substrat.

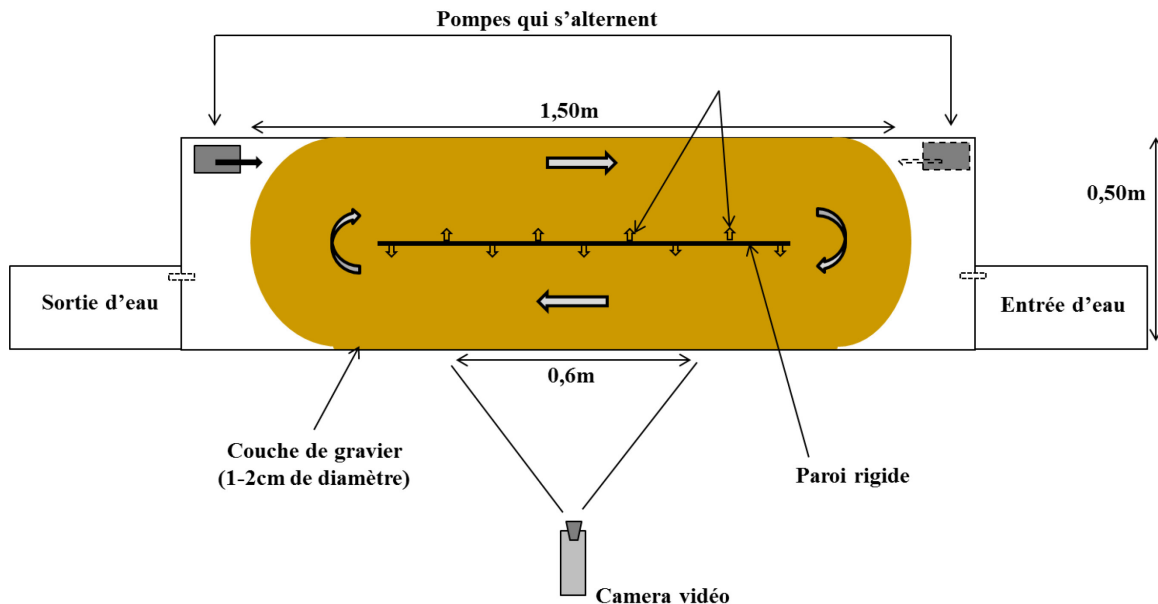


Figure 16 : Schéma d'un chronotron.

**1.2. La micro-respirométrie**

Le métabolisme standard a pu être évalué en mesurant la quantité d'oxygène consommée au repos, par un individu, à un instant donné ( $\text{mm}^3 \text{O}_2 \text{h}^{-1} \text{g}^{-1}$ ). Afin de déterminer s'il existait des différences de métabolisme entre les différents types de comportement migratoire des civelles, il a été nécessaire de travailler à l'échelle individuelle. Différentes avancées techniques ont permis d'élaborer des sondes à oxygènes très précises, fonctionnant indépendamment de divers paramètres (pH, turbidité etc.), et ne consommant pas d'oxygène, permettant ainsi d'effectuer de multiples mesures de consommations d'oxygène sur un même



individu. L'utilisation de ces sondes à oxygène a ainsi permis de travailler sur de petits organismes (Régnier et al. 2010) et de surcroît d'utiliser une technique d'une grande sensibilité. Chaque sonde à oxygène, localisée au centre de la paroi de la chambre de micro-respirométrie (Figure 17), va recevoir un signal lumineux par les fibres optiques, entrer dans un état excité et émettre une luminescence, inversement proportionnelle à la quantité d'oxygène présente, qui sera enregistrée par l'oxymètre.

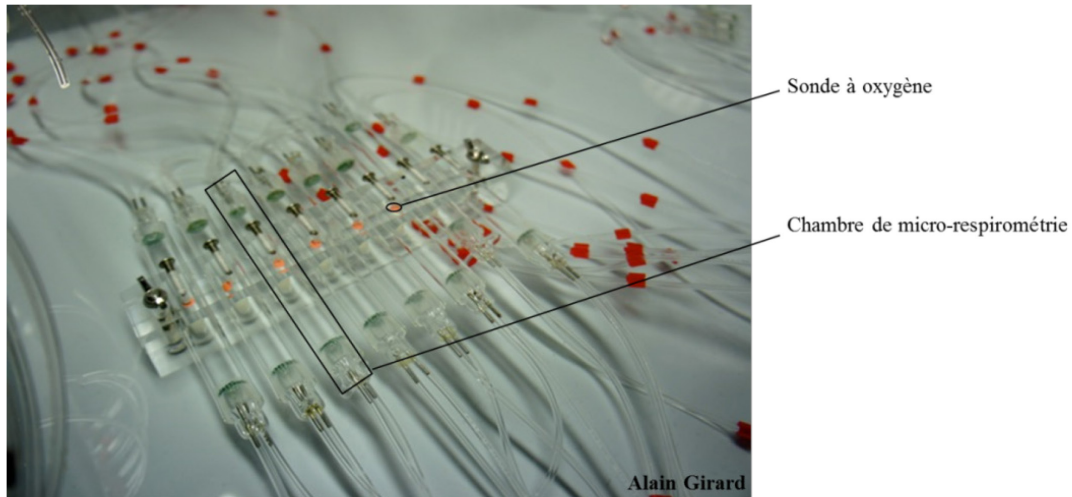


Figure 17 : Chambres de respirométrie.

Dans ce travail, le métabolisme standard des civelles a été mesuré grâce à un dispositif de micro-respirométrie initialement composé de 8 (2012) puis 16 chambres (2013) de respirométrie en verre borosilicaté (longueur 80mm, diamètre 13mm) munis de sondes à oxygène (5mm de diamètre, type PSt3 Loligo Systems) reliées à 4 oxymètres 4 canaux (Oxy4-mini PreSens) par 16 fibres optiques (diamètre 2mm) (Figure 17). Les oxymètres ont enregistré en temps réel les consommations d'oxygène dans chaque chambre à l'aide de 4 ordinateurs munis du logiciel OXY-4 version 2.11 (PreSens – Precision Sensing GmbH). Les chambres de micro-respirométrie ont été réparties sur deux portoirs de 8 chambres immergées dans un bac contenant 30L d'eau de source (Ondine). Le système de mesure a été placé dans une pièce thermorégulée à 11°C et la température de l'eau a été maintenue constante (11°C ± 0.1°C) à l'aide d'un groupe froid (TECO TRI15, Teco). Le suivi de la température a été quotidiennement réalisé (thermomètre VEMCO). L'eau a été maintenue à saturation d'oxygène à l'aide d'un diffuseur d'air. Les chambres ont été raccordées à 4 pompes péristaltiques (Masterflex® L/S® economy variable speed drive, Cole-Parmer) disposant d'un circuit ouvert relié à un programmeur et d'un circuit fermé (Figure 18). Le circuit ouvert a

permis une saturation de l'oxygène de chaque chambre de façon périodique et le circuit fermé a permis quant à lui de quantifier la diminution d'oxygène liée à la consommation des civelles. A partir de précédentes études menées au laboratoire sur la civelle, il a été décidé de couper le circuit ouvert pendant 20 min, période durant laquelle la consommation d'oxygène des civelles a été mesurée. Cette durée a été déterminée afin de ne pas descendre en dessous de 80% de saturation en oxygène dans les chambres de respirométrie et ainsi éviter tout stress hypoxique pour les civelles. Le circuit a ensuite été maintenu ouvert pendant 20 min avant la prochaine mesure.

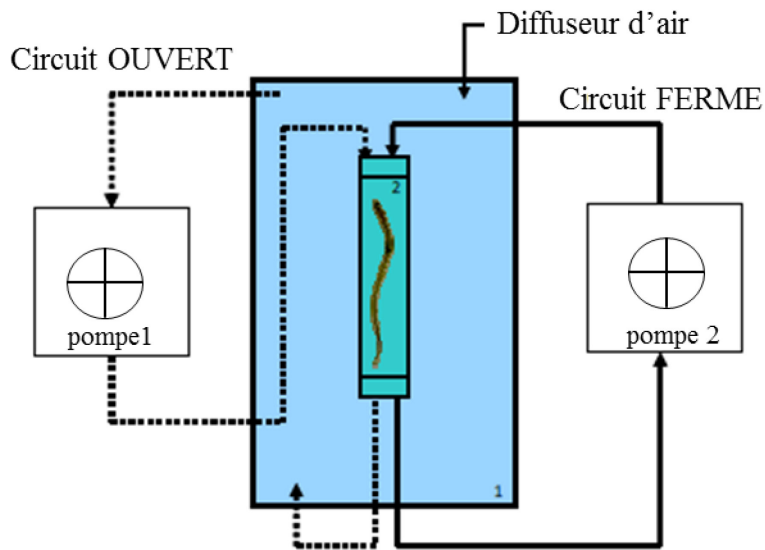


Figure 18 : Représentation schématique du fonctionnement d'une chambre de respirométrie. Pompe 1 : circuit ouvert-renouvellement de l'eau à partir du bac tampon (1) maintenue à saturation d'oxygène, pompe 2 : circuit fermé-circulation de l'eau dans la chambre (2).

Chaque jour, de 8 à 16 civelles ont été placées dans les chambres de respirométrie et lorsque le circuit était fermé à intervalle régulier, la diminution de la consommation d'oxygène, reflet de la consommation individuelle, a été mesurée. Les concentrations ont été exprimées en  $\text{mg dm}^{-3}$  après calibration des oxymètres grâce à des solutions d'oxygène connues (0% d'oxygène : sulfite de sodium ( $\text{Na}_2\text{SO}_3$ ) et 100% d'oxygène : eau de source saturée en oxygène ( $\text{Ca}^{2+}$  :  $7 \text{ mg L}^{-1}$  /  $\text{Mg}^{2+}$  :  $7,7 \text{ mg L}^{-1}$  /  $\text{Na}^+$  :  $9,9 \text{ mg L}^{-1}$  /  $\text{SO}_4^{2-}$  :  $14,4 \text{ mg L}^{-1}$  /  $\text{Cl}^-$  :  $4,3 \text{ mg L}^{-1}$  /  $\text{K}^+$  :  $1,9 \text{ mg L}^{-1}$  /  $\text{HCO}_3^-$  :  $61 \text{ mg L}^{-1}$  /  $\text{pH}=6,9$ )).

Chaque jour à 16h entre 8 et 16 civelles ont été réparties dans les chambres de micro-respirométrie et l'enregistrement a immédiatement débuté avec une mesure de consommation individuelle d'oxygène par minute. Après une période d'acclimatation de 16h, les 3 derniers

cycles d'enregistrements en circuit fermé ont été utilisés pour les mesures de métabolisme (Figure 19). Les individus ont ensuite été enlevés des chambres et trois nouveaux cycles de mesures ont été effectués pour corriger la mesure de la consommation d'oxygène liée au dispositif et à une éventuelle consommation bactérienne (Figure 19). Les civelles ont par la suite été anesthésiées (eugénol 1/10 dans de l'alcool 0,3 ml L<sup>-1</sup>), pesées et mesurées. Elles ont ensuite été conservées à -20°C afin de pouvoir déterminer sur chaque individu le contenu énergétique et la spéciation du Hg.

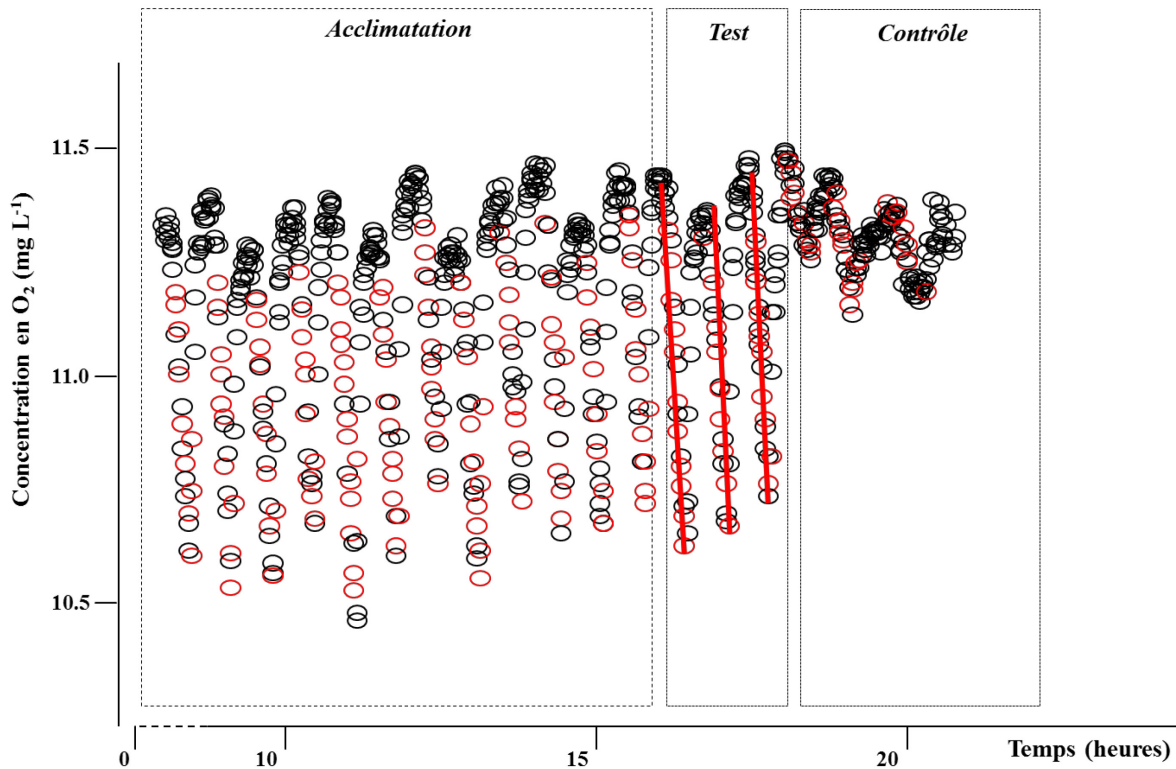


Figure 19 : Exemple d'enregistrement de la consommation d'oxygène pour une civelle. Les pentes représentées en rouge correspondent aux enregistrements réalisés en circuit fermé. La différence entre les pentes correspondant aux contrôles et aux tests permet de déterminer la consommation d'O<sub>2</sub>.

### Calcul du métabolisme

Le logiciel R (version R.2.14.) a été utilisé pour calculer le métabolisme standard. Un modèle linéaire généralisé (GLM) a permis de calculer la concentration individuelle d'oxygène de chaque civelle déduction faite de la concentration lors des phases de contrôles ([concentration d'O<sub>2</sub>~temps(h)\*session (test-contrôle à vide)]). Le métabolisme était supérieur à 0 si les pentes de la phase test étaient supérieures à la phase contrôle.

### 1.3. Etude de la contamination en MeHg par utilisation de traceurs isotopiques

Afin de pouvoir évaluer l'effet du MeHg, des expérimentations en aquarium utilisant un traceur isotopique du MeHg ont été menées. Cette méthodologie a permis de pouvoir travailler à des concentrations relativement faibles et d'évaluer non seulement la bioaccumulation du traceur par les organismes mais aussi sa métabolisation. La contamination des aquariums a été réalisée par ajout de 50 ng L<sup>-1</sup> à partir d'une solution de standard enrichi isotopiquement (<sup>201</sup>MeHg, ISC-Science, Oviedo) à 10 L d'eau de source. Les civelles ont ensuite été réparties dans les aquariums (n=12 ou n=24) et aucun autre ajout n'a été réalisé pendant les 11 jours du suivi de la contamination. Les expériences de contamination ont eu lieu à l'UMR ECOBIOP dans des salles thermo-régulées (11 ± 0,5°C) avec une luminosité constante de 7,25 μW cm<sup>-2</sup> afin de limiter tout stress pour les animaux. Chaque aquarium a été recouvert d'un support pour limiter tout risque de contamination extérieure (Figure 20). Les paramètres physico-chimiques (pH, T, O<sub>2</sub>) ont été quotidiennement relevés. L'eau a été aérée avec des petits tubes en polypropylène lorsque la saturation en oxygène était inférieure à 80% : l'utilisation de diffuseurs n'étant pas recommandé car ces derniers peuvent adsorber le MeHg présent dans les aquariums.



Figure 20 : Installation expérimentale utilisée pour la contamination des civelles.

## 2. Techniques analytiques

### 2.1. Analyse de spéciation du mercure par GC-ICPMS

Durant ces travaux, des analyses de spéciation pour doser les espèces mercurielles dans les civelles ont fait appel à l'utilisation d'espèces de Hg isotopiquement enrichies. Ces différentes espèces enrichies isotopiquement ont ainsi pu être utilisées comme :

- (1) étalon interne afin de déterminer les concentrations en MeHg et en Hg(II) dans les civelles issues du milieu naturel.
- (2) traceurs isotopiques pour la quantification et le suivi de la transformation du MeHg lors d'expérimentations sur des civelles en milieu contrôlé.

Utilisation de traceurs isotopiques comme étalon interne, dilution isotopique

Cette méthode a reposé sur l'ajout d'un traceur isotopique dans l'échantillon qui va ainsi se comporter comme un étalon interne qui subira les mêmes processus physico-chimiques que l'espèce naturelle. L'utilisation d'espèces isotopiquement enrichies a démontré de nombreux avantages dans les analyses de spéciation du Hg avec notamment l'amélioration de la justesse et de la précision des résultats puisqu'elle a permis de corriger des pertes ou des transformations des espèces chimiques qui ont pu se produire lors des différentes étapes du protocole analytique.

La méthode de quantification par dilution isotopique a permis de déterminer les concentrations des espèces mercurielles par détermination des rapports isotopiques entre la quantité connue de l'espèce enrichie isotopiquement et les abondances de chaque isotope naturel du même élément (Figure 21).

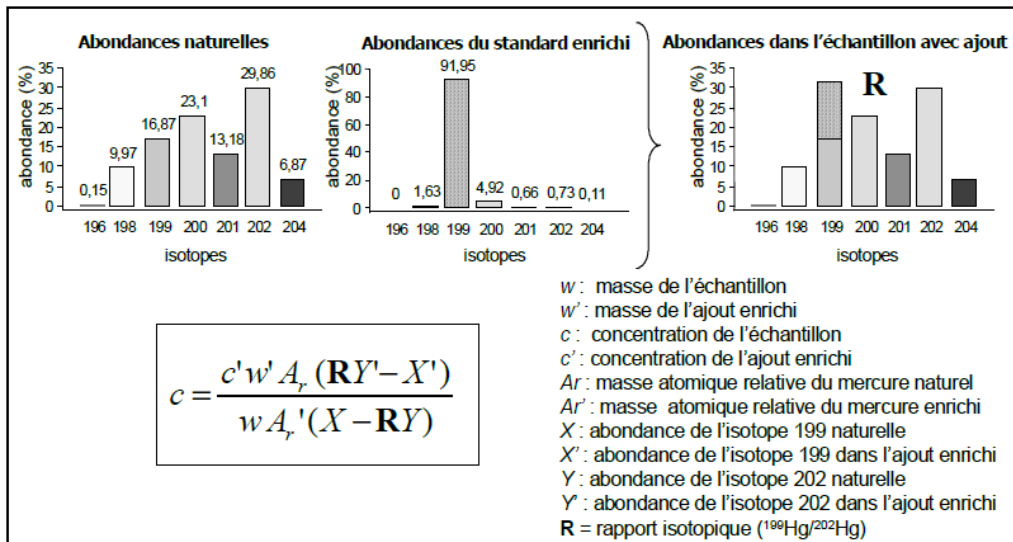


Figure 21 : Détermination de la concentration c d'un échantillon naturel par dilution isotopique après ajout de standard enrichi, cas du Hg(II), enrichi en <sup>199</sup>Hg(II) (d'après Monperrus, 2004).

Le protocole de préparation des échantillons utilisés pour les études des chapitres 1 et 3 est ici brièvement résumé (Figure 22). A partir d'échantillons lyophilisés (Crios, Cryotec) et broyés, l'extraction a été réalisée par digestion alcaline au TMAH (TetraMethylAmmonium Hydroxyde) à l'aide d'un système micro-onde ouvert (Discover System, CEM). L'extrait a ensuite été stocké à 4°C jusqu'à analyse. L'étape suivante de dérivation a permis de former des espèces mercurielles plus volatiles par propylation pour pouvoir être analysées en GC-ICPMS.

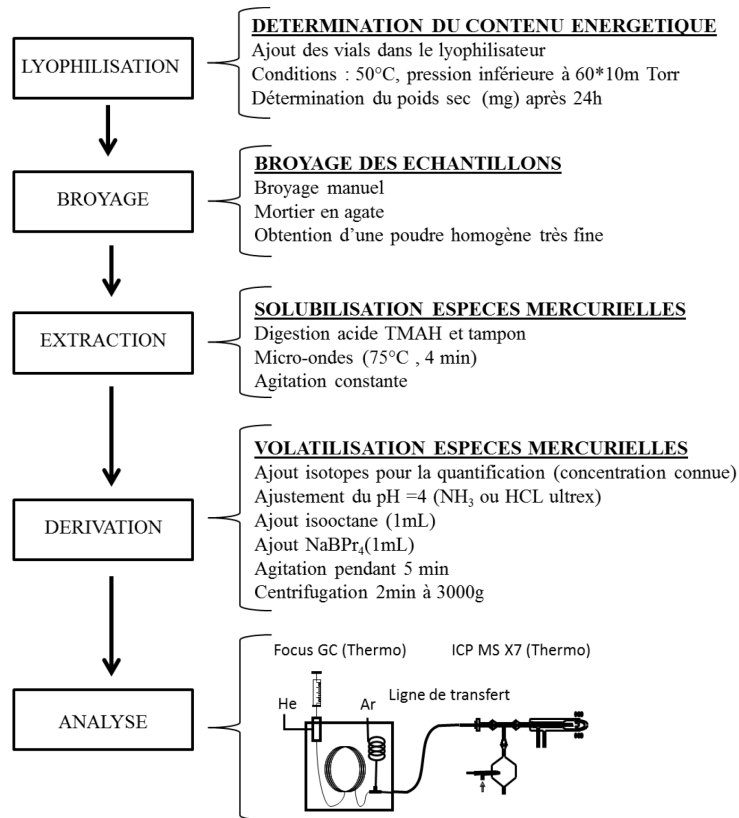


Figure 22 : Protocole de préparation des échantillons pour l'analyse de spéciation du Hg par dilution isotopique (à partir de la méthode de Navarro et al. 2013).

### Utilisation de traceurs isotopiques lors d'expérimentation en milieu contrôlé

Les traceurs isotopiques ont également pu être utilisés dans des études expérimentales afin de mimer la réactivité des composés et déterminer de façon spécifique et fiable leur devenir dans un écosystème ou dans un organisme. Les principaux avantages de ces traceurs ont dans un premier temps été de pouvoir les utiliser à des doses environnementales tout en ne modifiant pas le métabolisme des organismes. Ils ont également permis de pouvoir suivre des processus couplés pour différentes espèces chimiques d'un même élément.

Deux expériences en laboratoire ont donc étudié les processus de bioaccumulation et de transformation du MeHg après l'incubation de civelles avec du <sup>201</sup>MeHg marqué isotopiquement. Le processus de bioaccumulation et de méthylation du Hg(II) (<sup>199</sup>IHg) n'a pas été étudié dans ces travaux, une étude préliminaire ayant montré que la concentration de celui-ci était très faible à négligeable dans les civelles.

Le protocole de préparation des échantillons a été identique à celui utilisé lors des analyses par dilution isotopique (Figure 22) mis à part que la quantification des espèces du Hg 'spikées' et 'naturelles' va se faire par ajout d'une quantité connue de standard de

composition isotopique naturelle. La transformation du  $^{201}\text{MeHg}$  marqué isotopiquement fut observable à la fin de l'incubation des civelles après analyse au GC-ICPMS. Les concentrations des espèces 'naturelles' c'est-à-dire naturellement présentes dans l'organisme ( $\text{MeHg}$  et  $\text{Hg(II)}$ ) et les concentrations des espèces 'spikées' c'est-à-dire provenant du traceur isotopique ( $^{201}\text{MeHg}$  et  $^{201}\text{Hg(II)}$ ) ont été déterminées de façon précise par la méthode dite de dilution isotopique inverse (reversed isotope dilution) (Figure 23). Il a ensuite été possible de calculer le potentiel de déméthylation du  $\text{MeHg}$ .

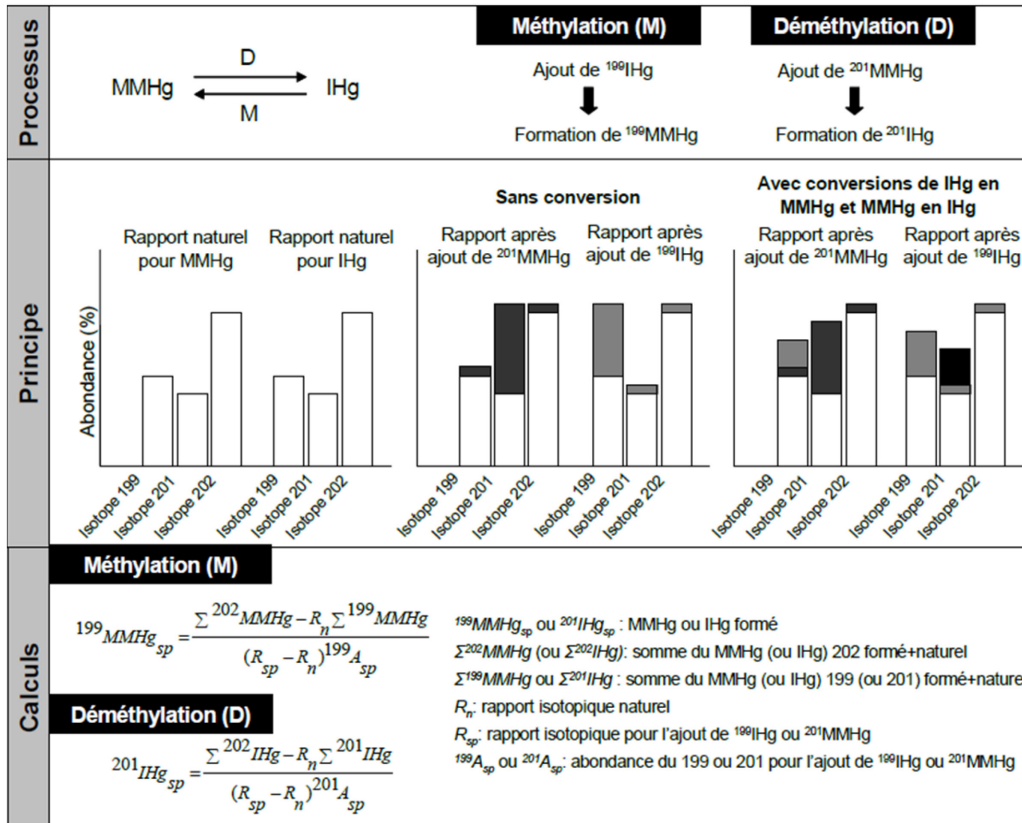


Figure 23 : Méthode de calculs permettant de déterminer les concentrations issues de la méthylation ou de la déméthylation par la technique de dilution isotopique inverse, d'après Monperrus, 2004.

### Analyse par GC-ICP-MS

Pour notre étude, l'analyse de spéciation a fait intervenir un couplage de chromatographie en phase gazeuse équipée d'une colonne capillaire (Focus GC, ThermoFinnigan) et un spectromètre de masse à plasma induit (ICP-MS X7, ThermoElemental) via une ligne de transfert capillaire (Figure 22).

Les paramètres utilisés pour l'ensemble des analyses ont été résumés dans le tableau 8 ci-après.

Tableau 8 : Paramètres d'utilisation du GC-ICPMS lors du dosage des espèces mercurielles.

<b>Paramètres Focus GC (Thermo)</b>	
Colonne	MXT-1
Température de l'injecteur	250°C
Programme de température	commence 80°C pendant 0,5 min, 60° C min <sup>-1</sup> jusqu'à 250°C, et maintien pendant 1 min.
Débit du gaz vecteur	25 ml min <sup>-1</sup>
<b>Ligne de transfert</b>	
Température de la ligne de transfert	280°C
Longueur de la ligne de transfert	50 cm
<b>Paramètres ICP-MS X7 (Thermo)</b>	
Puissance	1240 W
Flux du gaz, plasma	14 L min <sup>-1</sup>
Flux du gaz auxiliaire	0,6 L min <sup>-1</sup>
Flux du gaz nébulisation	0,3 L min <sup>-1</sup>
Temps de résidence	20 ms for m/z Hg 199, 200, 201, 202

## 2.2. Approche génétique : PCR quantitative en temps réel

### Préambule

Les civelles préalablement conservées à -80°C sous atmosphère d'azote ont été individuellement déposées sur de la glace dans une coupelle de pesée puis découpées en tronçons les plus fins possibles à l'aide de scalpel. Une fois l'obtention d'un échantillon le plus homogène possible, celui-ci a été réparti dans deux eppendorfs l'un pour le dosage des métallothioénines et l'autre pour l'analyse de la réponse génétique.

### Extraction des ARN totaux et rétro transcription (RT)

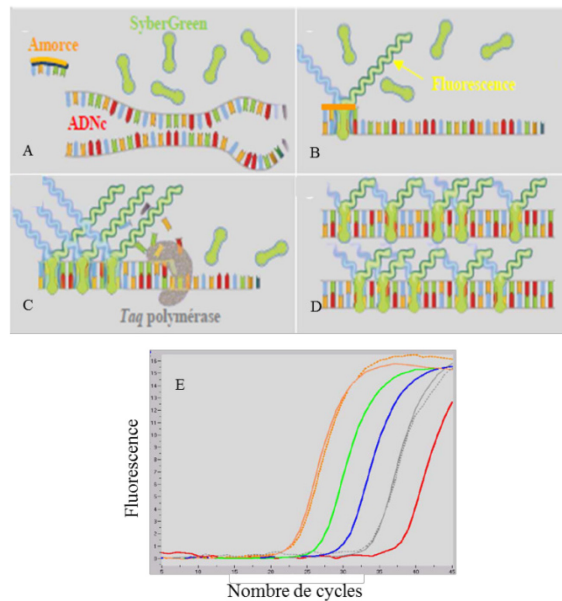
Pour éviter toute contamination par des RNAses (dégradation de l'ARN), le matériel utilisé a été décontaminé et autoclavé. Dans un premier temps, le kit 'Absolutely RNA extraction' (Stratagen Agilent) a servi à extraire les ARN totaux, puis le kit 'First strand cDNA synthesis' (Stratagen Agilent) permettant de synthétiser de l'ADN à partir des ARNs a été utilisé. Succinctement, 20 à 40 mg de tissus ont été broyés dans du tampon de lyse (thiocyanate de guanidine et mercapto-éthanol). L'ajout de phénol-chloroforme-alcool isoamylique et d'éthanol glacé à 75% a permis l'élimination des protéines hydrophobes et amphiphiles et des acides nucléiques. Après la dégradation de l'ADN, l'ARN a pu être récupéré par lavages



successifs de solutions salées et ajout de tampon d'éluion. Un mélange contenant 5 µg d'ARN totaux, 1 µL d'oligos dT, 1µL d'hexaprimer, 0,8 µL de dNTPs (10 mM) et 2 µL de tampon d'activité ont été chauffés à 65°C pendant 5min puis à 45°C en fin de cycle (thermocycleur eppendorf). Par la suite, 0,5 µL de RNase block et 1 µL de Reverse Transcriptase (RT) ont été ajoutés au mix pour un nouveau cycle de 1h à 42°C. Les ADNc synthétisés ont ensuite été stockés à -20°C jusqu'à leur utilisation.

### PCR quantitative en temps réel

La PCR quantitative a été utilisée pour évaluer l'effet de la contamination sur le niveau d'expression de certains gènes et ainsi permettre de suivre la production d'ARNm d'un gène à un instant donné. En effet, au contraire de la PCR 'classique', la PCR quantitative a permis la détection et la quantification de produits amplifiés au cours d'un cycle de réaction. Un fluorophore, dans notre cas le Sybergreen, va s'intercaler entre les bases d'une séquence d'ADN double brin et devenir fluorescent. L'intensité lumineuse émise, mesurée à 530 nm, va être proportionnelle au nombre de copies du fragment amplifié (Figure 24).



- A: Dénaturation des doubles brins d'ADN (95°C)
- B: Fixation des amorces, intercalation du SyberGreen et émission de fluorescence (55°C)
- C: Elongation par la Taq polymérase (72°C)
- D: Augmentation de l'émission de la fluorescence proportionnelle aux nombres de copies produites
- E: exemples de résultats : évolution de la fluorescence en fonction du nombre de cycles d'amplifications

**Figure 24 : Principe général de la PCR quantitative en temps réel (schéma modifié de la documentation de l'appareil LightCycler, Roche).**

L'appareil utilisé pour l'ensemble des analyses était le Mx3000P (Stratagene). Ce thermocycleur est muni d'un spectrophotomètre qui a mesuré la fluorescence émise pour chaque étape d'élongation de chaque échantillon. Un contrôle endogène, la *β-actine*, a systématiquement été amplifié en parallèle. Ainsi pour chaque échantillon, le nombre de

copies d'ADNc du gène étudié a été normalisé par rapport au nombre de copies codant pour le gène de la *β-actine*. L'ensemble des gènes étudiés au cours de ce travail est présenté dans le tableau ci-dessous (Tableau 9).

**Tableau 9 : Caractéristiques des gènes utilisés lors de la Q-PCR.**

<b>nom gène</b>	<b>fonction</b>	<b>N° accession GENE BANK</b>	<b>Primer(5'-3')</b>
<i>β-actin</i>	gène du cytosquelette	DQ493907	CAGCCTTCCTTCCTGGGT <sup>a</sup> AGTATTTGCGCTCGGGT <sup>b</sup>
<i>cox1</i>	sous unité de la cytochrome c oxydase	NC006531	TAGAGGCCGAGCTGG <sup>a</sup> GGGAGTTTGGTACTGTGTAAT <sup>b</sup>
12s	sous unité de l'ARN ribosomique	AF266495	ACCCGTGAGAATGCCCT <sup>a</sup> GTGGCTGGCAGGTT <sup>b</sup>
<i>sod2</i>	superoxyde mitochondriale	DQ493909	AGAAGCTGAGGGAGAAGATGT <sup>a</sup> GGAGAGGAATAAGACCTGTGGTT <sup>b</sup>
<i>cat</i>	catalase	DQ493908	AGCAACCGATCAAATGAAATTATGG <sup>a</sup> CAGCTCCCTTGGCGT <sup>b</sup>
<i>gst</i>	detoxication cellulaire	ABY47336	CAGTCAAAGGCAGATGTGGTGC <sup>a</sup> TTGCCATTGATGGGCAGTTTCTTGAAGTT <sup>b</sup>
<i>mt1</i>	gène de la métallothionéine	DQ493910	TGCACTACGTGTAAGAAAAGCTG <sup>a</sup> ACACATACAATAAACCAACACAAATGA <sup>b</sup>

A partir des ADNc rétro-transcrit, 10 µL du kit 'Brilliant III SYBR® Green QPCR Master Mix' (Stratagene, Agilent), 2 µL of d'amorces (sens et anti-sens) à 300 nM chacune, 7µL d'eau ultra-pure, 1 µL d'ADNc ont été ajoutés dans chaque puit des plaques à PCR. Le programme thermique utilisé présentait une première étape d'activation de l'enzyme (10 min à 95° C) suivi de l'amplification de 40 cycles (95°C, 30s ; 60°C, 5s ; 72°C, 30s). En fin de réaction, chaque courbe de fusion a été analysée pour vérifier la spécificité de la PCR et chaque température de fusion (T<sub>m</sub>) a été calculée. Cette dernière a été déterminée par le Mx3000P en analysant la décroissance de la fluorescence au cours d'un cycle de température allant progressivement de 60 à 95°C par pas de 0,5°C.

### 2.3. Dosage des métallothionéines

#### Principe

Le dosage des métallothionéines (MTs) reposait sur l'adaptation de la méthode de saturation du Hg(II) de Dutton et al. (1993) avec le remplacement du <sup>203</sup>Hg par du Hg(II) froid plus facilement manipulable (Baudrimont et al. 1997). Les MTs sont des protéines de faible poids moléculaire et riches en cystéines (SH) ce qui leurs confèrent la propriété de séquestrer jusqu'à sept cations métalliques divalents selon une échelle d'affinité. Vasák (1991) a classé

l'affinité de ces métaux pour les résidus cystéines des MTS selon l'ordre suivant : Hg(II)>>Cu(I), Ag(I), Bi(III)>>Cd(III)>Pb(II)>Zn(I)>Co(II)>Fe(II). Le Hg a présenté la plus forte affinité pour les MTs, s'il est ajouté en excès dans l'échantillon car il va se substituer aux autres métaux en occupant l'ensemble des sites de fixation. Le principe général repose donc sur le dosage du Hg séquestré après purification, saturation de ces protéines et élimination du Hg en excès.

Préparation des échantillons et dosage au spectrophotomètre d'absorption atomique :

Les échantillons de civelles dont le poids frais était compris entre 70 et 90 mg ont suivi le protocole présenté en Figure 10. Succinctement, les échantillons ont été broyés (ultra-turrax, T, IKA) dans du tampon tris sous atmosphère d'azote (limite la formation de ponts disulfures empêchant la séquestration des métaux) et dans de la glace (limite l'action des protéases) puis ont été centrifugés à 20 000 g à 4°C pendant 1h. Le surnageant a ensuite été saturé en Hg pendant 10 min avec l'ajout de Hg(II) à 50 mg L<sup>-1</sup> et d'acide trichloracétique à 10%. L'excès de Hg a été éliminé par ajout de 400 µL d'une solution d'hémoglobine de porc lyophilisé à 25 mg Hb mL<sup>-1</sup> dans du Tris à 30 mM (pH = 8,2 ; 20°C). Les complexes Hb-Hg ont rapidement été formés, précipités par les conditions acides du milieu et séparés du mélange par centrifugation à 20 000 g pendant 20 min. Le surnageant qui contenait les MTs saturées a ensuite été prélevé, pesé et conservé à 4°C jusqu'au dosage par spectrophotomètre d'absorption atomique (AMA 254, LECO) (Figure 25). Les échantillons liquides (100 µL) ont été introduits dans le AMA 254 (LECO) à l'aide d'un passeur automatique de nacelles (ASS 254). Après différents procédés de transformation, le Hg gazeux, entraîné par un flux d'oxygène vers les cellules de lecture, a alors été lu à 253,65 nm. Cet appareil possédait une limite de détection de 0,01 ng Hg par échantillon.

Pour chaque échantillon, ces préparations ont été réalisées en dupliquât pour s'assurer de la reproductibilité de la méthode. Par ailleurs, afin de vérifier la validité de la méthode, trois échantillons 'témoin' (200 µL de tampon, 200 µL de la solution de Hg(II), 400 µL de la solution d'hémoglobine de porc) ainsi que trois échantillons 'contrôle' contenant une solution purifiée de MT de foie de lapin (10 µg mL<sup>-1</sup>) ont subi parallèlement le même protocole (Figure 25).

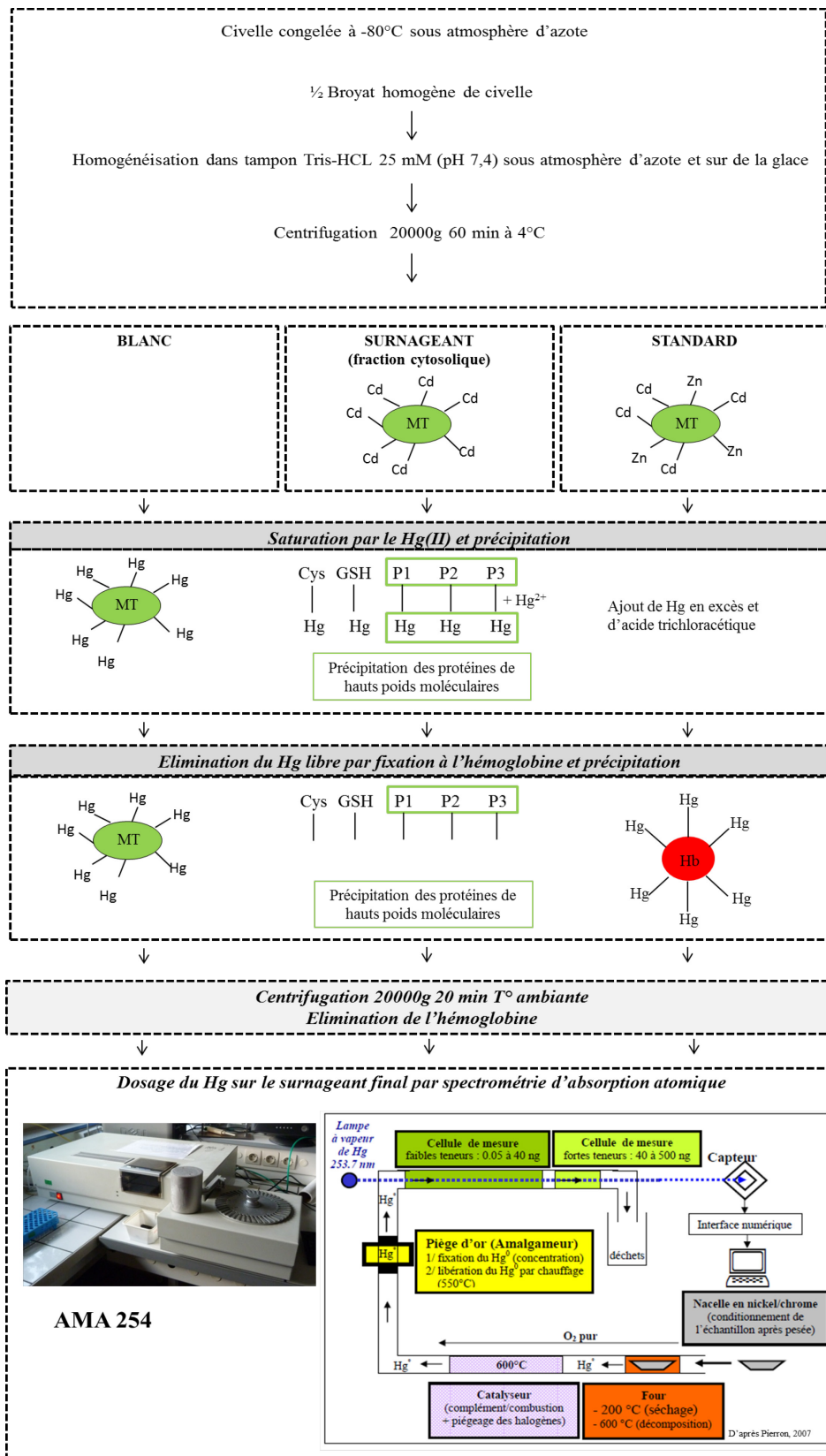


Figure 25 : Principe de dosage des métallothioénines.

## Références bibliographiques

Bardonnet A, Dasse S, Parade M, Heland M. Influence de l'alternance jour/nuit sur les déplacements de civelles en fluvarium. Bull Francais Pêche Piscic. 2003. (368):9–20.

Baudrimont M, Metivaud J, Maury-Brachet R, Ribeyre F, Boudou A. Bioaccumulation and metallothionein response in the asiatic clam (*Corbicula fluminea*) after experimental exposure to cadmium and inorganic mercury. Environ Toxicol Chem. 1997. 1;16(10):2096–105.

Bolliet V, Lambert P, Rives J, Bardonnet A. Rhythmic swimming activity in *Anguilla anguilla* glass eels: Synchronisation to water current reversal under laboratory conditions. J Exp Mar Biol Ecol. 2007. 344(1):54–66.

Bureau Du Colombier S, Bolliet V, Lambert P, Bardonnet A. Energy and migratory behavior in glass eels (*Anguilla anguilla*). Physiol Behav. 2007. 92(4):684–90.

Dutton MD, Stephenson M, Klaverkamp JF. A Mercury saturation assay for measuring metallothionein in fish. Environ Toxicol Chem. 1993. 1;12(7):1193–202.

Geffroy B, Bardonnet A. Differential effects of behaviour, propensity to migrate and recruitment season on glass eels and elvers' growing performance: Young eel behaviour and growth pattern. Ecol Freshw Fish. 2012. 21(3):469–82.

Monperrus M. Utilisation de traceurs isotopiques stables pour la spéciation du mercure et des butylétains application à l'étude de la biométhylation du mercure dans les environnements aquatiques. Université de Pau et des Pays de l'Adour; 2004.

Navarro P, Clemens S, Perrot V, Bolliet V, Tabouret H, Guérin T, Monperrus M, Amouroux D. Simultaneous determination of mercury and butyltin species using a multiple species-specific isotope dilution methodology on the European, *Anguilla anguilla* glass eel and yellow eel. Int J Environ Anal Chem. 2013. 93(2):166–82.

Régnier T, Bolliet V, Labonne J, Gaudin P. Assessing maternal effects on metabolic rate dynamics along early development in brown trout (*Salmo trutta*): an individual-based approach. J Comp Physiol [B]. 2010. 180(1):25–31.

Vasák M. Metal removal and substitution in vertebrate and invertebrate metallothioneins. Methods Enzymol. 1991. 205:452–58.

Lors de la migration estuarienne, les civelles ne s'alimentent pas ou peu (Bardonnnet et Riera 2005) et leurs réserves énergétiques peuvent donc rapidement devenir un facteur limitant. Par ailleurs, leur présence dans l'estuaire peut les exposer à de nombreux contaminants via les rejets urbains, les industries, etc. et ainsi potentiellement augmenter leurs dépenses énergétiques via la mise en place de processus de détoxification par exemple. Dans l'estuaire de l'Adour (notre zone d'étude), de précédents travaux ont pu mettre en évidence des sources chroniques de MeHg, notamment dû à la présence de zones à fort potentiel de méthylation (Stoichev et al. 2004, 2006). Cependant, le rôle de ce MeHg sur les civelles traversant l'estuaire de l'Adour n'a jamais été étudié.

Cette étude a donc été réalisée afin de comparer les niveaux de concentrations en MeHg de civelles capturées en entrée (Moliets, zone marine située à 40km de l'embouchure de l'estuaire) et en milieu d'estuaire (Urt, 21km en amont de l'embouchure de l'estuaire) et ce, sur cinq années d'échantillonnage entre 2004 et 2012. Les fluctuations temporelles du MeHg dans les civelles de Moliets et Urt ont également été déterminées sur cinq années d'échantillonnage entre 2004 et 2011. La fluctuation saisonnière des concentrations en MeHg a pu être analysée uniquement à Moliets pour l'année 2009-2010. Par ailleurs, l'impact du MeHg a été étudié sur le comportement migratoire des civelles sur dix échantillonnages réalisés entre 2004 et 2012. Les individus répondant au signal crépusculaire ont été désignés comme ayant un fort potentiel de migration ('High') et celles n'y répondant pas comme ayant un faible potentiel de migration ('Low').



# *CHAPITRE 1*

---





# Etat des lieux de la concentration en MeHg des civelles d'anguille européenne (*Anguilla anguilla*) dans l'estuaire de l'Adour

## **Article 1: Spatial and seasonal variations of methylmercury in European glass eels (*Anguilla Anguilla*) in the Adour estuary (France) and relation with their migratory behavior**

(Accepté dans Environmental Science and Pollution Research)

DOI/10.1007/s11356-015-4303-3

**Julie Claveau<sup>a,b</sup>, Mathilde Monperrus<sup>c</sup>, Marc Jarry<sup>a,b</sup>, Herve Pinaly<sup>c</sup>, Magalie Baudrimont<sup>d</sup>, Patrice Gonzalez<sup>d</sup>, David Amouroux<sup>c</sup>, Agnès Bardonnat<sup>a,b</sup>, Valérie Bolliet<sup>a,b</sup>**

<sup>a</sup> INRA, UMR 1224 Ecobiop, Aquapôle, 64310 Saint Pée sur Nivelle, France

<sup>b</sup> Université de Pau et des Pays de L'Adour, UMR 1224 Ecobiop, UFR Sciences et Techniques côte Basque, Anglet, France

<sup>c</sup> Laboratoire de Chimie Analytique Bio-Inorganique et Environnement, Institut Pluridisciplinaire de Recherche sur l'Environnement et les Matériaux, UMR 5254 CNRS, Université de Pau et des Pays de l'Adour, Hélioparc Pau Pyrénées, 2 av. P. Angot, 64053 9 Pau cedex 9, France

<sup>d</sup> Université de Bordeaux, UMR 5805 EPOC, team Aquatic Ecotoxicology, Place du Dr Peyneau, 33120 Arcachon, France

### Résumé en français

Le recrutement des civelles d'anguille européenne (*Anguilla anguilla*) a diminué de façon significative depuis le début des années 1980. De par le long cycle de vie de l'anguille, ses différents habitats (benthiques /démersaux) et sa forte teneur en lipides, cette espèce peut accumuler des concentrations élevées de contaminants, mais les données concernant les civelles sont encore rares. Cette étude fournit des données originales sur les concentrations en méthylmercure (MeHg) dans des civelles à l'échelle spatiale (mer et estuaire), annuelle et saisonnière. La relation entre les concentrations en MeHg dans les civelles et leur propension à migrer dans l'estuaire a également été étudiée. Les données de MeHg ont été individuellement reliées à la condition énergétique des civelles, estimée par le poids sec. Le comportement migratoire étudié en structure expérimentale a été lié à l'échelle individuelle à la concentration en MeHg et au poids sec des civelles. Les civelles marines et estuariennes ont été capturées de 2004 à 2011. Il y avait une forte corrélation inverse entre les concentrations en MeHg et le poids sec des civelles. Les concentrations en MeHg ont augmenté dans les civelles marines et estuariennes de 2004 à 2009 et de 2004 à 2010, respectivement. Puis en 2011, les concentrations dans les deux groupes ont diminué. A l'échelle saisonnière, les concentrations en MeHg étaient plus élevées à la fin de la saison de pêche (Avril). La

bioaccumulation du MeHg est susceptible de résulter de différentes sources, mais l'absence de différences significatives entre les civelles marines et estuariennes suggère que la contamination directe lors de la migration estuarienne est faible. D'autres sources telles que le transfert maternel ou la contamination océanique sont discutées.

## **Abstract**

Overall recruitment of European glass eels (*Anguilla anguilla*) has decreased significantly since the early 1980s. Due to their long life cycle, benthic/demersal habits and high lipid content, eels might accumulate high concentrations of contaminants but data concerning glass eels are still scarce. This study provides original data on methylmercury (MeHg) concentrations in glass eels at spatial (marine and estuarine), annual and seasonal scales. The relationship between MeHg concentrations in glass eels and their propensity to migrate up estuaries was also investigated. MeHg data were individually related to the eels' energetic condition which was estimated by dry weight. Glass eel migratory behaviour was investigated in an experimental flume and related to the MeHg concentration and dry weight at the individual scale. Marine and estuarine glass eels were caught from 2004 to 2011. There was a strong inverse correlation between MeHg concentrations and dry weight. MeHg concentrations increased in marine and estuarine glass eels from 2004 to 2009 and from 2004 to 2010, respectively, and then both groups decreased in 2011. On a seasonal time scale, MeHg concentrations were higher at the end of the fishing season (April). MeHg bioaccumulation is likely to result from different sources but the lack of significant differences between marine and estuarine glass eels suggests that direct contamination during estuarine migration is low. Other sources such as maternal transfer or oceanic contamination are discussed.

## **1. Introduction**

Since the early 1980s, there has been a significant decline in the recruitment of European (*Anguilla anguilla*), Japanese (*Anguilla japonica*) and American eels (*Anguilla rostrata*) throughout most of their distribution (Bonhommeau et al. 2008; Castonguay et al. 1994; Feunteun 2002; Stone 2003). The European eel is now threatened by extinction and considered to be below its safe biological limit (Dekker 2002). According to the literature,

several possible causes of the decrease of eel stocks have been considered: overfishing, changes in oceanic conditions due to global warming, habitat loss, parasites, infectious diseases and pollutants (e.g Haenen et al. 1994; Miller et al. 2009; Pierron et al. 2008; Van Ginneken et al. 2009). Because of their unusually long life cycle, benthic/demersal habits and high lipid content, eels might accumulate relatively high tissue concentrations of pollutants including pesticides (Byer et al. 2013), polychlorinated biphenyls (Maes et al. 2008) and heavy metals such as mercury (Durrieu et al. 2005; Esteve et al. 2012). The European eel reproduces in the Sargasso Sea and the leptocephalus larvae drift with the Gulf Stream to join the continental shelf where they metamorphose and are then referred to as glass eels. The glass eels migrate up estuaries to join rivers for a long period of growth and depending on the estuary, they can spend from one to several weeks in an aquatic ecosystem often exposed to anthropogenic discharges due to extensive urban development. Glass eels feed either not at all or very little during migration (Bardonnnet and Riera 2005) and are mainly passively exposed to pollutants. However, they exhibit high lipid content and when fat is mobilized for migration they can also bioconcentrate pollutants previously accumulated by the leptocephalus larvae during oceanic migration and/or via maternal transfer.

Bioaccumulation and/or concentration of pollutant might affect the propensity of glass eels to migrate, possibly due to a direct toxic effect, but also indirectly by affecting their energetic status. Previous studies using otolith microchemistry in yellow eels reported that some glass eels do not migrate to freshwater for growth and complete their life cycle between marine and brackish waters (Daverat et al. 2005; Tsukamoto et al. 1998; Tsukamoto et al. 2002; Tzeng et al. 2000). These different patterns of migration would depend, at least in part, on the glass eels' energy stores (Bureau du Colombier et al. 2007; Edeline 2007). Although mechanisms of toxicity of pollutants in fish are far from being fully understood, the energetic cost inherent to the detoxification processes might change the behavioural performance of fish (Correia et al. 2007).

Mercury and especially methylmercury (MeHg) are highly toxic compounds that can accumulate in eel tissue through direct contact with polluted environments and/or via the food web (Arleny et al. 2007; Redmayne et al. 2000). The sources of Hg in coastal environments include atmospheric deposition (Mason et al. 1997), river input due to erosion (Coquery et al. 1997; Cossa and Ficht 1999; Horvat et al. 1999) and/or anthropogenic point sources (Cossa and Ficht 1999). The Adour estuary is affected by increasing urban development and industrial activities downstream, as well as agriculture and fishery activities upstream. Relatively high concentrations of MeHg have been measured in the sediment, probably

because of a high methylation potential resulting from the activity of sulphate reducing bacteria (Stoichev et al. 2004, 2006; Dias 2008; Duran et al. 2008). In addition, bioaccumulation and biomagnification of MeHg have been observed in the benthic macrofauna (Monperrus et al. 2005) and in yellow eels collected in the Adour estuary (Arleny et al. 2007; Navarro et al. 2013). In glass eels, Navarro et al. (2013) reported an accumulation of MeHg related to weight, with higher concentrations observed in smaller individuals. The weight in glass eels is known to show seasonal fluctuation, probably because of different trophic resources during the oceanic migration of the leptocephalus larvae, but seasonal variations in MeHg concentrations have never been investigated. Several authors have reported consistent or distinct seasonal and annual variations of mercury concentrations in fish depending on species and sites (Eagles-Smith and Ackerman 2009; Greenfield et al. 2005, 2010, 2013b; Zhang et al. 2012). These variations might result from changes in MeHg production, different growth patterns or behaviour, temporary anthropogenic activities, and/or climatic events.

The aim of this paper was to determine MeHg concentrations in glass eels caught in the Adour estuary (south west France) in order to: (1) evaluate the potential relation between migratory behaviour, energy stores and MeHg content; (2) investigate the differences between estuarine and marine capture locations; (3) describe seasonal and interannual trends over an 8 year period.

## **2. Materials and methods**

### **2.1. Origin and handling of fish**

The study was carried out in the Adour estuary, located in the south west of France along the Bay of Biscay (Figure 26). This estuary (43° 30'N, 1° 30'W) is 25 km long and covers the complete estuarine mixing zone, 200 to 400 m wide with an average depth of 5 to 12 m. The mean annual water discharge is about 300 m<sup>3</sup> s<sup>-1</sup> and reaches 2000 m<sup>3</sup> s<sup>-1</sup> during brief flood events (Sharif et al. 2014).

Glass eels were caught by night during flood tide at two stations (Figure 26, Table 10): the marine station (Moliets, 43° 55'N, 1° 23'W), located 40 km north of the mouth of the Adour estuary and the estuarine station (Urt, 43° 28'N, 1° 17'W), situated 21 km from the mouth of the Adour estuary, half way between the estuary mouth and the upstream limit of tidal influence. Sampling was undertaken throughout the fishing season (November to April) from 2004 to 2012. In Moliets, fishing was carried out using a hand net while in Urt, glass eels were caught by commercial fishermen by pushing a net with a boat.

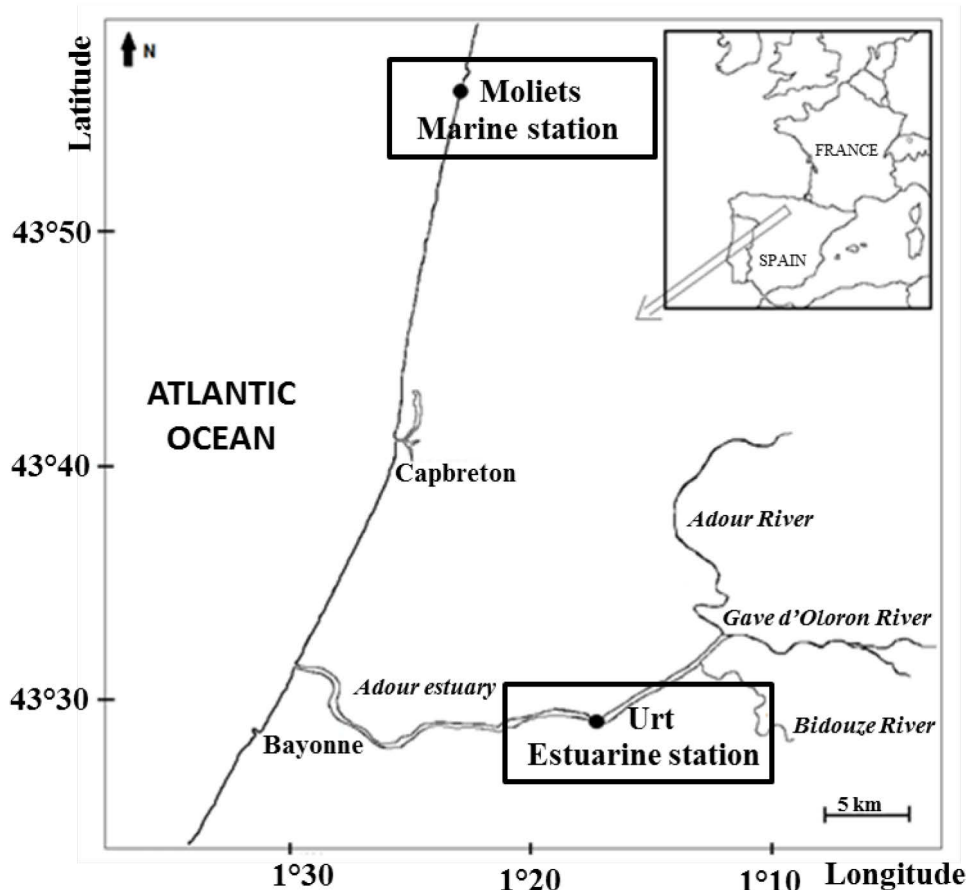


Figure 26: Map of the sampling sites.

After collection, glass eels were brought to the laboratory and kept in a tank. The following morning, groups of ten glass eels were anesthetized by immersion in a solution of  $0.036 \text{ ml L}^{-1}$  clove oil, measured, weighed (Sartorius CP 153 balance,  $\pm 1 \text{ mg}$ ) and then frozen at  $-20^{\circ}\text{C}$  until analysis. To study the propensity to migrate, 400 to 700 glass eels were installed in an experimental flume just after the capture and while waiting to be sorted.

## 2.2 Determination of glass eel propensity to migrate

The relationship between the propensity to migrate and MeHg accumulation in glass eels was evaluated in 2004-2006, 2011, and 2012 using an experimental flume as described by Bureau du Colombier et al. (2007). The flume is an annular structure composed of two parallel sections 10 m long. 400 to 700 glass eels were released in each section and subjected to a light / dark cycle (10.5 hrs of light and 13.5 hrs of dark separated by 30 mins of dawn and dusk) and a constant water current. Traps were positioned upstream and downstream of the two sections and an artificial shelter ( $1 \text{ m}^2$ ) was placed in the centre of each section. In the wild, glass eels migrate mainly during the night, and dusk represents one of the main

environmental cues triggering this behaviour (Gandolfi et al. 1984; Gascuel 1986). Thus, in our experimental installation, glass eels responding to the decrease in light intensity at dusk by ascending in the water column and moving with the flow were trapped downstream and considered as having a high propensity to migrate ('migrant'). Glass eels, still sheltering at the end of the 24 hr catching period, were considered as having a low propensity to migrate and were called 'non migrant'. After sorting, 10 migrant and 10 non migrant glass eels for each year (n = 100 total) were randomly sampled and anesthetized (as described in 2.1) to measure weight and length. There were then kept at -20°C until mercury speciation analysis.

**Table 10: Overview of samples and measurements (mean  $\pm$  standard deviation, nd=no determined)**

Date (DD/MM/YYYY)	Season	Station	Potential of migration	N	Length (mm)	Dry weight (mg)	Wet weight (mg)	[MeHg] (ng Hg g <sup>-1</sup> dw)	[Hg(II)] (ng Hg g <sup>-1</sup> dw)
01/04/2004	end	estuarine	high	10	70 $\pm$ 4	60 $\pm$ 15	287 $\pm$ 47	132 $\pm$ 42	6 $\pm$ 2
01/04/2004	end	estuarine	low	8	69 $\pm$ 4	55 $\pm$ 19	277 $\pm$ 80	124 $\pm$ 20	6 $\pm$ 2
13/12/2004	beginning	estuarine	high	10	70 $\pm$ 4	70 $\pm$ 12	320 $\pm$ 59	126 $\pm$ 27	4 $\pm$ 3
13/12/2004	beginning	estuarine	low	10	73 $\pm$ 4	75 $\pm$ 16	374 $\pm$ 69	113 $\pm$ 25	3 $\pm$ 2
13/12/2004	beginning	marine	high	10	74 $\pm$ 4	77 $\pm$ 17	369 $\pm$ 72	122 $\pm$ 22	10 $\pm$ 6
13/12/2004	beginning	marine	low	10	72 $\pm$ 5	77 $\pm$ 17	369 $\pm$ 76	112 $\pm$ 20	4 $\pm$ 2
07/12/2005	beginning	estuarine	high	10	75 $\pm$ 4	81 $\pm$ 14	419 $\pm$ 85	161 $\pm$ 36	23 $\pm$ 4
07/12/2005	beginning	estuarine	low	10	74 $\pm$ 3	70 $\pm$ 12	398 $\pm$ 35	158 $\pm$ 34	25 $\pm$ 11
10/01/2006	middle	estuarine	low	10	74 $\pm$ 4	75 $\pm$ 18	361 $\pm$ 67	152 $\pm$ 31	26 $\pm$ 18
10/01/2006	middle	estuarine	high	10	70 $\pm$ 4	75 $\pm$ 13	330 $\pm$ 49	141 $\pm$ 35	13 $\pm$ 4
10/03/2006	end	estuarine	high	10	70 $\pm$ 5	45 $\pm$ 20	267 $\pm$ 58	286 $\pm$ 171	31 $\pm$ 12
10/03/2006	end	estuarine	low	10	70 $\pm$ 5	58 $\pm$ 31	282 $\pm$ 79	202 $\pm$ 97	27 $\pm$ 13
03/12/2008	beginning	marine	nd	10	74 $\pm$ 3	97 $\pm$ 14	392 $\pm$ 54	113 $\pm$ 28	18 $\pm$ 11
16/11/2009	beginning	estuarine	nd	10	71 $\pm$ 4	75 $\pm$ 10	331 $\pm$ 44	176 $\pm$ 33	26 $\pm$ 14
17/11/2009	beginning	marine	nd	10	71 $\pm$ 4	78 $\pm$ 17	329 $\pm$ 65	178 $\pm$ 34	23 $\pm$ 13
21/01/2010	middle	estuarine	nd	10	71 $\pm$ 3	68 $\pm$ 20	318 $\pm$ 64	197 $\pm$ 48	21 $\pm$ 6
14/01/2010	middle	marine	nd	10	73 $\pm$ 5	93 $\pm$ 23	375 $\pm$ 90	157 $\pm$ 32	15 $\pm$ 5
18/02/2010	middle	marine	nd	10	70 $\pm$ 3	75 $\pm$ 10	310 $\pm$ 43	141 $\pm$ 21	21 $\pm$ 12
21/02/2010	middle	estuarine	nd	10	69 $\pm$ 4	66 $\pm$ 16	305 $\pm$ 67	188 $\pm$ 44	23 $\pm$ 9
15/04/2010	end	marine	nd	10	65 $\pm$ 4	47 $\pm$ 14	240 $\pm$ 57	209 $\pm$ 71	37 $\pm$ 14
02/12/2011	beginning	marine	nd	10	74 $\pm$ 3	77 $\pm$ 12	361 $\pm$ 47	120 $\pm$ 26	13 $\pm$ 7
03/12/2011	beginning	marine	high	9	70 $\pm$ 4	63 $\pm$ 15	305 $\pm$ 64	149 $\pm$ 40	13 $\pm$ 5
03/12/2011	beginning	marine	low	10	72 $\pm$ 3	72 $\pm$ 12	346 $\pm$ 47	139 $\pm$ 31	15 $\pm$ 7
28/12/2011	beginning	estuarine	nd	10	71 $\pm$ 3	67 $\pm$ 16	342 $\pm$ 57	136 $\pm$ 37	8 $\pm$ 3
02/01/2012	middle	estuarine	high	10	69 $\pm$ 5	62 $\pm$ 19	297 $\pm$ 73	138 $\pm$ 30	9 $\pm$ 1
02/01/2012	middle	estuarine	low	10	69 $\pm$ 4	64 $\pm$ 16	299 $\pm$ 56	158 $\pm$ 40	11 $\pm$ 4
24/03/2012	end	marine	high	8	68 $\pm$ 4	46 $\pm$ 13	238 $\pm$ 59	157 $\pm$ 37	26 $\pm$ 5
24/03/2012	end	marine	low	9	66 $\pm$ 4	44 $\pm$ 12	226 $\pm$ 54	200 $\pm$ 62	12 $\pm$ 6
27/04/2012	end	estuarine	high	10	70 $\pm$ 3	43 $\pm$ 10	251 $\pm$ 50	229 $\pm$ 68	17 $\pm$ 7
27/04/2012	end	estuarine	low	10	67 $\pm$ 3	44 $\pm$ 8	246 $\pm$ 32	215 $\pm$ 55	29 $\pm$ 12

### 2.3. Mercury speciation analysis

Eight to ten individuals from each sampling event (Table 10) were placed in a freeze dried system for 24 hrs and then individually mashed using an agate mortar. Mercury speciation analysis (MeHg and Hg(II)) was performed for each individual according to the procedure described by Navarro et al. (2013). Each individual was submitted to microwave extraction using TMAH and derivatised by propylation. The microwave extraction conditions were 70°C for 4 minutes with stirring. Afterwards, the supernatant was transferred to a clean vial with a Teflon cap. Acetic acid-sodium acetate buffer (pH 3.9, 0.1 mol L<sup>-1</sup>) was added to 2 ml of the supernatant as well as 50 µL of 10 ng g<sup>-1</sup> isotopically enriched Hg solution (<sup>199</sup>IHg and <sup>201</sup>MeHg) and the pH was re-adjusted with ultrapure HCl. Propylation of the species was carried out by adding 1 ml of iso-octane and 1 ml of 1% (w/v) NaBPr<sub>4</sub> solution. The tube was immediately closed and shaken for 5 minutes. The organic phase was then transferred to an injection vial and kept at -20°C until analysis.

The simultaneous analysis of mercury species was performed by Gas Chromatography combined with an Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometer (GC-ICP-MS, Thermo Fisher, and Waltham, MA, USA) with parameters previously detailed by Navarro et al. (2013) and the quantification was carried out by species specific isotope dilution technique (Monperrus et al. 2005). All measurements were performed in duplicate and two blanks were run every 20 samples to control any contamination during the analytical protocol. Accuracy was assessed by analysing the Certified Reference Material DOLT-4 Dogfish liver (NRCC, Ottawa, Canada). Good agreement with certified values was obtained with recoveries of 114±10% and 93±9% for MeHg and Hg(II), respectively. Low detection limits were determined with 0.005 ng Hg g<sup>-1</sup> dw and 0.013 ng Hg g<sup>-1</sup> dw for MeHg and Hg(II), respectively. All concentrations were expressed in ng Hg g<sup>-1</sup> dry weight.

### 2.4. Statistical analysis

All statistical analyses were performed using R software (R.2.14.2) (R Core Team 2014). Means are given ± standard deviation. The relationship between MeHg concentrations and dry weight of glass eels was examined for marine and estuarine glass eels by simple linear regression. Because samples were collected at different periods, both within and between years, subsamples were used to study the temporal and seasonal fluctuations of MeHg concentration in estuarine and marine glass eels. All Hg data were log transformed prior to parametric statistical analyses, to achieve normally distributed residuals with homogeneous



variance. Annual differences in length were determined with one way analysis of variance (ANOVA), followed by all pair-wise multiple comparison procedures (Tukey test). Covariance models (ANCOVA) were used to test the effect of year, of season, of site, migratory behaviour and of dry weight in the response of MeHg concentrations. The interactions in the responses were also evaluated. Percentage of variance explained by a factor was calculated as:  $100 \frac{\text{Sums of squares of factor}}{\text{Sums of square total}}$ . A significance level ( $p < 0.05$ ) was employed for all the statistical analyses.

### 3. Results

Hg species concentrations in glass eels of the whole dataset ranged between 61 and 682 ng Hg g<sup>-1</sup>dw and between 1 and 106 ng Hg g<sup>-1</sup>dw for MeHg and Hg(II), respectively with mean values of 161±64 and 21±20 ng Hg g<sup>-1</sup>dw, respectively. The MeHg represented 90±7 % of the total mercury indicating that most of the Hg in glass eels is in the form of MeHg as reported by Navarro et al. (2013) in glass eels, by Arleny et al. (2007) in muscle tissue of yellow eels, and generally reported in others fish species (for review see Wiener et al., 2002).

#### 3.1. MeHg concentrations in marine and estuarine glass eels

MeHg concentrations in marine and estuarine glass eels collected during different seasons or years were plotted against eels' dry weights (Table 10, Figure 27), considered as a good proxy of their body conditions as it gave similar results to the condition factor (data not shown). MeHg concentrations and dry weights ranged from 78 to 335 ng Hg g<sup>-1</sup> dw and from 22 to 123 mg for marine glass eels (Figure 27a) and from 61 to 682 ng Hg g<sup>-1</sup> dw and 13 to 125 mg for estuarine glass eels (Figure 27b). Analysis of covariance indicated an effect of the site ( $p=0.001$ ) and of the dry weight ( $p<0.0001$ ) on log-transformed MeHg concentrations (Table 11a). However, only 2% of MeHg concentration variations were explained by the site (marine<estuarine) while 31% were explained by the dry weight (negative correlation). There was no interaction between the dry weight and the site ( $p=0.0687$ ). Concentration of MeHg was negatively correlated to the dry weight: the smallest individuals had the highest contamination levels for both marine and estuarine glass eels (simple linear regression,  $p < 0.0001$ ,  $R^2=0.31$  and  $p < 0.0001$ ,  $R^2= 0.33$  respectively).

As season and/or year might affect MeHg concentrations, the analysis was then conducted on marine and estuarine glass eels caught at the same periods (November 2009, December 2004

and 2011, January and February 2010 Table 11 b-g). When these data were pooled, a significant effect of the dry weight and the site was also observed on log-transformed MeHg concentrations ( $p < 0.0001$  and  $p = 0.0237$  respectively, Table 11b). The site explained 4% of MeHg concentration variations (marine < estuarine) and the dry weight 13% (negative correlation). The effect of weight was lower in this analysis than in the first one, probably because it did not include glass eels sampled at the end of the fishing season which present the lowest body weight and the best inverse relationships between MeHg and weight (compare Tables 10 and 11 and see 3.4). When each period of sampling was analyzed separately (Table 11c-g), the effect of dry weight was significant for four of the five sampling dates and explained from 23% to 50% of MeHg concentration variations. An effect of the site was significant in only two of the five sampling periods (January and February 2010), explaining 26% and 33% of MeHg concentration variations, respectively. There were no significant interactions between the site and the dry weight.

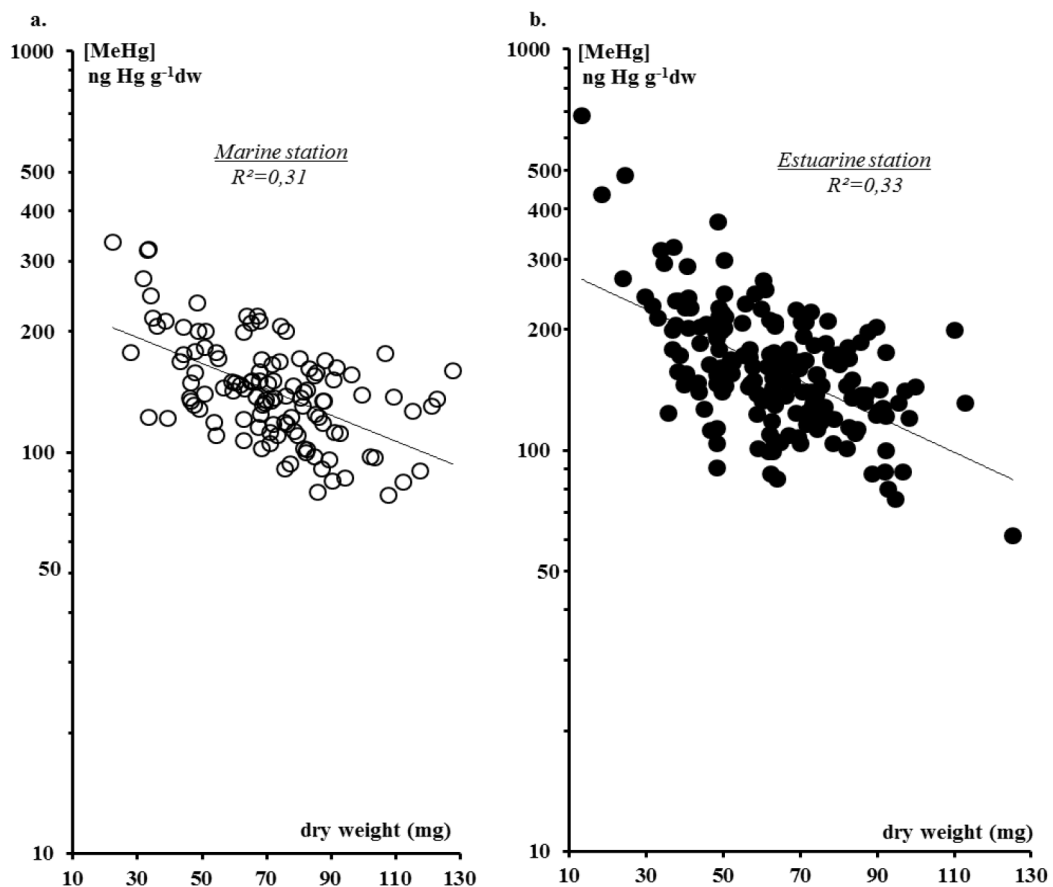


Figure 27: Relationship between dry weight (mg) and MeHg concentration (ng Hg g<sup>-1</sup> dw) in marine (a.) and estuarine (b.) glass eels. Data were combined from 2004 to 2012, n= 116 for marine glass eels and n=178 for estuarine glass eels (Table 10). Lines indicate regression slopes for log (MeHg) versus dry weight (dw).

**Table 11: Results of covariance analysis (Anova, type II) based on the linear model for explaining MeHg concentrations as a function of site (marine vs. estuarine) and dry weight %: percentage of variance explained by the factors. The direction of the effect is indicated only when the effect of the factor was significant.**

Factors	p-value	% variance	direction of the effect
<i>a. Dependant variable : MeHg concentration (data table 10, n= 294)</i>			<i>Model R<sup>2</sup> = 0.33</i>
Site	<b>0,0011</b>	2,5	marine < estuarine
Dry weight	<b>&lt;2.2.10<sup>-16</sup></b>	30,6	negative correlation
Site : Dry weight	0,0687	0,8	
<i>b. Dependant variable : MeHg concentration (data below pooled, n= 120)</i>			<i>Model R<sup>2</sup> = 0.17</i>
Site	<b>0,0237</b>	3,7	marine < estuarine
Dry weight	<b>3.037.10<sup>-5</sup></b>	13,1	negative correlation
Site : Dry weight	0,0756	2,2	
<i>c. Dependant variable : MeHg concentration (12/2004, n=40)</i>			<i>Model R<sup>2</sup> = 0.26</i>
Site	0,8128	0,1	
Dry weight	<b>0,0014</b>	24,6	negative correlation
Site : Dry weight	0,4023	1,5	
<i>d. Dependant variable : MeHg concentration (11/2009,n=20)</i>			<i>Model R<sup>2</sup> = 0.10</i>
Site	0,9209	0,1	
Dry weight	0,2033	9,9	
Site : Dry weight	0,9217	0,1	
<i>e. Dependant variable : MeHg concentration (01/2010, n=20)</i>			<i>Model R<sup>2</sup> = 0.62</i>
Site	<b>0,0047</b>	26	marine < estuarine
Dry weight	<b>0,0018</b>	33	negative correlation
Site : Dry weight	0,2881	3	
<i>f. Dependant variable : MeHg concentration (02/2010, n=20)</i>			<i>Model R<sup>2</sup> = 0.58</i>
Site	<b>0,0025</b>	33	marine < estuarine
Dry weight	<b>0,0097</b>	23	negative correlation
Site : Dry weight	0,356	2	
<i>g. Dependant variable : MeHg concentration (12/2011, n=39)</i>			<i>Model R<sup>2</sup> = 0.59</i>
Site	0,1475	6	
Dry weight	<b>0,0005</b>	50	negative correlation
Site : Dry weight	0,3239	3	

### 3.2. Inter-annual fluctuations of MeHg in marine glass eels

Annual fluctuations of dry weight and MeHg concentrations were analysed in December 2004 (n=20), December 2008 (n=10), November 2009 (n=10), January 2010 (n=10) and December 2011 (n=20) (Table 10, Figure 28). Glass eel mean length was  $72 \pm 4$  mm and no significant difference was observed between years of sampling (ANOVA,  $F=1.32$ ,  $p=0.2695$ ). Analysis of covariance indicated that MeHg concentrations were related to year ( $p<0.0001$ , explained 33% of the variance of data) and to dry weight ( $p<0.0001$ , explained 15% of the variance of data). There was no significant interaction between year and dry weight ( $p=0.5991$ ). For each sample, MeHg concentration was negatively correlated with the dry weight (Figure 28). From 2004 to 2009, there was an increase in MeHg concentration up to  $178 \pm 34$  ng Hg g<sup>-1</sup> dw and then a decrease to  $135 \pm 34$  ng Hg g<sup>-1</sup> dw in 2011 (Figure 28, Table 10).

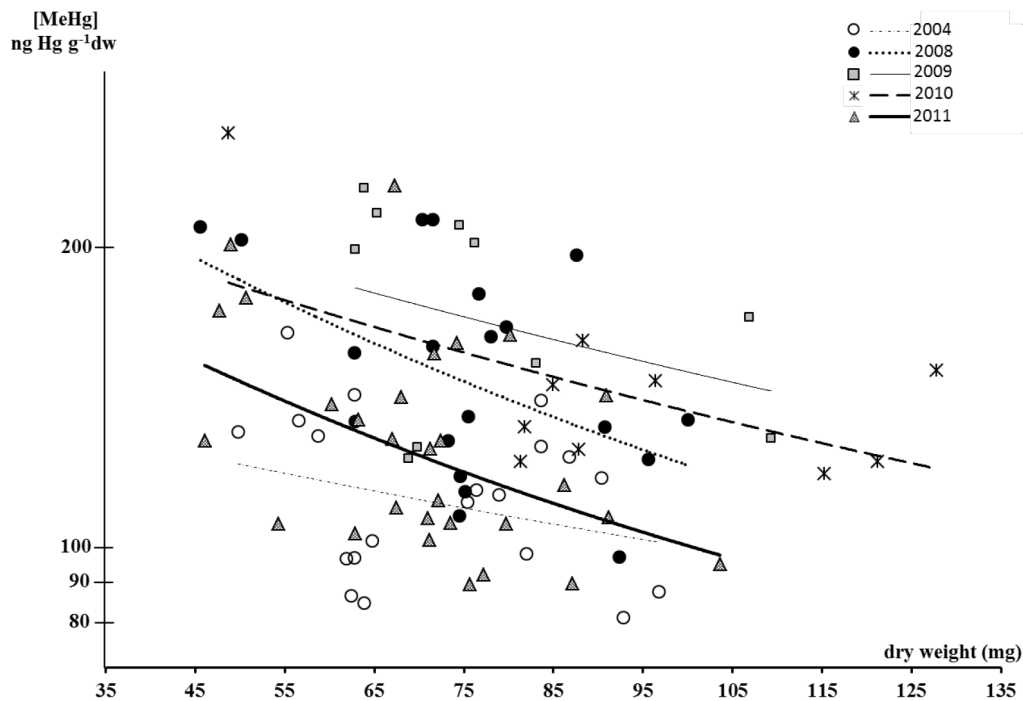


Figure 28: Relationship between dry weight (mg) and MeHg concentration (ng Hg g<sup>-1</sup>dw) in marine glass eels. Lines indicate regression slopes for log (MeHg) versus dry weight (dw) for each sampling date from 2004 to 2011 (see Table 10).

### 3.3. Inter-annual fluctuations of MeHg in estuarine glass eels

Twenty estuarine glass eels were studied in December 2004 and 2005 and 10 in November 2009, January 2010 and December 2011 (Table 10, Figure 29). No significant difference was observed between each sampling year in estuarine glass eel length ( $73 \pm 4$  mm on average, ANOVA,  $F=0.98$ ,  $p=0.2581$ , data not shown). As observed for marine glass eels, analysis of covariance indicated that MeHg concentrations were related to year ( $p<0.0001$ , explained

40% of the variance of data) and to dry weight ( $p < 0.0001$ , explained 18% of the variance of data). No significant interaction was observed between year and dry weight ( $p = 0.3283$ ). MeHg concentrations were negatively correlated with the dry weight. Similar to marine results, concentrations of MeHg in estuarine glass eels increased significantly from 2004 to 2010 (from  $120 \pm 26$  to  $198 \pm 48$  ng Hg g<sup>-1</sup>dw) and dropped in 2011 ( $136 \pm 37$  ng Hg g<sup>-1</sup>dw, Fig. 4, Table 10).

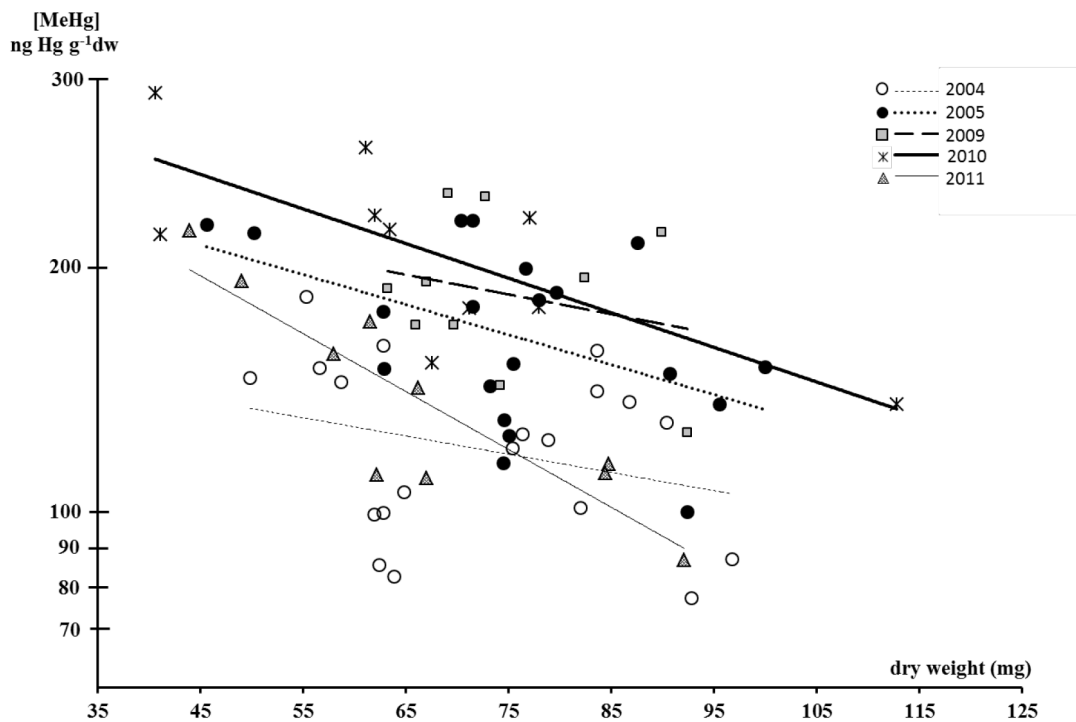


Figure 29: Relationship between dry weight (mg) and MeHg concentration (ng Hg g<sup>-1</sup>dw) in estuarine glass eels. Lines indicate regression slopes for log (MeHg) versus dry weight (dw) for each sampling date from 2004 to 2011 (see Table 10).

### 3.4. Seasonal fluctuations of MeHg in glass eels

Seasonal variation in MeHg concentrations were evaluated in 10 glass eels per month during the period 2009-2010 (November 2009, January, February and April 2010) at the marine (Moliets) station (Table 10, Figure 30). Analysis of covariance indicated a significant effect of the season ( $p = 0.002$ , explains 28% of the variance of data) and of dry weight ( $p < 0.0001$ , explains 25% of variance of data). There was no significant interaction between season and dry weight on log transformed MeHg concentrations ( $p = 0.0662$ ). The best relationship between MeHg concentration and dry weight was observed in glass eels collected at the end of fishing season (April,  $R^2 = 0.66$ ).

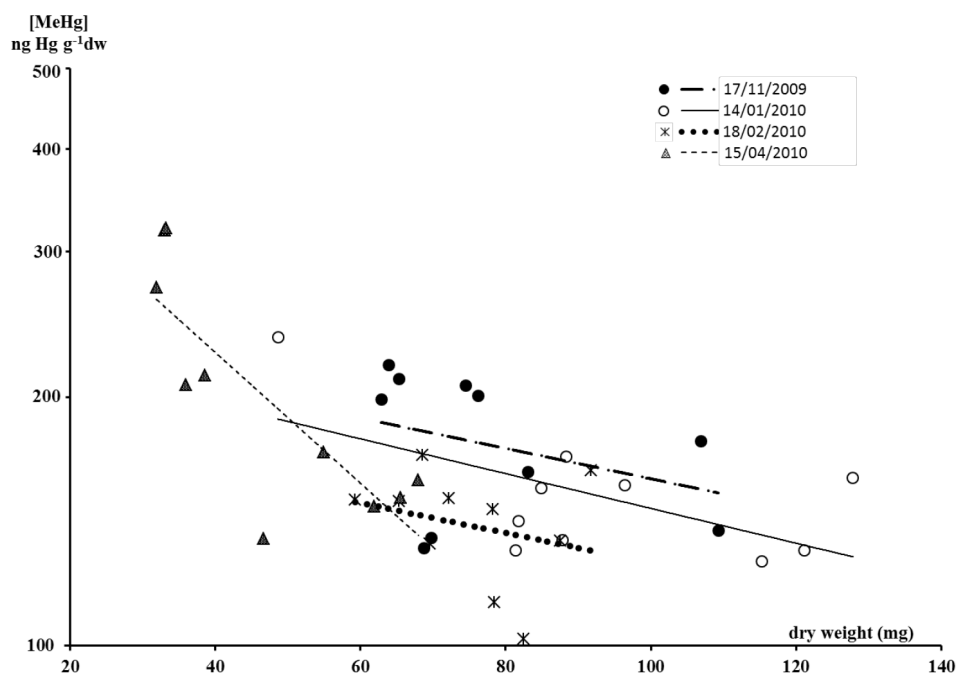


Figure 30: Relationship between dry weight (mg) and MeHg concentration ( $\text{ng Hg g}^{-1}\text{dw}$ ) in marine glass eels. Lines indicate regression slopes for  $\log(\text{MeHg})$  versus dry weight (dw) from November 2009 to April 2010 (Table 10).

### 3.5. MeHg concentrations in relation to migratory behaviour

Between 9 and 10 glass eels caught at the marine station in December 2004, 2011 and March 2012 and at the estuarine station in December 2004, 2005, January 2006, 2012, March 2006 and April 2004, 2012 were analysed for their high or low propensity to migrate (Table 10). Analysis of covariance indicated that MeHg concentrations were related to dry weight ( $p < 0.0001$ , explained 49% of the variance of data) but not to migratory behaviour ( $p = 0.4089$ ). There was no significant interaction between behaviour and dry weight on log transformed MeHg concentrations ( $p = 0.7659$ ).

## 4. Discussion

### 4.1. Migratory behaviour and MeHg concentrations in glass eels

To the best of our knowledge, our study is the first to investigate the relationship between MeHg accumulation and estuarine migration in fish. In the glass eel, MeHg concentration values ranged from 61 to 682  $\text{ng Hg.g}^{-1}\text{dw}$  (0.014 to 0.068  $\mu\text{g Hg g}^{-1}\text{ww}$ ) which is consistent with those found by Navarro et al. (2013) in the same estuary. MeHg is known for its high toxicity in fish, affecting morphology (Samson and Shenker 2000), physiology (Sarnowski 2003) and behavioural patterns such as swimming activity (Maximino et al. 2011). Laboratory experiments have demonstrated that embryonic exposure to MeHg causes behavioural changes in larval fish, as well as a decrease in foraging ability and an

increased susceptibility to predation (Alvarez et al. 2006; Weis and Weis 1995). Many fish behaviours are probably affected at exposure levels of MeHg much lower than those causing overt toxicity (Wiener et al., 2002). Laboratory studies often expose fish to concentrations of MeHg much higher than those found in the wild and little is known about the toxicological significance to fish of environmentally realistic exposure to MeHg (Wiener et al. 2002; Scheuhammer et al. 2007 for review). Based on a method calculating a tissue threshold effect level, Beckvar et al. (2005) recommended  $0.2 \mu\text{g Hg g}^{-1}\text{ww}$  for the whole body as protective for juvenile and adult fish (i.e. unlikely to have adverse effects). This is more than twice the highest concentration of MeHg found in glass eels in the present study ( $0.068 \mu\text{g Hg g}^{-1}\text{ww}$ ) and is consistent with the observation of no correlation between glass eel migratory behaviour and MeHg concentrations. These concentrations were probably too low to directly affect migration behaviour in glass eels but a relationship between migration and MeHg concentration cannot be excluded. Our results showed a negative correlation between the weight and MeHg concentration which is quite unusual (Costa et al. 2009; Noël et al. 2013). In addition, Bureau du Colombier et al. (2007), using the same experimental flume as in the present study, reported that non migrant glass eels caught in February had a lower energy content than migrant ones. In combination with our results, this suggests that non migrant glass eels might have higher MeHg concentrations than migrant ones. The lack of relationship between MeHg and migratory behaviour in our study probably results from the similar weight observed in migrant and non migrant individuals. One reason might be that between 100 and 150 migrant and non migrant glass eels were analysed in the study of Bureau du Colombier et al. (2007) while only 10 glass eels were sampled for mercury speciation analysis. Although an effort was made to randomly sample the 10 glass eels in each behavioural group, our sample size may have been insufficient to detect any differences.

#### **4.2. Marine versus continental comparison**

Spatial variations of mercury related to differences in MeHg production and availability have been observed in numerous fish species (Chumchal et al. 2008; Greenfield and Jahn 2010; Greenfield et al. 2013a, b; Hope and Rubin 2005; Suchanek 2008). In our study, MeHg concentrations were related to the site (marine/estuarine,  $p < 0.0001$ ) but this explained only 2% of the variance of data. This weak effect might seem surprising because the Adour estuary exhibits relatively high sedimentary concentrations of MeHg (108-1736. ng  $\text{Hg.g}^{-1}$  Stoichev et al. 2004). These concentration values have been explained by the existence of anthropogenic point sources of MeHg but also, and mainly, by a high methylation potential

in the sediment (Stoichev et al. 2004, 2006). Monperrus et al. (2005) also reported a strong relationship between MeHg concentrations in the sediment and in benthic organisms of the Adour estuary, as well as biomagnification of MeHg in the trophic network of benthic macrofauna. In another estuary (San Francisco Bay, CA, USA), comparison of the Hg stable isotope compositions of local forage fish species with collocated intertidal surface sediments showed good correlation between fish and sediment  $^{202}\text{Hg}$  values suggesting that sediment was the main source of mercury in the aquatic estuarine food chain (Gehrke et al. 2011). However, in aquatic systems, the route of exposure to MeHg is primarily through the diet (Wiener et al., 2002, Scheuhammer et al. 2007) and glass eels feed little or not at all during their estuarine migration (Bardonnet and Riera 2005). This limited dietary exposure might explain the moderate MeHg bioaccumulation during glass eel migration in the Adour estuary.

### 4.3. Temporal variations

Glass eels caught in November at the marine station were longer and heavier than those caught later in the season. This result agrees with previous studies showing a progressive decrease in size over the course of the season, likely to be related to fluctuations in trophic resources during the oceanic migration of the leptocephalus larvae (Charlon and Blanc 1982; Elie and Rochard 1994; Kawakami et al. 1999; Lambert et al. 2003; Wilson et al. 2007). The decrease in weight over the season and the inverse relationship between weight and MeHg concentrations suggest that the highest MeHg concentrations observed at the end of the season (April) may result from a concentration effect. However, weight explains only 15% of the results while season, explains up to 27%.

A number of studies, dealing with sediment and forage fish monitoring, reported seasonal variation in Hg concentrations which might be consistent (Eagles-Smith and Ackerman 2009; Zhang et al. 2012) or fluctuate depending on the site and/or the year (Greenfield et al. 2013b). For example, as observed in our study, lower mercury concentrations were observed in winter than in spring in the Mississippi silverside (*Menidia audens*) collected in San Francisco Bay but this pattern differed depending on the site (Greenfield et al. 2013b). In the literature, seasonal variations in Hg species concentrations are usually related to different patterns in net mercury methylation in the sediment or water column (Gorski et al. 1999; Heim et al. 2007; Stoichev et al. 2004). In spring and summer, an increase in MeHg concentrations has been reported for surface sediment in the Adour estuary (Stoichev et al. 2004), likely to be related to elevated temperature and increased in-situ activity of sulphate reducing bacteria. The high water flows, generally observed in the spring



in the Adour estuary, may have contributed to the dispersal of contaminated particles and Hg load, in the coastal zone, then partially methylated and available to marine glass eels (Sharif et al. 2014).

In addition to seasonal variation, a significant increase in MeHg concentrations was observed in marine and estuarine glass eels from 2004 to 2009 and from 2004 to 2010 respectively, followed by a decrease in 2010 or 2011. These results were only weakly explained by weight (15% for marine and 18% for estuarine individuals), while year explained up to 40% of the results. Inter-annual fluctuations have been hypothesized to result from fish movement behaviour, extreme weather events, or temporary management activities resulting in variations in MeHg exposure (Greenfield et al. 2005, 2013b). Such seasonal variation might also result from temporal variability of MeHg production in the sediment (Stoichev et al. 2004) but a long term survey of MeHg concentrations in glass eels and sediment might provide a better understanding of the bioaccumulation of MeHg in glass eels during estuarine migration.

Finally, it is noteworthy that a similar pattern of inter-annual variation was observed between the marine and estuarine sites, while in San Francisco Bay inter-annual patterns of MeHg concentrations varied considerably among site and species (Greenfield et al. 2013b). This supports the idea of a weak bioaccumulation of MeHg in glass eels during their migration in the Adour estuary but also raises the question of the source of contamination that might explain MeHg concentration values observed in glass eels. During the long oceanic migration from the Sargasso Sea to the European coast, the leptocephalus larvae might first accumulate MeHg via the diet. The ecology of most species of leptocephali is poorly known but recent studies provide evidence that they feed on particulate organic matter such as marine snow (Otake 1993; Miller et al. 2012, 2013) generally hosting plankton which can accumulate MeHg and influence MeHg concentrations in marine food webs (Fitzgerald et al. 2007; Hammerschmidt et al. 2013). However, if dietary exposure governed bioaccumulation rate, this should result in an increase of MeHg concentrations with weight, rather than the decrease we observed. Another origin of MeHg concentration values observed in glass eels might concern maternal transfer, considered as a significant route of exposure for larval and juvenile fish (Alvarez et al. 2006). A recent study, conducted in the sheepshead minnow (*Cyprinodon variegates*) fed a preoogenesis MeHg diet and then a diet enriched with Me<sup>199</sup>Hg during the period of oogenesis, suggested that both female tissue and the maternal diet during oogenesis are significant sources of Hg in eggs (Stefansson et al. 2014). Silver eels do not feed during oogenesis (which occurs during their oceanic migration to the Sargasso Sea) but before

metamorphosing into silver eels, yellow eels spend a long time in continental waters (4 to 20 years) where they can accumulate high quantities of mercury (Arleny et al. 2007; Navarro et al. 2013). Silver eels, which starve during their reproductive migration, may then concentrate stored MeHg, as previously observed for PCB or cadmium in eels (Pierron et al. 2008; Van Ginneken et al. 2009) and also for different lipophilic compounds, in Pacific salmon during migration to spawning site (Kelly et al., 2011). Although, maternal transfer of hydrophobic compounds may be relatively low (Kelly et al. 2011, Stefansson et al. 2014), concentration processes related to starvation should increase MeHg passed from mother to eggs at the spawning site. We can then hypothesize, as proposed for other species (Trudel and Rasmussen, 2006; Swanson et al. 2011), that leptocephalus larvae with the faster growth rate and the greater growth efficiency might dilute their Hg burden during oceanic migration. This would explain the inverse relationship between MeHg concentration and weight observed in our study.

## **5. Conclusion**

Our study provided direct evidence of a strong inverse relationship between dry weight and MeHg concentration in glass eels. Despite weak seasonal variation in glass eel MeHg concentrations, which is likely to depend on fluctuation in MeHg availability within the estuary, our results do not support the idea of significant MeHg contamination during the estuarine migration. The European eel exhibits a complex and long life cycle and MeHg concentrations probably result from contamination at different life stages including the glass eel stage. The effect of MeHg on migratory behaviour remains unclear and experimental approaches, using isotopically enriched MeHg ( $^{201}\text{MeHg}$ ,  $50 \text{ ng.L}^{-1}$ ) may help to elucidate this question.

## **Acknowledgements**

J.C.'s PhD thesis was funded by the University of Pau et les Pays de l'Adour (ED 211). We wish to thank Pascale Coste, Emmanuel Huchet and Jacques Rives for their technical assistance. We also thank Rosie Cox for correcting the English. The project was partly supported by funding from the Office National de l'Eau and Milieux Aquatiques (ONEMA), from the European Union within the framework of the ORQUE SUDOE project, the Conseil Général des Pyrénées Atlantiques within the framework of the EXPLOR project and by the University of Pau (BQR MIRA).

## References

- Alvarez MdC, Murphy CA, Rose KA, McCarthy ID, Fuiman LA. Maternal body burdens of methylmercury impair survival skills of offspring in Atlantic croaker (*Micropogonias undulatus*). *Aquatic Toxicol.* 2006. 80(4): 329–337.
- Arleny I, Tabouret H, Rodriguez-Gonzalez P, Bareille G, Donard OFX, Amouroux D. Methylmercury bioconcentration in muscle tissue of the European eel (*Anguilla anguilla*) from the Adour estuary (Bay of Biscay, France). *Mar Pollut Bull.* 2007. 54(7): 1031–1036.
- Bardonnet A, Riera P. Feeding of glass eels (*Anguilla anguilla*) in the course of their estuarine migration: new insights from stable isotope analysis. *Estuar Coast Shelf S.* 2005. 63(1-2):201–209.
- Beckvar N, Dillon TM, Read LB. Approaches for linking whole-body fish tissue residues of mercury or DDT to biological effects thresholds. *Environ Toxicol Chem.* 2005. 24(8):2094–2105.
- Bonhommeau S, Chassot E, Planque B, Rivot E, Knap A, Le Pape O. Impact of climate on eel populations of the Northern Hemisphere. *Mar Ecol Prog Ser*; 2008. 373:71–80.
- Bureau du Colombier S, Bolliet V, Lambert P, Bardonnet A. Energy and migratory behavior in glass eels (*Anguilla anguilla*). *Physiol Behav.* 2008. 92(4): 684–690.
- Byer JD, Alae M, Brown RS, Lebeuf M, Backus S, Keir M, Couillard CM, Casselman J, Hodson PV. Spatial trends of dioxin-like compounds in Atlantic anguillid eels. *Chemosphere.* 2013. 91(10):1439–1446.
- Castonguay M, Hodson PV, Moriarty C, Drinkwater KF, Jessop BM. Is there a role of ocean environment in American and European eel decline? *Fish Oceanogr.* 1994. 3(3):197–203.
- Charlon N, Blanc J. Study of *Anguilla Anguilla* L. glass eels in the Adour watershed. 1. Biometric characteristics of weight and length versus pigmentation *Arch Hydrobiol.* 1982. 93(2): 238–255(in French)
- Chumchal MM, Drenner RW, Fry B, Hambright KD, Newland LW. Habitat-Specific Differences in Mercury Concentration in a Top Predator from a Shallow Lake. *T Am Fish Soc.* 2008. 137(1):195–208.
- Coquery M, Cossa D, Sanjuan J. Speciation and sorption of mercury in two macro-tidal estuaries. *Mar Chem.* 1997. 58(1–2): 213–227.
- Correia AD, Gonçalves R, Scholze M, Ferreira M, Henriques MAR. Biochemical and behavioral responses in gilthead seabream (*Sparus aurata*) to phenanthrene. *J Exp Mar Biol Ecol.* 2007. 347(1-2):109–122.
- Cossa D, Ficht A (1999) Mercury reactivity. Ifremer, France. ISBN 2-84433-028-2, 23 (in French)
- Costa MF, Barbosa SCT, Barletta M, Dantas DV, Kehrig HA, Seixas TG, Malm O. Seasonal differences in mercury accumulation in *Trichiurus lepturus* (Cutlassfish) in relation to length and weight in a Northeast Brazilian estuary. *Environ Sci Pollut R.* 2009. 16(4): 423–430.

Daverat F, Limburg KE, Thibault I, Shiao JC, Dodson JJ, Caron F, Tzeng WN, Iizuka Y, Wickstrom H. Phenotypic plasticity of habitat use by three temperate eel species, *Anguilla anguilla*, *A. japonica* and *A. rostrata*. Mar Ecol Prog Ser. 2006. 308: 231–241.

Dekker W. Volume 1: thematic overview. In: *Monitoring of glass eel recruitment*, RIVO Netherlands institute for fisheries research, the Netherlands, IJmuiden . 2002. 1-59p

Dias JCS. Characterization of *Desulfomicrobium salsuginis* sp. nov. and *Desulfomicrobium aestuarii* sp. nov. two new sulfate-reducing bacteria isolated from the Adour estuary (French Atlantic coast) with specific mercury methylation potentials. Syst Appl Microbiol. 2008. 31(1): 30–7.

Duran R, Ranchou-Peyruse M, Menuet V, Monperrus M, Bareille G, Goñi M, Salvado JC, Amouroux D, Guyoneaud R, Donard OFX, Caumette P. Mercury methylation by a microbial community from sediments of the Adour Estuary (Bay of Biscay, France). Environ Pollut. 2008. 156(3):951–958.

Durrieu G, Maury-Brachet R, Girardin M, Rochard E, Boudou A. Contamination by heavy metals (Cd, Zn, Cu, and Hg) of eight fish species in the Gironde estuary (France). Estuaries. 2005. 28(4):581–591.

Eagles-Smith CA, Ackerman JT. Rapid Changes in Small Fish Mercury Concentrations in Estuarine Wetlands: Implications for Wildlife Risk and Monitoring Programs. Environ Sci Technol. 2009. 43(22): 8658–64.

Edeline E. Adaptive phenotypic plasticity of eel diadromy. Mar Ecol Prog Ser. 2007. 341: 229–232.

Elie P, Rochard E. Migration des civelles d'anguilles (*Anguilla anguilla* L.) dans les estuaires, modalités du phénomène et caractéristiques des individus. B Fr Peche Piscic. 1994. (335):81–98.

Esteve C, Alcaide E, Ureña R. The effect of metals on condition and pathologies of European eel (*Anguilla anguilla*): In situ and laboratory experiments. Aquatic Toxicol. 2012. 109:176–184.

Feunteun E. Management and restoration of European eel population (*Anguilla anguilla*): An impossible bargain. Ecol Eng. 2002. 18(5): 575–591.

Fitzgerald WF, Lamborg CH, Hammerschmidt CR. Marine Biogeochemical Cycling of Mercury. Chem Rev. 2007. 107(2): 641–662.

Gandolfi G, Pesaro M, Tongiorgi P. Environmental factors affecting the ascent of elvers, *Anguilla anguilla* (L.), into the Arno river. Oebalia, 1984. X, 17-35.

Gascuel D. Flow-carried and active swimming migration of the glass eel (*Anguilla anguilla*) in the tidal area of a small estuary on the French Atlantic coast. Helgoländer Meere Sun. 1986. 40:321–6.

Gehrke GE, Blum JD, Slotton DG, Greenfield BK. Mercury Isotopes Link Mercury in San Francisco Bay Forage Fish to Surface Sediments. Environ Sci Technol. 2011. 45(4):1264–1270.

Gorski PR, Lathrop RC, Hill SD, Herrin RT. Temporal mercury dynamics and diet composition in the mimic shiner. T Am Fish Soc. 1999. 128(4): 701–712.

Greenfield BK, Davis JA, Fairey R, Roberts C, Crane D, Ichikawa G. Seasonal, interannual, and long-term variation in sport fish contamination, San Francisco Bay. Sci Total Environ. 2005. 336(1-3):25–43.

Greenfield BK, Jahn A. Mercury in San Francisco Bay forage fish. *Environ Pollut*. 2010. 158(8): 2716–2724.

Greenfield BK, Slotton DG, Harrold KH. Predictors of mercury spatial patterns in San Francisco Bay forage fish. *Environ Toxicol Chem*. 2013a. 32: 2728–2737.

Greenfield BK, Melwani AR, Allen RM, Slotton DG, Ayers SM, Harrold KH, Ridolfi K, Jahn A, Grenier JL, Sandheinrich MB. Seasonal and annual trends in forage fish mercury concentrations, San Francisco Bay. *Sci Total Environ*. 2013b. 444: 591–601.

Haenen OLM, Van Banning P, Dekker W. Infection of eel *Anguilla anguilla* (L.) and smelt *Osmerus eperlanus* (L.) with *Anguillicola crassus* (Nematoda, Dracunculoidea) in the Netherlands from 1986 to 1992. *Aquaculture*. 1994. 126(3–4): 219–229. 8

Hammerschmidt CR, Fitzgerald WF. Methylmercury Accumulation in Plankton on Continental Margin of the Northwest Atlantic Ocean. *Environ Sci Technol*. 2006. 47(8): 3671–3677.

Heim WA, Coale KH, Stephenson M, Choe KY, Gill GA, Foe C. Spatial and habitat-based variations in total and methyl mercury concentrations in surficial sediments in the San Francisco Bay-Delta. *Environ Sci Technol*; 2007.41(10): 3501–3507.

Hope BK, Rubin JR. Mercury levels and relationships in water, sediment, and fish tissue in the Willamette Basin, Oregon. *Arch Environ Con Tox*. 2005. 48(3): 367–380.

Horvat M, Covelli S, Faganeli J, Logar M, Mandić V, Rajar R, Sirca A, Zagar D. Mercury in contaminated coastal environments; a case study: the Gulf of Trieste. *Sci Tot Environ*. 1999. 237-238:43–56.

Kawakami Y, Mochioka N, Kimura R, Nakazono A. Seasonal changes of the RNA/DNA ratio, size and lipid contents and immigration adaptability of Japanese glass-eels, *Anguilla japonica*, collected in northern Kyushu, Japan. *J Exp Mar Biol Ecol*. 1999. 238(1): 1–19.

Kelly B, Ikonomou M, MacPherson N, Sampson T, Patterson D, Dubetz C. Tissue residue concentrations of organohalogenes and trace elements in adult pacific salmon returning to the fraser river, British Columbia, Canada. *Env Tox Chem*. 2011. 30(2): 367-376.

Lambert P, Sbailhi M, Rochard E, Marchelidon J, Dufour S, Elie P. Morphological variability and rate of growth hormone of European glass eels (*Anguilla Anguilla*) in the Gironde estuary during the season 1997-1998. *B Fr Peche Piscic*. 2003. (368): 69–84. (in French)

Maes J, Belpaire C, Goemans G. Spatial variations and temporal trends between 1994 and 2005 in polychlorinated biphenyls, organochlorine pesticides and heavy metals in European eel (*Anguilla anguilla* L.) in Flanders, Belgium. *Environ Pollut*. 2008. 153(1): 223–237.

Mason RP, Lawson NM, Sullivan KA. The concentration, speciation and sources of mercury in Chesapeake Bay precipitation. *Atmos Environ*. 1997. 31(21): 3541–3550.

Maximino C, Araujo J, Leão LKR, Grisolia ABA, Oliveira KRM, Lima MG, Batista EJ, Crespo-Lopez ME, Gouveia A, Herculano AM. Possible role of serotonergic system in the neurobehavioral impairment induced by acute methylmercury exposure in zebrafish (*Danio rerio*). *Neurotoxicol Teratol*. 2011. 33(6):727–734.

Miller MJ, Kimura S, Friedland KD, Knights B, Kim H, Jellyman DJ, Tsukamoto K. Review of ocean-atmospheric factors in the Atlantic and Pacific oceans influencing

spawning and recruitment of anguillid eels. In Haro A, Smith KL, Rulifson RA, Moffitt CM, Klauda RJ, Dadswell MJ, Cunjak RA, Cooper JE, Beal KL, Avery TS (eds) Challenges for Diadromous Fishes in a Dynamic Global Environment. 2009. 231-249p

Miller MJ, Otake T, Aoyama J, Wouthuyzen S, Suharti S, Sugeha HY, Tsukamoto K. Observations of gut contents of leptocephali in the North Equatorial Current and Tomini Bay, Indonesia. *Cost Mar Sci.* 2012. 35:277-288

Miller MJ, Chikaraishi Y, Ogawa NO, Yamada Y, Tsukamoto K, Ohkouchi N. A low trophic position of Japanese eel larvae indicates feeding on marine snow. *Biol Lett-uk* rsbl20120826. 2013.

Monperrus M, Point D, Grall J, Chauvaud L, Amouroux D, Bareille G, Donard OFX. Determination of metal and organometal trophic bioaccumulation in the benthic macrofauna of the Adour estuary coastal zone (SW France, Bay of Biscay). *J Environ Monitor.* 2005. 7(7): 693.

Navarro P, Clemens S, Perrot V, Bolliet V, Tabouret H, Guérin T, Monperrus M, Amouroux D. Simultaneous determination of mercury and butyltin species using a multiple species-specific isotope dilution methodology on the European, *Anguilla anguilla* glass eel and yellow eel. *Int J Environ An Ch.* 2013. 93(2):166–182.

Noël L, Chekri R, Millour S, Merlo M, Leblanc JC, Guérin T. Distribution and relationships of As, Cd, Pb and Hg in freshwater fish from five French fishing areas. *Chemosphere.* 2013. 90(6):1900–1910.

Otake TKN. Dissolved and particulate organic matter as possible food sources for eel leptocephali. *Mar Ecol Prog Ser.* 1993. 92: 27–34.

Pierron F, Baudrimont M, Dufour S, Elie P, Bossy A, Baloche S, Gonzalez P, Bourdineaud JP, Massabuau JC. How Cadmium Could Compromise the Completion of the European Eel's Reproductive Migration. *Environ Sci Technol.* 2008. 42(12): 4607–4612.

R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2014.

Redmayne AC, Kim JP, Closs GP, Hunter KA. Methyl mercury bioaccumulation in long-finned eels, *Anguilla dieffenbachii*, from three rivers in Otago, New Zealand. *Sci Tot Environ.* 2000. 262(1-2):37–47. Samson JC, Shenker J. The teratogenic effects of methylmercury on early development of the zebrafish, *Danio rerio*. *Aquatic Toxicol.* 2000. 48(2–3): 343–354.

Sarnowski P. The effects of metals on yolk sac resorption and growth of starved and fed common carp (*Cyprinus carpio L.*) larvae. *Acta.Sci.Pol.Pisc.* 2003. 2: 227–235.

Scheuhammer AM, Meyer MW, Sandheinrich MB, Murray MW. Effects of environmental methylmercury on the health of wild birds, mammals, and fish. *Ambio.* 2007. 36(1):12–19.

Sharif A, Monperrus M, Tessier E, Bouchet S, Pinaly H, Rodriguez-Gonzalez P, Maron P, Amouroux D. Fate of mercury species in the coastal plume of the Adour River estuary (Bay of Biscay, SW France) *Sci Tot Environ.* 2014. 496: 701-713.

Stefansson ES, Heyes A, Rowe CL. Tracing Maternal Transfer of Methylmercury in the Sheepshead Minnow (*Cyprinodon variegatus*) with an Enriched Mercury Stable Isotope. *Environ Sci Technol.* 2014. 48(3):1957–1963.

Stoichev T, Amouroux D, Wasserman J, Point D, De Diego A, Bareille G, Donard OFX. Dynamics of mercury species in surface sediments of a macrotidal estuarine-coastal system (Adour River, Bay of Biscay). *Estuar Coast Shelf S.* 2004. 59(3): 511–521.

Stoichev T, Amouroux D, Monperrus M, Point D, Tessier E, Bareille G, Donard OFX. Mercury in surface waters of a macrotidal urban estuary (River Adour, south-west France). *Chem Ecol.* 2006. 22(2):137–148.

Stone R. Freshwater Eels Are Slip-Sliding Away. *Science.* 2003. 302(5643):221–222.

Suchanek TH. Mercury Cycling and Bioaccumulation in a Mine-dominated Aquatic Ecosystem: Clear Lake, California. *Ecol Appl.* 2008. 18(sp8): A1–A2.

Swanson H, Gantner N, Kidd K, Muir DCG, Reist JD. Comparison of mercury concentrations in landlocked, resident, and sea-run fish (*Salvelinus* spp) from Nunavut, Canada. *Env Tox Chem.* 2011. 30(6): 1459-1467. Trudel M, Rasmussen JB. Bioenergetics and mercury dynamics in fish: a modelling perspective. *Can J Fish Aquat Sci.* 2006. 63:1890-1902.

Tsukamoto K, Nakai I, Tesch WV. Do all freshwater eels migrate? *Nature.* 1998. 396(6712):635-636.

Tsukamoto K, Aoyama J, Miller MJ. Migration, speciation, and the evolution of diadromy in anguillid eels. *Can J Fish Aquat Sci.* 2002. 59(12):1989–1998.

Tzeng WN, Lin HR, Wang CH, Xu SN. Differences in size and growth rates of male and female migrating Japanese eels in Pearl River, China. *J Fish Biol.* 2000. 57(5):1245–1253.

Van Ginneken V, Palstra A, Leonards P, Nieveen M, Van Den Berg H, Flik G, Spanings T, Van Den Thillart G, Murk A. PCBs and the energy cost of migration in the European eel (*Anguilla anguilla* L.). *Aquatic Toxicol.* 2009. 92(4): 213–220.

Weis JS, Weis P. Effects of exposure to lead on behavior of mummichog (*Fundulus heteroclitus* L.) larvae. *J Exp Mar Biol Ecol.* 1995. 222(1): 1–10.

Wiener JG, Krabbenhoft DP, Heinz GH, Scheuhammer AM. Ecotoxicology of mercury. In Hoffman DJ, Rattner BA, Burton GA, Cairns Jr (eds.) *Handbook of ecotoxicology*, 2<sup>nd</sup> edn. Lewis Publishers Boca Raton, Florida. 2002. 409-464p

Wilson JM, Reis-Santos P, Fonseca AV, Antunes JC, Bouça PD, Coimbra J. Seasonal changes in ionoregulatory variables of the glass eel *Anguilla anguilla* following estuarine entry: comparison with resident elvers. *J Fish Biol.* 2007.70(4):1239–1253.

Zhang L, Campbell LM, Johnson TB. Seasonal Variation in Mercury and Food Web Biomagnification in Lake Ontario, Canada. *Environ Pollut.* 2007. 161: 178–84.

Le chapitre précédent n'a mis en évidence aucune différence de concentrations en MeHg en fonction du fort ('High') ou du faible ('Low') potentiel de migration des civelles (article 1). Cependant, le faible nombre d'individu utilisé chaque année n'a peut-être pas permis de déceler une éventuelle relation entre le taux mercure et le comportement migratoire. Cette question a donc été abordée dans un deuxième chapitre grâce à l'utilisation d'un traceur isotopique en milieu expérimental. L'objectif de cette étude était de mesurer la bioaccumulation du MeHg chez des civelles exposées à du MeHg enrichi isotopiquement ( $^{201}\text{MeHg}$ ) et d'étudier son effet sur leur comportement de migration, leur statut énergétique et leur processus de détoxication.





## ***CHAPITRE 2***

---



## Etude en milieu contrôlé de l'impact du MeHg sur les capacités migratoires des civelles, le statut énergétique et les capacités de détoxification

### **Partie 1 : Effet du MeHg sur comportement de migration des civelles (*Anguilla anguilla*) : une étude expérimentale**

#### **Article 2: Methylmercury effects on migratory behaviour in glass eels (*Anguilla anguilla*): an experimental study using isotopic tracers**

(re-soumission à Comparative Biochemistry and Physiology, Part C : Toxicology and Pharmacology)

**Julie Claveau<sup>a,b</sup>, Mathilde Monperrus<sup>c</sup>, Marc Jarry<sup>a,b</sup>, Magalie Baudrimont<sup>d</sup>, Patrice Gonzalez<sup>d</sup>, Joana Cavalheiro<sup>c</sup> Nathalie Mesmer-Dudons<sup>d</sup>, Valérie Bolliet<sup>a,b</sup>**

<sup>a</sup> INRA, UMR 1224 Ecobiop, Aquapôle, 64310 Saint Pée sur Nivelle, France

<sup>b</sup> Université de Pau et des Pays de L'Adour, UMR 1224 Ecobiop, UFR Sciences et Techniques côte Basque, Anglet, France  
bolliet@st-pee.inra.fr / jclaveau@st-pee.inra.fr/marc.jarry@univ-pau.fr

<sup>c</sup> Laboratoire de Chimie Analytique Bio-Inorganique et Environnement, Institut Pluridisciplinaire de Recherche sur l'Environnement et les Matériaux, UMR 5254 CNRS, Université de Pau et des Pays de l'Adour, Hélioparc Pau Pyrénées, 2 av. P. Angot, 64053 9 Pau cedex 9, France david.amouroux@univ-pau.fr/mathilde.monperrus@univ-pau.fr/  
joana.cavalheiro@univ-pau.fr

<sup>d</sup> Université de Bordeaux, UMR 5805 EPOC, team Aquatic Ecotoxicology, Place du Dr Peyneau, 33120 Arcachon, France  
p.gonzalez@epoc.u-bordeaux1.fr/ m.baudrimont@epoc.u-bordeaux1.fr n.mesmer-dudons@epoc.u-bordeaux1.fr

#### **Résumé en français**

L'effet de méthylmercure (MeHg) sur la propension à migrer des civelles, l'activité mitochondriale et le système de défense antioxydantes a été étudié. Les civelles marines ont d'abord été triées dans une structure expérimentale en fonction de leur réponse au signal crépusculaire. Les poissons répondant à la diminution de l'intensité lumineuse en remontant dans la colonne d'eau et en se déplaçant avec ou contre-courant ont été considérés comme ayant une forte propension à migrer (migrants). Les civelles restant dans les abris jusqu'à la fin des 24 heures de la période de capture ont été considérées comme ayant une faible propension à migrer et ont été appelées non migrantes. Les civelles migrantes et non migrantes ont ensuite été marquées individuellement et exposées à du <sup>201</sup>MeHg enrichi isotopiquement (50 ng L<sup>-1</sup>) pendant 11 jours. L'effet de la contamination a été étudié sur la structure des fibres musculaires, et le niveau d'expression de gènes impliqués dans l'activité

mitochondriale et le système de défense antioxydantes. Pour étudier l'effet du MeHg sur le comportement des civelles, les migrantes et les non migrantes ont à nouveau été triées et la bioaccumulation du  $^{201}\text{MeHg}$  et des produits de la déméthylation ( $^{201}\text{Hg}$  (II)) ont été déterminés pour chaque individu. L'exposition au MeHg a augmenté l'activité des civelles non migrantes mais pas leur comportement de migration. La contamination a affecté la structure mitochondriale et le métabolisme ce qui suggère un plus fort stress oxydant et l'activation du système de défense antioxydantes des civelles non migrantes. Au final, nos résultats suggèrent que l'exposition au MeHg pourrait induire une augmentation de la dépense énergétique et une plus grande vulnérabilité à la prédation chez les civelles non-migrantes dans le milieu naturel.

### **Abstract**

The effect of methylmercury (MeHg) on glass eels' propensity to migrate, mitochondrial activity and antioxidative defence systems were investigated. Marine glass eels were first sorted in an experimental flume according to their response to dusk. Fish responding to the decrease in light intensity by ascending in the water column and moving with or against the flow were considered as having a high propensity to migrate (migrant). Glass eels still sheltering at the end of the 24 hrs catching period were considered as having a low propensity to migrate and were called non-migrant. Migrant and non-migrant glass eels were then individually tagged and exposed to isotopically enriched  $^{201}\text{MeHg}$  ( $50 \text{ ng L}^{-1}$ ) for 11 days. The effect of contamination was studied on muscle fibres structure, and the expression level of genes involved in mitochondrial activity and antioxidative defence systems. To investigate the effect of MeHg on glass eel behaviour, migrant and non-migrant glass eels were sorted again and the bioaccumulation of  $^{201}\text{MeHg}$  and its demethylation product ( $^{201}\text{Hg}(\text{II})$ ) was determined for each individual. MeHg exposure increased activity in non-migrant glass eels but not migratory behaviour. Contamination affected mitochondrial structure and metabolism and suggests a higher oxidative stress and activation of antioxidative defence systems in non-migrant glass eels. Altogether, our results suggest that exposure to MeHg might induce an increase in energy expenditure and a higher vulnerability to predation in non-migrant glass eels in the wild.

## 1. Introduction

The European eel (*Anguilla anguilla* L., 1975) has, for several decades, been considered an endangered species. Overfishing, climate-current changes, habitat destruction, migration barriers and pollution are among the many suggested causes of their decline (Dekker, 2002; Feunteun, 2002). This catadrome species reproduces in the Sargasso Sea from March to July (Schmidt, 1922; McCleave et al., 1998) and the resulting larvae (Leptocephali) migrate northeast to coastal areas whilst exhibiting a diel vertical migration. After metamorphosis on the continental shelf, glass eels enter estuaries mostly from October to April/May and migrate up-stream for the growing phase into the yellow eel stage. Then, yellow eels metamorphose into silver eels and migrate downstream to the ocean to reproduce and probably die (Tesch, 1977).

Glass eel is a key developmental stage because many physiological (Fontaine and Raffy, 1932; Callamand and Fontaine, 1942; Ciccotti et al., 1993), morphological (Grassi and Calandruccio, 1897; Elie, 1979) and ethological metamorphoses (Dean, 1912) occur. As for some other species, the Selective Tidal Stream Transport (STST) is the vector of estuarine migration in glass eels until they reach the tidal limit (Forward and Tankersley, 2001). During the flood tide, glass eels move up in the water column and migrate with the current to save energy. During ebb tides, they go down and remain on or near the substratum to avoid being carried downstream to the sea by the current (Jellyman, 1979; McCleave and Kleckner, 1982; Forward and Tankersley, 2001). However, recent studies using otolith microchemistry in yellow eels indicate that some individuals may not migrate to freshwater and may complete their life cycle between marine and brackish waters (Tsukamoto et al., 1998; Tzeng et al., 2000; Tsukamoto et al., 2002; Daverat et al., 2006). This propensity of glass eels to migrate, or not, to freshwater may be related to their energy status, migrant individuals having a higher body condition (Edeline et al., 2004, 2006; Bureau Du Colombier et al., 2007; Edeline, 2007). However, most glass eels starve during estuarine migration (Bardonnet and Riera, 2005) and thus, depend upon energy stores accumulated by the leptocephalus larvae in order to reach freshwater. Energy expenditure during this migration results from locomotor activity and standard metabolism that can strongly fluctuate between individuals (Régnier et al., 2010) but also with temperature (in poikilothermic species) and environmental stress, such as contaminants. Exposure to contaminants contributes to additional energy needs through the implementation of processes of detoxification and cellular repair (Correia et al., 2007) but its effect on migratory behaviour in glass eels has never been investigated.

Mercury is a highly toxic ubiquitous compound due to its presence in natural or anthropogenic sources (Morel et al., 1998). It is found in the environment in various forms: elementary mercury ( $\text{Hg}^0$ ), inorganic mercury ( $\text{Hg(II)}$ ) and organic mercury (MeHg) (Clarkson, 2002). MeHg is the most toxic form, mainly produced in aquatic ecosystems by microbial processes (Fitzgerald and Mason, 1997) and highly bioaccumulated in aquatic biota including eels (Arleny et al., 2007). It has been reported that 90 % of total mercury absorbed into a fish through the food web is in the methylated form (Hall et al., 1997) and almost all mercury found in fish muscle is in this form (Bloom, 1992). MeHg has been reported to induce neurological (Burbacher et al., 1990; Gilbert and Grant-Webster, 1995), histological (Usuki et al., 1998; Cambier et al., 2009), sensory (Tanan et al., 2006) and reproductive damage (Hammerschmidt et al., 2002; Drevnick and Sandheinrich, 2003). Mercury also inhibits cholinesterase in fish brain and muscle, which can affect behaviour such as swimming activity, crucial for predator-prey interaction, reproductive behaviour or migration (Liao et al., 2006; Alves Costa et al., 2007; Vieira et al., 2009). In the estuarine fish, *Pomatoschistus microps*, Vieira et al., (2009) reported that mercury affected swimming resistance and distance covered while in adults *D. rerio*, exposed to  $1 \text{ mg.kg}^{-1}$  of MeHg, thigmotaxis as well as erratic swimming has been observed (Maximino et al., 2011).

Mechanisms of MeHg toxicity are far from being fully understood but pathways usually affected include oxidative stress, energy metabolism and disruption of mitochondrial function (Cambier et al., 2009; Vieira et al., 2009; Cambier et al., 2010; Richter et al., 2011; Gonzalez et al., 2005; Nøstbakken et al., 2012; Yadetie et al., 2013). In Atlantic cod, treated with  $2 \text{ mg kg}^{-1}$  of MeHg for 14 days, Yadetie et al., (2013) reported an up-regulation of several genes involved in amino acid and lipid metabolism. Zebrafish, contaminated with food containing  $13 \text{ mg kg}^{-1}$  MeHg for 49 days presented a decrease in the state 3 mitochondrial respiration, cytochrome c oxidase (*cox*) activity and in the rate of ATP production accumulation in red permeabilized fibres (Cambier et al., 2009). The disruption of the electron transport chain in the mitochondria lead to the formation of Reactive Oxygen Species (ROS) producing an oxidative stress which may lead to lipid peroxidation and cell apoptosis (Livingstone, 2001; Berntssen et al., 2003; Elia et al., 2003). To fight against oxidative stress, cells synthesize anti-oxidant enzymes like catalase (*cat*) or superoxide dismutase (*sod2*) (Stohs and Bagchi, 1995). In order to detoxify, the cell has various mechanisms: the glutathione-s-transferase (*gst*) enzyme which catalyzes the conjugation of several metals (Edwards et al., 2000), ABC transporters able to extrude metals by active efflux (Dassa and Bouige, 2001; Achard et al., 2004) or the metallothioneins, cystein-rich

proteins which chelate and sequester metal ions (Roesijadi et al., 1996; Baudrimont et al., 1997; Baudrimont et al., 1999; Chan et al., 2002; Baudrimont et al., 2003). In addition, the *in-vivo* demethylation of the MeHg into Hg(II) can also be a detoxification pathway in some species (Evans et al., 2000; Bourdineaud et al., 2012).

All of these responses to MeHg exposure require additional energy (Correia et al., 2007; Vierra et al., 2009) which, in a starving organism such as glass eels, might lead to weight loss and decrease their ability to migrate up the estuary (Bureau Du Colombier et al., 2007; Edeline, 2007).

In order to investigate this question, this study proposes an experimental approach with glass eels exposed to isotopically enriched MeHg ( $^{201}\text{MeHg}$ ,  $50 \text{ ng L}^{-1}$ ). The effects of MeHg bioaccumulation was studied on their propensity to migrate, metabolism, oxidative stress response and processes of detoxification.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Sampling site

Glass eels were caught in March 2012 on the Atlantic coast, downstream of the mouth of the Huchet river (Moliets, South-Western France,  $43^{\circ}51 \text{ N}$ ,  $1^{\circ}23 \text{ W}$ ), *i.e.* in a site where flood and ebb tides have similar durations (about 6 hrs each). Fishing took place by night during the flood tide using a net. Individuals caught in such conditions have freshly metamorphosed into glass eels and can be considered to be at the beginning of their estuarine migration. In the morning following their capture, 1400 glass eels were placed in an experimental flume to be sorted according to their response to photoperiod : sorting 1 (Bureau Du Colombier et al., 2007). 1000 other individuals were held for a second sorting (sorting 2). The sampling protocol is summarized in Figure 31.

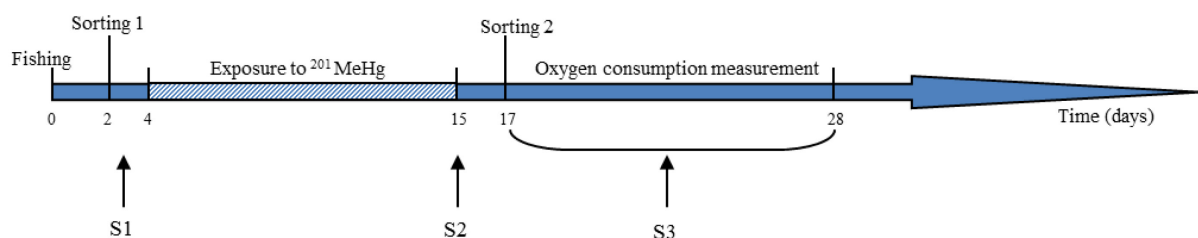


Figure 31. Schematical representation of the experimental protocol. S1 to S3: sampling times for biometric and mercury speciation analysis. S1: first sampling, before exposure to  $^{201}\text{MeHg}$ ; S2: second sampling just after exposure; S3 third sampling, after the second sorting and oxygen consumption measurement.



## 2.2. Experimental Flume and pre-exposure sorting (sorting 1).

The flume is an annular structure composed of two parallel sections 10m long (Figure 32). 700 glass eels were released in each section and subjected to a light/dark cycle (10.5 hrs of light and 13.5 hrs of dark separated by 30 mins of dawn and dusk) and a constant water current, as described by Bureau Du Colombier et al., (2007). Traps were positioned upstream and downstream in the two sections and an artificial shelter (1m<sup>2</sup>) was placed in the centre of each section. In the wild, glass eels migrate mainly during the night, and dusk represents one of the environmental cues triggering this behaviour. They use flood tides to migrate upstream with the flow but experimental studies and personal observations in the wild suggest that they can swim against the current when the velocity is low (Bolliet et al., 2007). Thus, in our experimental installation, glass eels responding to the decrease in light intensity at dusk by ascending in the water column and moving with or against the flow were trapped downstream or upstream and were considered to have a high propensity to migrate ('migrant'). Glass eels still sheltering at the end of the 24 hrs catching period were considered as having a low propensity to migrate and were called 'non-migrant'. Individuals, trapped upstream or downstream but not in response to dusk were called 'active', which means that they swam with or against the current but not in relation to the migration cue (dusk).

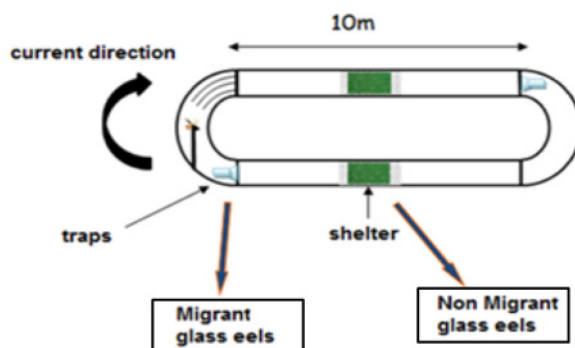
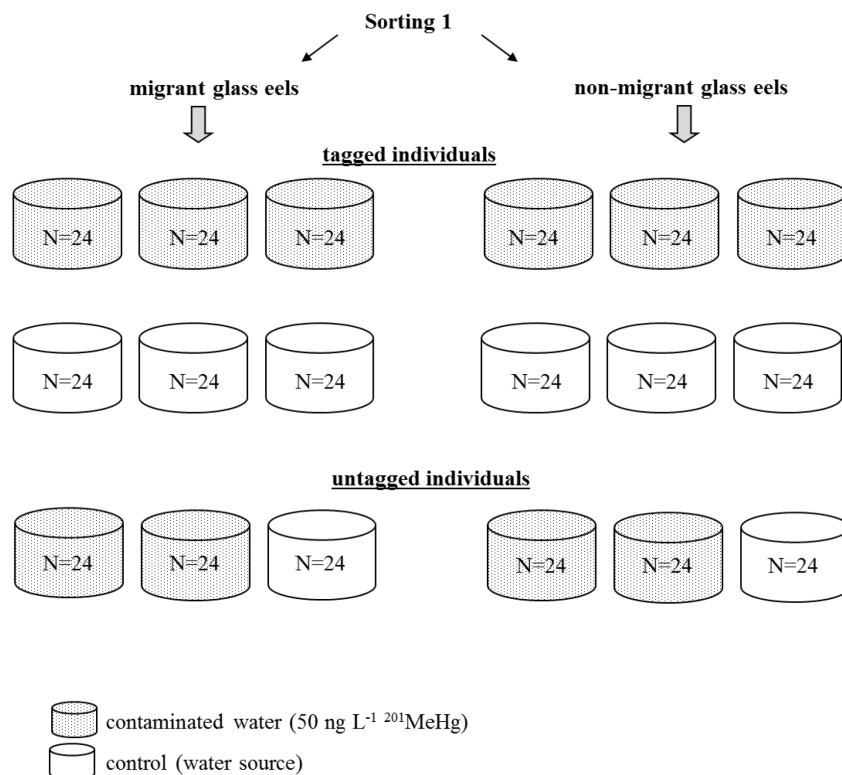


Figure 32: Schematic view of the flume.

## 2.3. Initial measurement and tagging

Just after the first sorting, 341 migrant and 251 non-migrant glass eels were anaesthetised by immersion in a solution of 0.012 mL L<sup>-1</sup> clove oil and measured for length and weight (Sartorius CP 153 balance,  $\pm 1$  mg). From these groups of fish, 144 migrants and 144 non-migrants were randomly sampled and individually tagged using visible implant elastomers as described by Imbert et al., (2007). All tagged glass eels and 96 untagged individuals were then transferred to 18 glass tanks containing 10L (n=24/tank) of commercial water as shown in Figure 33. Ten tanks were contaminated with 50 ng L<sup>-1</sup> <sup>201</sup>MeHg.



**Figure 33: Experimental set up after the first sorting to investigate the effect of MeHg on glass eels' propensity to migrate, 72 migrant and 72 non-migrant glass eels were tagged and exposed to <sup>201</sup>MeHg (50 ng L<sup>-1</sup>) in 10L tanks for 11 days before a second sorting. To investigate the effect of MeHg exposure on gene expression and bioaccumulation, 24 migrant and 24 non-migrant glass eels were exposed to the same conditions but were untagged.**

## 2.4. Exposure conditions

Ten tanks were contaminated with isotopically enriched monomethylmercury (<sup>201</sup>MeHg, ISC Science, Oviedo, Spain) added to the water at a concentration of 50 ng L<sup>-1</sup> (Figure 33). All tanks (contaminated and control) were kept in the same room at 11± 0.5°C and under dim light (2.92 x 10<sup>-3</sup> μW.cm<sup>-1</sup>) for 11 days (Figure 31). pH and oxygen concentrations were measured daily in all tanks. Water was not aerated in order to avoid adsorption of isotopic tracers by air diffusers. When the water oxygen concentration decreased to below 80% saturation, the water was aerated using a small polypropylene tube until 100% saturation was attained.

## 2.5 Post-exposure sorting (sorting 2)

After exposure, all tagged individuals (contaminated and control) were subjected to a second sorting as described in 2.1, to identify migrant, non migrant and active individuals (Figure 31 Sorting 2). Five hundred untagged individuals originating from the same initial group of fish were added to each section to facilitate synchronization by increasing density (Bolliet et al., 2007). During the sorting 2, 13 tagged contaminated and 21 tagged control glass eels escaped

from the flume and were not used for analysis. Untagged contaminated and control individuals were kept for genetic and mercury speciation analysis (see sections 2.7 and 2.8).

## 2.6. Standard metabolism measurement

At the end of the second sorting, migrant and non-migrant tagged glass eels were transferred to 16 respirometry chambers of an intermittent flow respirometer as described by Régnier et al., (2010). Oxygen consumption was measured individually each day for 16 glass eels (one per chamber). Eleven days were necessary to determine oxygen consumption in 26 migrant and 32 non-migrant contaminated glass eels and in 12 migrant and 37 non-migrant control glass eels (Figure 31). Standard metabolism was expressed in  $\text{mm}^3 \text{O}_2$  consumed by an individual per hour per gram of dry weight ( $\text{mm}^3 \text{h}^{-1} \text{g}^{-1} \text{dw}$ ). After measurement, glass eels were anaesthetized, measured for size and weight and individually kept at  $-20^\circ\text{C}$  until mercury speciation analysis.

## 2.7. Mercury speciation analysis

Mercury species concentrations were determined in: 10 migrant and 10 non-migrant glass eels sampled before exposure to  $^{201}\text{MeHg}$  (S1 Figure 31), in 10 migrant and 9 non-migrant glass eels sampled after exposure to  $^{201}\text{MeHg}$  (S2, Figure 31) and in 31 migrant, 43 non-migrant and 58 active individuals collected after the second sorting and oxygen consumption determination (S3, Figure 31, Table 12).

After collection, each glass eel was lyophilized and mashed using an agate mortar. Each individual was then submitted to microwave extraction according the procedure previously published by Navarro et al., (2013). The supernatant was then spiked with known amounts of standard solution of MeHg and Hg(II) and submitted to propylation. Mercury speciation analysis was performed by GC-ICPMS using the method detailed by Navarro et al., (2013). Both natural (naturally assimilated in the wild) and spiked (derived from the isotopically enriched  $^{201}\text{MeHg}$  used for the contamination) mercury species (i.e. MeHg and Hg(II)) were quantified by isotopic pattern deconvolution methodology (Rodríguez-González et al., 2005). Analytical performances were evaluated using the Certified Reference Material DOLT- 4 (Dogfish Liver, NRCC, Ottawa, Canada). Good agreement with certified values (recoveries of 87% and 101% for MeHg and Hg(II), respectively) confirm the accuracy and precision of the method used. Detection limits of 0.04 and 0.11  $\text{ng g}^{-1}$  were found for MeHg and Hg(II), respectively. All concentrations were expressed in  $\text{ng Hg g}^{-1}$  dry weight.

**Table 12: Overview of samples, biometric measurements and mercury species concentrations (mean  $\pm$  standard deviation). The behaviour was determine before exposure to MeHg (Sampling 1, S1), just after exposure (Sampling 2, S2) and after the second sorting that followed exposure (Sampling 3, S3). For this second sorting, we indicated first the behaviour observed during the first sorting and then during the second one. Natural concentrations correspond to mercury species bioaccumulated in the wild while spiked concentrations correspond to mercury species accumulated after experimental exposure to  $^{201}\text{MeHg}$ .**

Behaviour	N	length (mm)	wet weight (mg)	dry weight (mg)	Natural		Spiked	
					MeHg (ng.g dw)	Hg(II) (ng.g dw)	$^{201}\text{MeHg}$ (ng.g dw)	$^{201}\text{Hg(II)}$ (ng.g dw)
<b>S1 : Before exposure</b>								
Migrant	10	68 $\pm$ 3	251 $\pm$ 47	48 $\pm$ 13	188 $\pm$ 45	12 $\pm$ 3		
non migrant	10	65 $\pm$ 3	224 $\pm$ 38	40 $\pm$ 7	203 $\pm$ 44	12 $\pm$ 2		
<b>S2 : after exposure</b>								
Migrant	10	66 $\pm$ 3	222 $\pm$ 32	65 $\pm$ 8	138 $\pm$ 29	18 $\pm$ 6	72 $\pm$ 10	4 $\pm$ 1
non migrant	9	66 $\pm$ 2	216 $\pm$ 37	63 $\pm$ 9	162 $\pm$ 60	23 $\pm$ 6	79 $\pm$ 26	8 $\pm$ 2
<b>S3 Post-exposure and the second sorting</b>								
Migrant : migrant	25	67 $\pm$ 4	225 $\pm$ 47	43 $\pm$ 11	201 $\pm$ 67	20 $\pm$ 12	90 $\pm$ 22	5 $\pm$ 3
non migrant: migrant	7	64 $\pm$ 3	216 $\pm$ 29	41 $\pm$ 8	203 $\pm$ 52	27 $\pm$ 9	102 $\pm$ 23	7 $\pm$ 1
total migrant after the second sorting	31	67 $\pm$ 4	224 $\pm$ 44	43 $\pm$ 11	203 $\pm$ 64	22 $\pm$ 11	92 $\pm$ 22	5 $\pm$ 2
non migrant: non migrant	30	64 $\pm$ 3	203 $\pm$ 28	38 $\pm$ 6	213 $\pm$ 51	25 $\pm$ 10	97 $\pm$ 13	6 $\pm$ 1
migrant: non migrant	13	66 $\pm$ 3	230 $\pm$ 43	44 $\pm$ 11	208 $\pm$ 57	24 $\pm$ 11	91 $\pm$ 16	6 $\pm$ 1
total non migrant after the second sorting	43	65 $\pm$ 3	211 $\pm$ 35	41 $\pm$ 8	211 $\pm$ 52	25 $\pm$ 10	95 $\pm$ 14	6 $\pm$ 1
Migrant: active	27	65 $\pm$ 4	208 $\pm$ 38	41 $\pm$ 9	214 $\pm$ 40	19 $\pm$ 7	96 $\pm$ 18	5 $\pm$ 1
non migrant: active	30	65 $\pm$ 3	215 $\pm$ 37	41 $\pm$ 9	212 $\pm$ 67	21 $\pm$ 6	100 $\pm$ 21	5 $\pm$ 1
total active after the second sorting	58	65 $\pm$ 3	212 $\pm$ 37	41 $\pm$ 9	213 $\pm$ 57	20 $\pm$ 6	99 $\pm$ 19	5 $\pm$ 1

## 2.8 .Genetic analysis

### Sampling procedure

Just after exposure to  $^{201}\text{MeHg}$ , untagged contaminated and control migrant and non-migrant (n=10 for each group) glass eels were anesthetized on ice to be measured and weighed. All glass eels were individually placed in polyethylene bags under  $\text{N}_2$  atmosphere, immersed in liquid nitrogen and stored at  $-80^\circ\text{C}$  to reduce oxidation of metallothioneins and to allow two types of analysis (Q-PCR and metallothioneins quantification) on the same sample

RNA extraction and quantitative real-time PCR

The expression levels of 7 genes were analyzed ( $\beta$ -actin, *cox1*, 12s, *sod2*, *cat*, *gst*, *mtl*, Table 13). Each glass eel was divided to obtain a sample as homogeneous as possible and between 20 to 40 mg of wet weight were used to extract total RNA following the instructions of the ‘Absolutely RNA® Miniprep’ kit (Agilent). Then, the cDNA was produced from the total RNA with the kit ‘AffinityScript™ Multiple Temperature cDNA synthesis’ kit (Agilent) and stored at -20°C until analysis. Quantitative real-time PCR was achieved with a MX3000P (Stratagene). The amplification sequence consisted of a first step of activation of *Taq* DNA polymerase at 95°C for 10 min followed by an amplification of 40 cycles at 95°C for 30s, 60°C, 30s, 72°C, 30s. The primers sequences used are reported in Table 13. Each real time-PCR was performed in a final volume of 20µL reaction solution containing 1 µL cDNA, 2 µL of the gene-specific primer pair at a final concentration of 300 nM for each primer, 7 µL distilled water and 10µL of Brilliant III SYBR® Green QPCR Master Mix (Stratagene, Agilent). Reaction specificity was determined for each reaction from the dissociation curve of the PCR product. This dissociation curve was obtained by following the SyberGreen fluorescence level during gradual heating of the PCR products from 60°C to 95°C. Relative quantification of each gene expression level was normalized according to the  $\beta$ -actin gene expression. Relative expression of each gene was expressed using the  $2^{-\Delta CT}$  method as described by Livak and Schmittgen (2001). The  $\Delta$  Cycle Threshold (CT) represents the difference between the CT of a specific gene and the CT of the  $\beta$ -actin gene.

**Table 13: Function and specific primer pairs for the 7 genes from *A anguilla* used in this study. (a : forward primer, b : reverse primer).**

gene name	function	accession number	Primer(5'-3')
<i><math>\beta</math>-actin</i>	cytoskeletal gene	DQ493907	CAGCCTTCCTTCCTGGGT <sup>a</sup> AGTATTTGCGCTCGGGTG <sup>b</sup>
<i>cox1</i>	sub unit 1 of the cytochrome C oxydase	NC006531	TAGAGGCCGGAGCTGG <sup>a</sup> GGGAGTTTGGTACTGTGTAAT <sup>b</sup>
12s	small subunit 12s of the ribosome RNA	AF266495	ACCCGTGAGAATGCCCT <sup>a</sup> GTGGCTGGCACGAGTT <sup>b</sup>
<i>sod2</i>	mitochondrial superoxide dismutase	DQ493909	AGAAGCTGAGGGAGAAGATGT <sup>a</sup> GGAGAGGAATAAGACCTGTGGTT <sup>b</sup>
<i>cat</i>	catalase	DQ493908	AGCAACCGATCAAATGAAATTATGG <sup>a</sup> CAGCTCCCTTGGCGTG <sup>b</sup>
<i>gst</i>	cellular detoxification	ABY47336	CAGTCAAAGGCAGATGTGGTGC <sup>a</sup> TTGCCATTGATGGGCAGTTTCTTGAAGTT <sup>b</sup>
<i>mtl</i>	metallothionein gene (isoforme 1)	DQ493910	TGCACTACGTGTAAGAAAAGCTG <sup>a</sup> ACACATACAATAAACCCAACACAAATGA <sup>b</sup>

### Metallothionein quantification (MT)

The concentrations of total MT proteins in glass eels were determined by Hg(II) saturation assay as previously described by Baudrimont et al., (2003). The analysis was conducted on 10 glass eels for each condition with the saturation assay being repeated twice per sample. Trichloroacetic acid was used for the denaturation of non-MT proteins and the lyophilized beef haemoglobin (Sigma) prepared in 30mM Tris-HCl buffer (pH 8.2 at 20°C) was added to remove the excess of mercury not bound to the MT. At the end, the supernatant with the MT fraction was quantitatively recovered for mercury determination by flameless atomic absorption spectrometry (AMA 254, Altec, Prague, Czech Republic). The detection limit of the experimental instrument was estimated at 0.01 ng Hg binding site g<sup>-1</sup> (wet weight). At the same time, blanks were performed to validate the method and to deduce the mercury burden for each sample. Furthermore, during the quantification by flameless atomic absorption spectrometry, an internal standard (TORT 2, Lobster Hepatopancreas, Canada) was regularly measured as a normal sample to check measurements.

## **2.9 .Electron microscopy**

Just after exposure, five contaminated and five control migrant and non-migrant glass eels were anaesthetized, measured for length and weight and then killed by a lethal dose of anaesthesia (0.036 mL L<sup>-1</sup> clove oil). For each glass eel, a piece 2.5mm long was sampled just after the urogenital opening and immediately transferred in a fixing solution (1.25% glutaraldehyde buffered with 0.1 mmol L<sup>-1</sup> sodium cacodylate solution, pH 7.4; osmolarity 500 mosmol L<sup>-1</sup>) for 24 hrs at 4°C. Samples were then rinsed 3 times in a cacodylate buffer (0.2 mmol L<sup>-1</sup>, NaCl 2%) post fixed (2% osmic acid, sodium cacodylate 0.2mmol L<sup>-1</sup>, 4% NaCl), and dehydrated until being embedded, stained and observed under a MET Philips CM10 as described by Cambier et al., (2009).

## **2.10. Statistical Analysis**

All statistical analyses were performed using R software (R.2.14.2). Means are given ± standard deviation. All Hg concentrations data were log transformed, to achieve normally distributed data with homogeneous variance, prior to parametric statistical analyses. Chi-

square tests were used to compare the behaviours observed in both sections of the flume, and between the contaminated eels and controls. Statistical differences between migrant and non-migrant or controls and contaminated eels were assessed using the Student t-test for biometrics and mercury concentrations. Differences in oxygen consumption, gene expression levels and MT were determined with a one way analysis of variance (ANOVA), followed by all pair-wise multiple comparison procedures (Tukey test). Covariance models (ANCOVA) were used to test the effect of sampling and of dry weight, in the response of MeHg concentrations. The interactions in the responses were also evaluated. Percentage of variance

explained by a factor was calculated as:  $100 \frac{\text{Sums of squares of factor}}{\text{Sums of squares total}}$ . A significance level ( $p < 0.05$ ) was employed for all the statistical analyses.

### 3. Results

#### 3.1. Sorting 1 and biometric parameters

After the first sorting, glass eel behaviour in response to dusk was similar between the two sections of the flume (Chi square test,  $X^2=3.9325$ ,  $p=0,1400$ ) and all individuals were pooled for analysis. 40% of glass eels ascended in the water column at dusk and moved with the current (Table 14). They were trapped downstream and considered as migrant i.e. with a high propensity to migrate. 29% stayed in shelters and were considered as non-migrant i.e. with a low propensity to migrate (Table 14). Active glass eels (12%) were trapped downstream or upstream during the light or dark phases but not in response to dusk. 13.5% of glass eels were collected at the end of the sorting in the water column or at the bottom of the flume sections. These individuals probably escaped from the shelters during sampling and were not analyzed. Length was significantly longer in migrant glass eels than in non-migrant ones (t-test,  $p=0,0146$ , Table 14) but no significant differences were observed for the wet weight (t-test,  $p=0,2620$ , Table 14).

Table 14: Mean length and weight of migrant, non-migrant and active glass eels before (sorting 1) and after (sorting 2) exposure to MeHg. (N) Number of glass eels, (%) proportions of glass eels. Results that differs significantly are represented in bold ( $p < 0.05$ ).

<u>Pre-exposure behaviour (sorting 1)</u>		N (%)	Length (mm)	Weight (mg)
	<b>migrant</b>	566 (40)	<b>67 ± 3</b>	236 ± 41
	<b>non-migrant</b>	409 (29)	<b>66 ± 3</b>	232 ± 41
	<b>active</b>	162 (12)	nd	nd

<u>Post-exposure behaviour (sorting 2)</u>		N (%)	Length (mm)	Weight (mg)
<b>migrant</b>	contaminated	32 (26)	67± 4	224± 44
	control	15 (12)	66 ± 3	211± 34
<b>non-migrant</b>	contaminated	43 (33)	65 ± 3	211 ± 35
	control	71 (57)	65 ± 3	218 ± 39
<b>active</b>	contaminated	57 (43)	65 ± 3	212 ± 37
	control	37 (30)	64 ± 3	204 ± 32

### 3.2. Post-exposure behaviour, sorting 2

In control, proportion of migrants decreased and proportion of active glass eels increased when compare to the first sorting (40 to 12% and 12 to 30% respectively, Table 14). Behaviour was different in control and contaminated glass eels (Chi square test,  $X^2=5.76$ ,  $p=0,0112$ ). Methylmercury exposure increased the proportion of migrant and active glass eels when compared to control (12 to 26% and 30 to 43% respectively, Table 14). This increase in active glass eels after exposure was mainly observed in individuals that initially showed a low propensity to migrate in sorting 1 (Figure 34). In contrast, the higher proportion of migrant glass eels observed after exposure was mainly observed in individuals that initially showed a high propensity to migrate (Figure 34).



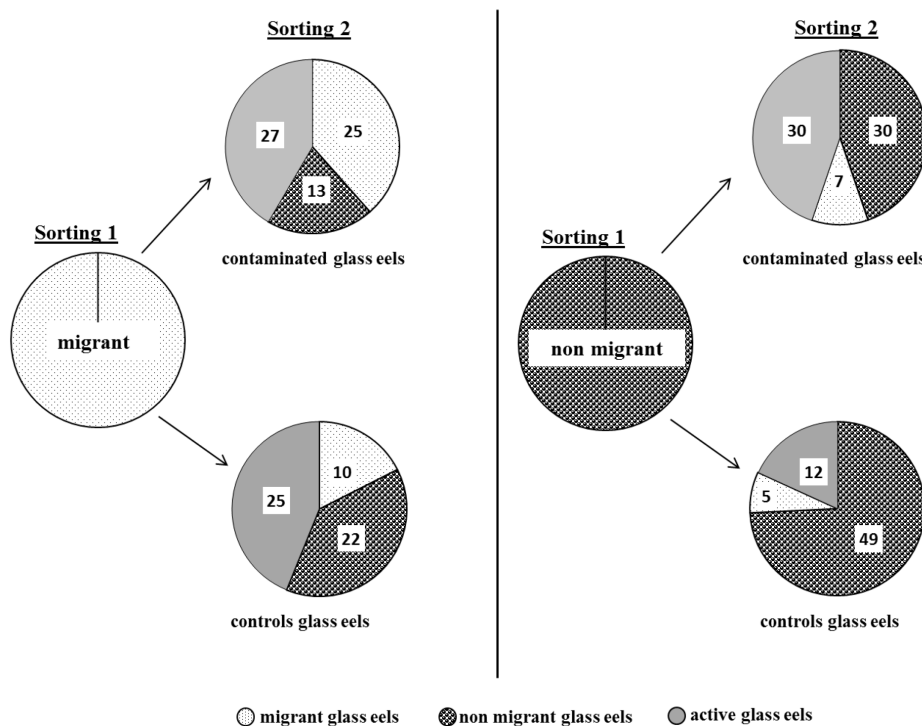


Figure 34: Effect of MeHg on glass eel behaviour sorted in an experimental flume in response to dusk. Sorting 1: before exposure to MeHg, Sorting 2: after exposure to MeHg. The number of individuals for each behaviour is indicated in each section.

### 3.3. Mercury species concentrations

Natural mercury species, i.e. mercury species accumulated in the wild, were analyzed in migrant and non-migrant glass eels, before exposure to  $^{201}\text{MeHg}$  (S1), just after exposure (S2) and following the second sorting (S3) (Table 12, Figure 35). Spiked mercury species, i.e. mercury species deriving from the spiked  $^{201}\text{MeHg}$ , were analyzed in migrant and non-migrant glass eels just after exposure to MeHg and following the second sorting. Active individuals were only analyzed after the second sorting for natural and spiked mercury. Mercury species concentrations in these individuals were not significantly different from those in migrant or non-migrant glass eels except for natural Hg(II) which was lower in active individuals than in non migrant ones ( $p=0,0370$ ). This group of behaviour was not represented in Figure 35. In addition, following the second sorting, there were no significant differences in migrant or non-migrant glass eels in relation to their initial behaviour after Sorting 1 (t test  $p>0,05$ , Table 12).

Just after exposure to  $^{201}\text{MeHg}$ , glass eels showed a bioaccumulation of  $75\pm 19 \text{ ng Hg g}^{-1}$  of spiked MeHg (Figure 35c). Analysis of covariance indicated that natural and spiked MeHg concentrations were related to dry weight ( $p<0,0001$ , explains 35% and 53 % of the variance of data respectively, negative correlation, Figure 35a,c) but not to sampling ( $p=0,9097$  and  $p=0,8949$ , respectively).

Mean natural Hg(II) concentrations increased progressively with time ( $12 \pm 2$  (before exposure);  $20 \pm 6$  (after exposure) and  $23 \pm 10$  ng Hg g<sup>-1</sup>dw (after the second sorting)). Concentrations were related to dry weight ( $p=0,0169$  explains 4% of the variance of data) and sampling ( $p<0,0001$  explains 28% of the variance of data). Exposure of glass eels to <sup>201</sup>MeHg also induced an average bioaccumulation of  $6 \pm 3$  ng Hg g<sup>-1</sup> of <sup>201</sup>Hg(II) resulting from the demethylation of the isotopic tracer (Figure 35d). <sup>201</sup>Hg(II) concentrations were not related to dry weight ( $p=0,0945$ ) nor sampling ( $p=0,1374$ ). Regardless of the mercury species, there was no significant interaction between sampling and dry weight.

Differences in natural and/or spiked mercury species between migrant and non-migrant individuals were assessed using the Student t-test. There was no significant difference in natural and spiked MeHg concentrations between migrant and non-migrant glass eels (Table 12,  $p>0,05$ ). In contrast, concentrations of natural Hg(II) were higher in non-migrant glass eels than in migrant ones just after exposure (S2, Table 12,  $p=0,0392$ ). The concentrations of <sup>201</sup>Hg(II) deriving from the spiked <sup>201</sup>MeHg was also higher for non-migrant glass eels just after exposure (S2) and after the second sorting (S3, Table 12,  $p<0,0001$  and  $p=0,0337$ , respectively).

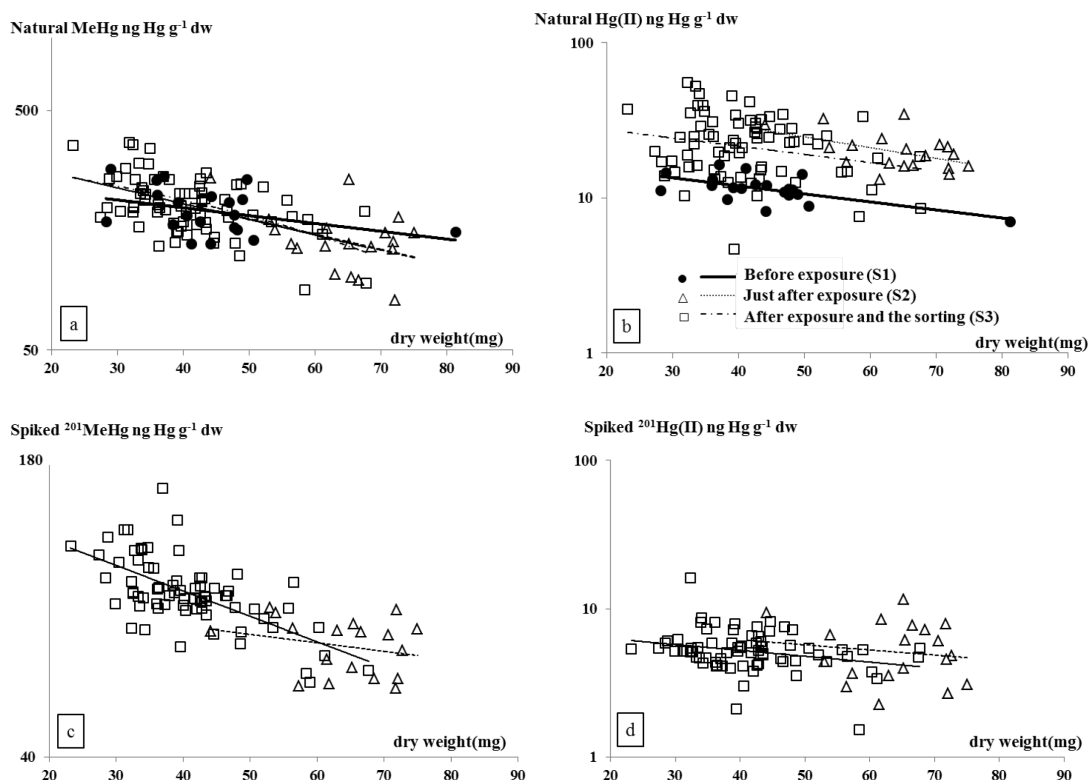
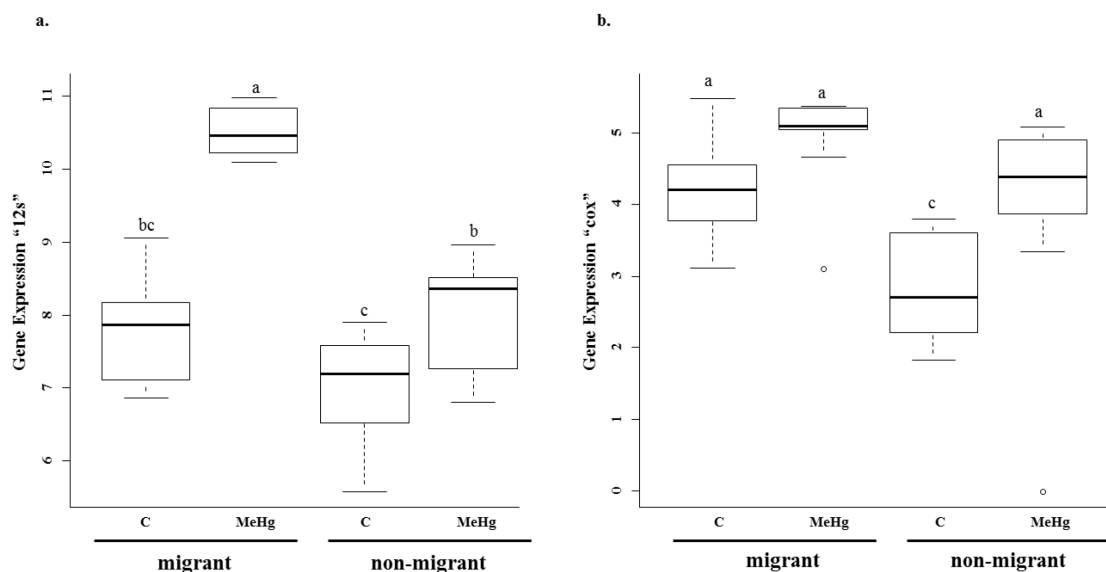


Figure 35: Natural and spiked MeHg and Hg(II) concentrations (log transformed) in glass eels against dry weight. Migrant and non-migrant individuals have been pooled. S1: glass eels sampled just after the first sorting before <sup>201</sup>MeHg exposure, S2: glass eels sampled after the first sorting and just after the exposure to <sup>201</sup>MeHg, S3: glass eels sampled after the second sorting and oxygen consumption measurements.

### 3.4. MeHg effects on gene expression level

The expression of genes involved in mitochondrial metabolism (*12s*, *coxI*), the response against oxidative stress (*sod2*, *cat*) and the detoxification processes (*gst*, *mt1*) were assessed in 10 migrant and 10 non-migrant glass eels just after exposure to  $^{201}\text{MeHg}$  as well as in 10 migrant and 9 non-migrant control glass eels (Figures 36-38). The Anova analysis revealed significant differences between groups of fish for both *12s* and *coxI* genes ( $F=52.578$ ,  $p<0,001$  and  $F=15.055$ ,  $p<0,0001$ , respectively). For both migrant and non-migrant glass eels, the expression level of *12s* increased significantly after contamination ( $p<0,0001$ , Figure 36a) and this increase was particularly marked in migrant glass eels. For *coxI*, the increase in expression level after contamination was only significant in non-migrant glass eels ( $p<0,0001$ , Figure 36b). Both in control and contaminated glass eels, the gene expression tended to be higher in migrant than in non-migrant glass eels but this was only significant in contaminated individuals for the gene *12s* ( $p<0,0001$ , Figure 36a) and in the control ones for the gene *coxI* ( $p=0,0008$ , Figure 36b).



**Figure 36: Gene expression in mitochondrial metabolism. *12s*: panel (a), *coxI*: panel (b) in log (as compared to  $\beta$ -actin) in contaminated (MeHg) or controls (C) migrant and non-migrant glass eels. Boxplots show the median, first and third quartiles as well as extreme values and outliers. Different letters on top of each box-plot indicate a significant difference between treatments or groups as determined by ANOVA followed Tukey's pairwise comparisons ( $P < 0,05$ ).**

Genes expression levels involved in oxidative stress response (catalase: *cat* and superoxide dismutase: *sod*, Figure 37) also differed between groups and treatment (Anova  $F=13.931$  and  $F=42.862$  respectively,  $p<0,0001$ ) Contamination triggered an increase in the expression level

of genes although not significant in migrant glass eels for the *cat* gene ( $p=0,0874$ , Figure 37a). Both in control and contaminated glass eels, there were no differences between migrant and non-migrant glass eels in *cat* expression. *Sod* expression was higher in migrant than in non-migrant after exposure to  $^{201}\text{MeHg}$  ( $p<0,0001$ , Figure 37b).

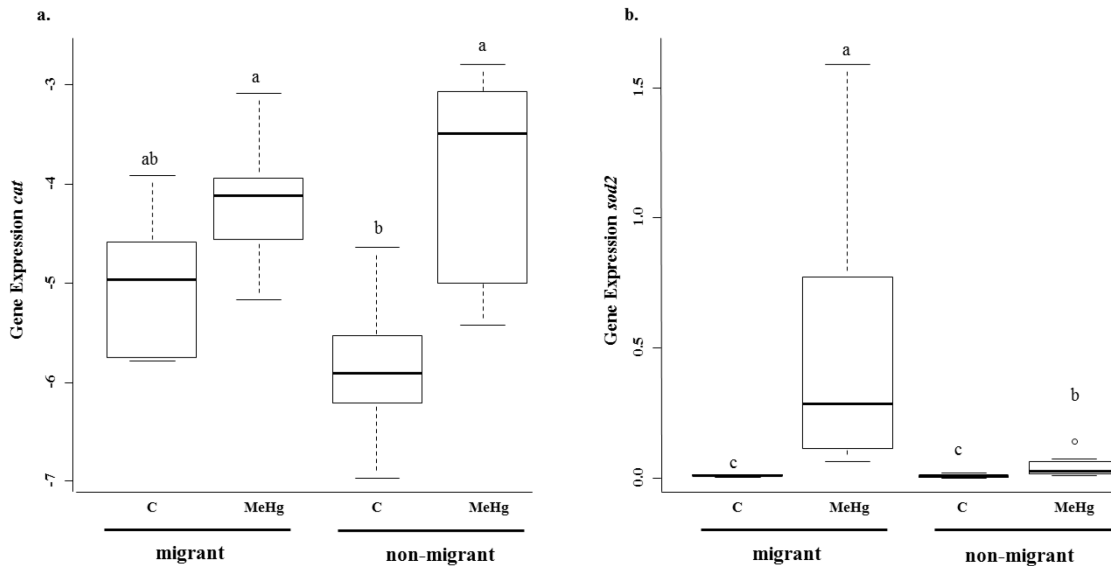


Figure 37: Gene expression in oxidative stress. *cat*: panel (a), *sod2*: panel (b) in log (as compared to  $\beta$ -actin) in contaminated (MeHg) or controls (C) migrant and non-migrant glass eels. Boxplots show the median, first and third quartiles as well as extreme values and outliers. Different letters on top of each boxplot indicate a significant difference between treatments or groups as determined by ANOVA followed Tukey's pairwise comparisons ( $P < 0,05$ ).

Significant differences were observed between groups and treatment for *gst* and *mt1* genes expression levels (Anova  $F=47.867$  and  $F=10.731$  respectively,  $p<0,0001$ , Figure 38). There was no difference between control migrant and non-migrant glass eels in both genes expression levels (Figure 38). Exposure to  $^{201}\text{MeHg}$  significantly increased gene expression except for *mt1* in non migrant glass eels ( $p=0,1613$  Figure 38b). Non-migrant contaminated glass eels presented a significantly higher expression level for *gst* than migrant ones ( $p=0,0196$ , Figure 38a) and an opposite relationship was observed for *mt1* expression level ( $p=0,0233$ , Figure 38b).

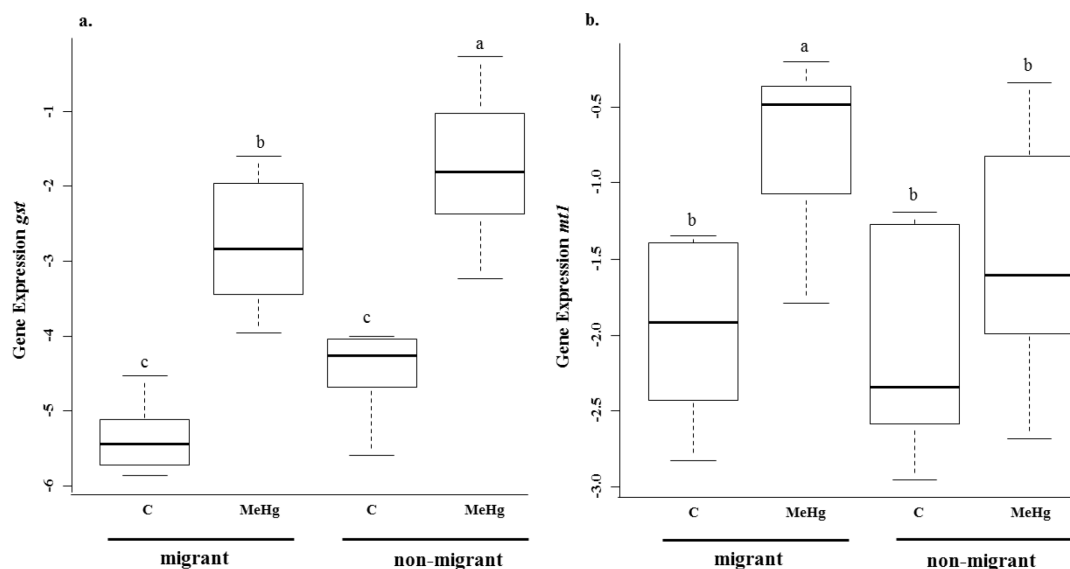


Figure 38: Gene expression in detoxification process. *gsr*: panel (a), *mtI* : panel (b) in log (as compared to  $\beta$ -actin) in contaminated (MeHg) or controls (C) migrant and non-migrant glass eels. Boxplots show the median, first and third quartiles as well as extreme values and outliers. Different letters on top of each boxplot indicate a significant difference between treatments or groups as determined by ANOVA followed Tukey's pairwise comparisons ( $P < 0,05$ ).

### 3.5. Metallothionein concentrations

Significant differences were revealed by the Anova analysis between groups and treatment ( $F = 3.54$ ,  $p = 0,0240$ ). Eleven days of exposure to  $^{201}\text{MeHg}$  did not significantly affect MT levels in migrant and non-migrant glass eels ( $p > 0,05$ , Figure 39) and there were no differences between migrant and non-migrant control glass eels ( $p > 0,05$ ). However, MT concentration was higher after contamination in migrant individuals than in non-migrant ones ( $p = 0,186$ ).

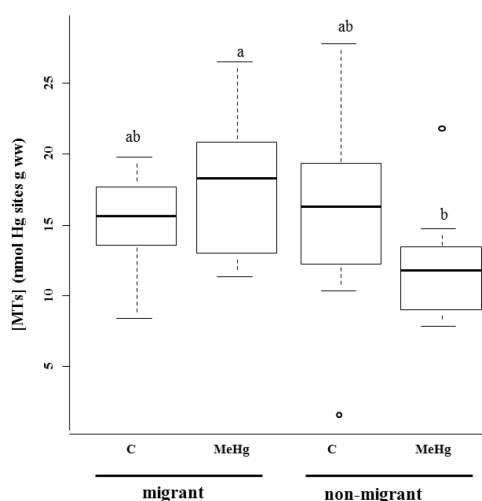


Figure 39: Metallothionein concentrations (nmol Hg sites  $\text{g}^{-1}\text{ww}$ ) in contaminated (MeHg) or controls (C) migrant and non-migrant glass eels. Boxplots show the median, first and third quartiles as well as extreme values and outliers. Different letters on top of each boxplot indicate a significant difference between treatments or groups as determined by ANOVA followed Tukey's pairwise comparisons ( $P < 0,05$ ).

### 3.6. Standard metabolic rates

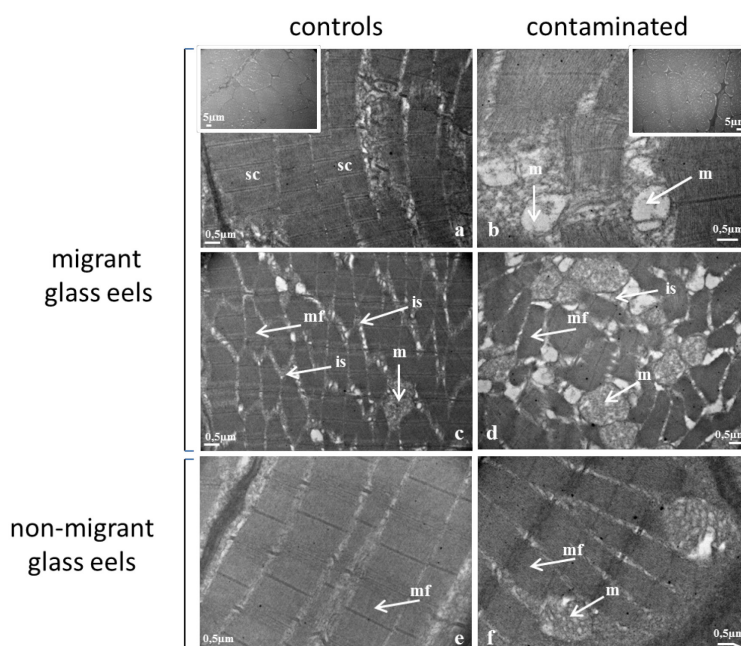
Standard metabolic rates were measured in contaminated and control glass eels after the second sorting. Six to eight migrant and non-migrant individuals were analyzed each day during 11 days. There were no significant differences in oxygen consumption in relation to the day of measurement (data not shown). Oxygen consumptions were on average  $0.25 \pm 0.08 \text{ mm}^3 \text{ g}^{-1} \text{ dw}$  and the Anova analysis did not show significant differences in oxygen consumption in relation to migratory behaviour ( $p=0,8228$ , Table 15).

**Table 15: Oxygen consumption (mean  $\pm$  standard deviation,  $\text{mm}^3 \text{ g}^{-1} \text{ dw}$ ) in controls and contaminated glass eels related to migratory behaviour. N: number of glass eels sampled.**

	N	Controls	N	Contaminated
migrant glass eels	12	$0.25 \pm 0.07$	26	$0.26 \pm 0.08$
non-migrant glass eels	37	$0.23 \pm 0.06$	32	$0.25 \pm 0.07$

### 3.7. Histological alterations in muscular fibres

After 11 days of exposure to  $^{201}\text{MeHg}$ , migrant glass eels were markedly affected by MeHg at the muscular level and mitochondrial ultrastructure (Figure 40). Mitochondria were empty, resulting in complete destruction of mitochondrial cristae (b). Irregular and abnormal separation of the internal and external membrane was seen in contaminated glass eels (b and d). The space between fibre bundles increased with contamination (compare c and d). The effect of MeHg exposure was less spectacular in non-migrant glass eels, although an alteration of the ultrastructure of mitochondria can still be observed (e and f).



**Figure 40: Electron microscopic analysis of muscular fibres of migrant (a-d) and non-migrant (e-f) glass eels for control (a-c-e) and contaminated (b-d-f) conditions. is: interfiber space, m:mitochondria, mf: muscle fiber, sc:sarcomeres.**

## 4. Discussion

### 4.1. Behavioural test

Behavioural sorting differentiates glass eels moving in the water column in response to dusk (as observed in migrant individuals in the wild) from glass eels that remains in the shelters regardless of environmental cues (considered as non-migrant in the wild). The reasons why some glass eels do not migrate to freshwater in the wild and complete their life cycle between marine and brackish waters remain unclear (Tsukamoto et al., 1998; Tzeng et al., 2000; Tsukamoto et al., 2002; Daverat et al., 2006). They may have lost synchronisation to environmental cues for unknown reasons and settle in the estuary but they may also stop migration, because of a deficit in energetic stores (Bureau Du Colombier et al., 2007; Edeline, 2007). After the second sorting, proportions of control migrant glass eels decreased when compared to the first sorting, while both proportions of active and non-migrant individuals increased. This suggests that some individuals lost synchronization to environmental cues probably during the 15 days where fish were kept in tanks in between the two sorting processes. Indeed, during their estuarine migration, glass eels use flood tide transport (McCleave and Kleckner, 1982; Wippelhauser and McCleave, 1987) to reach river water for growth at a low energetic cost (Hickman, 1981). They are abundant in the water column during the flood tide and migrate with the current and remain on or near the bottom during the ebb tide until they reach the tidal limit (Forward and Tankersley, 2001). This rhythmic pattern of activity is synchronised to environmental cues related to the tidal cycle such as current water reversal (Wippelhauser and McCleave, 1987; Bolliet et al., 2007; Bolliet and Labonne, 2008) or odour content (Creutzberg, 1961). However, glass eel catches usually occur at night (Gandolfi et al., 1984; Gascuel, 1986) and dusk, at least in clear water estuaries, represent another strong synchroniser triggering ascension in the water column during the flood. Both synchronisations to the tide and the light-dark cycle are endogenous (McCleave and Wippelhauser, 1987; Bolliet et al., 2007; unpublished data) and driven by one or several clocks that are likely to be coupled together. During the 15 days of stalling between the 2 sorting processes, glass eels were maintained without any water current and subjected to a LD cycle with a very low light intensity during daytime. Such conditions may have desynchronised the clocks and affected their behavioural response to dusk.

After exposure, MeHg concentration was around 300 ng g<sup>-1</sup>dw (0.03 µg Hg g<sup>-1</sup>ww ) in glass eels which is lower than the 0.2 µg Hg g<sup>-1</sup>ww for the whole body recommended by Beckvar et al., (2005), as protective for juvenile and adult fish (i.e. unlikely to have adverse

effects). However, even if exposure to low toxicant concentrations probably do not strongly affect physiological function in fish, they may be unable to function in an ecological context if their behaviour is altered (Scott and Sloman, 2004).

Exposure to MeHg increased activity both in migrant and non-migrant glass eels. However, when compared to controls, activity in response to dusk (by ascending in the water column and mainly swimming with the water current as observed in the wild) was better maintained in contaminated migrant glass eels, while contaminated non migrant individuals mainly swam upstream during the light phase. An increase in swimming activity has already been reported in the largemouth bass after 24hrs of exposure to  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  mercury (Morgan, 1979) and in *Fundulus heteroclitus*, after embryonic or larval exposure to  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  MeHg (Zhou and Weis, 1998). In the wild, such disruption of activity patterns may alter the ability of fish to mate, find food, appropriate habitat and/or avoid predation (Atchison et al., 1987). In the case of glass eels, an increase of activity during the day and against the water current in non-migrant individuals may lead to a higher vulnerability to predation and high energy expenditure. This might suggest that non-migrant individuals may be more vulnerable than migrant ones to MeHg exposure but the ecological effects remain difficult to assess.

#### **4.2. Mercury species bioaccumulation**

Concentrations of natural MeHg and Hg(II) agree with the levels found in the same estuary by Navarro et al. (2013) and Claveau et al., (submitted). Concentrations of MeHg were much higher than those of Hg(II) due to the high lipophilic property of MeHg that can easily cross biological membranes. MeHg can accumulate up to 2.5 times quicker than Hg(II) when assimilated through the gills (Bouquegneau and Joiris, 1988). It is not retained by the gills and rapidly reaches other organs and muscle via the blood system. Loumbourdis and Danscher, (2004) also reported that Hg(II) forms complexes with selenium or cysteine, which accumulate in lysosomes and are then eliminated by the biliary route.

Similar concentrations of spiked  $^{201}\text{MeHg}$  observed just after exposure in both migrant and non-migrant glass eels provide direct evidence for a bioaccumulation of these mercury species regardless of the migratory behaviour. Comparison of these bioaccumulation levels with others studies remains difficult because many of them used trophic exposure, leading to relatively high bioaccumulation reported in different target organs (Berntssen et al., 2003; Sinaie et al., 2010; Monteiro et al., 2013; Mela et al., 2014). In the present study, glass eels were exposed to MeHg in the water at ecologically relevant doses and the bioaccumulation was determined at the body level. The originality of our study also lies in the use of isotopic



tracers which enables the observation of the demethylation processes. As previously reported in other species, glass eels are able to demethylate MeHg into Hg (II) (Wiener et al., 2003; Bourdineaud et al., 2012). Just after contamination, this process was more marked in non-migrant than in migrant glass eels. This suggests that non-migrant glass eels may have a greater ability to demethylate. However, the observed concentrations are the result of assimilation, transformation and elimination processes of mercury (Ribeyre and Boudou, 1984), and the possibility of a more rapid elimination of Hg(II) in migrant glass eels cannot be excluded.

### **4.3. MeHg affects metabolism**

Genetic analysis revealed that control migrant and non-migrant glass eels presented similar expression levels of the gene *12s*, while *coxI* was more strongly expressed in migrant glass eels. The *coxI* gene belongs to complex IV of the mitochondrial respiratory electron transport chain of mitochondria located in the inner membrane of the mitochondria. A higher expression level in this gene might suggest an acute energy demand and a higher standard metabolism in control migrant glass eels.

MeHg exposure led to an over-expression of both *12s* and *coxI* genes in glass eels but the effect differed between the two behavioural groups. Indeed, when compared to controls, the increase in *12s* expression levels was higher in migrant (x10) than in non-migrant glass eels (x3) while the ratio *12s/coxI* markedly increased in migrant (x5) and decreased in non-migrant individuals (/2). The marked increase in the *12s* expression level in migrant glass eels might result from the higher mitochondrial damage revealed in these individuals by the ultrastructure analysis. Disorganization of membranes associated with a loss of the cristae ultrastructure has already been observed in fish and mammals and might be attributed to preapoptotic lesions (Angermuller et al., 1998; Oliveira Ribeiro et al., 2008; Cambier et al., 2009). The increase of the number of mitochondria after MeHg exposure could then depict an adaptive response of organisms to compensate for mitochondrial damage and to maintain ATP production and metabolism. However, in non-migrant glass eels, the decrease in the *12s/coxI* ratio after exposure might reflect a higher energy demand and ATP production.

According to the results above in control and contaminated migrant and non-migrant glass eels, the lack of difference in standard metabolism might be surprising. This might result from the fact that oxygen consumption measurement and genetic analysis were not conducted on the same individuals and not at the same time but this remained to be confirmed.

#### 4.4. MeHg-induced oxidative stress

Mercury species are known to trigger redox reactions generating ROS which induce oxidative damage to biological molecules leading to lipid peroxidation and cell apoptosis (Livingstone, 2001; Berntssen et al., 2003; Elia et al., 2003). To fight against ROS, cells have different antioxidative defence systems such as *cat*, *sod*, *gst* or *mt1*. In control glass eels, there were no significant differences in these gene expression levels between migrant and non-migrant glass eels. The *sod-cat* system represents the first defence against oxidative damage by its inhibiting effect on ROS formation (Pandey et al., 2003) and both genes tended to be over-expressed in glass eels after MeHg exposure. This result is consistent with several studies reporting an increase in SOD and CAT activities in fish after MeHg or Hg(II) exposure (Berntssen et al., 2003; Vieira et al., 2009; Monteiro et al., 2009; Huang et al., 2010; Monteiro et al., 2013). Mercury is known to induce ROS production through mitochondrial impairment but an increase activity of the mitochondrial respiratory chain can also leads to an increase production of ROS in mitochondria (Murphy, 2009; Edeas et al., 2010). According to our results, ROS production and the resulting oxidative stress observed in non migrant glass eels might result from both mitochondrial impairment and an increase in mitochondrial activity (decrease in the *12s/cox1* ratio). In addition, the increase of *sod2* (the mitochondrial isoform of superoxide dismutase) expression level shows that the cell tried to reduce the presence of these ROS in the mitochondria.

The effect of mercury exposure on *gst* expression levels was also consistent with previous studies showing an increase in GST activity in fish after mercury contamination (Monteiro et al., 2009; Vieira et al., 2009; Huang et al., 2010). GST catalyses the synthetic conjugation reactions of xenobiotics to GSH and plays an important role in tissue protection from oxidative stress (Luo et al., 2006). In *Hoplias malabaricus*, fed for 30 days on contaminated live juvenile *natrinxa* and exposed to sub-lethal concentrations of 0.15 mg L<sup>-1</sup> HgCl<sub>2</sub> for 96hrs, an increase in GST activity was observed in the liver, indicating the development of a defensive mechanism to counteract the effect of Hg(II) (Monteiro et al., 2013).

As observed for *cat* expression levels, the increase of *gst* after exposure to MeHg was higher in non-migrant glass eels than in migrant ones. This supports the hypothesis of a higher oxidative stress in non-migrant glass eels which might result, at least in part, from a higher demethylation processes. Shapiro and Chan (2008), using an in vitro primary astrocyte culture model, demonstrated that MeHg could be converted into Hg(II) and that demethylation increased with oxidative stress. However, this hypothesis was not supported by the *mt* expression levels which did not significantly increase in non-migrant glass eels after MeHg

exposure. In addition, *mt* expression level and MT concentrations were higher in migrant than in non migrant glass eels after exposure. MT codes for a protein that sequesters many divalent transition metals such as Hg(II) (Langston et al., 1998; Huang et al., 2007) and plays an important role in protection against oxidative stress (Andrews, 2000). Its concentration usually increases in tissues in which MeHg demethylation occurs (Bourdineaud et al., 2012) and a positive correlation has previously been observed between the expression of hepatic *mt* messenger RNA and Hg fillets of *Ictalurus punctatus* and *Micropterus salmoides* (Schlenk et al., 1995). A significant relationship between MT levels and Hg content have also been reported in several fish species : *Anguilla japonica*, (Ureña et al., 2007), *Aphanopus carbo* (Bebianno et al., 2007), *Brycon amazonicus* (Monteiro et al., 2009), *Scatophagus argus* (Sinaie et al., 2010) and *Hoplias malabaricus* (Monteiro et al., 2013). In glass eels, the *mt* expression levels and MT concentrations were not correlated to the oxidative stress after MeHg exposure. Such a discrepancy might result from the very low concentrations of IHg measured in glass eels. On the other hand, demethylation processes and the relationships with metallothionein proteins are far from fully understood. In the liver of the tusk, *Brosme brosme*, metallothionein transcription was not correlated to the accumulated mercury (Olsvik et al., 2013) and in mice, Bourdineaud et al., (2012) reported that the *mt2* gene was repressed in mercury demethylating tissue and that low doses of the metal contaminant can induce unexpected gene and protein responses.

In conclusion, exposure to MeHg at ecologically relevant concentrations affected migratory behavioural patterns in glass eels in different ways. Activity increased in non-migrant glass eels but not in response to migratory cues. Our results also provided evidences that MeHg affects mitochondrial structure and metabolism in glass eels and suggest an increase of the oxidative stress and an activation of antioxidative defence systems. The oxidative stress might be higher in non-migrant individuals, maybe in relation to higher demethylation processes. The reasons why migrant and non-migrant glass eels do not react in the same way to MeHg exposure remain to be elucidated. However, altogether, our results suggest an increase in energy expenditure and a higher vulnerability to predation in non migrant glass eels.

### Acknowledgements

Julie Claveau's PhD thesis was funded by The University of Pau & Pays Adour (ED 211). We wish to thank Pascale Coste, Emmanuel Huchet and Jacques Rives for their technical

assistance. The project was partly supported by funding from the European Union in the framework of the ORQUE SUDOE project, the Conseil Général des Pyrénées Atlantiques in the framework of the EXPLOR project and from the University of Pau (BQR MIRA). We also thank Rosie Cox for correcting the English.

## References

- Achard P, Herr A, Baulcombe D.C, Harberd N.P. Modulation of Floral Development by a Gibberellin-Regulated microRNA. *Development*. 2004. 131 (14):3357–65.
- Alves Costa J.R.M, Mela M, Silva de Assis H.C.D, Pelletier E, Randi M.A.F, Oliveira Ribeiro C.A.D. Enzymatic Inhibition and Morphological Changes in *Hopliss Malabaricus* from Dietary Exposure to lead(II) or Methylmercury. *Ecotox Environ Safe*. 2007. 67 (1):82–88.
- Andrews G.K. Regulation of Metallothionein Gene Expression by Oxidative Stress and Metal Ions. *Biochem Pharmacol*. 2000. 59 (1):95–104.
- Angermuller S, Kunstle G, Tiegs G. Pre-Apoptotic Alterations in Hepatocytes of TNF -Treated Galactosamine-Sensitized Mice. *J Histochem Cytochem*. 1998. 46 (10):1175–83.
- Arleny I, Tabouret T, Rodriguez-Gonzalez P, Bareille G, Donard O.F.X., Amouroux D. Methylmercury Bioconcentration in Muscle Tissue of the European Eel (*Anguilla Anguilla*) from the Adour Estuary (Bay of Biscay, France). *Mar Pollut Bull*. 2007. 54 (7):1031–36.
- Atchison G.J, Henry M.G, Sandheinrich M.B. Effects of Metals on Fish Behaviour: A Review. *Environ Biol Fish*. 1987. 18 (1):11–25.
- Bardonnet A, Riera A. Feeding of Glass Eels (*Anguilla Anguilla*) in the Course of Their Estuarine Migration: New Insights from Stable Isotope Analysis. *Estua Coast Shelf S*. 2005. 63 (1-2):201–9.
- Baudrimont M, Metivaud J, Maury-Brachet R, Ribeyre F, Boudou A. Bioaccumulation and Metallothionein Response in the Asiatic Clam (*Corbicula Fluminea*) after Experimental Exposure to Cadmium and Inorganic Mercury. *Environ Toxicol Chem*. 1997. 16 (10):2096–2105.
- Baudrimont M, Andrès S, Metivaud J, Lapaquellerie Y, Ribeyre F, Maillet N, Latouche C, Boudou A. Field Transplantation of the Freshwater Bivalve *Corbicula Fluminea* along a Polymetallic Contamination Gradient (river Lot, France): II. Metallothionein Response to Metal Exposure. *Environ Toxicol Chem*. 1999. 18 (11):2472–77.
- Baudrimont M, Sandres S, Durrieu G, Boudou A. The Key Role of Metallothioneins in the Bivalve *Corbicula Fluminea* during the Depuration Phase, after in Situ Exposure to Cd and Zn. *Aquat Toxicol*. 2003. 63 (2):89–102.
- Bebiano M.J, Santos C, Canário J, Gouveia N, Sena-Carvalho D, Vale C. Hg and Metallothionein-like Proteins in the Black Scabbardfish *Aphanopus Carbo*. *Food Chem Toxicol*. 2007. 45 (8):1443–52.
- Beckvar N, Dillon T.M, Read L.B. Approaches for Linking Whole-Body Fish Tissue Residues of Mercury or DDT to Biological Effects Thresholds. *Environ Toxicol Chem*. 2005. 24 (8):2094–2105.
- Berntssen M.H.G, Aatland A, Handy R.D. Chronic Dietary Mercury Exposure Causes Oxidative Stress, Brain Lesions, and Altered Behaviour in Atlantic Salmon (*Salmo Salar*) Parr. *Aquat Toxicol*. 2003. 65 (1):55–72.
- Bloom N.S. On the Chemical Form of Mercury in Edible Fish and Marine Invertebrate Tissue. *Can J Fish Aquat Sci*. 1992. 49 (5):1010–17.

Bolliet V, Lambert P, Rives J, Bardonnnet A. Rhythmic Swimming Activity in *Anguilla Anguilla* Glass Eels: Synchronisation to Water Current Reversal under Laboratory Conditions. *J Exp Mar Biol Ecol.* 2007. 344 (1):54–66.

Bolliet V, Labonne J. Individual Patterns of Rhythmic Swimming Activity in *Anguilla Anguilla* Glass Eels Synchronised to Water Current Reversal. *J Exp Mar Biol Ecol.* 2008. 362 (2):125–30.

Bouquegneau J.M, Joiris C. The Fate of Stable Pollutants — Heavy Metals and Organochlorines — in Marine Organisms. In *Adv Comp Environ Physiol.* 1988. 219–47.

Bourdineaud J-P, Laclau M, Maury-Brachet R, Gonzalez P, Baudrimont M, Mesmer-Dudons N, Fujimura M, Marighetto A, Godefroy D, Rostène W, Brèthes D. Effects of Methylmercury Contained in a Diet Mimicking the Wayana Amerindians Contamination through Fish Consumption: Mercury Accumulation, Metallothionein Induction, Gene Expression Variations, and Role of the Chemokine CCL2. *Int J Mol Sci.* 2012. 13 (12):7710–38.

Burbacher T.M, Rodier P.M, Weiss B. Methylmercury Developmental Neurotoxicity: A Comparison of Effects in Humans and Animals. *Neurotoxicol Teratol.* 1990. 12 (3):191–202.

Bureau Du Colombier S, Bolliet V, Lambert P, Bardonnnet A. Energy and Migratory Behaviour in Glass Eels (*Anguilla Anguilla*). *Physiol Behav.* 2007. 92 (4):684–90.

Callamand O, Fontaine M. L'activité Thyroïdienne de L'anguille Au Cours de Son Développement. *Arch Zool Exp Gen.* 1942. 82:129–35.

Cambier S, Bénard G, Mesmer-Dudons N, Gonzalez P, Rossignol R, Brèthes D, Bourdineaud J-P. At Environmental Doses, Dietary Methylmercury Inhibits Mitochondrial Energy Metabolism in Skeletal Muscles of the Zebra Fish (*Danio Rerio*). *Int J Biochem Cell B.* 2009. 41 (4):791–99.

Cambier S, Gonzalez P, Durrieu G, Maury-Brachet R, Boudou A, Bourdineaud J-P. Serial Analysis of Gene Expression in the Skeletal Muscles of Zebrafish Fed with a Methylmercury-Contaminated Diet. *Environ Sci Technol.* 2010. 44 (1):469–75.

Chan M.K, Othman R, Zubir D, Salmijah S. Induction of a Putative Metallothionein Gene in the Blood Cockle, *Anadara Granosa*, Exposed to Cadmium. *Comp Biochem Phys C.* 2002. 131 (2):123–32.

Ciccotti BE, Macchi E, Rossi A, Cataldi E, Cataudella S. Glass Eel (*Anguilla Anguilla*) Acclimation to Freshwater and Seawater: Morphological Changes of the Digestive Tract. *J Appl Ichthyol.* 1993. 9 (2):74–81.

Clarkson T.W. The Three Modern Faces of Mercury. *Environ Health Persp.* 2002. 110 (Suppl 1):11.

Correia A.D, Gonçalves R, Scholze M, Ferreira M, Henriques M.A-R. Biochemical and Behavioural Responses in Gilthead Seabream (*Sparus Aurata*) to Phenanthrene. *J Exp Mar Biol Ecol.* 2007. 347 (1-2):109–22.

Creutzberg, F. On the Orientation of Migrating Elvers (*Anguilla Vulgaris Turt.*) in a Tidal Area. *Neth J Sea Res.* 1961. 1 (3):257–338.

Dassa E, Bouige P. The ABC of ABCS: A Phylogenetic and Functional Classification of ABC Systems in Living Organisms. *Res Microbiol.* 2001. 152 (3-4):211–29.

Daverat F, Limburg K.E, Thibault I, Shiao J.C, Dodson J.J, Caron F, Tzeng W.N, Iizuka Y, Wickstrom H. Phenotypic Plasticity of Habitat Use by Three Temperate Eel Species, *Anguilla Anguilla*, *A. Japonica* and *A. Rostrata*. Mar Ecol Prog Ser. 2006. 308:231–41.

Dean B. Changes In the Behaviour of the Eel during Transformation. Ann N.Y. Acad. Sci. 1912. 22:321–326.

Dekker W. Monitoring of Glass Eel Recruitment. Volume 1: Thematic Overview. 3 vols. Ijmuiden, the Netherlands: RIVO - Netherlands institute for fisheries research. 2002.

Drevnick P.E, Sandheinrich M.B. Effects of Dietary Methylmercury on Reproductive Endocrinology of Fathead Minnows. Environ Sci Technol. 2003. 37 (19):4390–96.

Edeas M, Attaf D, Mailfert A-S, Nasu M, Joubet R. Maillard Reaction, Mitochondria and Oxidative Stress : Potential Role of Antioxidants. Pathol Biol. 2010. 58: 220–25.

Edeline E, Dufour S, Briand C, Fatin D, Elie P. Thyroid Status Is Related to Migratory Behaviour in *Anguilla Anguilla* Glass Eels. Mar Ecol Prog Ser. 2004. 282:261–70.

Edeline E, Lambert P, Rigaud C, Elie P. Effects of Body Condition and Water Temperature on *Anguilla Anguilla* Glass Eel Migratory Behaviour. J Exp Mar Biol Ecol. 2006. 331 (2):217–25.

Edeline E. Adaptive Phenotypic Plasticity of Eel Diadromy. Mar Ecol Prog Ser. 2007. 341:229–32.

Edwards R, Dixon D.P, Walbot V. Plant Glutathione S-Transferases: Enzymes with Multiple Functions in Sickness and in Health. Trends Plant Sci. 2000. 5 (5):193–98.

Elia A.C, Galarini R, Taticchi M.I, Dörr A.J.M, Mantilacci L. Antioxidant Responses and Bioaccumulation in *Ictalurus Melas* under Mercury Exposure. Ecotox Environ Safe. 2003. 55 (2):162–67.

Elie P. Contribution À L'étude Des Montées de Civelles d'*Anguilla Anguilla* Linné (Poisson, Téléptéen, Anguilliforme), dans l'estuaire de La Loire: Pêche, Écologie, Écophysiologie et L'élevage. 1979. Thèse de doctorat biologie animale, Université Rennes I.

Evans R.D, Addison E.M, Villeneuve J.Y, MacDonald K.S, Joachim D.G. Distribution of Inorganic and Methylmercury among Tissues in Mink (*Mustela Vison*) and Otter (*Lutra Canadensis*). Environ Res. 200. 84 (2):133–39.

Feunteun E. Management and Restoration of European Eel Population (*Anguilla Anguilla*): An Impossible Bargain. Ecol Eng. 2002. 18 (5):575–91.

Fitzgerald W.F, Mason R.P. Biogeochemical Cycling of Mercury in the Marine Environment. Met Ions Biol Syst. 1997. 34:53–111.

Fontaine M, Raffy A. Recherches Physiologiques et Biologiques Sur Les Civelles. Bull Inst Océanogr. 1932. 603:1–18.

Forward J.R.B, Tankersley R.A. Selective Tidal-Stream Transport of Marine Animals. Oceanogr Mar Biol. 2001. 39:305–53.

Gandolfi G, Pesaro M, Tongiorgi M. Environmental Factors Affecting the Ascent of Glass Eels, *Anguilla Anguilla* (L.), into the Arno River. Oebalia, 1984. 10:17–35.

Gascuel D. Flow-Carried and Active Swimming Migration of the Glass eel (*Anguilla Anguilla*) in the Tidal Area of a Small Estuary on the French Atlantic Coast. Helgoländer Meeresun. 1986. 40 (3):321–26.

Gilbert S.G, Grant-Webster K.S. Neurobehavioural Effects of Developmental Methylmercury Exposure. *Environ Health Persp.* 1995. 103 (6):135.

Gonzalez P, Dominique Y, Massabuau J.C, Boudou A, Bourdineaud J-P. Comparative Effects of Dietary Methylmercury on Gene Expression in Liver, Skeletal Muscle, and Brain of the Zebrafish (*Danio Rerio*). *Environ Sci Technol.* 2005. 39 (11):3972–80.

Grassi G.B, Calandrucchio S. Riproduzione E Metamorfosi Delle Anguille. *Pesca Aquacult.* 1897. 7.193–202.

Hall B.D, Bodaly R.A, Fudge R.J.P, Rudd J.W.M, Rosenberg D.M. Food as the Dominant Pathway of Methylmercury Uptake by Fish. *Water Air Soil Poll.* 1997. 100 (1-2):13–24.

Hammerschmidt C.R, Sandheinrich M.B, Wiener J.G, Rada R.G. Effects of Dietary Methylmercury on Reproduction of Fathead Minnows. *Environ Sci Technol.* 2002. 36 (5): 877–83.

Hickman R.A. Densities and Swimbladder Development of Juvenile American Eels, *Anguilla Rostrata* (Lesueur) as Related to Energetics of Migration. *J Fish Biol.* 1981. 18 (5):507–17.

Huang Z-Y, Zhang Q, Chen J, Zhuang Z-X, Wang X-R. Bioaccumulation of Metals and Induction of Metallo- Thioneins in Selected Tissues of Common Carp (*Cyprinus Carpio L.*) Co-Exposed to Cadmium, Mercury and Lead. *Appl Organomet Chem.* 2007. 21 (2):101–7.

Huang W, Cao L, Ye Z, Yin X, Dou S. Antioxidative Responses and Bioaccumulation in Japanese Flounder Larvae and Juveniles under Chronic Mercury Exposure. *Comp Biochem Phys C.* 2010. 152 (1):99–106.

Imbert H, Beaulaton L, Rigaud C, Elie P. Evaluation of Visible Implant Elastomer as a Method for Tagging Small European Eels. *J Fish Biol.* 2007. 71 (5):1546–54.

Jellyman D.J. Upstream Migration of Glass eels (*Anguilla* Spp.) in the Waikato River. *New Zeal J Mar Fresh.* 1979. 13 (1):13-22.

Langston W.J, Bebianno M.J. Metal Metabolism In Aquatic Environments. Springer. 1998.

Liao C-Y, Fu J-J, Shi J-B, Zhou Q-F, Yuan C-G, Jiang G-B. Methylmercury Accumulation, Histopathology Effects, and Cholinesterase Activity Alterations in Medaka (*Oryzias Latipes*) Following Sublethal Exposure to Methylmercury Chloride. *Environ Toxicol Pharm.* 2006. 22 (2):225–33.

Livak K.J, Schmittgen T.D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods.* 2001. 25 (4):402–8.

Livingstone D.R. Contaminant-Stimulated Reactive Oxygen Species Production and Oxidative Damage in Aquatic Organisms. *Mar Pollut Bull.* 2001. 42 (8):656–66.

Loumbourdis N.S, Danscher G. Autometallographic Tracing of Mercury in Frog Liver. *Environ Pollut.* 2004. 129 (2):299–304.

Luo J, Xuan Y.T, Gu Y, Prabhu S.D. Prolonged Oxidative Stress Inverts the Cardiac Force–frequency Relation: Role of Altered Calcium Handling and Myofilament Calcium Responsiveness. *J Mol Cell Cardiol.* 2006. 40 (1):64–75.



Maximino C, Araujo J, Leão L.K.R, Grisolia A.B.A, Oliveira K.R.M, Lima M.G, Batista E.J.O, Crespo-López M.E, Gouveia A, Herculano A.M. Possible Role of Serotonergic System in the Neurobehavioural Impairment Induced by Acute Methylmercury Exposure in Zebrafish (*Danio Rerio*). *Neurotoxicol Teratol*. 2011. 33 (6):727–34.

McCleave J.D, Kleckner R.C. Selective Tidal Stream Transport in the Estuarine Migration of Glass Eels of the American Eel (*Anguilla Rostrata*). *J Conseil*. 1982. 40 (3):262–71.

McCleave J.D, Wippelhauser G.S. Behavioural Aspects of Selective Tidal Stream Transport in Juvenile American Eels. *Am Fish S S*. 1987. 1.

McCleave J.D, Brickley P.J, O'Brien K.M, Kistne, D.A, Wong M.W, Gallagher M, Watson S.M. Do Leptocephali of the European Eel Swim to Reach Continental Waters? Status of the Question. *J Mar Biol Assoc*.1998. 78 (01):285–306.

Mela M, Neto F.F, Yamamoto F.Y, Almeida R, Grötzner S.R, Ventura D.F, Oliveira Ribeiro C.A. Mercury Distribution in Target Organs and Biochemical Responses after Subchronic and Trophic Exposure to Neotropical Fish *Hoplias Malabaricus*. *Fish Physiol Biochem*. 2014. 40 (1):245–56.

Monteiro D.A, Rantin F.T, Kalinin A.L. Inorganic Mercury Exposure: Toxicological Effects, Oxidative Stress Biomarkers and Bioaccumulation in the Tropical Freshwater Fish Matrinxã, *Brycon Amazonicus* (Spix and Agassiz, 1829). *Ecotoxicology*. 2009. 19 (1):105–23.

Monteiro D.A, Rantin F.T, Kalinin A.L. Dietary Intake of Inorganic Mercury: Bioaccumulation and Oxidative Stress Parameters in the Neotropical Fish *Hoplias Malabaricus*. *Ecotoxicology*. 2013. 22 (3):46–56.

Morel F.M.M, Kraepiel A.M.L, Amyot M. The Chemical Cycle and Bioaccumulation of Mercury. *Annu Rev Ecol Syst*. 1998. 543–66.

Morgan W.S.G. Fish Locomotor Behaviour Patterns as a Monitoring Tool. *J. Water. Pollut. Control Fed*. 1979. 51:580–589.

Murphy M.P. How Mitochondria Produce Reactive Oxygen Species. *Biochem. J*. 2009. 417:1–13.

Navarro P, Clemens S, Perrot V, Bolliet V, Tabouret H, Guérin T, Monperrus M, Amouroux D. Simultaneous Determination of Mercury and Butyltin Species Using a Multiple Species-Specific Isotope Dilution Methodology on the European, *Anguilla Anguilla* Glass Eel and Yellow Eel. *Int J Environ An Ch*. 2013. 93 (2):166–82.

Nøstbakken O.J, Bredal I.L, Olsvik P.A, Huang T.S, Torstensen B.E. Effect of Marine Omega 3 Fatty Acids on Methylmercury-Induced Toxicity in Fish and Mammalian Cells In Vitro. *J Biomed Biotechnol*. 2012. 1–13.

Oliveira Ribeiro C A, Mesmer-Dudons N, Gonzalez P, Yannick D, Bourdineaud J-P, Boudou A, Massabuau J-C. Effects of Dietary Methylmercury on Zebrafish Skeletal Muscle Fibres. *Environ Toxicol Pharm*. 2008. 25 (3):304–9.

Olsvik P.A, Lindgren M, Maage A. Mercury Contamination in Deep-Water Fish: Transcriptional Responses in Tusk (*Brosme Brosme*) from a Fjord Gradient. *Aquat Toxicol*. 2013. 144-145:172–85.

Pandey S, Parvez S, Sayeed I, Haque R, Bin-Hafeez B, Raisuddin S. Biomarkers of Oxidative Stress: A Comparative Study of River Yamuna Fish Wallago Attu (Bl. & Schn.). *Sci Total Environ*. 2003. 309 (1-3):105–15.

Régnier T, Bolliet V, Labonne J, Gaudin P. Assessing Maternal Effects on Metabolic Rate Dynamics along Early Development in Brown Trout (*Salmo Trutta*): An Individual-Based Approach. *J Comp Physiol B*. 2012. 180 (1):25–31.

Ribeyre F, Boudou A. Etude Expérimentale Des Processus de Décontamination Chez *Salmo Gairdneri*, Après Contamination Par Voie Directe Avec Deux Dérivés Du Mercure (HgCl<sub>2</sub> et CH<sub>3</sub>HgCl)—Analyse Des Transferts Aux Niveaux ‘organisme’ et ‘organes.’ *Environ Pollut Ser*. 1984. 35 (3):203–28.

Richter C.A, Garcia-Reyero N, Martyniuk C, Knoebl I, Pope M, Wright-Osment K-M, Denslow N.D, Tillitt D.E. Gene Expression Changes in Female Zebrafish (*Danio Rerio*) Brain in Response to Acute Exposure to Methylmercury. *Environ Toxicol Chem*. 2011. 30 (2):301–8.

Rodríguez-González P, Marchante-Gayón J.M, García Alonso J.I, Sanz-Medel A. Isotope Dilution Analysis for Elemental Speciation: A Tutorial Review. *Spectrochim Acta*. 2005. 60 (2):151–207.

Roesijadi G, Hansen K.M, Unger M.E. Cadmium-Induced Metallothionein Expression during Embryonic and Early Larval Development of the Mollusc *Crassostrea Virginica*. *Toxicol App Pharm*. 1996. 140 (2):356–63.

Schlenk D, Zhang Y.S, Nix J. Expression of Hepatic Metallothionein Messenger RNA in Feral and Caged Fish Species Correlates with Muscle Mercury Levels. *Ecotox Environ Safe*. 1995. 31 (3):282–86.

Schmidt J. The Breeding Places of the Eel. *Philos T R Soc*. 1922. 211.

Scott G.R, Sloman K.A. The Effects of Environmental Pollutants on Complex Fish Behaviour: Integrating Behavioural and Physiological Indicators of Toxicity. *Aquat Toxicol*. 2004. 68 (4):369–92.

Shapiro A.M, Chan H.M. Characterization of Demethylation of Methylmercury in Cultured Astrocytes. *Chemosphere*. 2008. 74 (1):112–18.

Sinaie M, Bastami K.D, Ghorbanpour M, Najafzadeh H, Shekari M, Haghparast S. Metallothionein Biosynthesis as a Detoxification Mechanism in Mercury Exposure in Fish, Spotted Scat (*Scatophagus Argus*). *Fish Physiol Biochem*. 2010. 36 (4):1235–42.

Stohs S.J, Bagchi D. Oxidative Mechanisms in the Toxicity of Metal Ions. *Free Radical Bio Med*. 1995. 18 (2):321–36.

Tanan C.L, Ventura D.F, de Souza J.M, Grotzner S.R, Mela M, Gouveia Jr.A, Oliveira-Ribeiro C.A. Effects of Mercury Intoxication on the Response of Horizontal Cells of the Retina of Thraira Fish (*Hoplais Malabaricus*). *Braz J Med Biol Res*. 2006. 39: 7.

Tesch F.W. 1977. The Eel Biology and Managements of Anguillid Eels. Chapman et Hall.

Tsukamoto K, Aoyama J, Miller M.J. Migration, Speciation, and the Evolution of Diadromy in Anguillid Eels. *Can J Fish Aquat Sci*. 2002. 59 (12):1989–98.

Tsukamoto K, Nakai I, Tesch W.V. Do All Freshwater Eels Migrate? *Nature*. 1998. 396 (6712):635–36.

Tzeng W.N, Wang C.H, Wickström H, Reizenstein M. Occurrence of the Semi-Catadromous European Eel *Anguilla Anguilla* in the Baltic Sea. *Mar Biol*. 2000. 137 (1):93–98.

Ureña R, Peri S del Ramo J, Torreblanca A. Metal and Metallothionein Content in Tissues from Wild and Farmed *Anguilla Anguilla* at Commercial Size. *Environ Intern.* 2007. 33 (4):532–39.

Usuki F, Yasutake A, Matsumoto M, Umehara F, Higuchi I. The Effect of Methylmercury on Skeletal Muscle in the Rat: A Histopathological Study. *Toxicol Lett.* 1998. 94 (3):227–32.

Vieira L.R, Gravato C, Soares A.M.V.M, Morgado F, Guilhermino L. Acute Effects of Copper and Mercury on the Estuarine Fish *Pomatoschistus Microps*: Linking Biomarkers to Behaviour. *Chemosphere.* 2009. 76 (10):1416–27.

Wiener J.G, Krabbenhoft D.K, Heinz G.H, Scheuhammer A.M. Ecotoxicology of Mercury. In Hoffman, D.J., Rattner, B.A., Burton, G.A., Cairns, Jr. and J., (Eds.), *Handbook of Ecotoxicology*, 2nd Edition, CRC Press, Boca Raton, Florida. 2003. Chapter 16. 409–63.

Wippelhauser G.S, McCleave J.D. Precision of Behaviour of Migrating Juvenile American Eels (*Anguilla Rostrata*) Utilizing Selective Tidal Stream Transport. *J Conseil.* 1987. 44 (1):80–89.

Yadete F, Karlsen O.A, Lanzén A, Berg K, Olsvik P, Hogstrand C, Goksøyr A. Global Transcriptome Analysis of Atlantic Cod (*Gadus Morhua*) Liver after in Vivo Methylmercury Exposure Suggests Effects on Energy Metabolism Pathways. *Aquat Toxicol.* 2013. 126:314–25.

Zhou T, Weis J.S. Swimming Behaviour and Predator Avoidance in Three Populations Of *Fundulus Heteroclitus* Larvae after Embryonic And/or Larval Exposure to Methylmercury. *Aquat Toxicol.* 1998. 43 (2):131–48.

La contamination au MeHg augmente l'activité mais pas le comportement de migration des civelles en réponse au signal crépusculaire. En milieu naturel, la photopériode n'est pas le seul facteur permettant la synchronisation des civelles lors de la migration estuarienne. L'utilisation du TTS par la civelle implique une dynamique de migration qui dépend également du rythme des marées. En milieu expérimental, une inversion du courant toutes les 6,2hrs s'est avérée être un bon synchroniseur de l'activité de nage des civelles (Bolliet et al. 2007). Par ailleurs, Bolliet et Labonne (2008) ont démontré l'existence de différents patrons d'activité en réponse à l'inversion du courant, en lien avec le contenu énergétique des civelles.

Afin de confirmer l'effet du MeHg sur le comportement migratoire des civelles, nous avons testé ce second synchroniseur en structure expérimentale (chronotrons). Après contamination des civelles par un traceur isotopique, les civelles ont été soumises à des inversions de courant toutes les 6.2hrs. La bioaccumulation de espèces mercurielles ainsi que le comportement ont par la suite été analysés.



## **Partie 2 : Effet du MeHg sur la synchronisation des civelles en réponse au signal de marée**

### **1. Introduction**

Chez la civelle, la migration estuarienne est sous la dépendance de différents signaux environnementaux tels que la photopériode, le rythme tidal, la température ou encore les odeurs (Creutzberg 1961 ; Gascuel 1986). Les modifications comportementales des civelles observées en fluvium, suite à leur exposition au MeHg, suggèrent que ce dernier pourrait augmenter l'activité des individus 'non migrants' (article 2). Toutefois, la dynamique de déplacement des civelles dans l'estuaire est principalement synchronisée sur le rythme des marées (Creutzberg 1959, 1961 ; Jellyman 1977, 1979 ; McCleave et Kleckner 1982 ; McCleave et Wippelhauser 1987 ; Wippelhauser et McCleave 1988). Afin de mimer les marées, l'inversion du courant s'est avérée être un synchroniseur efficace de l'activité des civelles en milieu expérimental (McCleave et Wippelhauser 1987 ; Wippelhauser et McCleave 1988). Des travaux plus récents ont montré que les civelles synchronisées sur cette alternance de courant présentaient différents comportements de nage tels que la nage dans le sens du courant, à contre-courant ou un comportement alternant une nage dans le sens et à contre-courant (Bolliet et al. 2007 ; Bolliet et Labonne 2008).

L'objectif de cette étude a donc été de tester l'effet du MeHg sur la synchronisation des civelles à l'inversion du courant. Pour cela, dans un premier temps, les civelles ont été contaminées avec un traceur isotopique afin d'observer la bioaccumulation du MeHg et sa déméthylation en Hg(II). Puis les civelles ont été étudiées dans une structure appelée un chronotron (Méthodologies, paragraphe 1.1.2) dans laquelle elles ont été soumises à des inversions de courant toutes les 6,2hrs. L'effet du MeHg a été analysé sur l'activité (nombre moyen de fois où la civelle a été observée en mouvement dans la colonne d'eau) et sur la synchronisation du comportement de nage avec l'alternance du courant. La bioaccumulation du MeHg ainsi que son produit de transformation (Hg (II)) a été suivie lors de deux étapes : en fin de contamination et à la fin du suivi comportemental. Les résultats ont également été comparés avec l'étude précédente réalisée en fluvium (facteur de synchronisation du comportement migratoire : signal crépusculaire).

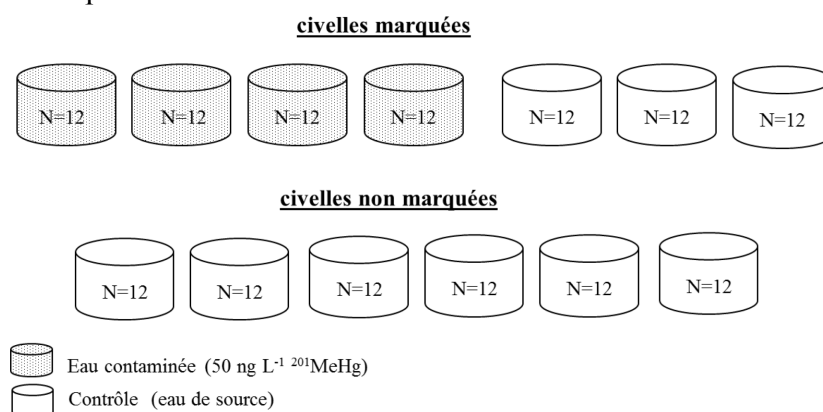
## 2. Matériels et Méthodes

### 2.1. Origine des civelles

Des civelles ont été capturées sur la côte Atlantique, à l'entrée du courant d'Huchet (Moliets, Sud-Ouest de la France, 43°51 N, 1°23 W). La pêche a eu lieu pendant la nuit du 13 au 14 février 2012 à marée montante avec un tamis à main. Le matin suivant la capture, 84 civelles ont dans un premier temps été aléatoirement choisies, anesthésiées (eugénol 1/10 dans de l'alcool 0.1 ml L<sup>-1</sup>), mesurées et pesées (Sartorius CP 153 balance, ± 1 mg). Chacune d'entre elles a ensuite été individuellement marquée avec des VIE-tag fluorescents (combinaisons d'un ou deux spots hypodermiques de différents couleurs) comme décrit dans Imbert et al. (2007).

### 2.2. Protocole de contamination

Toutes les civelles marquées et 72 civelles non marquées ont été transférées dans 13 aquariums (N=12) contenant 10L d'eau commerciale (Figure 41). Quatre aquariums ont été contaminés avec du monométhylmercure enrichi isotopiquement (<sup>201</sup>MeHg ISC Science, Oviedo, Espagne) selon le même protocole que détaillé précédemment (article 2). Pendant les 11 jours d'incubation, les paramètres physico-chimiques ont été quotidiennement relevés et le taux d'oxygène ajusté si besoin (article 2 pour plus de détails). A la fin de la contamination, les paramètres biométriques (longueur/poids) des civelles marquées ont de nouveau été déterminés après anesthésie (eugénol 1/10 dans de l'alcool 0.3 ml L<sup>-1</sup>). Les concentrations naturelles (naturellement assimilées dans la nature) et spikées (issues du traceur enrichi <sup>201</sup>MeHg) ont été quantifiées sur un lot de 12 civelles marquées contaminées du même aquarium et des prélèvements d'eau.



**Figure 41 : Protocole expérimental de contamination pour évaluer l'effet du MeHg sur la synchronisation de nage des civelles à l'inversion du courant. 48 civelles ont été marquées et exposées au <sup>201</sup>MeHg (50 ng L<sup>-1</sup>) dans des aquariums de 10L pour 11 jours et 36 civelles ont également été marquées pour suivre l'impact de la contamination dans les chronotrons. 72 civelles non marquées et non contaminées ont favorisé la synchronisation des civelles par effet de densité.**

### 2.3. Synchronisation des civelles à l'alternance du courant

Par la suite, 36 civelles contaminées et 108 non contaminées ont été placées dans deux chronotrons de façon à obtenir par chronotron 18 civelles marquées contaminées et 18 civelles non contaminées (de codes couleurs différents) ainsi que 36 civelles 'témoins' (non marquées non contaminées) qui ont facilité la synchronisation des individus par effet de densité (Bolliet et Labonne 2008). Le principe de fonctionnement du chronotron est détaillé dans la partie Méthodologies, paragraphe 1.1.2. L'expérience a été menée à une faible intensité lumineuse ( $0,4 \mu\text{W cm}^{-2}$ ) avec une lumière UV de  $0,6 \mu\text{W cm}^{-2}$  permettant de distinguer les codes couleurs fluorescents. La température de l'eau a été maintenue à  $11,5 \pm 0,5^\circ \text{C}$  et le courant a été programmé pour être alternativement inversé toutes les 6.2hrs.

### 2.4. Enregistrement de l'activité de nage

Les civelles ont été filmées pendant 15 secondes toutes les 40 min pour observer leur comportement de synchronisation avec l'inversion du courant. Trois phases de suivis comportementaux ont été étudiées:

- 1) une première phase de 11 jours où le courant a été alterné toutes les 6,2hrs (cycle de marée) durant laquelle chaque individu a été filmé afin d'évaluer son niveau d'activité et sa synchronisation avec ou contre les courant.
- 2) une phase d'étale de 2,5 jours où le courant a été arrêté afin d'étudier le comportement exploratoire des civelles en absence de synchroniseur.
- 3) une dernière phase de 4 jours où le courant a de nouveau été alterné toutes les 6,2hrs (cycle de marée) afin d'observer le comportement des civelles après une phase d'étale.

Pour chaque civelle marquée, l'observation du comportement a consisté à déterminer :

- le niveau d'activité estimé par le nombre moyen de fois où un individu actif a été observé en dans la colonne d'eau
- sa synchronisation avec ou à contre-courant. Un individu a été considéré comme synchronisé s'il a été observé au minimum 15 fois sur un même cycle de marée (dans le sens ou à contre-courant).

A la fin de l'expérience, les paramètres biométriques (poids frais/longueur/poids sec) ont été déterminés pour chaque individu marqué. Les concentrations naturelles et spikées des espèces du mercure (MeHg et Hg(II)) ont été déterminées pour chaque individu marqué.



### 2.5. Analyses statistiques

La périodicité de l'activité de nage des civelles a été analysée en utilisant le périodogramme de Lomb-Scargle (Time Series Analysis Seriel Cosinor 5.1, Expert Soft Technologie). Tous les tests statistiques ont été effectués avec le logiciel R (R.2.14.2). Les moyennes sont données  $\pm$  écart type. Les données ont été log transformées, si nécessaire, pour obtenir des résidus normalement distribués avec l'homogénéité de la variance, avant toute analyse statistique paramétrique. Les différences biométriques entre les différents moments de mesures ont été déterminées par une analyse de variance (ANOVA) sur des données appariées suivie par une procédure de comparaisons multiples par paires (test de Tukey). Des tests de Student ont été utilisés pour tester les différences entre les lots de civelles contaminées et contrôles. Des analyses de variance à deux facteurs (ANOVA) ont permis de déterminer l'effet de la contamination sur l'activité de nage et la synchronisation des civelles avec l'inversion du courant. Des modèles de covariance (ANCOVA) ont été utilisés pour tester l'effet du poids et du temps afin d'expliquer les concentrations en mercure observées.

## 3. Résultats

Durant l'expérience, quelques civelles se sont échappées de l'un des chronotrons. Afin de ne pas biaiser nos résultats, les résultats de ce chronotron n'ont pas été pris en compte.

### 3.1. Paramètres biométriques

Les paramètres biométriques ont été mesurés à t1 (après la pêche), t2 (après la contamination) et t3 (après le suivi comportemental dans les chronotrons). Pour les civelles contaminées ainsi que les civelles contrôles, la longueur et le poids étaient significativement plus faibles à t3 et cela pour chaque individu mesuré (ANOVA,  $F=203.40$ ,  $F=42.76$ , respectivement ;  $p<0,0001$ , Annexe 1). Quel que soit le moment de prélèvement, aucune différence significative de longueur ni de poids n'a été observée entre les civelles contaminées et contrôles (t-test ;  $p>0,05$ ; Annexe 1).

Le nombre d'observations cumulées au cours des 3 phases a été positivement corrélé à la perte poids des individus ( $R^2=0,58$  pour les contrôles et  $R^2=0,84$  pour les contaminées) aussi bien pour les civelles contrôles que contaminées (Figure 42).

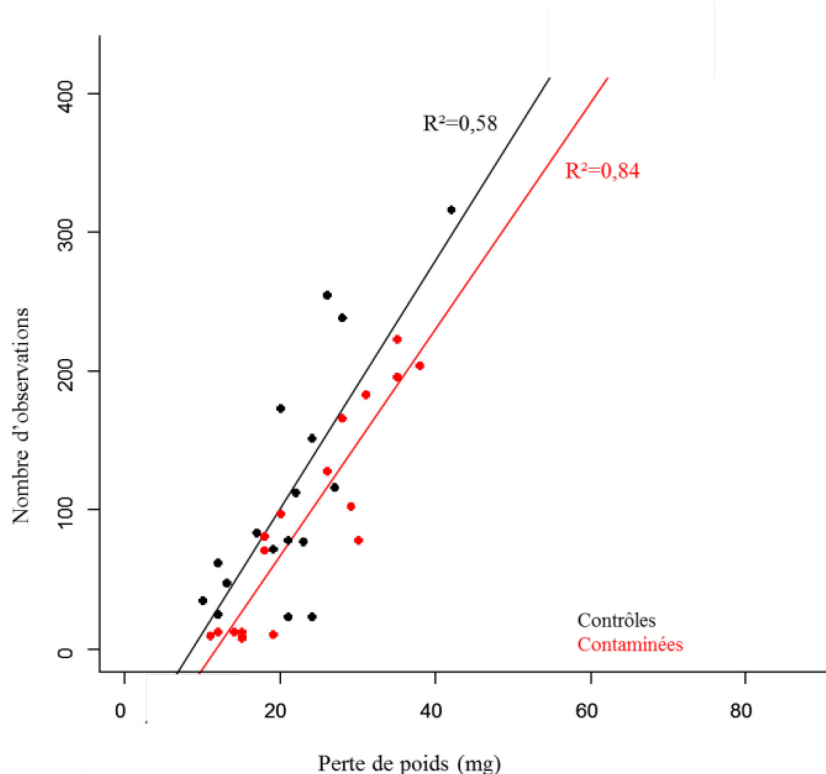


Figure 42 : Perte de poids des civelles à la fin de la phase 3 en fonction du nombre total d’observations dans le sens ou à contre-courant pour les civelles contaminées ( $F=87.74$  ;  $p=1,17.10^{-7}$  ;  $R^2=0.84$ ) et contrôles ( $F=23.33$  ;  $2,21.10^{-4}$  ;  $R^2=0.58$ ).

### 3.2. Activité et synchronisation des civelles

Lors de la première phase de suivi comportemental, le nombre moyen d’observation de civelles dans la colonne d’eau a tendance à être plus important pour les contrôles que pour les contaminées, notamment pour celles se déplaçant dans le sens du courant (Figure 43).

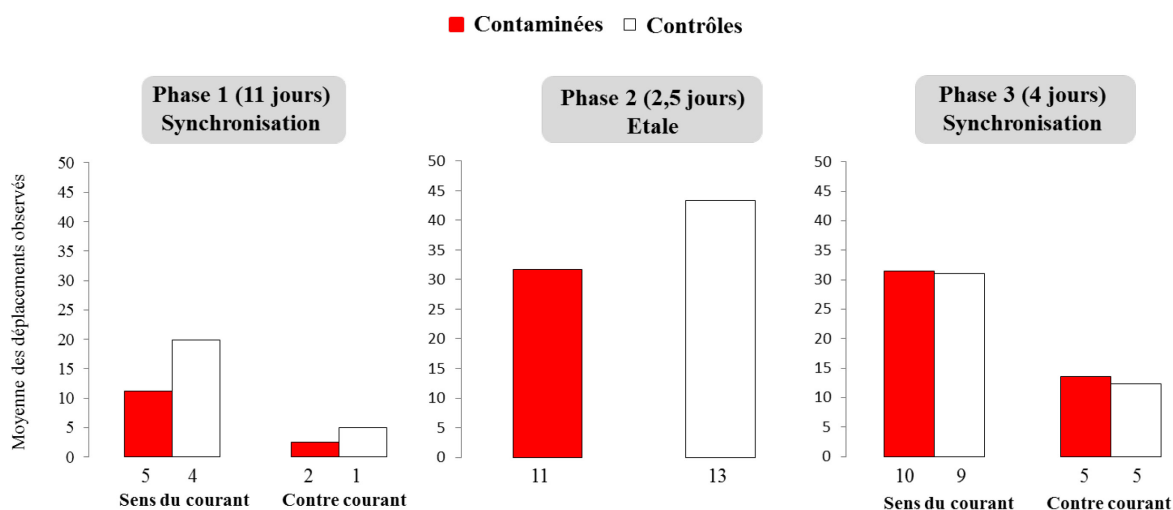


Figure 43 : Moyenne des déplacements des civelles contaminées (rouge) ou contrôles (blanc) observées lors des trois phases de suivis comportementaux : phase 1, 11 jours de synchronisation à l’inversion du courant; phase 2, étale (arrêt du courant); phase 3, 4 jours de synchronisation à l’inversion du courant. Chaque valeur sous les histogrammes correspond au nombre de civelles observées plus de 15 fois en activité, synchronisées avec ou à contre-courant. Aucune différence significative n’a été observée entre les lots.

Le nombre de civelles observées dans le sens ou à contre-courant plus de 15 fois est également supérieur chez les contrôles que chez les contaminées (Tableau 16) avec un nombre moyen d'observation de  $46 \pm 28$  par individu contrôle et de  $34 \pm 17$  par individu contaminé.

**Tableau 16 : Nombre de civelles contaminées ou contrôles observées lors des phases 1 à 3 plus de 15 fois en activité et synchronisées avec une période de 12,4hrs+/- 0,3 avec le courant. SC : civelles nageant avec le courant une marée sur 2, CC : civelles nageant à contre-courant une marée sur 2 ; SC/CC : civelles alternant la nage avec et à contre-courant à chaque inversion de courant.**

	<u>Phase 1</u>		<u>Phase 2 (pas de courant)</u>		<u>Phase 3</u>	
	<i>activité</i>	<i>synchronisation</i>	<i>activité</i>	<i>activité</i>	<i>synchronisation</i>	
<b>Contaminées</b>						
SC	4	4		9	6	
CC	1	0	10	5	2	
SC/CC	0	0		3	3	
<b>Contrôles</b>						
SC	5	4		10	5	
CC	2	0	13	5	1	
SC/CC	0	0		4	4	

Lorsque les pompes ont été arrêtées (absence totale de courant, phase 2), le nombre de civelles en activité a augmenté (Tableau 16) et le nombre moyen de fois où les civelles sont observées dans la colonne d'eau, bien que non significatif, a tendance à être plus faible chez les contaminées que chez les contrôles (Figure 43). La moyenne des observations par individu a été de  $55 \pm 19$  chez les contrôles et de  $51 \pm 15$  chez les contaminées. Lors de la phase 3 (remise en marche du courant), le nombre de civelles observées plus de 15 fois dans la colonne d'eau a augmenté par rapport à la phase 1, à la fois chez les contaminées et les contrôles (Tableau 16). Le nombre moyen d'observation a été semblable entre les 2 groupes (ANOVA,  $p > 0,05$ ; Figure 43) et aucune différence entre le nombre d'individus en activité plus de 15 fois ou synchronisés sur l'alternance du courant n'a été observé (Tableau 16).

### 3.3. Spéciation du mercure

Lors de la contamination,  $50 \text{ ng L}^{-1}$  ont été ajoutés dans 10 L d'eau soit environ 500 ng de  $^{201}\text{MeHg}$  spiké. A la fin de la contamination, le bilan de masse était en moyenne de 120 ng de  $^{201}\text{MeHg}$  spiké et 19 ng de  $^{201}\text{Hg(II)}$  spiké dans l'eau ainsi que 306 ng de  $^{201}\text{MeHg}$  spiké et 145 ng de  $^{201}\text{Hg(II)}$  spiké dans les civelles soit un total de 590 ng de  $^{201}\text{MeHg}$  spiké ce qui a validé les résultats obtenus.

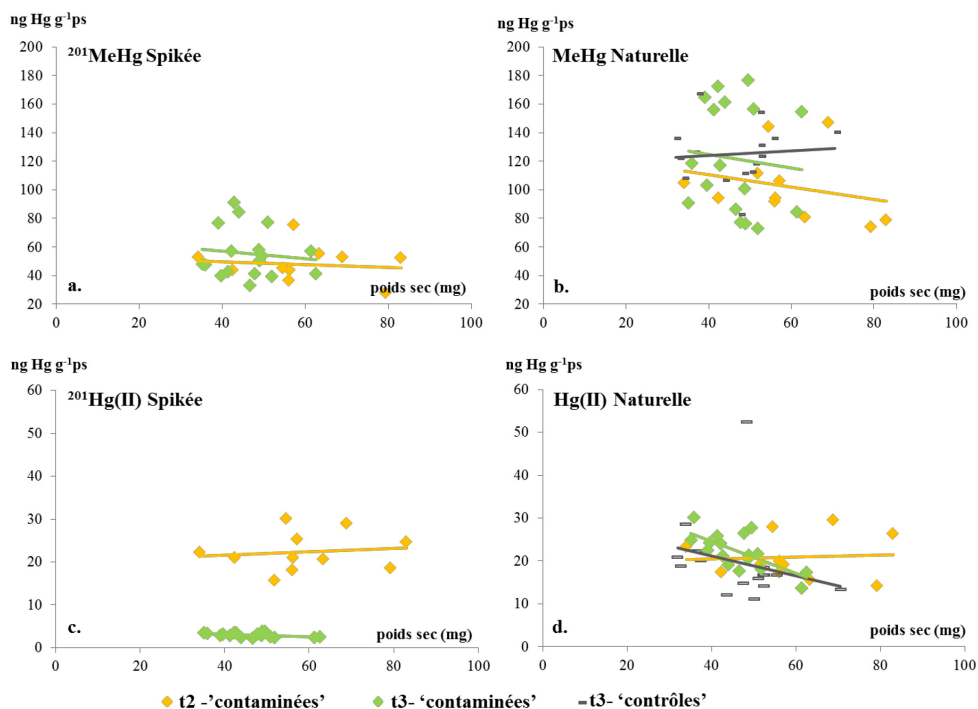
Le facteur de bioaccumulation<sup>1</sup> de chaque espèce mercurielle a été calculé. Uniquement, les facteurs de bioaccumulation des espèces ‘spikées’ sont présentées dans le Tableau 17. Les espèces naturelles bien qu’ayant des facteurs de bioaccumulation plus importants n’ont pas montrées de variations importantes entre les moments d’échantillonnages et ne sont donc pas présentées.

**Tableau 17 : Concentration moyenne mesurée dans deux aquariums du traceur (<sup>201</sup>MeHg spiké et <sup>201</sup>Hg(II) spiké) à la fin de la contamination (t2) (ng L<sup>-1</sup>) et facteur de bioaccumulation correspondant. t2 ; civelles analysées à la fin de la contamination, t3 : civelles analysées après l’étude comportementale, 15 jours après la fin de la contamination.**

	<sup>201</sup> MeHg spiké	<sup>201</sup> Hg(II) spiké
eau (ng L <sup>-1</sup> ) (t2)	11,98 ± 0,234	1,89 ± 0,004
Fbioac (t2)	4	11,8
Fbioac (t3)	4,6	1,8

Le facteur de bioaccumulation du <sup>201</sup>MeHg spiké était de 4 à t2 puis de 4,6 à t3 (Tableau 17). En revanche, pour le <sup>201</sup>Hg(II) spiké, il est passé de 11,8 à t2 à 1,8 à t3 (Tableau 17).

Les résultats des concentrations des espèces de Hg spikées (bioaccumulées lors de la contamination) et naturelles (bioaccumulé *in-vivo*) pour les différentes périodes d’échantillonnage (t2, t3) sont présentés en Figure 44.



**Figure 44: Concentrations naturelles et spikées en méthylmercure (MeHg) et mercure inorganique (Hg(II)) dans les civelles (ng Hg<sup>-1</sup> ps) en fonction du poids sec (en mg). t2 ; civelles analysées à la fin de la contamination, t3 : civelles analysées après l’étude comportementale, 15 jours après la contamination.**

<sup>1</sup> Désigne le rapport entre la concentration d’une substance chimique (le Hg) dans un organisme (la civelle) et sa concentration dans le milieu (l’eau)

La concentration en MeHg spikée n'est pas significativement différente entre (t2) et (t3) et aucune relation n'a pu être mise en évidence avec le poids sec des civelles (ANCOVA,  $p > 0.05$ , Figure 44a). La concentration en Hg(II) spikée est significativement plus importante à la fin de la contamination (t2) qu'à la fin du suivi comportemental (t3) (ANCOVA;  $p < 0.001$ ; Figure 44). L'analyse de covariance n'a montré aucun effet du temps ( $p > 0.05$ ) ni du poids sec ( $p > 0.05$ ) sur la concentration en MeHg naturelle. En revanche, un effet du poids sec ( $p = 2.712 \cdot 10^{-4}$ , 22% de la déviance) et de l'interaction poids sec et du temps ( $p = 3.89 \cdot 10^{-3}$ , 18% de la déviance) a été observé sur les concentrations de Hg(II) log transformées (ANCOVA, Figure 44).

#### 4. Discussion

La perte de poids des civelles est étroitement corrélée à leur activité mais aucune différence n'a pu être mise en évidence entre les individus contrôles et contaminés. Ce résultat contraste avec de précédentes études qui ont montré une réduction de la masse corporelle lors d'une contamination (Zhou et al. 2001 ; Huang et al. 2010), pouvant résulter de dépenses énergétiques supplémentaires liées à la mise en place de processus de détoxification (Ozcan Oruç et al. 2006). Les concentrations relativement faibles de MeHg utilisées dans notre étude ainsi que la durée d'exposition pourraient être à l'origine de ce résultat.

Dans les chronotrons, la marée est mimée par une inversion du sens du courant toutes les 6.2hrs. Tel que précédemment mis en évidence dans ces mêmes installations (Bolliet et al. 2007; Bolliet et Labonne 2008), les civelles ont présenté 4 patrons comportementaux : une nage avec le courant une marée sur deux, une nage à contre-courant une marée sur deux, une alternance de nage avec et contre-courant à chaque inversion de courant ou une absence totale d'activité, les individus restant enfouis dans le substrat. Ces différents comportements de nage sont endogènes et contrôlés par une horloge biologique (Bolliet et al. 2007) qui ne semble pas avoir été affectée par les conditions d'exposition au MeHg puisqu'ils se retrouvent à la fois chez les civelles contrôles et contaminées. Lors de la première phase d'alternance du courant, l'activité des civelles, caractérisée par le nombre moyen de déplacement, s'est avérée avoir tendance à être plus faible chez les contaminées que chez les contrôles. Plusieurs études ont préalablement démontré que le MeHg pouvait affecter le comportement et les performances de nage des organismes (Zhou et Weis 1998 ; Smith et al. 2010). Sakamoto et al, (1998) suggère que le Hg pourrait perturber la capacité du cerveau à contrôler efficacement les fonctions motrices, ce qui aurait pour conséquences d'inhiber la capacité de l'organisme à

capturer des proies, ou éviter les prédateurs (Weis et Weis 1995 ; Zhou et al. 2001). Samson et al (2001) ont observé une diminution de l'activité de nage des larves de poisson zèbre (*Danio rerio*) dont les embryons avaient été exposés à des concentrations de 15 mg L<sup>-1</sup> de MeHg. Chez le saumon atlantique, nourri quatre mois avec du chlorure de mercure (10mg kg<sup>-1</sup> dw de Hg), une diminution de l'activité de nage a également été observée, mais uniquement après alimentation (Berntssen et al. 2003). Les auteurs suggèrent que cette diminution de l'activité pourrait représenter une réponse adaptative pour économiser l'énergie et compenser le coût métabolique lié à la mise en place de mécanismes de détoxification. Par ailleurs, chez le juvénile de *Pomatoschistus microps*, exposé 96hrs à des concentrations de Hg supérieures ou égales à 3,1 µg L<sup>-1</sup> de Hg, l'activité des enzymes antioxydantes étaient négativement corrélées avec l'activité de nage, ce qui va dans le sens de l'hypothèse précédente (Abreu et al. 2010). Ces résultats contrastent avec la précédente étude mettant en évidence une augmentation du nombre de civelles actives après exposition à des doses semblables de MeHg. Le fluvarium, a l'avantage de pouvoir suivre un très grand nombre d'individu. Il ne permet cependant d'observer qu'une probabilité de migration des civelles. En effet, il ne peut pas discriminer avec exactitude des civelles migrantes de non migrantes, des expériences de doubles tris ayant montrées que les civelles ne maintenaient pas toutes le même comportement de migration (Bureau du Colombier 2008). Même si peu d'individu ont été analysé, l'étude dans le chronotron permet d'observer une activité de nage et de synchronisation à l'échelle individuelle ce qui en fait un outil pertinent pour l'étude du comportement de migration. Par ailleurs, les différents travaux de l'effet du Hg sur l'activité des poissons ont parfois donné des résultats contradictoires (augmentation/diminution) pouvant être liés aux doses utilisées, à la durée d'exposition, l'espèce ou encore aux conditions expérimentales (Atchison et al 1987 ; Zhou and Weis 1998 ; Berntssen et al. 2003 ; Vieira et al. 2009). Chez *Brycon amazonicus*, le Hg(II) a induit un important stress oxydatif (Monteiro et al. 2010) qui pourrait affecter le comportement de nage des individus (Vieira et al. 2009). Dans notre étude, il s'agit de la même espèce et des mêmes conditions d'exposition au polluant que dans l'expérience effectuée dans le fluvarium (article 2). Les résultats montrent cependant des taux de Hg(II) spikés, et un processus de déméthylation beaucoup plus important (différence entre t2 et t3). L'étude en fluvarium a montré des taux de déméthylation après 11 jours de contamination de 4% pour les civelles migrantes et 9% pour les non migrantes (article 2), alors que dans cette étude, le taux de déméthylation a été de 33%. Cependant, les prélèvements d'eau ont révélé la présence de Hg(II) spiké (19ng à t2) ce qui laisse suggérer qu'une partie de ce dernier a pu directement être absorbé par la civelle. Lors d'une expérience préliminaire de double ajout de

traceurs isotopiques (Hg(II) et MeHg), seulement 2% de déméthylation avait pu être observé dans l'eau. A notre connaissance, les conditions durant cette deuxième expérience ont été identiques. Il est possible que les cinétiques de transformation et d'accumulation du MeHg et du Hg(II) aient pu être différentes entre les deux expériences. Néanmoins, cette hypothèse est à prendre avec précaution car nos travaux dans les chronotrons n'ont concerné qu'un nombre très restreint d'individus.

Lors de la phase 3, il n'y a plus aucune différence d'activité entre les civelles contaminées et contrôles ce qui suggère un effet transitoire de la contamination. Les niveaux de concentrations en Hg(II) spikés sont aussi plus faibles tout comme le facteur de bioaccumulation qui évolue de 11,8 à t2 à 1,8 à t3 suggérant dans un premier temps une capacité des civelles à dépurifier une partie du MeHg par déméthylation (t2), puis excrétion(t3). Il aurait été intéressant de prélever de l'eau à intervalles de temps réguliers, afin de suivre le processus d'élimination du Hg(II) spiké.

Les niveaux de concentrations en MeHg naturels et spikés ont tendance à être légèrement plus faibles dans cette étude que ceux observés dans l'article 2 et dans l'étude de Navarro et al. (2013). La concentration en Hg(II) spikée est également différente de celle observée dans l'étude précédente. Dans cette étude, la concentration moyenne à t2 et t3 était de  $22 \pm 4$  ng Hg g<sup>-1</sup> ps et  $3 \pm 0,5$  ng Hg g<sup>-1</sup> ps, respectivement alors qu'elle était de  $4 \pm 1$  ng Hg g<sup>-1</sup> ps pour les migrantes et  $8 \pm 2$  ng Hg g<sup>-1</sup> ps pour les non migrantes (t2) puis de  $5 \pm 2$  ng Hg g<sup>-1</sup> ps pour l'étude expérimentale en fluvarium (entre 17 et 28 jours après la contamination, article 2).

Ces résultats suggèrent une aptitude des civelles à déméthyliser, notamment à t2, réduisant ainsi les concentrations en MeHg. Par ailleurs, la forte baisse de Hg(II) spikée observée entre t2 et t3 lors de cette étude laisse suggérer une forte aptitude des civelles à excréter le Hg(II).

Le Hg(II) traverse moins facilement les barrières biologiques (Boudou and Ribeyre 1985) ce qui suggère que les civelles ont certainement déméthylé le MeHg une fois celui-ci bioaccumulé. De plus, la diminution des concentrations à la fin du suivi comportemental montre une importante capacité d'excrétion du Hg(II) par les civelles. Généralement, le Hg(II) forme des complexes avec des molécules comportant des groupements cystéines ou sélénés puis s'associe à des lysosomes pour être ensuite éliminé par voie biliaire (Loumbourdis et Danscher 2004). Le procédé d'élimination d'un métal et donc du Hg(II) est généralement très variable d'une espèce à l'autre (Jeziarska et Witeska 2006). Par exemple, chez *Oreochromis niloticus*, le taux d'élimination du Hg(II) est rapide durant les 10 premiers jours puis passe à un rendement d'élimination de 9 à 15% durant les 30 jours suivants (Wang

et al 2010). Pour *Pomatoschistus microps*, la cinétique de dépuración est très rapide avec une perte de 75% de Hg(II) dans le foie après 4 semaines de dépuración (Abreu et al. 2010).

Pour le MeHg naturel, cela peut probablement s'expliquer par le fait que les civelles n'ont pas été prélevées à la même période et n'ont donc pas rencontré les mêmes conditions. La durée d'exposition au traceur isotopique ayant été la même, à savoir, 11 jours, la seule différence entre les deux expériences est le nombre de civelles par aquarium. Une hypothèse serait que la bioaccumulation du mercure ait diminuée avec la densité.

En conclusion, l'exposition au MeHg semble affecter l'activité des civelles notamment en la réduisant mais ce processus semble transitoire. Bien qu'observé à un niveau plus faible lors de l'étude précédente en fluvarium (article 2), une capacité de déméthylation importante du MeHg puis d'excrétion laisse entrevoir le potentiel des civelles à réduire la charge toxique de MeHg. Ce processus également transitoire, certainement coûteux en énergie, pourrait expliquer la réduction d'activité.



## Références bibliographiques

- Abreu S, Rodrigues A, Gadelha J, Morgado F, Soares A. Mercury Depuration in *Pomatoschistus microps* during Acclimatation. 2010. 3 :159-164
- Atchison GJ, Henry MG, Sandheinrich MB. Effects of metals on fish behavior: a review. *Environ Biol Fishes*. 1987. 18(1):11–25.
- Bardonnnet A, Dasse S, Parade M, Heland M. Influence de l’alternance jour/nuit sur les déplacements de civelles en fluvarium. *Bull Franccais Pêche Piscic*. 2003. (368):9–20.
- Bardonnnet A, Riera P. Feeding of glass eels (*Anguilla anguilla*) in the course of their estuarine migration: new insights from stable isotope analysis. *Estuar Coast Shelf Sci*. 2005 Apr;63(1-2):201–9.
- Berntssen MHG, Aatland A, Handy RD. Chronic dietary mercury exposure causes oxidative stress, brain lesions, and altered behaviour in Atlantic salmon (*Salmo salar*) parr. *Aquat Toxicol*. 2003. 65(1):55–72.
- Bolliet V, Labonne J. Individual patterns of rhythmic swimming activity in *Anguilla anguilla* glass eels synchronised to water current reversal. *J Exp Mar Biol Ecol*. 2008. 362(2):125–30.
- Bolliet V, Lambert P, Rives J, Bardonnnet A. Rhythmic swimming activity in *Anguilla anguilla* glass eels: Synchronisation to water current reversal under laboratory conditions. *J Exp Mar Biol Ecol*. 2007. 344(1):54–66.
- Boudou A, Ribeyre F. Experimental study of trophic contamination of *salmo gairdneri* by 2 mercury compounds - hgcl<sub>2</sub> and ch<sub>3</sub>hgcl - analysis at the organism and organ levels. *Water Air Soil Pollut*. 1985. (26):137–48.
- Bureau Du Colombier S, Bolliet V, Lambert P, Bardonnnet A. Energy and migratory behavior in glass eels (*Anguilla anguilla*). *Physiol Behav*. 2007. 92(4):684–90.
- Creutzberg F. Discrimination Between Ebb and Flood Tide in Migrating Elvers (*Anguilla vulgaris Turt.*) by Means of Olfactory Perception. *Nature*. 1959. 19;184(4703):1961–2.
- Creutzberg F. On the orientation of migrating elvers (*Anguilla vulgaris turt.*) in a tidal area. *Neth J Sea Res*. 1961. 1(3):257–338.
- Elie P. Contribution à l’étude des montées de civelles d’*Anguilla anguilla* Linné (Poisson, télépsthéen, anguilliforme), dans l’estuaire de la Loire : pêche, écologie, écophysiole et l’élevage. Thèse de doctorat biologie animale, Université Rennes I; 1979.
- Elie P, Rochard E. Migration des civelles d’anguilles (*Anguilla anguilla L.*) dans les estuaires, modalités du phénomène et caractéristiques des individus. *Bull Fr Pêche Piscic*. 1994. (335):81–98.
- Forward Jr RB, Tankersley RA. Selective tidal-stream transport of marine animals. *Oceanogr Mar Biol Annu Rev*. 2001. 39:305–53.
- Gandolfi G, Pesaro M, Tongiorgi P. Environmental factors affecting the ascent of glass eels, *Anguilla anguilla (L.)*, into the Arno River. *Oebalia*. 1984. 10:17–35.
- Gascuel D. Flow-carried and active swimming migration of the glass eel (*Anguilla anguilla*) in the tidal area of a small estuary on the French Atlantic coast. *Helgoländer Meeresunters*. 1986. 1;40(3):321–6.

Hammerschmidt CR, Fitzgerald WF. Bioaccumulation and Trophic Transfer of Methylmercury in Long Island Sound. *Arch Environ Contam Toxicol*. 2006. 3;51(3):416–24.

Huang W, Cao L, Ye Z, Yin X, Dou S. Antioxidative responses and bioaccumulation in Japanese flounder larvae and juveniles under chronic mercury exposure. *Comp Biochem Physiol Part C Toxicol Pharmacol*. 2010. 152(1):99–106.

Imbert H, Beaulaton L, Rigaud C, Elie P. Evaluation of visible implant elastomer as a method for tagging small European eels. *J Fish Biol*. 2007 Nov;71(5):1546–54.

Jellyman DJ. Invasion of a New Zealand freshwater stream by glass-eels of two *Anguilla spp.* *N Z J Mar Freshw Res*. 1977. 11(2):193–209.

Jellyman DJ. Upstream migration of glass-eels (*Anguilla spp.*) in the Waikato River. *N Z J Mar Freshw Res*. 1979. 13(1):13–22.

Jeziarska B, Witeska M. The metal uptake and accumulation in fish living in polluted waters. In: Twardowska I, Allen HE, Häggblom MM, Stefaniak S, editors. *Soil Water Pollut Monit Prot Remediat*. Springer Netherlands; 2006. 107–14p

Loumbourdis NS, Danscher G. Autometallographic tracing of mercury in frog liver. *Environ Pollut Barking Essex* 1987. 2004. 129(2):299–304.

McCleave JD, Kleckner RC. Selective tidal stream transport in the estuarine migration of glass eels of the American eel (*Anguilla rostrata*). *J Cons*. 1982. 1;40(3):262–71.

McCleave JD, Wippelhauser GS. Behavioral aspects of selective tidal stream transport in juvenile American eels. *American Fisheries Society Symposium*. 1987. 138–50.

Monteiro DA, Rantin FT, Kalinin AL. Inorganic mercury exposure: toxicological effects, oxidative stress biomarkers and bioaccumulation in the tropical freshwater fish matrinxã, *Brycon amazonicus* (Spix and Agassiz, 1829). *Ecotoxicology*. 2010. 28;19(1):105–23.

Navarro P, Clemens S, Perrot V, Bolliet V, Tabouret H, Guérin T, Monperrus M, Amouroux D. Simultaneous determination of mercury and butyltin species using a multiple species-specific isotope dilution methodology on the European, *Anguilla anguilla* glass eel and yellow eel. *Int J Environ Anal Chem*. 2013. 93(2):166–82.

Ozcan Oruç E, Uner N, Sevgiler Y, Usta D, Durmaz H. Sublethal effects of organophosphate diazinon on the brain of *Cyprinus carpio*. *Drug Chem Toxicol*. 2006. 29(1):57–67.

Sakamoto M, Wakabayashi K, Kakita A, Hitoshi Takahashi, Adachi T, Nakano A. Widespread neuronal degeneration in rats following oral administration of methylmercury during the postnatal developing phase: a model of fetal-type Minamata disease. *Brain Res*. 1998. 16;784(1–2):351–4.

Samson JC, Goodridge R, Olobatuyi F, Weis JS. Delayed effects of embryonic exposure of zebrafish (*Danio rerio*) to methylmercury (MeHg). *Aquat Toxicol*. 2001. 51(4):369–76.

Smith LE, Carvan MJ, Dellinger JA, Ghorai JK, White DB, Williams FE, Weber D. Developmental selenomethionine and methylmercury exposures affect zebrafish learning. *Neurotoxicol Teratol*. 2010. 32(2):246–55.

Ullrich SM, Ilyushchenko MA, Tanton TW, Uskov GA. Mercury contamination in the vicinity of a derelict chlor-alkali plant: Part II: Contamination of the aquatic and terrestrial

food chain and potential risks to the local population. *Sci Total Environ.* 2007. 1;381(1–3):290–306.

Vieira LR, Gravato C, Soares AMVM, Morgado F, Guilhermino L. Acute effects of copper and mercury on the estuarine fish *Pomatoschistus microps*: Linking biomarkers to behaviour. *Chemosphere.* 2009. 76(10):1416–27.

Wang R, Wong M-H, Wang W-X. Mercury exposure in the freshwater tilapia *Oreochromis niloticus*. *Environ Pollut Barking Essex.* 2010. 158(8):2694–701.

Weis JS, Weis P. Effects of exposure to lead on behavior of mummichog (*Fundulus heteroclitus* L.) larvae. *J Exp Mar Biol Ecol.* 1995. 222(1):1–10.

Wipfelhauser GS, McCleave JD. Rhythmic activity of migrating juvenile American eels *Anguilla rostrata*. *J Mar Biol Assoc U K.* 1988. 68(01):81–91.

Zhou T, Scali R, Weis JS. Effects of methylmercury on ontogeny of prey capture ability and growth in three populations of larval *Fundulus heteroclitus*. *Arch Environ Contam Toxicol.* 2001. 41(1):47–54.

Zhou T, Weis JS. Swimming behavior and predator avoidance in three populations of *Fundulus heteroclitus* larvae after embryonic and/or larval exposure to methylmercury. *Aquat Toxicol.* 1998. 43(2):131–48.

Le premier chapitre a mis en évidence des fluctuations temporelles et saisonnières des concentrations en MeHg dans des civelles prélevées en entrée (Moliets) et en milieu de l'estuaire de l'Adour (Urt) (article 1). Le deuxième chapitre a quant à lui montré que la contamination au MeHg augmentait l'activité des civelles mais pas en réponse au signal crépusculaire. L'exposition au MeHg affectait également la structure mitochondriale et le métabolisme des civelles. Au final, le MeHg pourrait engendrer des conséquences non négligeables dans le milieu naturel. L'objectif de ce troisième chapitre vise donc à étudier dans le milieu naturel le comportement de migration, les concentrations en Hg et les mécanismes de détoxification.



# *CHAPITRE 3*

---



## **Etude dans le milieu naturel du comportement de migration, du taux de contamination au mercure et des mécanismes de détoxification**

### **1. Introduction**

Le MeHg est un composé connu pour être particulièrement bioaccumulable chez de nombreux organismes, notamment la civelle, chez qui des concentrations moyennes de l'ordre de 150 à 200 ng Hg g<sup>-1</sup> ps ont été reportées (Navarro et al. 2013, article 1). Dans le cadre de cette thèse, des fluctuations annuelles des concentrations en MeHg ont été observées chez des civelles échantillonnées en milieu marin ou estuarien entre 2004 et 2011 (article 1). Des variations saisonnières ont également été observées, avec notamment de plus fortes concentrations en fin de saison (printemps). Ce dernier résultat, cohérent avec d'autres études (Zhang et al. 2012 ; Greenfield et al. 2013) suggère que ces variations pourraient être attribuées à des différences de méthylation dans la colonne d'eau et le sédiment (Gorski et al. 1999 ; Heim et al. 2007). L'estuaire de l'Adour subit une forte pression anthropique, et est notamment connu pour une augmentation des concentrations en MeHg dans les sédiments de surface au printemps et en été (Stoichev et al. 2004). Ces fortes concentrations en MeHg retrouvées dans les sédiments (zones de méthylation) sont notamment dues à la présence de nombreuses BSR (Dias 2008 ; Duran et al. 2008). Lors de la migration des civelles dans l'estuaire de l'Adour, les civelles sont donc sujettes à une éventuelle contamination au MeHg mais les impacts étaient jusque-là inconnus. Environ 90% du Hg s'accumule sous forme méthylé dans les organismes et les dommages peuvent être nombreux : neurologiques, histologiques, sensoriels mais également comportementaux (Klaper et al. 2008 ; Xu et al. 2012 ; Mela et al. 2014).

Lors de notre précédente étude en milieu contrôlé sur la contamination des civelles au MeHg, il en est ressorti que la contamination a augmenté l'activité mais pas le comportement de migration. La contamination a maintenu le comportement de migration des civelles initialement migrantes et augmenté l'activité des civelles initialement non migrantes (article 2). De plus, le MeHg a affecté le métabolisme des civelles, suggérant une augmentation du stress oxydant et des défenses antioxydantes.

L'objectif de ce troisième chapitre est principalement d'étudier dans le milieu naturel, les relations éventuelles existant entre le comportement migratoire des civelles, leur statut énergétique et leur taux naturels de Hg. Ces relations sont abordées chez des civelles marines et estuariennes, en début et fin de saison et ce, sur deux années de campagne de pêche.



Il s'agit dans un premier temps de déterminer en structure expérimentale (fluvarium) le potentiel de migration des civelles en fonction du lieu (Moliets et Urt) et de la saison (début de saison : automne / fin de saison : printemps) lors de deux campagnes de pêches (2011/2012 et 2012/2013). Dans un second temps, le statut énergétique, la concentration en espèces mercurielles ainsi que l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme énergétique (*12s*, *cox*), le stress oxydant (*cat*, *sod*), la mobilisation des réserves énergétiques (*tgl*) et les mécanismes de detoxication (*gst*) sont évalués afin de caractériser les civelles migrantes et non migrantes lors des deux campagnes de pêches.

## 2. Méthodes

### 2.1. Origine des civelles

Les civelles ont été prélevées en milieu maritime (Moliets, 43° 55'N, 1° 23'W) et dans l'estuaire de l'Adour (Urt, 43° 28'N, 1° 17'W) en limite de salure des eaux (Figure 45).

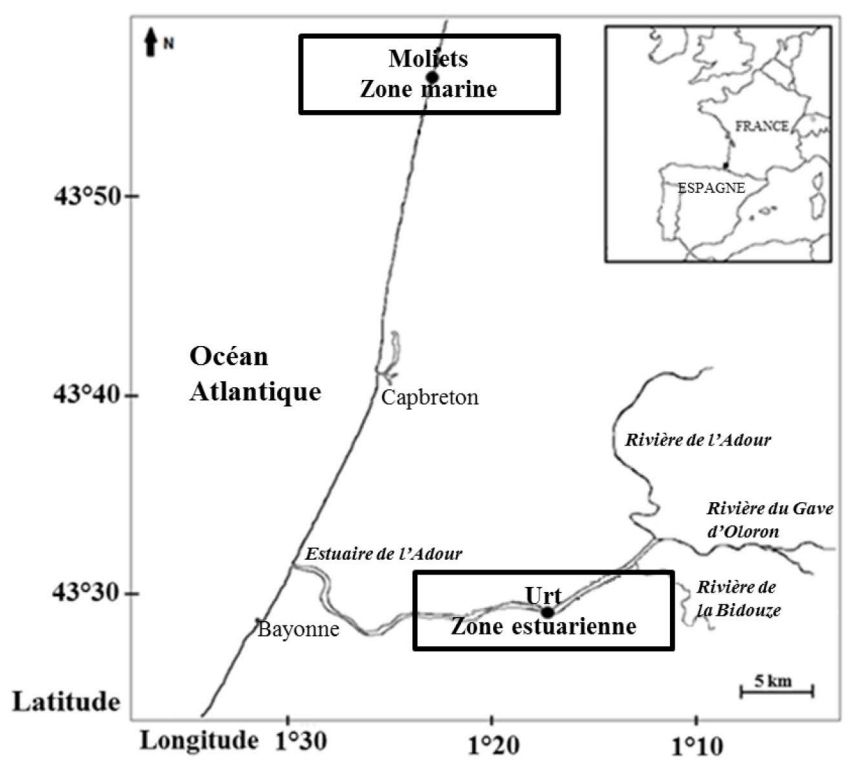


Figure 45: Sites choisis pour les prélèvements des civelles.

### 2.2. Périodes et méthodes d'échantillonnages

Deux campagnes d'échantillonnage ont eu lieu : en 2011-2012 et 2012-2013, en début (novembre-décembre) et fin (mars-avril) de saison de pêche (Tableau 17, cf partie résultats).

Cependant, suite à des problèmes techniques liés aux installations expérimentales lors de la campagne réalisée en début de saison 2012-2013 nous avons décidé de ne pas prendre en compte ces données. Les civelles ont été pêchées par des techniciens de l'UMR ECOBIOP ou par un pêcheur professionnel (pêche du 27 au 28/12/2011 à Urt).

Une fois pêchées, les civelles ont été immédiatement transportées au laboratoire où elles ont été mises en stabulation dans leur eau d'origine aérée jusqu'au lendemain matin dans une salle thermorégulée à 11°C.

### 2.3. Protocoles expérimentaux

Pour chaque pêche effectuée, les civelles ont suivi le protocole expérimental présenté en Figure 46. Le matin suivant la pêche, les civelles ont été soumises à un tri comportemental en fluvarium afin de différencier les civelles ayant un fort (migrantes) ou un faible (non migrantes) potentiel de migration (cf partie Méthodologies, paragraphe 1.1). A partir de ces deux lots, trois sous-échantillonnages aléatoires ont eu lieu de façon à obtenir :

- 10 civelles migrantes et non migrantes (lot 1). Ce lot a permis de caractériser, à l'échelle individuelle, l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme mitochondrial (12s, *cox*), le stress oxydant (*cat*, *sod*), la mobilisation des réserves énergétiques (*tg1*), les mécanismes de détoxification (*gst*) et le dosage des métallothionéines (MT). Pour ce lot, uniquement les données obtenues en fin de saison à Moliets et Urt en 2013 ont été présentées. En effet, suite au fait que certaines pêches ont été infructueuses, que certains tris n'ont pas permis d'obtenir assez de civelles pour l'ensemble des échantillonnages et que le protocole de dosage de l'expression des gènes a dû être ajusté au cours de la thèse, seule cette année s'est avérée complète.

- entre 14 et 24 civelles migrantes et non migrantes (lot 2) afin dans un premier temps de pouvoir quantifier, à l'échelle individuelle, le métabolisme standard. A la fin de cette mesure, les paramètres biométriques et une estimation du contenu énergétique (estimé par le poids sec) ont été déterminés sur chaque civelle. Les concentrations naturelles en mercure (MeHg et Hg(II)) ont été déterminées sur un sous échantillonnage aléatoire de 8 à 14 individus migrants et non migrants. Pour ce lot, les différentes campagnes d'échantillonnage sont présentées dans le Tableau 18 (cf partie résultats). La variation du nombre de civelles échantillonnées entre les différentes campagnes peut s'expliquer par les résultats des différents tris, comme par exemple à Urt en fin de saison 2013 où il a été décidé d'analyser plus d'échantillons car une partie des civelles s'était réalimentée.

- entre 19 et 159 civelles migrantes et non migrantes (lot 3) ont été utilisées pour mesurer les paramètres biométriques. Chaque individu a été anesthésié de façon létale (eugénol 1/10 dans de l'alcool 0.3 ml L<sup>-1</sup>) puis mesuré et pesé (Figure 46). Les différentes campagnes d'échantillonnage pour ce lot sont identiques au lot 2 et sont présentées dans le Tableau 18 (cf partie résultats). De par la variabilité entre les effectifs échantillonnés pour chaque année, le détail pour chaque campagne est présenté dans le Tableau 18 (cf partie résultats). Cette grande variabilité s'explique principalement par le nombre de civelles pêchées à chaque campagne mais également par la date d'échantillonnage. Par ailleurs, à Moliets, la pêche de fin de saison 2012 a également été utilisée pour l'expérience du chapitre 2 (article 2) qui a nécessité un nombre important de civelles.

Les analyses n'ont pas été réalisées dans ce chapitre sur les civelles actives et les techniques utilisées (Figure 46) sont décrites de façon détaillée dans la partie Méthodologies et sont associées à un paragraphe symbolisé par '§' qui fait référence à la description de chaque analyse utilisée.

**Date** : 25/11/2011 au 13/04/2013

**Nombre de Civelles** : 550 à 1400

**Lieu** : Moliets ou Urt

**Protocole expérimental**

TRI COMPORTEMENTAL EN FLUVARIIUM

Identification des différents comportements de migration des civelles : MIGRANTE, NON MIGRANTE

**Lot 1**

Sous-échantillonnage aléatoire pour chaque comportement (n = 10) :

- \*mesure paramètres biométriques (Lg, PF)
- \*expression de gènes mitochondriaux, du stress oxydant, des réserves énergétiques et de détoxication (§ 2,2)
- \*dosage des métallothioénines (§ 2,3)

**Lot 2**

Sous-échantillonnage aléatoire pour chaque comportement (n = 14 à 24) :

- \*mesure métabolisme standard (§ 1,2)
- \*mesure paramètres biométriques (Lg, PF)
- \*mesure contenu énergétique (PS) (§ 2,1)
- \*spéciation du mercure naturel (MeHg, Hg(II)) (§ 2,1)

**Lot 3**

Sous-échantillonnage aléatoire pour chaque comportement (n = 19 à 159) :

- \*mesure paramètres biométriques (Lg, PF)

Figure 46: Protocole expérimental réalisé pour chaque pêche. Lg: longueur, PF : Poids Frais, PS : Poids Sec, n : nombre de civelles échantillonnées par comportement de migration. L'acronyme (§) fait référence au paragraphe de la partie Méthodologies (§ X), de ce manuscrit et à chaque sous-partie (§ X, X) expliquant les méthodes d'échantillonnages et d'analyses des échantillons.

## 2.4. Analyses statistiques

Toutes les analyses statistiques ont été effectuées en utilisant le logiciel R (R.2.14.2). Les moyennes sont données  $\pm$  écart-type. L'analyse de la relation entre le comportement de migration, le lieu de prélèvement et la saison a été effectuée à partir d'un modèle linéaire généralisé (GLM : loi binomiale). Les civelles migrantes et non migrantes ont été caractérisées en fonction de différents paramètres : des tests de Student (t-test) ont été utilisés pour comparer les paramètres biométriques (lot 1 et 3 poolés car échantillonnés le même jour), les paramètres génétiques, la concentration en MT (lot 1) ainsi que le métabolisme et les concentrations en espèces mercurielles (sous-échantillonnage aléatoire du lot 2) en fonction du comportement de migration des civelles et/ou de la saison et/ou du lieu d'échantillonnage. La cohérence du sous-échantillonnage aléatoire avec le lot 2 complet a été réalisée en préambule (données non montrées). Des transformations logarithmiques ont été utilisées si nécessaires lorsque la normalité et l'homogénéité des données n'étaient pas vérifiées. Des Analyses en Composante Principale (ACP) ont par la suite permis de décrire les niveaux de contamination, le métabolisme, le contenu énergétique (sous-échantillonnage aléatoire du lot 2), l'expression génétique et les dosages en métallothionéines (lot 1) en fonction du comportement de migration des civelles. Un niveau de significativité ( $p < 0,05$ ) a été appliqué pour l'ensemble des tests statistiques.

## 3. Résultats

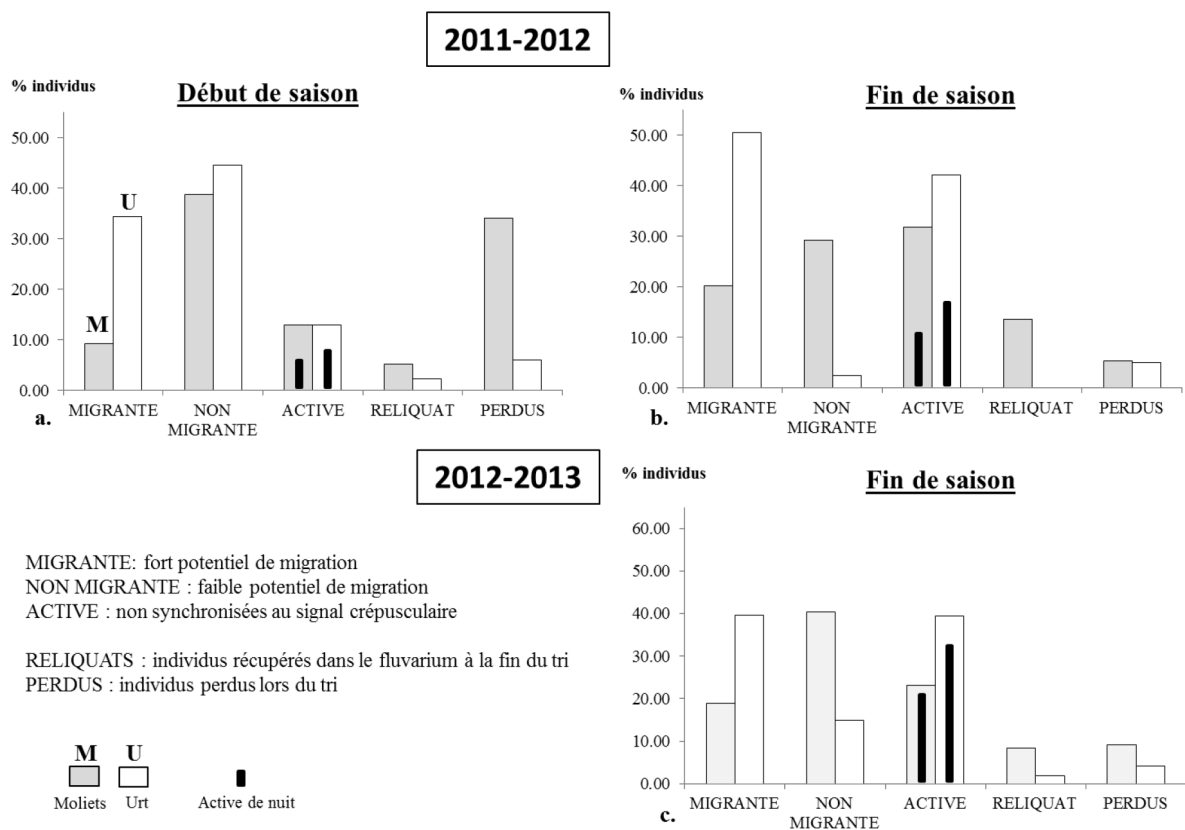
### 3.1 Comportement de migration des civelles en fonction du lieu et de la saison

La répartition de l'ensemble des individus lors des différents tris comportementaux est présentée en Figure 47 et le détail des effectifs obtenus pour les civelles migrantes, actives et non migrantes est exposé dans le Tableau 18 (cf partie résultats). Le nombre de civelles non migrantes a été supérieur aux civelles migrantes sauf pour les deux prélèvements effectués à Urt en avril 2012 et 2013 (Tableau 18, cf partie résultats).

**Tableau 18 : Effectifs (Eff) obtenus après les tris en fluvarium puis pour l'échantillonnage du lot 3 et pour le regroupement des lots 1 et 3. Caractérisation du comportement des civelles après le tri en fluvarium : migrantes (Mig), actives (Act), non migrantes (NM), reliquats et perdus (Rel et Per) à partir des effectifs totaux (eff tot) obtenus lors des différents pêches effectuées entre 2011 et 2013 à Urt (U) et Moliets (M). Les civelles migrantes correspondent aux civelles ayant répondu au signal crépusculaire, les civelles actives correspondent à celles qui ne se sont pas synchronisées en réponse au signal crépusculaire et les civelles non migrantes sont celles qui sont restées dans les abris.**

Année	Lieu	Saison de pêche	Date de pêche	Eff tot	Tri en fluvarium (effectifs)				Lot 3		Lots 1 + 3	
					Mig	Act	NM	Rel et Per	Mig	NM	Mig	NM
2011/2012	M	Début	24 au 25/11/2011	1400	129	181	542	548	44	65	54	75
	U	Début	27 au 28/12/2011	900	309	116	401	74	92	140	102	150
	M	Fin	19 au 20/03/2012	1400	282	446	409	263	19	24	29	34
	U	Fin	22 au 23/04/2012	860	434	362	21	43	80	21	100	21
2012/2013	M	Fin	07 au 08/04/2013	900	170	209	363	158	67	133	77	143
	U	Fin	13 au 14/04/2013	550	218	217	82	33	159	38	169	48

La proportion de civelles ayant un fort potentiel de migration (migrantes) a été deux à trois fois plus importante à Urt qu'à Moliets, ceci, indépendamment de la saison et de l'année d'échantillonnage (Figure 47). Les résultats du GLM (Tableau 19) ont confirmé cette observation bien que le lieu n'explique que 9% de l'effet.



**Figure 47 : Comportements observés lors des tris en fluvarium sur l'ensemble des campagnes d'échantillonnages de 2011 à 2013. a. Début de saison 2011-2012 / b. Fin de saison 2011-2012 / c. Fin de saison 2012-2013.**

Les comportements fluctuent également avec la saison. En fin de saison à Urt, une très nette diminution de la proportion des non migrantes a été observé au profit des migrantes et surtout des actives qui se sont surtout déplacées de nuit (Figure 47b, 47c). Les résultats du GLM ont confirmé l'effet saison mais ce dernier n'explique que 7% des différences d'effectifs migrantes/non migrantes. Une interaction lieu/saison a également été mise en évidence ( $p < 0,0001$ ; Tableau 19). Le modèle résultant de cette analyse n'a expliqué au total que 17% de la déviance totale. Le faible pourcentage d'explication des résultats par l'effet saison est probablement lié aux civelles de Moliets dont les proportions d'individus migrants et non migrants n'ont pas beaucoup varié d'une saison à l'autre (Figure 47). Il faut néanmoins noter que plus de 30% des individus se sont échappés du dispositif en début de saison, ce qui a pu biaiser les résultats (Figure 47a).

**Tableau 19 : Effet du lieu (Urt/Moliets) et de la saison (début et fin de saison) sur le comportement (migrante/non migrante) des civelles triées en milieu expérimental en réponse au crépuscule. Résultats de l'analyse de déviance basée sur le modèle linéaire généralisé (GLM) (avec distribution binomiale). DS : début de saison, FS : fin de saison.**

Effets	Déviance	Degré de liberté	Chisq	p-value	% déviance	Direction de l'effet
Lieu	413,33	1	4221,9	$< 2,2 \cdot 10^{-16}$	9%	Urt > Moliets
Saison	330,29	1	3891,6	$< 2,2 \cdot 10^{-16}$	7%	DS < FS
Lieu:Saison	48,66	1	3843	$3,01 \cdot 10^{-12}$	1%	

déviance nulle=4635,3 sur 3359 degrés de liberté

### 3.2. Caractérisation des civelles migrantes et non migrantes.

#### 3.2.1. Migrantes et non migrantes

Comme expliqué dans la partie 2.4, les données des lots 1 et 3 ont été poolées pour comparer les paramètres biométriques entre les civelles migrantes et non migrantes. La comparaison des mesures biométriques, du métabolisme standard ainsi que des dosages de Hg réalisés sur des civelles migrantes et non migrantes est présentée dans le Tableau 20.

Aucune différence significative de longueur n'a été observée entre civelles migrantes et non migrantes (t-test ;  $p > 0,05$ , Tableau 20). En revanche, les civelles non migrantes ont présenté un poids frais significativement plus important (t-test ;  $p < 0,001$  ; Tableau 20).

Concernant le lot 2, aucune différence significative n'a pu être mise en évidence parmi l'ensemble des paramètres mesurés, mis à part pour le métabolisme absolu, significativement plus important chez les civelles non migrantes (t-test ;  $p < 0,05$ ; Tableau 20) et la concentration

en Hg(II), significativement plus importante chez les civelles migrantes (t-test ;  $p=0,01$  ; Tableau 20).

**Tableau 20** : Caractéristiques des civelles migrantes et non migrantes des lots 1 et 3 (poolés) et du lot 2, indépendamment de la saison et du lieu de pêche (cf Tableau 18). Les données sont exprimées en moyenne  $\pm$  écart-type). Lg : Longueur, PF : Poids frais. Les paramètres variant significativement sont en gras.

<b>LOT 1, 3</b>	<b>migrante</b>		<b>non migrante</b>		<b>t-test</b>
<b><u>Biométrie</u></b>	n	m $\pm$ et	n	m $\pm$ et	p-value
Lg (mm)	531	68 $\pm$ 4	471	69 $\pm$ 4	0,11
PF (mg)	531	272 $\pm$ 62	471	288 $\pm$ 70	<b>2,32.10<sup>-4</sup></b>
<b>LOT 2</b>	<b>migrante</b>		<b>non migrante</b>		<b>t-test</b>
<b><u>Biométrie</u></b>	n	m $\pm$ et	n	m $\pm$ et	p-value
Lg (mm)	58	69 $\pm$ 4	52	69 $\pm$ 4	0,76
PF (mg)	58	273 $\pm$ 57	52	273 $\pm$ 66	0,96
<b><u>Poids sec (mg)</u></b>	58	55 $\pm$ 14	52	55 $\pm$ 16	0,79
<b><u>Métabolisme</u></b>					
Métabolisme absolu (mm <sup>3</sup> h <sup>-1</sup> )	58	13 $\pm$ 3	52	15 $\pm$ 4	<b>0,04</b>
Métabolisme relatif (mm <sup>3</sup> g <sup>-1</sup> ps)	58	0,25 $\pm$ 0,07	52	0,28 $\pm$ 0,11	0,06
<b><u>Spéciation mercure</u></b>					
MeHg (ng Hg g <sup>-1</sup> ps)	58	145 $\pm$ 49	52	146 $\pm$ 46	0,85
Hg(II) (ng Hg g <sup>-1</sup> ps)	58	21 $\pm$ 18	52	14 $\pm$ 10	<b>0,01</b>

L'analyse en composante principale réalisée sur le sous -échantillonnage du lot 2 a expliqué 72,7% de la variabilité totale (Figure 48). Elle a mis en évidence une corrélation inverse entre la contamination en Hg(II) et le métabolisme absolu (Tableau 20 ; Figure 48a). Une corrélation inverse significative entre le MeHg et le poids sec ainsi qu'entre le métabolisme relatif et le poids sec a également observée (Figure 48a). La forte dispersion des individus dans le plan ne permet cependant pas clairement d'associer ces relations à un comportement de migration (Figure 48b).

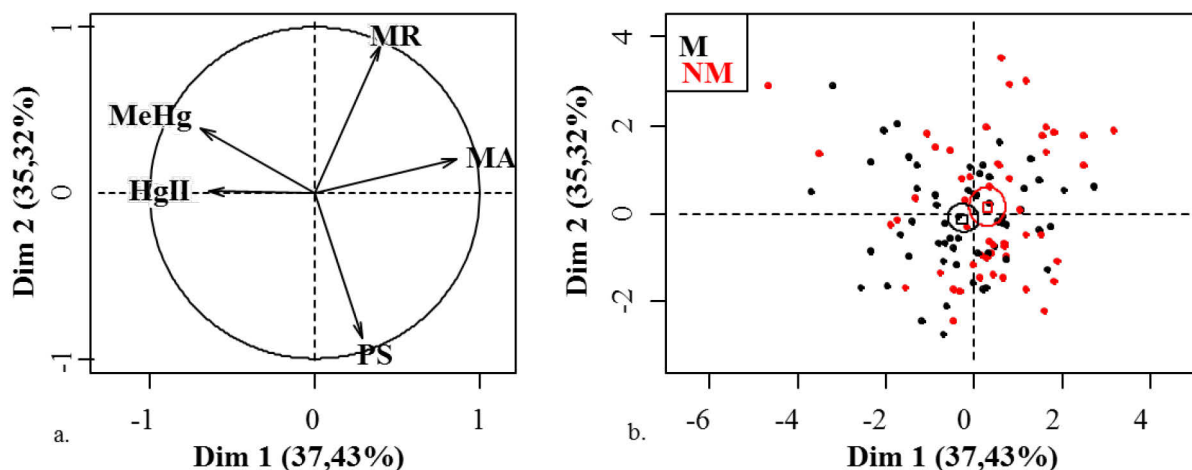


Figure 48: Analyse en Composante Principale (ACP) en fonction du Métabolisme Absolu (MA), du Métabolisme Relatif (MR), du Poids Sec (PS), de la concentration en Méthylmercure (MeHg) et en Mercure Inorganique (Hg(II)) pour des civelles Migrantes (M ; \*) et Non Migrantes (NM ; •) du lot 2. Cercle des corrélations (a.), carte des individus avec ellipses de dispersion des individus (b.).

Dans le but d'évaluer d'éventuelles différences de teneurs énergétiques, de métabolisme standard, de concentration en Hg, etc. entre civelles migrantes et non migrantes, en fonction du lieu et de la saison, les données ont par la suite été analysées en fonction de ces deux facteurs.

### 3.2.2. Caractérisation des civelles migrantes et non migrantes en fonction de la saison

- Evolution des caractéristiques des civelles entre le début et la fin de saison.

Les valeurs des paramètres biométriques des lots 1 et 3 poolés (longueur/poids) ont globalement été plus élevées en début qu'en fin de saison (t-test ;  $p < 0,001$ , Tableau 21). L'analyse du lot 2 a montré la même tendance concernant les paramètres biométriques, bien que l'échantillonnage soit plus faible. Par ailleurs, le métabolisme relatif s'est avéré être plus faible en début qu'en fin de saison (t-test ;  $p < 0,05$ , Tableau 21). Ces différences sont observées aussi bien pour les civelles migrantes que les non migrantes (détails en annexe 2). Aucune différence significative n'a par contre été observée entre les concentrations de Hg mesurées en début ou fin de saison (t-test,  $p > 0,05$  ; Tableau 21).



Tableau 21 : Caractéristiques des civelles des lots 1 et 3 (poolés) et du lot 2 en fonction la saison et indépendamment du comportement migratoire des individus et du lieu de pêche (cf Tableau 18). Les données sont exprimées en moyenne  $\pm$  écart-type). Lg : Longueur, PF : Poids frais. Les paramètres variant significativement sont en gras.

<i>LOT 1, 3</i>	Début de saison		Fin de saison		t-test
	n	m $\pm$ et	n	m $\pm$ et	p-value
<b><i>Biométrie</i></b>					
Lg (mm)	381	71 $\pm$ 4	621	67 $\pm$ 4	<b>2,20.10<sup>-16</sup></b>
PF (mg)	381	334 $\pm$ 56	621	246 $\pm$ 48	<b>2,20.10<sup>-16</sup></b>
<i>LOT 2</i>	Début de saison		Fin de saison		t-test
	n	m $\pm$ et	n	m $\pm$ et	p-value
<b><i>Biométrie</i></b>					
Lg (mm)	38	70 $\pm$ 4	72	68 $\pm$ 4	<b>0,02</b>
PF (mg)	38	314 $\pm$ 60	72	251 $\pm$ 50	<b>6,65.10<sup>-7</sup></b>
<b><i>Poids sec (mg)</i></b>	38	66 $\pm$ 15	72	49 $\pm$ 11	<b>2,40.10<sup>-7</sup></b>
<b><i>Métabolisme</i></b>					
Métabolisme absolu (mm <sup>3</sup> h <sup>-1</sup> )	38	13 $\pm$ 3	72	14 $\pm$ 4	0,12
Métabolisme relatif (mm <sup>3</sup> g <sup>-1</sup> ps)	38	0,21 $\pm$ 0,06	72	0,30 $\pm$ 0,09	<b>3,71.10<sup>-9</sup></b>
<b><i>Spéciation mercure</i></b>					
MeHg (ng Hg g <sup>-1</sup> ps)	38	147 $\pm$ 35	72	145 $\pm$ 53	0,49
Hg(II) (ng Hg g <sup>-1</sup> ps)	38	20 $\pm$ 19	72	17 $\pm$ 11	0,75

- Caractérisation des civelles migrantes et non migrantes en début et en fin de saison

Aucune différence significative n'a été observée pour les paramètres biométriques entre les civelles migrantes et non migrantes échantillonnées en début ou fin de saison (lot 1 et 3) (t-test ;  $p > 0,05$  ; Tableaux 22 et 23).

Les mêmes résultats ont été obtenus sur le lot 2 et aucune différence significative n'a pu être mis en évidence concernant les concentrations en Hg en début ou fin de saison (t-test ;  $p > 0,05$  ; Tableaux 22 et 23). En revanche, le métabolisme relatif et absolu a été significativement plus élevé chez les civelles non migrantes en fin de saison (t-test ;  $p < 0,05$  ; Tableau 23).

Tableau 22: Caractéristiques des civelles migrantes et non migrantes des lots 1 et 3 (poolés) et du lot 2 en début de saison, indépendamment du lieu de pêche (cf Tableau 18). Les données sont exprimées en moyenne ± écart-type). Lg : Longueur, PF : Poids frais. Les paramètres variant significativement sont en gras.

LOT 1, 3	DEBUT DE SAISON				t-test
	migrante		non migrante		
<u>Biométrie</u>	n	m ± et	n	m ± et	p-value
L (mm)	156	71 ± 3	225	71 ± 4	0,82
PF (mg)	156	331 ± 51	225	336 ± 59	0,37

LOT 2	migrante		non migrante		t-test
	n	m ± et	n	m ± et	
<u>Biométrie</u>					p-value
L (mm)	18	70 ± 4	20	71 ± 4	0,57
PF (mg)	18	305 ± 65	20	322 ± 56	0,4
<u>Poids sec (mg)</u>	18	63 ± 16	20	68 ± 14	0,38
<u>Métabolisme</u>					
Métabolisme absolu (mm <sup>3</sup> h <sup>-1</sup> )	18	13 ± 2	20	13 ± 4	0,84
Métabolisme relatif (mm <sup>3</sup> g <sup>-1</sup> ps)	18	0,22 ± 0,07	20	0,20 ± 0,05	0,43
<u>Spéciation mercure</u>					
MeHg (ng Hg g <sup>-1</sup> ps)	18	145 ± 35	20	149 ± 37	0,73
Hg(II) (ng Hg g <sup>-1</sup> ps)	18	28 ± 26	20	13 ± 6	0,13

Tableau 23 : Caractéristiques des civelles migrantes et non migrantes des lots 1 et 3 (poolés) et du lot 2 en fin de saison, indépendamment du lieu de pêche (cf Tableau 18). Les données sont exprimées en moyenne ± écart-type). Lg : Longueur, PF : Poids frais. Les paramètres variant significativement sont en gras.

LOT 1, 3	FIN DE SAISON				t-test
	migrante		non migrante		
<u>Biométrie</u>	n	m ± et	n	m ± et	p-value
L (mm)	375	67 ± 4	246	68 ± 4	0,09
PF (mg)	375	247 ± 48	246	245 ± 48	0,57

LOT 2	migrante		non migrante		t-test
	n	m ± et	n	m ± et	
<u>Biométrie</u>					p-value
L (mm)	40	69 ± 3	32	68 ± 4	0,29
PF (mg)	40	258 ± 47	32	243 ± 53	0,21
<u>Poids sec (mg)</u>	40	51 ± 11	32	48 ± 12	0,25
<u>Métabolisme</u>					
Métabolisme absolu (mm <sup>3</sup> h <sup>-1</sup> )	40	13 ± 4	32	15 ± 4	<b>0,01</b>
Métabolisme relatif (mm <sup>3</sup> g <sup>-1</sup> ps)	40	0,26 ± 0,06	32	0,34 ± 0,10	<b>8,06.10<sup>-4</sup></b>
<u>Spéciation mercure</u>					
MeHg (ng Hg g <sup>-1</sup> ps)	40	146 ± 55	32	144 ± 52	0,99
Hg(II) (ng Hg g <sup>-1</sup> ps)	40	18 ± 11	32	15 ± 12	0,23

L'analyse en composante principale s'est avérée identique à celle réalisée en 3.2.1 (Figure 48). Les relations observées sont donc les mêmes, à savoir, une relation inverse entre le Hg(II) et le métabolisme absolu ainsi qu'entre le MeHg et le poids sec. La dispersion des individus dans le plan a permis d'associer les civelles échantillonnées en début de saison à un plus fort poids sec ainsi que les civelles non migrantes de fin de saison à un plus fort métabolisme (Figure 49).

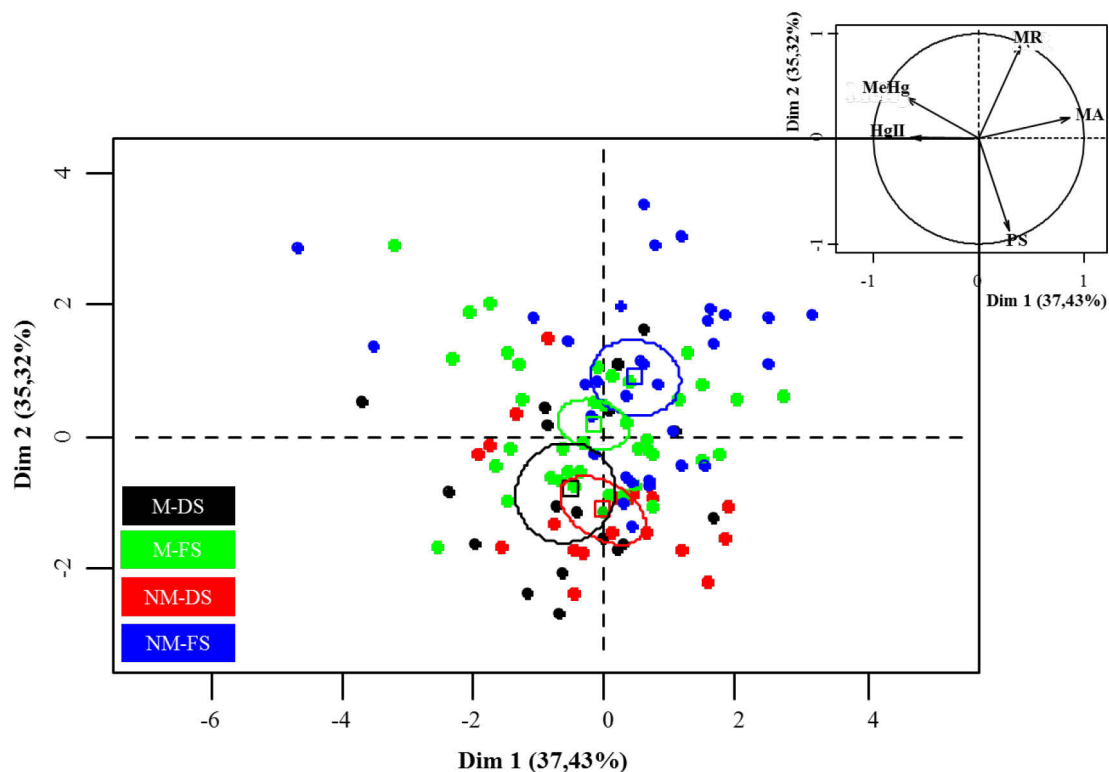


Figure 49: Carte et ellipses de dispersion des individus du lot 2 et issus de l'Analyse en Composante Principale (ACP) en fonction du Métabolisme Absolu (MA), du Métabolisme Relatif (MR), du Poids Sec (PS), de la concentration en Méthylmercure (MeHg) et en Mercure Inorganique (Hg(II)). M: civelles Migrantes ; NM: civelles Non Migrantes ; DS : Début de saison ; DS : Fin de Saison. En haut à droite le cercle de corrélation.

### 3.2.3. Caractérisation des civelles migrantes et non migrantes en fonction du lieu d'échantillonnage

- Caractérisation des civelles échantillonnées à Urt et à Moliets

Les paramètres biométriques (longueur/poids) ont été différents entre Urt et Moliets (t-test ;  $p < 0,05$  : Tableau 24). En considérant le lot 1 et 3 poolés, les civelles échantillonnées à Urt ont présentées un poids et une longueur significativement plus importants qu'à Moliets (t-test ;  $p < 0,05$ , Tableau 24) mais uniquement chez les civelles non migrantes (Annexe 3). Pour le lot

2, il n'y a eu aucune différence significative entre les deux sites pour l'ensemble des paramètres testés (t-test ;  $p > 0,05$  ; Tableau 24 et Annexe 3).

**Tableau 24: Caractéristiques des civelles des lots 1 et 3 (poolés) et du lot 2 échantillonnées à Urt et Moliets, indépendamment du comportement migratoire et de la saison de pêche (cf Tableau 18). Les données sont exprimées en moyenne  $\pm$  écart-type). Lg : Longueur, PF : Poids frais. Les paramètres variant significativement sont en gras.**

<i>LOT 1, 3</i>	<b>Moliets</b>		<b>Urt</b>		<b>t-test</b>
	n	m $\pm$ et	n	m $\pm$ et	p-value
<b><i>Biométrie</i></b>					
L (mm)	412	68 $\pm$ 4	590	69 $\pm$ 4	<b>0,01</b>
PF (mg)	412	270 $\pm$ 62	590	286 $\pm$ 68	<b>2,28.10<sup>-4</sup></b>

<i>LOT 2</i>	<b>Moliets</b>		<b>Urt</b>		<b>t-test</b>
	n	m $\pm$ et	n	m $\pm$ et	p-value
<b><i>Biométrie</i></b>					
L (mm)	55	69 $\pm$ 4	55	69 $\pm$ 4	0,42
PF (mg)	55	266 $\pm$ 68	55	280 $\pm$ 54	0,25
<b><i>Poids sec (mg)</i></b>	55	54 $\pm$ 16	55	56 $\pm$ 14	0,34
<b><i>Métabolisme</i></b>					
Métabolisme absolu (mm <sup>3</sup> h <sup>-1</sup> )	55	14 $\pm$ 3	55	14 $\pm$ 4	0,54
Métabolisme relatif (mm <sup>3</sup> g <sup>-1</sup> ps)	55	0,27 $\pm$ 0,10	55	0,26 $\pm$ 0,08	0,53
<b><i>Spéciation mercure</i></b>					
MeHg (ng Hg g <sup>-1</sup> ps)	55	146 $\pm$ 47	55	145 $\pm$ 50	0,71
Hg(II) (ng Hg g <sup>-1</sup> ps)	55	18 $\pm$ 12	55	18 $\pm$ 17	0,18

- Caractérisation des civelles migrantes et non migrantes à Urt et à Moliets

Concernant les paramètres biométriques des lots 1 et 3 poolés à Moliets, aucune différence significative n'a été observée entre civelles migrantes et non migrantes (t-test ;  $p > 0,05$  ; Tableau 25). A Urt, les civelles non migrantes ont par contre présenté des longueurs et poids frais significativement plus élevés que chez les migrantes (t-test ;  $p < 0,05$  ; analyse sur le lot 1 et 3 poolés, Tableau 25).

Sur le lot 2, quelque soit le lieu d'échantillonnage, aucune différence significative n'a été observée pour les paramètres biométriques ce qui souligne la difficulté à faire un sous échantillonnage représentatif du lot initial (t-test ;  $p > 0,05$  ; Tableaux 25 et 26). Les métabolismes absolu et relatif ont été significativement plus importants chez les civelles non migrantes que chez les migrantes à Moliets (t-test ;  $p < 0,05$  ; Tableau 26).

Tableau 25 : Caractéristiques des civelles migrantes et non migrantes des lots 1 et 3 (poolés) et du lot 2 échantillonnées à Moliets, indépendamment de la saison de pêche (cf Tableau 18). Les données sont exprimées en moyenne  $\pm$  écart-type). Lg : Longueur, PF : Poids frais. Les paramètres variant significativement sont en gras.

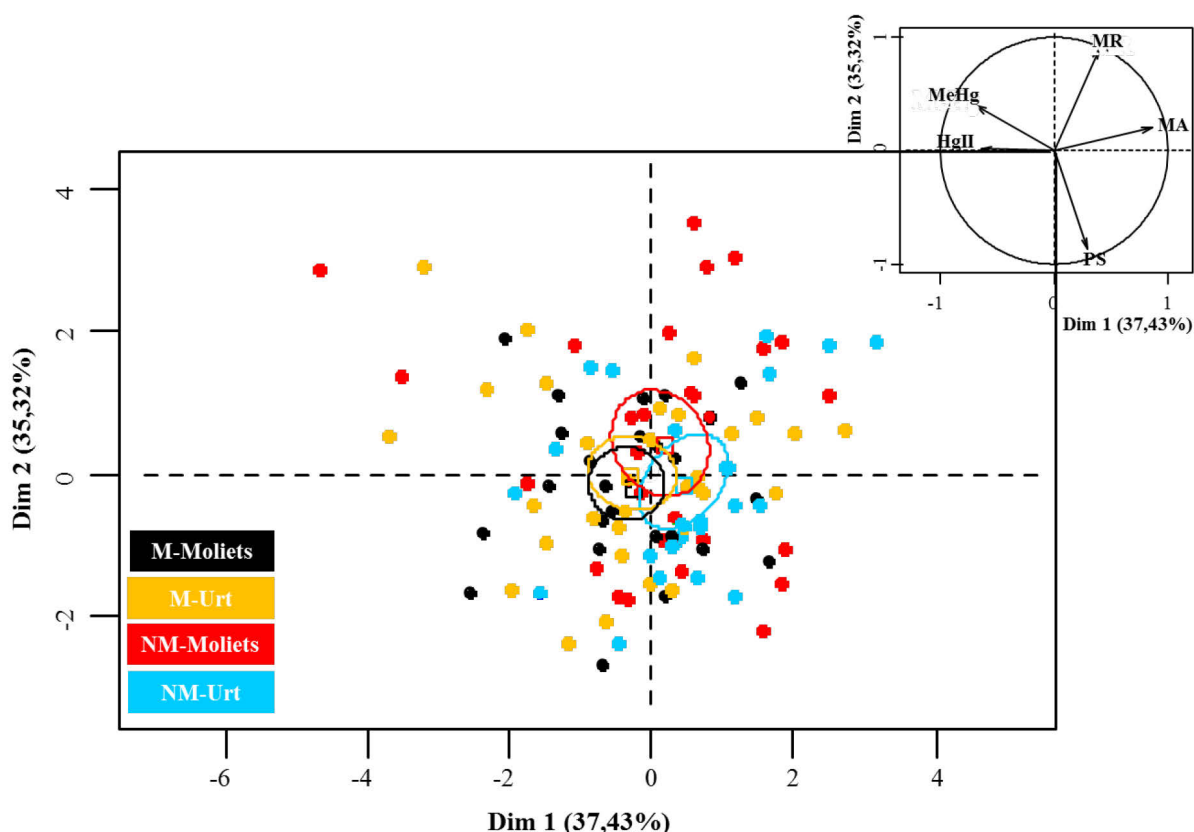
LOT 1, 3	MOLIETS				t-test
	migrante		non migrante		
<u>Biométrie</u>	n	m $\pm$ et	n	m $\pm$ et	p-value
L (mm)	160	69 $\pm$ 4	252	68 $\pm$ 4	0,09
PF (mg)	160	274 $\pm$ 62	252	266 $\pm$ 63	0,18
LOT 2	migrante		non migrante		t-test
<u>Biométrie</u>	n	m $\pm$ et	n	m $\pm$ et	p-value
L (mm)	26	69 $\pm$ 5	29	68 $\pm$ 5	0,27
PF (mg)	26	270 $\pm$ 58	29	263 $\pm$ 77	0,74
<u>Poids sec (mg)</u>	26	54 $\pm$ 14	29	53 $\pm$ 18	0,79
<u>Métabolisme</u>					
Métabolisme absolu (mm <sup>3</sup> h <sup>-1</sup> )	26	13 $\pm$ 3	29	15 $\pm$ 4	<b>0,03</b>
Métabolisme relatif (mm <sup>3</sup> g <sup>-1</sup> ps)	26	0,24 $\pm$ 0,07	29	0,29 $\pm$ 0,11	<b>0,04</b>
<u>Spéciation mercure</u>					
MeHg (ng Hg g <sup>-1</sup> ps)	26	139 $\pm$ 38	29	153 $\pm$ 51	0,23
Hg(II) (ng Hg g <sup>-1</sup> ps)	26	19 $\pm$ 12	29	16 $\pm$ 12	0,41

Tableau 26 : Caractéristiques des civelles migrantes et non migrantes des lots 1 et 3 (poolés) et du lot 2 échantillonnées à Moliets, indépendamment de la saison de pêche (cf Tableau 18). Les données sont exprimées en moyenne  $\pm$  écart-type). Lg : Longueur, PF : Poids frais. Les paramètres variant significativement sont en gras.

LOT 1, 3	URT				t-test
	migrante		non migrante		
<u>Biométrie</u>	n	m $\pm$ et	n	m $\pm$ et	p-value
L (mm)	371	68 $\pm$ 4	219	70 $\pm$ 4	<b>6,66.10<sup>-5</sup></b>
PF (mg)	371	270 $\pm$ 62	219	314 $\pm$ 70	<b>5,66.10<sup>-13</sup></b>
LOT 2	migrante		non migrante		t-test
<u>Biométrie</u>	n	m $\pm$ et	n	m $\pm$ et	p-value
L (mm)	32	69 $\pm$ 4	23	70 $\pm$ 3	0,34
PF (mg)	32	275 $\pm$ 58	23	286 $\pm$ 49	0,47
<u>Poids sec (mg)</u>	32	55 $\pm$ 14	23	58 $\pm$ 13	0,37
<u>Métabolisme</u>					
Métabolisme absolu (mm <sup>3</sup> h <sup>-1</sup> )	32	14 $\pm$ 3	23	15 $\pm$ 4	0,44
Métabolisme relatif (mm <sup>3</sup> g <sup>-1</sup> ps)	32	0,26 $\pm$ 0,07	23	0,26 $\pm$ 0,1	0,98
<u>Spéciation mercure</u>					

MeHg (ng Hg g <sup>-1</sup> ps)	32	151 ± 57	23	138 ± 38	0,37
Hg(II) (ng Hg g <sup>-1</sup> ps)	32	23 ± 22	23	11 ± 4	<b>6,5.10<sup>-3</sup></b>

La concentration en Hg(II) s'est avérée significativement plus importante chez les civelles migrantes à Urt (t-test ; p<0,05 ; Tableau 26). L'analyse en composante principale a été identique à celle réalisée en 3.2.1 (Figure 48). Les relations observées ont donc été une relation inverse entre le Hg(II) et le métabolisme absolu ainsi qu'entre le MeHg et le poids sec. La forte dispersion des individus dans le plan n'a cependant pas permis d'associer



clairement ces relations à un comportement de migration ou à un lieu d'échantillonnage. (Figure 50).

**Figure 50 :** Carte et ellipses de dispersion des individus du lot 2 et issus de l'Analyse en Composante Principale (ACP) en fonction du Métabolisme Absolu (MA), du Métabolisme Relatif (MR), du Poids Sec (PS), de la concentration en Méthylmercure (MeHg) et en Mercure Inorganique (Hg(II)). M: civelles Migrantes ; NM: civelles Non Migrantes échantillonnées à Urt et à Moliets. En haut à droite le cercle de corrélation.

Pour des raisons techniques de préparation des échantillons, les mesures de métabolisme, du contenu énergétique et de la concentration en composés mercuriels ont été réalisées sur des individus différents de ceux utilisés pour l'étude de l'expression génétique (Figure 46). Par

ailleurs, les données présentées dans les Tableaux 27 et 28 ne concernent que les civelles échantillonnées en fin de saison 2013 (lot 1).

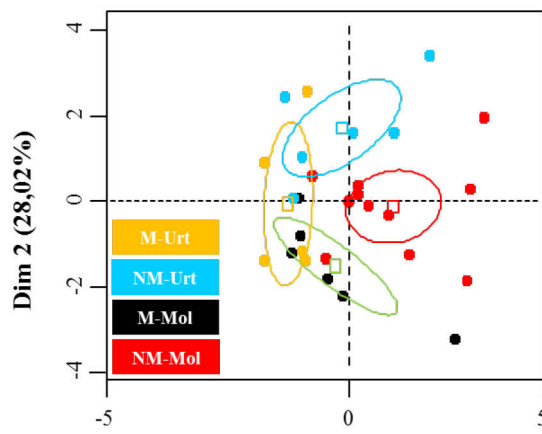
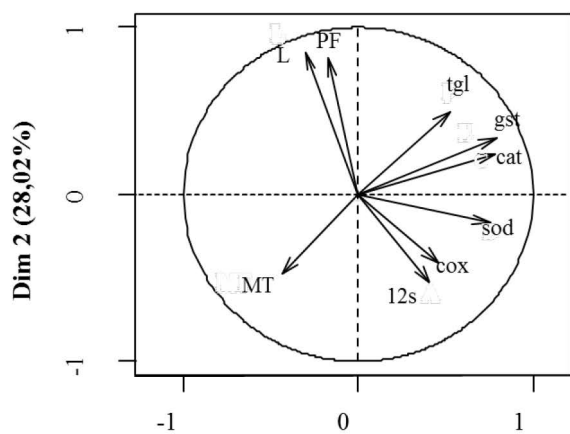
A partir du lot 1, à Urt, les civelles non migrantes ont présentées des niveaux d'expression du gène relatif au métabolisme lipidique (*tgl*) significativement plus élevés que chez les migrantes (t-test ;  $p < 0,05$  ; Tableau 27). En revanche, la concentration en métallothionéines (MT) s'est avérée significativement plus faible chez les non migrantes (t-test ;  $p < 0,05$  ; Tableau 27). A Moliets, les civelles non migrantes ont présenté des niveaux d'expressions significativement plus importants pour les gènes *cat* et *tgl* (t-test ;  $p < 0,05$  ; Tableau 28). Ces résultats ont été semblables à ceux obtenus en fin de saison 2012 à Moliets (données ajoutées à titre de comparaison dans le tableau 28). En 2012, une expression significativement plus élevée des gènes *sod* et *gst* a également été observée chez les non migrantes mais cette tendance n'est pas significative en 2013 (Tableau 28).

**Tableau 27 : Biométrie, expression de gènes impliqués dans le métabolisme mitochondrial (*12s*, *cox*), le métabolisme des lipides (*tgl*), le stress oxydant (*cat*, *sod*), les mécanismes de détoxication (*gst*) et la concentrations en métallothionéines (MT) chez les civelles migrantes et non migrantes échantillonnées à Moliets en fin de saison de pêche 2013. Les données sont exprimées en moyenne  $\pm$  écart-type). Lg : Longueur, PF : Poids frais. Entre parenthèses, les valeurs, à titre de comparaison, obtenues sur un échantillonnage réalisé à Moliets en 2012. Les paramètres variant significativement sont en gras.**

LOT 1	MOLIETS				t-test
	migrante		non migrante		
<u>Biométrie</u>	n	m $\pm$ et	n	m $\pm$ et	p-value
L (mm)	6 (10)	65 $\pm$ 3 / (64 $\pm$ 3)	10 (9)	66 $\pm$ 3 / (66 $\pm$ 3)	0,66 / (0,23)
PF (mg)	6 (10)	243 $\pm$ 48 / (231 $\pm$ 33)	10 (9)	237 $\pm$ 42 / (223 $\pm$ 41)	0,81 / (0,67)
<u>Gènes</u>					
<i>12s</i>	6 (10)	4904 $\pm$ 2833 / (690 $\pm$ 255)	10 (9)	3627 $\pm$ 1908 / (344 $\pm$ 223)	0,36 / ( <b>5,9.10<sup>-3</sup></b> )
<i>cox</i>	6 (10)	102 $\pm$ 108 / (401 $\pm$ 159)	10 (9)	47 $\pm$ 22 / (373 $\pm$ 210)	0,18 / (0,75)
<i>cat</i>	6 (10)	0,0046 $\pm$ 0,0036 / (0,018 $\pm$ 0,009)	10 (9)	0,033 $\pm$ 0,017 / (0,060 $\pm$ 0,038)	<b>2,31.10<sup>-4</sup> / (4,23.10<sup>-3</sup>)</b>
<i>sod</i>	6 (10)	0,017 $\pm$ 0,010 / (0,006 $\pm$ 0,003)	10 (9)	0,025 $\pm$ 0,019 / (0,02 $\pm$ 0,01)	0,38 / ( <b>6,06.10<sup>-4</sup></b> )
<i>gst</i>	6 (10)	0,025 $\pm$ 0,025 / (0,080 $\pm$ 0,039)	10 (9)	0,057 $\pm$ 0,045 / (0,71 $\pm$ 0,57)	0,05 / ( <b>7,15.10<sup>-6</sup></b> )
<i>tgl</i>	6 (10)	0,016 $\pm$ 0,012 / (0,082 $\pm$ 0,048)	10 (9)	0,013 $\pm$ 0,078 / (0,71 $\pm$ 0,38)	<b>5,46.10<sup>-4</sup> / (3,03.10<sup>-7</sup>)</b>
<u>Concentration MT</u>					
MT (nmol Hg site g <sup>-1</sup> pf)	6 (10)	23 $\pm$ 11 / (23 $\pm$ 8)	10 (9)	15 $\pm$ 6 / (15 $\pm$ 4)	0,12 / ( <b>0,01</b> )

Tableau 28 : Biométrie, expression de gènes impliqués dans le métabolisme mitochondrial (12s, *cox*), le métabolisme des lipides (*tgl*), le stress oxydant (*cat*, *sod*), les mécanismes de détoxication (*gst*) et concentrations en métallothionéines (MT) chez les civelles migrantes et non migrantes échantillonnées à Urt en fin de saison de pêche 2013. Les données sont exprimées en moyenne ± écart-type). Lg : Longueur, PF : Poids frais. Les paramètres variant significativement sont en gras.

LOT 1	URT				t-test
	migrante		non migrante		
<b><u>Biométrie</u></b>	n	m ± et	n	m ± et	p-value
L (mm)	5	68 ± 5	6	70 ± 2	0,55
PF (mg)	5	249 ± 81	6	295 ± 45	0,3
<b><u>Gènes</u></b>					
12s	5	1143 ± 924	6	933 ± 264	0,64
<i>cox</i>	5	22 ± 8	6	46 ± 30	0,09
<i>cat</i>	5	0,008 ± 0,008	6	0,013 ± 0,008	0,26
<i>sod</i>	5	0,01 ± 0,006	6	0,01 ± 0,006	0,7
<i>gst</i>	5	0,02 ± 0,01	6	0,05 ± 0,05	0,27
<i>tgl</i>	5	0,025 ± 0,024	6	0,28 ± 0,24	<b>0,02</b>
<b><u>Concentration MT</u></b>					
MT (nmol Hg site g <sup>-1</sup> pf)	5	25 ± 8	6	12 ± 6	<b>0,01</b>



L'analyse en composante principale a mis en évidence une corrélation positive entre les gènes de détoxication (*gst*), du stress oxydant (*cat*) et de mobilisation des réserves énergétiques (*tgl*) (Figure 51a) notamment chez les individus non migrants (Figure 51b).



Figure 51: Analyse en Composante Principale (ACP) en fonction du Métabolisme Absolu (MA), du Métabolisme Relatif (MR), du Poids Sec (PS), de la concentration en Méthylmercure (MeHg) et en Mercure Inorganique (Hg(II)) pour des civelles Migrantes (M ; \*) et Non Migrantes (NM ; •) du lot 2. Cercle des corrélations (a.), carte des individus avec ellipses de dispersion des individus (b.).

## 4. Discussion

Les données obtenues lors des campagnes 2011/2012 et 2012/2013 confirment les résultats obtenus lors des années précédentes (article 1). Le MeHg mesuré dans les civelles n'est pas ou peu d'origine estuarienne et les individus prélevés en fin de saison présentent des concentrations plus importantes qu'en début de saison, probablement liés à un poids plus faible et une concentration des contaminants. Les civelles capturées en début de saison ont également des longueurs et poids frais plus importants que celles capturées en fin de saison de pêche ce qui est en accord avec la littérature et nos précédents résultats (Charlon et Blanc 1982 ; Lambert et al. 2003 ; Wilson et al. 2007). Cette diminution des paramètres biométriques résulterait de variations de la ressource trophique durant la migration océanique.

### 4.1. Evolution des comportements de migration des civelles

Durant les deux campagnes d'échantillonnage, la proportion de civelles migrantes après le tri en fluvarium a été plus importante à Urt qu'à Moliets (dans l'hypothèse où les civelles perdues à Moliets en 2011-2012 ne sont pas des migrantes). Ce résultat suggère une meilleure synchronisation aux signaux environnementaux chez les civelles provenant de l'estuaire. Comme de nombreuses autres espèces (Tankersley et al. 1998 ; Trancart et al. 2011), les civelles utilisent le transport tidal sélectif pour remonter les estuaires (Forward et Tankersley 2001). Les synchroniseurs de l'activité locomotrice peuvent être multiples. Chez le crabe, *Carcinus maenas*, Warman et Naylor (1995) ont montré que le rythme d'activité de nage était synchronisé par au moins 3 synchroniseurs liés à la marée : la salinité, la température et la pression hydrostatique. Chez la civelle, seule l'inversion du courant et les odeurs (maritime ou terrigène) ont été testées expérimentalement mais il est probable qu'il y en ait d'autres et que tous soient couplés entre eux pour assurer une synchronisation optimale (Creutzberg 1961 ; Wippelhauser et McCleave 1988 ; Bolliet et al. 2007 ; Bolliet et Labonne 2008). On connaît encore très peu de chose sur la synchronisation des civelles en milieux marin et estuarien ni sur le déclenchement ou l'arrêt de cette synchronisation. Il est possible que cette dernière soit plus forte en estuaire qu'en mer, de par la présence de synchroniseurs tidaux plus marqués ou plus nombreux (alternance du courant, odeurs, pression hydrostatique, température, débit, salinité etc.). Les individus prélevés en estuaire pourraient alors répondre plus facilement aux stimuli en milieu expérimental mais cette hypothèse reste à confirmer.

La réduction drastique du pourcentage de civelles non migrantes au profit de comportements migrants et actifs en fin de saison à Urt s'explique probablement par le fait que la majorité des individus se sont réalimentés. Les civelles sont transparentes et lors des mesures biométriques, nous avons pu observer que l'estomac et/ou l'intestin d'environ 70% de civelles échantillonnées à Urt en fin de saison (observation avant tri comportemental) contenait des restes de nourriture, preuve d'un début de réalimentation (données non montrées). Aucune civelle de Moliets n'a par contre été observée avec de la nourriture dans le tube digestif. Cette observation est à mettre en relation avec le poids plus important des civelles d'Urt en fin de saison par rapport à celles de Moliets ( $286 \pm 32$  à Urt vs  $269 \pm 62$  à Moliets). En début de saison, lorsque la majorité des civelles jeûnent, les civelles sont par contre logiquement plus maigres en estuaire qu'en mer. Cette reprise de l'alimentation dans l'estuaire en fin de saison de pêche est conforme à la littérature (Cantrelle 1981), et correspond au début de la colonisation du bassin versant en amont de la marée dynamique. Cette colonisation s'amorce en mai lorsque la température dépasse 13-14°C (White et Knights 1997a, 1997b). Les individus qui arrivent plus tôt en limite de marée dynamique vont stabuler à ce niveau de l'estuaire sans s'alimenter jusqu'aux mois d'avril/mai dans nos régions. On peut donc supposer que certains facteurs endogènes (statut physiologique, stade de pigmentation ou autres) mais également exogènes, tel que la température, entraînent à cette période, une augmentation de l'activité locomotrice des individus en vue de la dernière phase de colonisation.

#### **4.2. Caractérisation des civelles migrantes et non migrantes**

##### Paramètres biométriques

Globalement, nos données de longueur et de poids ne vont pas dans le sens d'études précédentes suggérant que le contenu énergétique des civelles migrantes est plus élevé que celui des non migrantes (Edeline et al. 2007 ; Bureau Du Colombier et al. 2007). A Moliets, l'absence de différence est néanmoins cohérente avec les travaux de Bureau du Colombier et al. (2008) et Geoffroy et Bardonnnet (2012) qui justifient ce résultat par le fait que les civelles sont en début de migration et n'ont pas encore beaucoup puisé dans leurs réserves énergétiques. Le contenu énergétique chez ces individus pourrait donc ne pas être un facteur limitant pour leur migration estuarienne. L'absence de différence à Urt peut paraître plus surprenante mais s'explique probablement par le fait que les civelles de fin de saison ont été échantillonnées en avril et non en février comme c'était le cas dans l'étude de Bureau du

Colombier et al. (2007). Tel qu'expliqué précédemment, la majorité des civelles de notre étude s'étaient réalimentées ce qui a pu masquer d'éventuelles différences de poids entre migrantes et non migrantes.

#### Contenu énergétique et métabolisme

Dans l'ensemble, nos données mettent en évidence deux corrélations inverses en lien avec le contenu énergétique et le métabolisme des civelles. Tout d'abord, une première corrélation a été observée entre le contenu énergétique des civelles (évalué par le poids sec) et le MeHg. Ce résultat vient confirmer les précédents travaux de Navarro et al. (2013) et l'article 1 qui avaient déjà mis en évidence cette relation. La deuxième corrélation établie est la relation inverse entre le métabolisme relatif des civelles et leur poids sec. Cette relation n'a à notre connaissance jamais été observée auparavant chez la civelle et semblerait notamment plus marquée pour les civelles non migrantes, avec un plus fort métabolisme relatif pour un plus faible poids sec (données non montrées). Ces résultats vont dans le sens de précédentes études chez *Salmo trutta*, mettant en évidence un plus fort métabolisme relatif chez des œufs ou larves de petite taille (Régner et al. 2012, 2013).

Les métabolismes absolu et relatif se sont également avérés être plus importants chez les civelles non migrantes que chez les migrantes en fin de saison à Moliets. Deux hypothèses peuvent être avancées pour expliquer ce résultat : 1) une sensibilité plus importante des civelles non migrantes au stress ou 2) une moins bonne efficacité métabolique entraînant une demande énergétique accrue. Les concentrations en Hg, similaires à l'article 1 ne sont pas significativement différentes entre les civelles migrantes et non migrantes, ce qui rejette l'hypothèse d'un stress résultant d'une contamination au mercure.

A Urt, aucune différence de métabolisme n'a pu être observée mais les civelles se sont réalimentées ce qui a pu masquer l'effet du stress.

#### Niveaux de contamination en composés mercuriels

Les concentrations en MeHg et en Hg(II) mesurées dans les civelles sont en accord avec les travaux de Navarro et al. (2013) et les deux précédents chapitres de cette thèse. Aucune relation n'a été observée entre le comportement de migration des civelles et la concentration en MeHg. La corrélation inverse mise en évidence entre le métabolisme absolu et la concentration en Hg(II) est cohérente avec le fait que ces deux facteurs sont corrélés au poids des civelles. Par ailleurs, contrairement à de nombreuses études montrant une corrélation positive entre un paramètre biométrique (la longueur/le poids) et la concentration en Hg (Weis

et Ashley 2007 ; Noël et al. 2013), notre étude met en évidence une corrélation inverse entre ces deux paramètres, qui ne semble pas être expliquée par le comportement de migration. Ce résultat, déjà observé dans l'article 1, suggère que si les civelles non migrantes présentent un plus faible contenu énergétique que les migrantes (Bureau du Colombier et al. 2007), elles devraient alors également présenter une plus forte concentration en MeHg.

La plus forte concentration en Hg(II) observée chez les civelles migrantes à Urt est contradictoire avec les résultats obtenus lors de l'étude expérimentale (article 2) où l'inverse a été observé. Ces différences restent à élucider.

#### Energie, Stress oxydant et détoxification

A Moliets en 2013, on observe une plus forte expression des gènes impliqués dans le stress oxydant (*cat*) et la mobilisation des réserves énergétiques (*tgl*) chez les civelles non migrantes par comparaison aux migrantes. Une même tendance est observée pour les gènes *sod* mais elle n'est significative que pour les individus prélevés en 2012. L'augmentation de la *tgl* intervient généralement dans la lyse des triglycérides (Arrese et Soulages 2010) et permet la récupération de l'énergie stockée sous forme de lipides. Les acides gras vont ensuite être utilisés par la mitochondrie pour la production d'ATP. Si le fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale augmente, cela conduit à une augmentation de la production d'espèces réactives à l'oxygène (ERO) et la mise en place de mécanismes de défenses. L'augmentation de la catalase (*cat*) montre que ces ERO touchent le compartiment cytoplasmique.

Contrairement à ce qu'on pourrait attendre, aucune augmentation de l'expression des gènes *12s* et *cox* n'est observé mais le rapport *cox/12s* est plus élevé pour les civelles non migrantes. Ce résultat suggère que l'expression de *cox* est plus importante dans chaque mitochondrie chez les civelles non migrantes et supporte l'hypothèse d'une activité mitochondriale accrue chez ces dernières.

Une plus forte demande énergétique, un fonctionnement des mitochondries et un stress oxydant plus important chez les civelles non migrantes renforcent l'hypothèse d'une plus grande sensibilité au stress chez ces dernières. Il est néanmoins peu probable que ce stress soit lié à une déméthylation plus importante chez les non migrantes, tel que proposé dans le précédent chapitre, car les concentrations de Hg(II) sont ici plus élevées chez les civelles migrantes.

A Urt, seule l'expression de la *tgl* apparaît significativement plus importante chez les civelles non migrantes que chez les migrantes suggérant, comme à Moliets, une demande accrue

d'énergie chez les non migrantes. Ce résultat est cohérent avec le rapport *cox/12s* qui est également plus important chez les civelles non migrantes, et va dans le sens d'une augmentation du fonctionnement de la chaîne mitochondriale. Cependant, il n'y a aucune augmentation de l'expression des gènes *cat*, *sod* et *gst* suggérant que cette expression est ici suffisante pour faire face au stress oxydant généré.

En résumé, la demande énergétique apparaît plus importante chez les civelles non migrantes que chez les migrantes, entraînant une augmentation du fonctionnement des mitochondries pouvant conduire à un stress oxydant. Ces résultats ne semblent pas être une réponse à une bioaccumulation plus importante en MeHg ou à une déméthylation plus forte ce qui n'exclue pas une contamination plus importante par d'autres contaminants. La demande énergétique est plus importante à Moliets qu'à Urt, ce qui est cohérent avec les résultats du métabolisme. Le même type d'analyse chez des individus prélevés en début de saison serait maintenant nécessaire pour comprendre si ces différences géographiques sont liées à la réalimentation des civelles estuariennes en fin de saison.

## Références bibliographiques

Arrese EL, Soulages JL. Insect fat body: energy, metabolism, and regulation. *Annu Rev Entomol.* 2010. 55:207–25.

Bolliet V, Labonne J. Individual patterns of rhythmic swimming activity in *Anguilla anguilla* glass eels synchronised to water current reversal. *J Exp Mar Biol Ecol.* 2008. 362(2):125–30.

Bolliet V, Lambert P, Rives J, Bardonnnet A. Rhythmic swimming activity in *Anguilla anguilla* glass eels: Synchronisation to water current reversal under laboratory conditions. *J Exp Mar Biol Ecol.* 2007. 344(1):54–66.

Bureau du Colombier S. Place du statut énergétique dans la dynamique migratoire de la civelle d'anguille européenne (*Anguilla anguilla*). Université de Pau et des Pays de l'Adour. 2008.

Bureau Du Colombier S, Bolliet V, Lambert P, Bardonnnet A. Energy and migratory behavior in glass eels (*Anguilla anguilla*). *Physiol Behav.* 2007. 92(4):684–90.

Bureau du Colombier S, Lambert P, Bardonnnet A. Is feeding behaviour related to glass eel propensity to migrate? *Estuar Coast Shelf Sci.* 2008. 80(3):323–9.

Cantrelle I. Étude de la migration et de la pêche des civelles (*Anguilla anguilla* L. 1758) dans l'estuaire de la Gironde. 1981.

Charlon N, Blanc J. Etude des civelles d'*Anguilla anguilla* L. dans la region du bassin de l'Adour . 1. Caracteristiques biometriques de longueur et de poids en fonction de la pigmentation. *Arch Fuer Hydrobiol.* 1982. 93(2):238–55.

Creutzberg F. On the orientation of migrating elvers (*Anguilla vulgaris turt.*) in a tidal area. *Neth J Sea Res.* 1961. 1(3):257–338.

Dias JCS. Characterization of *Desulfomicrobium salsuginis* sp. nov. and *Desulfomicrobium aestuarii* sp. nov., two new sulfate-reducing bacteria isolated from the Adour estuary (French Atlantic coast) with specific mercury methylation potentials. *Syst Appl Microbiol.* 2008. 31(1):30–7.

Duran R, Ranchou-Peyruse M, Menuet V, Monperrus M, Bareille G, Goñi MS, Salvado JC, Amouroux S, Guyoneaud R, Donard OFX, Caumette P. Mercury methylation by a microbial community from sediments of the Adour Estuary (Bay of Biscay, France). *Environ Pollut.* 2008. 156(3):951–8.

Edeline E. Adaptive phenotypic plasticity of eel diadromy. *Mar Ecol Prog Ser.* 2007. 4;341:229–32.

Forward Jr RB, Tankersley RA. Selective tidal-stream transport of marine animals. *Oceanogr Mar Biol Annu Rev.* 2001.39:305–53.

Geoffroy B, Bardonnnet A. Differential effects of behaviour, propensity to migrate and recruitment season on glass eels and elvers' growing performance: Young eel behaviour and growth pattern. *Ecol Freshw Fish.* 2012. 21(3):469–82.

Gorski PR, Lathrop RC, Hill SD, Herrin RT. Temporal mercury dynamics and diet composition in the mimic shiner. *Trans Am Fish Soc.* 1999. 128(4):701–12.

Greenfield BK, Melwani AR, Allen RM, Slotton DG, Ayers SM, Harrold KH, Ridolfi K, Jahn A, Grenier JL, Sandheinrich MB. Seasonal and annual trends in forage fish mercury concentrations, San Francisco Bay. *Sci Total Environ*. 2013. 444:591–601.

Heim WA, Coale KH, Stephenson M, Choe K-Y, Gill GA, Foe C. Spatial and habitat-based variations in total and methyl mercury concentrations in surficial sediments in the San Francisco Bay-Delta. *Environ Sci Technol*. 2007. 15;41(10):3501–7.

Klaper R, Carter B., Richter C. Use of a 15k gene microarray to determine gene expression changes in response to acute and chronic methylmercury exposure in the fathead minnow *Pimephales promelas* Rafinesque. *J Fish Biol*. 2008. 72:2207–80.

Lambert P, Sbaihi M, Rochard E, Marchelidon J, Dufour S, Elie P. Variabilités morphologique et du taux d'hormone de croissance des civelles d'anguilles européennes (*Anguilla anguilla*) Dans l'estuaire de la Gironde au cours de la saison 1997-1998. *Bull Francais Pêche Piscic*. 2003. (368):69–84.

Mela M, Neto FF, Yamamoto FY, Almeida R, Grötzner SR, Ventura DF, Oliveira Ribeiro C. Mercury distribution in target organs and biochemical responses after subchronic and trophic exposure to Neotropical fish *Hoplias malabaricus*. *Fish Physiol Biochem*. 2014. 40(1):245–56.

Navarro P, Clemens S, Perrot V, Bolliet V, Tabouret H, Guérin T, Monperrus M, Donard OFX. Simultaneous determination of mercury and butyltin species using a multiple species-specific isotope dilution methodology on the European, *Anguilla anguilla* glass eel and yellow eel. *Int J Environ Anal Chem*. 2013. 93(2):166–82.

Noël L, Chekri R, Millour S, Merlo M, Leblanc J-C, Guérin T. Distribution and relationships of As, Cd, Pb and Hg in freshwater fish from five French fishing areas. *Chemosphere*. 2013. 90(6):1900–10.

Régnier T, Bolliet V, Gaudin P, Labonne J. Bigger is not always better: egg size influences survival throughout incubation in brown trout (*Salmo trutta*). *Ecol Freshw Fish*. 2013. 1;22(2):169–77.

Régnier T, Labonne J, Gaudin P, Bolliet V. Influence of energetic status on ontogenetic niche shifts: emergence from the redd is linked to metabolic rate in brown trout. *Oecologia*. 2012. 1;168(2):371–80.

Stoichev T, Amouroux D, Wasserman J., Point D, De Diego A, Bareille G, Donard OFX. Dynamics of mercury species in surface sediments of a macrotidal estuarine-coastal system (Adour River, Bay of Biscay). *Estuar Coast Shelf Sci*. 2004. 59(3):511–21.

Tankersley RA, Wieber MG, Sigala MA, Kachurak KA. Migratory Behavior of Ovigerous Blue Crabs *Callinectes sapidus*: Evidence for Selective Tidal-Stream Transport. *Biol Bull*. 1998. 195(2):168.

Trancart T, Lambert P, Rochard E, Daverat F, Roqueplo C, Coustillas J. Swimming activity responses to water current reversal support selective tidal-stream transport hypothesis in juvenile thinlip mullet *Liza ramada*. *J Exp Mar Biol Ecol*. 2011. 1;399(2):120–9.

Warman CG, Naylor E. Evidence for multiple, cue-specific circatidal clocks in the shore crab *Carcinus maenas*. *J Exp Mar Biol Ecol*. 1995. 28;189(1–2):93–101.

Weis P, Ashley JTF. Contaminants in fish of the Hackensack Meadowlands, New Jersey: size, sex, and seasonal relationships as related to health risks. *Arch Environ Contam Toxicol*. 2007. 52(1):80–9.

White EM, Knights B. Dynamics of upstream migration of the European eel, *Anguilla anguilla* (L.), in the Rivers Severn and Avon, England, with special reference to the effects of man-made barriers. *Fish Manag Ecol*. 1997a. 1;4(4):311–24.

White EM, Knights B. Environmental factors affecting migration of the European eel in the Rivers Severn and Avon. *J Fish Biol*. 1997b. (50):1104–16.

Wilson JM, Reis-Santos P, Fonseca A-V, Antunes JC, Bouça PD, Coimbra J. Seasonal changes in ionoregulatory variables of the glass eel *Anguilla anguilla* following estuarine entry: comparison with resident elvers. *J Fish Biol*. 2007. 70(4):1239–53.

Wippelhauser GS, McCleave JD. Rhythmic activity of migrating juvenile American eels *Anguilla rostrata*. *J Mar Biol Assoc U K*. 1988. 68(01):81–91.

Xu X, Weber D, Carvan MJ, Coppens R, Lamb C, Goetz S, Schaefer LA. Comparison of neurobehavioral effects of methylmercury exposure in older and younger adult zebrafish (*Danio rerio*). *NeuroToxicology*. 2012. 33(5):1212–8.

Zhang L, Campbell LM, Johnson TB. Seasonal variation in mercury and food web biomagnification in Lake Ontario, Canada. *Environ Pollut Barking Essex* 1987. 2012. 161:178–84.





# ***DISCUSSION***

---



## **Discussion et perspectives**

Ce travail de thèse s'inscrit dans une réflexion visant à comprendre le déterminisme de la migration et s'intéresse particulièrement au rôle du MeHg et du statut énergétique. Cette étude est à notre connaissance la première réalisée sur ce sujet.

### **4.1. Impact du mercure sur le comportement**

L'effet du MeHg a dans un premier temps été testé sur le comportement de migration des civelles, triées d'après leur réponse au signal crépusculaire (fluvarium). La contamination a affecté le comportement des civelles non migrantes en augmentant leur activité mais pas leur comportement de migration (article 2). Les conséquences écologiques d'une telle contamination dans le milieu naturel sont difficiles à appréhender mais il est probable que l'augmentation d'activité entraîne une plus grande dépense énergétique. Par ailleurs, l'augmentation de l'activité ne s'est pas faite en réponse au synchroniseur de migration (crépuscule) mais de jour, période durant laquelle la civelle n'est généralement pas active. Ce changement de comportement pourrait donc également rendre ces individus plus vulnérables à la prédation. Généralement, les mâles se situent en zones estuariennes et les femelles en amont des bassins versants (Bertin 1956 ; Vladykov 1966 ; Oliveira et McCleave 2000). Dans l'hypothèse d'une augmentation de l'activité des civelles suite à une contamination, il serait également possible d'envisager une altération du sex-ratio qui pourrait alors s'inverser en faveur des mâles. Par ailleurs, une fois la limite de marée dynamique franchie, selon leurs stades de développement, les individus recommencent à se nourrir (Charlon et Blanc 1983 ; Peterson et Martin-Robichaud 1994). Le MeHg pourrait ainsi inhiber la reprise alimentaire ce qui pourrait conduire à l'épuisement des individus et potentiellement à leur morts ce qui pourrait participer à réduire les effectifs de l'espèce. Par ailleurs, l'activité de nage de la civelle est sous le contrôle de facteurs endogènes (Bolliet et al. 2007) et la question se pose donc quant à l'impact potentiel du Hg sur les horloges biologiques de cette dernière. Le Hg pourrait modifier l'horloge interne des civelles et donc potentiellement affecter les rythmes biologiques endogènes de la civelle.

Par la suite, le comportement de migration des civelles a été testé dans une autre structure expérimentale (chronotron) où les individus ont été soumis à un synchroniseur également important de la migration estuarienne : l'inversion du courant. Différents paramètres comportementaux ont été observés : le niveau d'activité de nage, (évalué par le nombre d'observations de chaque individu en activité dans le sens et/ou à contre-courant) et la synchronisation de cette activité de nage sur l'inversion du courant (mise en évidence par un rythme d'activité circatidal). Après exposition au MeHg, les résultats ont montré une diminution du niveau moyen d'activité de nage des civelles mais cet effet n'a été que temporaire. Ce résultat est cohérent avec d'autres études montrant que la capacité de capture des proies avait également été partiellement altérée chez des larves de poisson suite à une contamination au MeHg (Weis et Weis 1995 ; Zhou et al. 2001). Ces auteurs ont supposé que l'exposition au MeHg avait engendré un retard de développement neurologique temporaire qui a ensuite été compensé, et donc qu'aucun effet à long terme n'avait été causé. Dans le cadre de notre étude, il est possible que les doses de contaminants relativement faibles utilisées et/ou le temps d'exposition soient à l'origine de la réversibilité des effets mais cela reste à confirmer.

#### **4.2. Processus de déméthylation chez les civelles migrantes et non migrantes après contamination au MeHg**

Les résultats expérimentaux en fluvarium ont permis de mettre en évidence des différences de réponses entre les civelles migrantes et non migrantes après contamination au MeHg. Même si les mécanismes restent obscurs, une déméthylation et un stress oxydant plus importants ont été observés chez les civelles non migrantes.

L'originalité de ce travail de thèse réside en partie dans l'emploi d'isotopes stables du MeHg permettant de suivre, à l'échelle individuelle, sa bioaccumulation et les processus de déméthylation et d'élimination du Hg(II) formé. Les résultats montrent des taux non négligeables de déméthylation suite à la contamination au MeHg et ce, particulièrement chez les non migrantes (4% chez les civelles migrantes, 9% chez les non migrantes et 33% pour l'étude dans le chronotron). Nos résultats montrent également que les taux de Hg(II) formés diminuent une quinzaine de jours après exposition au MeHg suggérant son élimination (5% pour la dernière étude, chapitre 2). Il est classiquement admis que le MeHg s'accumule dans

l'organisme et que le Hg(II) est plus facilement éliminé (Trudel et Rasmussen 1997 ; Oliveira Ribeiro et al. 1999) mais ce mécanisme n'avait jamais été mis en évidence chez la civelle.

La majorité des travaux concernant le mercure se sont focalisés sur le MeHg (Cambier et al. 2009 ; Penglase et al. 2014 ; Stefansson et al. 2014) et il existe très peu d'études sur le Hg(II) et ses effets sur les organismes. Monteiro et al. (2013), ont montré que l'exposition par voie trophique d'*Hoplias malabaricus* à une concentration de 0,15 mg L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> pendant 96 heures a conduit à une augmentation de la glutathion-s-transférase (mécanismes de défense). L'effet du Hg(II) chez la civelle reste difficile à appréhender mais la plus forte déméthylation observée chez les non migrants semble être une piste intéressante à approfondir. Il serait d'ailleurs intéressant, dans la continuité de ce travail, d'utiliser les techniques d'imagerie et d'ablation laser développées à l'IPREM afin de suivre les processus d'absorption, de transformation et d'élimination du MeHg et du Hg(II) à l'échelle de l'organe.

### 4.3. Déterminisme du comportement de migration

Certains auteurs ont émis l'hypothèse que le contenu énergétique était impliqué dans la propension à migrer des civelles : les civelles possédant un plus grand contenu énergétique présentant une plus grande capacité de migration (Edeline et al. 2004, 2006, 2007 ; Bureau Du Colombier et al. 2007). Nos résultats ne mettent cependant en évidence aucune différence de contenus énergétiques en lien avec le comportement de migration chez la civelle suggérant, tout comme l'avait fait Bureau du Colombier (2008), que d'autres facteurs sont impliqués. Plusieurs études ont mis en évidence qu'en plus de la quantité de réserves énergétiques, la vitesse de leur utilisation pourrait également être un facteur limitant le processus de migration (Metcalfé et al. 1995 ; Forseth et al. 1999). Dans notre étude, le métabolisme relatif est d'autant plus important que l'individu est maigre (données non montrées) et ce, aussi bien chez les civelles migrantes que chez les non migrantes. Ce résultat est cohérent avec les travaux de Régnier et al. (2012) mais n'avait jamais été montré chez la civelle. Il suggère que les civelles non migrantes, classiquement plus maigres que les migrantes (Bureau Du Colombier et al. 2007), devraient présenter un plus fort métabolisme .

Nos résultats mettent effectivement en évidence un métabolisme relatif plus important chez les civelles non migrantes en milieu naturel mais cela dépend du lieu et de la saison. Cette plus forte demande énergétique est également associée à un stress oxydant plus important

chez les civelles non migrantes. Il est possible que ces individus présentent un métabolisme naturellement plus élevé entraînant une importante production radicalaire et donc une augmentation du stress oxydant et des mécanismes de défense. Mais une deuxième hypothèse pourrait être que l'augmentation du métabolisme est une conséquence du stress et non l'inverse. Les civelles non migrantes seraient alors simplement plus sensibles aux stress environnementaux tels que les conditions de migration océanique rencontrées par la leptocéphale, la pollution, les variations de salinité, d'oxygène ou encore de température.

En fin de saison, les civelles ont globalement un poids plus faible et un métabolisme plus élevé. A Urt, cela n'a pas été observé mais les individus s'étaient réalimentés et avaient repris du poids. Un métabolisme relatif plus important en fin de saison pourrait suggérer des conditions de migration transocéanique plus difficiles (moins de ressources alimentaires) conduisant à un stress supplémentaire chez ces individus. Il est cependant difficile à ce stade de dire si les civelles de fin de saison pourraient avoir un moins bon potentiel de migration que les individus de début de saison. Ces résultats préliminaires sur le métabolisme semblent cependant prometteurs et nécessitent d'être approfondis.

#### **4.4. Limites des tris comportementaux**

Dans notre étude, les civelles migrantes et non migrantes n'ont globalement présentées aucune différence de poids. Tel que mentionné précédemment, ce résultat est en contradiction avec les travaux de Bureau Du Colombier et al. (2007) effectués dans la même structure expérimentale. Il est possible que ces différences résultent du nombre de civelles analysées inférieur dans notre étude car des sous échantillonnages ont dû être faits. Par ailleurs, si le fluvarium permet d'obtenir un grand nombre d'individus migrants et non migrants, des expériences de doubles tris ont montré que toutes les civelles ne maintenaient pas leur comportement de migration (Bureau du Colombier 2008). Le tri en fluvarium donne donc une probabilité de migration mais ne permet pas de discriminer avec certitude des civelles migrantes et non migrantes. Dans le cadre de cette thèse, le double tri n'a pas été utilisé car il s'avère contraignant en termes de moyens et de temps. Dans le cadre du chapitre 3 par exemple, la comparaison des résultats obtenus à Urt et Moliets, nécessitait de réaliser les tris de façon rapprochée et le double tri était impossible.

Le chronotron ne permet pas de suivre un grand nombre d'individus en même temps mais il permet d'associer, à l'échelle individuelle, le niveau d'activité de nage et la synchronisation du rythme de nage avec plusieurs paramètres simultanés (contamination, énergie, réponse à l'expression de gènes etc.). Par ailleurs, des travaux effectués dans l'unité ont mis en évidence que les comportements observés dans les chronotrons pouvaient se maintenir à l'identique au moins deux mois. Ces observations suggèrent que dans le cadre de questions ne nécessitant pas un grand nombre d'individus, le chronotron pourrait s'avérer être un outil plus fiable pour mettre en relation comportement de migration, dépense énergétique et contamination.



## Références bibliographiques

- Bertin L. Eels : a biological study. Cleaver-Hume Press. London; 1956.
- Bolliet V, Lambert P, Rives J, Bardonnnet A. Rhythmic swimming activity in *Anguilla anguilla* glass eels: Synchronisation to water current reversal under laboratory conditions. J Exp Mar Biol Ecol. 2007. 344(1):54–66.
- Bureau du Colombier S. Place du statut énergétique dans la dynamique migratoire de la civelle d'anguille européenne (*Anguilla anguilla*). Université de Pau et des Pays de l'Adour; 2008.
- Bureau Du Colombier S, Bolliet V, Lambert P, Bardonnnet A. Energy and migratory behavior in glass eels (*Anguilla anguilla*). Physiol Behav. 2007. 92(4):684–90.
- Cambier S, Bénard G, Mesmer-Dudons N, Gonzalez P, Rossignol R, Brèthes D, et al. At environmental doses, dietary methylmercury inhibits mitochondrial energy metabolism in skeletal muscles of the zebra fish (*Danio rerio*). Int J Biochem Cell Biol. 2009. 41(4):791–9.
- Charlon N, Blanc JM. Etude des civelles d'*Anguilla anguilla* L. dans la région du bassin de l'Adour. 2. Régime alimentaire et variations de quelques caractéristiques biochimiques en cours de migration. Arch Hydrobiol. 1983.
- Edeline E. Adaptive phenotypic plasticity of eel diadromy. Mar Ecol Prog Ser. 2007. 4;341:229–32.
- Edeline E, Dufour S, Briand C, Fatin D, Elie P. Thyroid status is related to migratory behavior in *anguilla Anguilla* glass eels. Mar Ecol Prog Ser. 2004 Nov 16;282:261–70.
- Edeline E, Lambert P, Rigaud C, Elie P. Effects of body condition and water temperature on *Anguilla anguilla* glass eel migratory behavior. J Exp Mar Biol Ecol. 2006. 331(2):217–25.
- Forseth T, Nesje TF, Jonsson B, Hårsaker K. Juvenile migration in brown trout: a consequence of energetic state. J Anim Ecol. 1999. 1;68(4):783–93.
- Metcalf NB, Taylor AC, Thorpe JE. Metabolic rate, social status and life-history strategies in Atlantic salmon. Anim Behav. 1995. 49(2):431–6.
- Monteiro DA, Rantin FT, Kalinin AL. Dietary intake of inorganic mercury: bioaccumulation and oxidative stress parameters in the neotropical fish *Hoplias malabaricus*. Ecotoxicology. 2013. 1;22(3):446–56.
- Oliveira K, McCleave JD. Variation in Population and Life History Traits of the American Eel, *Anguilla rostrata*, in Four Rivers in Maine. Environ Biol Fishes. 2000. 1;59(2):141–51.
- Oliveira Ribeiro CA, Rouleau C, Pelletier E, Audet C, Tjälve H. Distribution kinetics of dietary methylmercury in the Arctic Charr (*Salvelinus alpinus*). Environ Sci Technol. 1999. 33(6):902–7.
- Penglase S, Hamre K, Ellingsen S. Selenium and mercury have a synergistic negative effect on fish reproduction. Aquat Toxicol. 2014. 149:16–24.
- Peterson RH, Martin-Robichaud DJ. First feeding and growth of elvers of the American eel (*Anguilla rostrata* L) at several temperature regimes. Canada. 1994.

Régnier T, Labonne J, Gaudin P, Bolliet V. Influence of energetic status on ontogenetic niche shifts: emergence from the redd is linked to metabolic rate in brown trout. *Oecologia*. 2012. 1;168(2):371–80.

Stefansson ES, Heyes A, Rowe CL. Tracing Maternal Transfer of Methylmercury in the Sheepshead Minnow (*Cyprinodon variegatus*) with an Enriched Mercury Stable Isotope. *Environ Sci Technol*. 2014. 4;48(3):1957–63.

Trudel M, Rasmussen J. Modeling the Elimination of Mercury by Fish. *Env Sci Technol*. 1997. 31:1716–22.

Vladykov V. Remarks on the American eel (*Anguilla rostrata* L): size of elvers entering streams; the relative abundance of adult males and females; and present economic importance of eels in North American. *Verhandlungen der Internationale Vereinigung für Theoretische and Angewandte Limnologie*. 1966. 16:1007–17.

Weis JS, Weis P. Effects of exposure to lead on behavior of mummichog (*Fundulus heteroclitus* L.) larvae. *J Exp Mar Biol Ecol*. 1995. 222(1):1–10.

Zhou T, Scali R, Weis JS. Effects of methylmercury on ontogeny of prey capture ability and growth in three populations of larval *Fundulus heteroclitus*. *Arch Environ Contam Toxicol*. 2001. 41(1):47–54.



# ***ANNEXES***

---



## Annexe 1

Tableau 1 bis : Résumé des paramètres biométriques obtenus pour chaque civelle pour les différentes périodes d'échantillonnage : t1 (après la pêche), t2 (après la contamination) et t3 (après le suivi comportemental dans les chronotrons).

Ind	LONGUEUR (mm)			POIDS FRAIS (mg)			POIDS SEC (mg)
	t1	t2	t3	t1	t2	t3	t3
1	65	64	62	243	243	217	41,3
2	71	70	69	268	259	238	46,6
3	71	68	68	266	263	228	42,2
4	66	65	64	227	227	196	35,9
5	73	73	72	309	312	274	49,5
6	74	73	72	354	349	319	62,5
7	71,5	67	65	265	265	253	48,9
8	67	67	65	279	272	264	51,8
9	68	62	60	201	196	190	35,1
10	64	64	62	237	236	208	39,6
11	70	68	68	256	263	237	47,7
12	65	64	64	235	234	217	43,2
13	68	67	66	281	279	253	48,7
14	70	67	66	230	225	215	39
15	68	67	66	247	246	227	43,9
16	71	70	69	324	322	306	61,3
17	67	67	66	237	233	223	42,7
18	69	68	68	275	269	260	50,9
19	72	71	75	292	292	275	52,2
20	71	70	70	285	283	261	52,5
21	67	65	64	252	249	233	43,7
22	63,5	62	62	228	227	200	37,4
23	65	63	62,5	196	195	184	32,8
24	61	60	60	197	195	171	32
25	71	69	69	275	277	263	52,4
26	73	72	71	288	284	267	51,1
27	60	60	59	150	143	129	20,2
28	71	70	70	281	284	259	52,4
29	67	67	66	253	259	243	47,5
30	65	64	64	205	203	185	33,9
31	74	72	72	332	340	290	55,5
32	66	64	63,5	228	227	204	36,5
33	77	76	75	366	356	343	70,6
34	69	67	67	267	261	240	48,3
35	71	70	morte	315	315	morte	morte
36	70	69	68	279	278	266	50,2

## Annexe 2

Tableau 2bis : Caractéristiques des civelles migrantes des lots 1 et 3 (poolés) et du lot 2 en début et fin de saison, indépendamment du lieu de pêche (cf Tableau 18). Les données sont exprimées en moyenne  $\pm$  écart-type). Lg : Longueur, PF : Poids frais. Les paramètres variant significativement sont en gras.

<i>LOT 1, 3</i>	<b>Migrante</b>				<b>t-test</b>
	<b>Début de saison</b>		<b>Fin de saison</b>		
<b><u>Biométrie</u></b>	n	m $\pm$ et	n	m $\pm$ et	p-value
L (mm)	156	71 $\pm$ 3	375	67 $\pm$ 4	<b>2,20.10<sup>-16</sup></b>
PF (mg)	156	331 $\pm$ 51	375	247 $\pm$ 48	<b>2,20.10<sup>-16</sup></b>

<i>LOT 2</i>	<b>Début de saison</b>		<b>Fin de saison</b>		<b>t-test</b>
<b><u>Biométrie</u></b>	n	m $\pm$ et	n	m $\pm$ et	p-value
L (mm)	18	70 $\pm$ 4	40	69 $\pm$ 5	0,34
PF (mg)	18	305 $\pm$ 65	40	258 $\pm$ 47	<b>0,01</b>
<b><u>Poids sec (mg)</u></b>	18	63 $\pm$ 16	40	51 $\pm$ 11	<b>0,006</b>
<b><u>Métabolisme</u></b>					
Métabolisme absolu (mm <sup>3</sup> h <sup>-1</sup> )	18	13 $\pm$ 2	40	13 $\pm$ 2	0,80
Métabolisme relatif (mm <sup>3</sup> g <sup>-1</sup> ps)	18	0,22 $\pm$ 0,07	40	0,26 $\pm$ 0,06	<b>0,02</b>
<b><u>Spéciation mercure</u></b>					
MeHg (ng Hg g <sup>-1</sup> ps)	18	145 $\pm$ 35	40	146 $\pm$ 55	0,78
Hg(II) (ng Hg g <sup>-1</sup> ps)	18	28 $\pm$ 26	40	18 $\pm$ 11	0,60

Tableau 3bis : Caractéristiques des civelles non migrantes des lots 1 et 3 (poolés) et du lot 2 en début et fin de saison, indépendamment du lieu de pêche (cf Tableau 18). Les données sont exprimées en moyenne  $\pm$  écart-type). Lg : Longueur, PF : Poids frais. Les paramètres variant significativement sont en gras.

<i>LOT 1, 3</i>	Non Migrante				t-test
	Début de saison		Fin de saison		
<b><i>Biométrie</i></b>	n	m $\pm$ et	n	m $\pm$ et	p-value
L (mm)	225	71 $\pm$ 4	246	67 $\pm$ 4	<b>2,20.10<sup>-16</sup></b>
PF (mg)	225	333 $\pm$ 59	246	245 $\pm$ 48	<b>2,20.10<sup>-16</sup></b>

<i>LOT 2</i>	Début de saison		Fin de saison		t-test
	n	m $\pm$ et	n	m $\pm$ et	
<b><i>Biométrie</i></b>					p-value
L (mm)	20	70 $\pm$ 4	32	68 $\pm$ 4	<b>0,019</b>
PF (mg)	20	322 $\pm$ 56	32	243 $\pm$ 53	<b>9,09.10<sup>-6</sup></b>
<b><i>Poids sec (mg)</i></b>	20	68 $\pm$ 14	32	48 $\pm$ 12	<b>6,87.10<sup>-6</sup></b>
<b><i>Métabolisme</i></b>					
Métabolisme absolu (mm <sup>3</sup> h <sup>-1</sup> )	20	13 $\pm$ 4	32	15 $\pm$ 4	0,05
Métabolisme relatif (mm <sup>3</sup> g <sup>-1</sup> ps)	20	0,20 $\pm$ 0,05	32	0,34 $\pm$ 0,10	<b>6,10.10<sup>-9</sup></b>
<b><i>Spéciation mercure</i></b>					
MeHg (ng Hg g <sup>-1</sup> ps)	20	149 $\pm$ 37	32	144 $\pm$ 52	0,50
Hg(II) (ng Hg g <sup>-1</sup> ps)	20	13 $\pm$ 6	32	15 $\pm$ 12	0,47



## Annexe 3

Tableau 4bis : Caractéristiques des civelles migrantes des lots 1 et 3 (poolés) et du lot 2 entre Moliets et Urt, indépendamment de la saison (cf Tableau 18). Les données sont exprimées en moyenne  $\pm$  écart-type). Lg : Longueur, PF : Poids frais. Les paramètres variant significativement sont en gras.

LOT 1, 3	Migrante				t-test
	Moliets		Urt		
<u>Biométrie</u>	n	m $\pm$ et	n	m $\pm$ et	p-value
L (mm)	160	69 $\pm$ 4	371	68 $\pm$ 4	0,41
PF (mg)	160	274 $\pm$ 62	371	270 $\pm$ 62	0,48

LOT 2	Migrante				t-test
	Moliets		Urt		
<u>Biométrie</u>	n	m $\pm$ et	n	m $\pm$ et	p-value
L (mm)	26	69 $\pm$ 4	32	69 $\pm$ 4	0,83
PF (mg)	26	270 $\pm$ 58	32	275 $\pm$ 58	0,70
<u>Poids sec (mg)</u>	26	54 $\pm$ 14	32	55 $\pm$ 14	0,85
<u>Métabolisme</u>					
Métabolisme absolu (mm <sup>3</sup> h <sup>-1</sup> )	26	13 $\pm$ 3	32	14 $\pm$ 3	0,22
Métabolisme relatif (mm <sup>3</sup> g <sup>-1</sup> ps)	26	0,24 $\pm$ 0,07	32	0,26 $\pm$ 0,07	0,41
<u>Spéciation mercure</u>					
MeHg (ng Hg g <sup>-1</sup> ps)	26	139 $\pm$ 38	32	151 $\pm$ 57	0,42
Hg(II) (ng Hg g <sup>-1</sup> ps)	26	19 $\pm$ 12	32	23 $\pm$ 22	0,94

Tableau 5bis : Caractéristiques des civelles non migrantes des lots 1 et 3 (poolés) et du lot 2 entre Moliets et Urt, indépendamment de la saison (cf Tableau 18). Les données sont exprimées en moyenne  $\pm$  écart-type). Lg : Longueur, PF : Poids frais. Les paramètres variant significativement sont en gras.

<i>LOT 1, 3</i>	<b>Non Migrante</b>				<b>t-test</b>
	<b>Moliets</b>		<b>Urt</b>		
<u><i>Biométrie</i></u>	n	m $\pm$ et	n	m $\pm$ et	p-value
L (mm)	252	68 $\pm$ 4	219	70 $\pm$ 4	<b>1,07.10<sup>-6</sup></b>
PF (mg)	252	266 $\pm$ 63	219	313 $\pm$ 70	<b>6,75.10<sup>-14</sup></b>

<i>LOT 2</i>	<b>Moliets</b>		<b>Urt</b>		<b>t-test</b>
<u><i>Biométrie</i></u>	n	m $\pm$ et	n	m $\pm$ et	p-value
L (mm)	29	68 $\pm$ 5	23	70 $\pm$ 3	0,17
PF (mg)	29	263 $\pm$ 77	23	286 $\pm$ 49	0,20
<u><i>Poids sec (mg)</i></u>	29	53 $\pm$ 18	23	58 $\pm$ 13	0,23
<u><i>Métabolisme</i></u>					
Métabolisme absolu (mm <sup>3</sup> h <sup>-1</sup> )	29	15 $\pm$ 4	23	15 $\pm$ 5	0,91
Métabolisme relatif (mm <sup>3</sup> g <sup>-1</sup> ps)	29	0,30 $\pm$ 0,11	23	0,26 $\pm$ 0,10	0,22
<u><i>Spéciation mercure</i></u>					
MeHg (ng Hg g <sup>-1</sup> ps)	29	153 $\pm$ 51	23	137 $\pm$ 38	0,22
Hg(II) (ng Hg g <sup>-1</sup> ps)	29	16 $\pm$ 13	23	11 $\pm$ 4	<b>0,03</b>





**Title:** Impact of methylmercury on the migratory behaviour, energetic status and detoxification processes in the European glass eel (*Anguilla Anguilla*): *in situ* and in experimental studies.

**Keywords:** *Anguilla anguilla*, methylmercury, glass eel, migratory behaviour

Over the last three decades, the arrival of *Anguilla anguilla* glass eels has markedly declined which has led to a decrease in the number of yellow eels in the watersheds. In 2007, the Regulation (EC) indicated that 60% of glass eels (<12cm long) caught by fisheries should be used for restocking. To migrate and colonize a new environment, glass eels must have a good energetic condition. However, during their estuarine migration, glass eels either feed very little or more likely not at all. The speed at which they expend their energy stores depends on various factors (temperature, contaminants etc.). In the Adour estuary, many studies have reported relatively high methylmercury (MeHg) concentrations in the sediments, and bioaccumulation in yellow eels. Exposure to MeHg requires energy for detoxification which, in starving organisms such as glass eels, might lead to weight loss, decreasing their ability to migrate up the estuary. To study the impact of MeHg on migratory behaviour in glass eels, we first conducted an inventory of MeHg concentrations of glass eels in the estuary of the Adour, (2) evaluate the effect of MeHg on two synchronizers of estuarine migration: dusk and tide on glass eels through the use of isotopic tracers and (3) to study the natural environment (Adour) migratory behavior, mercury contamination levels and detoxification mechanisms of glass eels. Our results show temporal and seasonal fluctuations in the concentration of MeHg glass eels collected input and middle of the estuary. Moreover, MeHg exposure, in a controlled environment, increased the activity of glass eels but not in response to migratory behavior. However, due to contamination, mitochondrial structure and metabolism have been modified suggesting a stronger oxidative stress and activation of antioxidant defences of glass eels, particularly those with low migration potential (non-migrant). In addition, the wild study showed a higher energy demand for non-migrating glass eels causing an increase in mitochondrial function which may lead to higher oxidative stress.

**Titre:** Impact du méthylmercure sur le potentiel de migration, le statut énergétique et les mécanismes de détoxification chez la civelle d'anguille européenne (*Anguilla anguilla*): Etudes *in situ* et expérimentale

**Mots-clés:** *Anguilla anguilla*, méthylmercure, civelle, potentiel de migration

Au cours des trois dernières décennies, une chute des captures de civelles d'anguille européenne, (*Anguilla anguilla*) a conduit à une diminution du nombre d'anguille jaune dans les bassins versants. En 2007, le règlement (CE) instaure que 60% des civelles pêchées (<12 cm de long) doivent être dédiés à des opérations de repeuplement. Cependant, pour migrer et coloniser un nouvel environnement, les civelles doivent avoir une bonne condition énergétique. Or, les civelles ne s'alimentent pas ou peu durant leur migration estuarienne et la vitesse d'utilisation de leurs réserves dépend de divers facteurs (température, contaminants etc.). Dans l'estuaire de l'Adour, différents travaux ont mis en évidence de fortes concentrations en méthylmercure (MeHg) dans les sédiments et une bioaccumulation de ce composé chez l'anguille jaune. L'exposition au MeHg entraîne la mise en place de processus de détoxification qui pourraient être coûteux en énergie ce qui, chez des organismes jeûnant comme les civelles, conduirait à une perte de poids pouvant affecter leurs capacités de migration. Pour étudier l'impact du méthylmercure sur le potentiel de migration des civelles, nous avons tout d'abord (1) effectuer un état des lieux des concentrations en MeHg des civelles de l'estuaire de l'Adour, (2) évaluer l'effet du MeHg sur deux synchroniseurs de la migration estuarienne: le signal crépusculaire et l'alternance des marées chez les civelles grâce à l'utilisation de traceurs isotopiques et (3) étudier dans le milieu naturel (Adour) le comportement de migration, les taux de contamination au mercure et les mécanismes de détoxification des civelles. Nos résultats montrent des fluctuations temporelles et saisonnières de la concentration en MeHg des civelles prélevées en entrée et en milieu de l'estuaire. Par ailleurs, l'exposition au MeHg, en milieu contrôlé, a augmenté l'activité des civelles mais pas leur comportement de migration. Cependant, suite à la contamination, la structure mitochondriale et le métabolisme ont été modifiés suggérant un plus fort stress oxydant et une activation des défenses antioxydantes notamment des civelles ayant un faible potentiel de migration (non migrantes). En complément, l'étude en milieu naturel a mis en évidence une plus forte demande énergétique pour les civelles non migrantes entraînant une augmentation du fonctionnement des mitochondries et pouvant conduire à un plus fort stress oxydant.

**Laboratoire de rattachement:** UMR Ecobiop/UMR 1224 ECOBIOP -INRA/UPPA-/Aquapôle - Quartier Ibarron / 64310 Saint-Pée sur Nivelle